

Universität Kassel
Fachbereich 10 Mathematik und Naturwissenschaften
Fachgebiet Ökologie

Dissertation

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktorin der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Schadenserhebung, Kartierung und Charakterisierung des „*Diplodia*-
Triebsterbens“ der Kiefer, insbesondere des endophytischen
Vorkommens in den klimasensiblen Räumen und Identifikation von den
in Kiefer (*Pinus sylvestris*) vorkommenden Endophyten

In Kooperation mit der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt

vorgelegt von:
Johanna Bußkamp
Tag der Disputation: 4.07.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Ewald Langer
2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Gailing

Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Personen und Institutionen herzlich bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Prof. Dr. Ewald Langer für die Betreuung der Doktorarbeit

Prof. Dr. Oliver Gailing für die Übernahme des Koreferats

das **Team des Fachbereichs Ökologie** der Universität Kassel, insbesondere bei **Ulrike Frieling** und **Sylvia Heinemann** für die Laborarbeiten und bei **Janett Riebesehl** für die Hilfestellung beim Einstellen der genetischen Sequenzen

Dr. Gitta Langer für die intensive inhaltliche Begleitung der Doktorarbeit und Hilfestellungen

Dr. Ulrich Bressemer für die freundliche Unterstützung der Arbeit

Annette Ihlemann für die Laborarbeiten, Recherchen, den großen Einsatz, Unterstützung und Ermutigungen in allen Lagen

Peter Gawehn für die Außenaufnahmen, viele Ideen zur Umsetzung der praktischen Arbeiten, 1000 ende gefahrene Kilometer, weitergegebene Erfahrungen

Markus Pfeffer für die Außenaufnahmen in Letzlingen und Pfungstadt

Christine Weinert, Kerstin Herwig, Hanna Judaschke und **Martina Hille** für Laborarbeiten

Dr. Michael Habermann, Leiter der Abteilung Waldschutz, für die wohlwollende Unterstützung der Arbeit

Abteilung Waldschutz der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt für die Bereitstellung von Daten und die Unterstützung

Den beteiligten Förstern

Dr. Paul Heydeck vom LFE für Zusendung von Kiefernmaterial mit *Truncatella conorum-piceae* und Hilfe beim Auswählen von Untersuchungsbeständen in Brandenburg

Waldklimafonds für die finanzielle Unterstützung des WAHYKLAS-Projekt (Förderkennzeichen 28W-C-4-031) und den **Projektpartnern** des Projekts: Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg, Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (LWF), Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde (LFE), Thüringen Forst – AöR, Service- und Kompetenzzentrum Gotha, Potsdam Institut für Klimafolgenforschung (PIK) für die Bereitstellung von Daten und die gemeinsamen Probenahmen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 <i>Diplodia</i> -Triebsterben.....	1
1.1.1 Der Erreger - <i>Sphaeropsis sapinea</i>	1
1.1.2 Symptome des <i>Diplodia</i> -Triebsterbens.....	5
1.2 <i>Pinus sylvestris</i>	10
1.3 Schaderreger an <i>Pinus sylvestris</i>	12
1.3.1 Kiefern-Mistel.....	12
1.3.2 Wurzelschwamm	13
1.3.3 Sonstige Schaderreger	14
1.4 Endophyten.....	17
1.4.1 Diversität und Ordination	22
1.5 Ziele der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Untersuchte Kiefernbestände.....	24
2.1.1 Beprobungen von Kiefernbeständen	25
2.1.2 Systematische Beprobung von Kiefernbeständen.....	27
2.1.3 Monatliche Probennahme einer Kiefer	29
2.1.4 Zusätzliche Versuche mit Kiefernzweigen	30
2.2 Erhebung des Wurzelschwammvorkommens	30
2.3 Erfassung des Mistelvorkommens an Kiefern	32
2.4 Isolation von Endophyten.....	32

2.4.1 Versuche zum Einfluss der Isolationsmethode	36
2.5 Identifizierung der Pilzkulturen	41
2.5.1 Einordnung nach Morphotypen.....	41
2.5.2 DNA-Analyse	42
2.5.3 Kulturversuche zur Bestimmung der isolierten Endophyten	44
2.6 Untersuchungen zu ausgewählten Endophyten.....	51
2.6.1 Temperaturversuche	51
2.6.2 VC-Test mit verschiedenen <i>S. sapinea</i> -Stämmen	53
2.6.3 Antagonistentests mit <i>S. sapinea</i> und Endophyten	54
2.7 Datenanalyse	58
3. Ergebnisse	59
3.1 Schadenskartierung	59
3.2 Isolierte und identifizierte Endophyten und Schaderreger	73
3.2.1 Einfluss der Isolationsmethode auf die Diversität der Endophyten.....	85
3.2.2 Analyse der Endophytendiversität in Abhängigkeit von verschiedenen Methoden	92
3.2.3 Bewertung der Endophyten hinsichtlich Pathogenität und ökologischer Bedeutung	103
3.3 Untersuchungen zu ausgewählten Endophyten.....	116
3.3.1 Temperaturversuche	116
3.3.2 VC-Test	119
3.3.3 Antagonistentests	119
4. Diskussion	125
4.1. Auslösende Faktoren für ein <i>Diplodia</i> -Triebsterben	125
4.2. Einfluss der Methode auf die Isolation von Endophyten.....	137
4.3 Isolierte Endophyten	145
4.4 Untersuchungen zu ausgewählten Endophyten.....	163

4.4.1 Temperaturversuche	163
4.4.2 VC-Test	165
4.4.3 Potentielle Antagonisten	166
4.5 Ausblick.....	171
5. Zusammenfassung.....	172
6. Literatur	174
7. Anhang	200
Index fungorum	200
Abkürzungsverzeichnis	203
Digitaler Anhang	204

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pyknidien von <i>S. sapinea</i> auf Kiefernzweigen	2
Abbildung 2: Makro- und mikroskopische Ansichten von <i>S. sapinea</i>	5
Abbildung 3: Verbreitung des <i>Diplodia</i> -Triebsterbens weltweit.....	6
Abbildung 4: Symptome des <i>Diplodia</i> -Triebsterbens.....	7
Abbildung 5: Kiefern auf verschiedenen Standorten.....	11
Abbildung 6: Natürliches Verbreitungsgebiet von <i>P. sylvestris</i>	11
Abbildung 7: Das natürliche, zonale Verbreitungsgebiet von <i>P. sylvestris</i>	13
Abbildung 8: Wurzelschwamm-Fruchtkörper an einem Kiefernstubben	14
Abbildung 9: Kiefern nach einem Fraß der Kiefernbuschhornblattwespe	15
Abbildung 10: Untersuchte Probeflächen mit <i>P. sylvestris</i>	24
Abbildung 11: Untersuchte Probeflächen entlang des Transekts	28
Abbildung 12: Kiefernstubben mit Fruchtkörpern von <i>H. annosum</i>	30
Abbildung 13: Mikroskopische Ansichten von <i>Spiniger meineckellus</i>	31
Abbildung 14: Entnadelter Kieferntrieb	33
Abbildung 15: Isolation von Endophyten auf MYP-Medium	34
Abbildung 16: Kiefernzweig für den Versuch zur Lokalisierung der Endophyten.....	40
Abbildung 17: Verwendetes PCR-Programm	44
Abbildung 18: Kiefernzweige in der feuchten Kammer.	51
Abbildung 19: VC-Test mit 12 <i>S. sapinea</i> -Stämmen	54
Abbildung 20: Wuchsverhalten der Pilzkulturen im Antagonistentest.....	55
Abbildung 21: Test zur Hypheninterferenz.....	57
Abbildung 22: Endophytisches Vorkommen von <i>S. sapinea</i>	60
Abbildung 23: Kartierung der Fruchtkörper des Wurzelschwamms	61
Abbildung 24: Kartierung des Mistelvorkommens an der Waldkiefer.....	62
Abbildung 25: Kartierung der Wurzelschwamm-Fruchtkörper	66
Abbildung 26: Lage der kartierten Stubben und der Wurzelschwamm-Fruchtkörper	66
Abbildung 27: Mistelvorkommen auf der Untersuchungsfläche Bürstadt.....	67
Abbildung 28: Niederschlagsmengen pro Monat für Lampertheim	68
Abbildung 29: Durchschnittliche monatliche Temperatur für Mannheim	69
Abbildung 30: Tagesmaximal-Temperatur der Wetterstation in Mannheim	69
Abbildung 31: Tagesminimal-Temperatur für die Wetterstation in Mannheim	69
Abbildung 32: Venn-Diagramm zum Vorkommen der OTUs	70

Abbildung 33: Vorkommen der OTUs dargestellt im Venn-Diagramm.....	71
Abbildung 34: Grafische Darstellung der Beratungsfälle	72
Abbildung 35: Kartografische Darstellung der Beratungsfälle.....	73
Abbildung 36: Vielfalt der Endophyten.....	75
Abbildung 37: Konidien von OTU11 (<i>Truncatella conorum-piceae</i>).....	78
Abbildung 38: Reinkultur von OTU11 auf Kiefernadelagar	78
Abbildung 39: Längen und Breiten der Konidiosporen von <i>Truncatella</i> -Stämmen....	80
Abbildung 40: Abklatsch eines Kiefernzweiges	85
Abbildung 41: Anteil der verschiedenen Klassen an der absoluten Häufigkeit	92
Abbildung 42: Anteil der verschiedenen Ordnungen an der absoluten Häufigkeit....	93
Abbildung 43: Venn-Diagramm des Vorkommens der OTUs in Kiefernzweigen	94
Abbildung 44: Relative Häufigkeiten ausgewählter OTUs in Triebsegmenten.....	94
Abbildung 45: Gerundete relative Häufigkeit der OTUs in Prozent.....	97
Abbildung 46: Endophytisches Vorkommen von <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	98
Abbildung 47: CA-Korrespondenzanalyse mit ausgewählten OTUs.....	99
Abbildung 48: DCA-Korrespondenzanalyse mit ausgewählten OTUs	99
Abbildung 49: Kanonische Korrespondenzanalyse mit ausgewählten OTUs	100
Abbildung 50: Relative Häufigkeit der Isolation von <i>S. polyspora</i> und <i>M. olivacea</i> .	101
Abbildung 51: Alter der untersuchten Triebsegmente von Kiefer.....	102
Abbildung 52: Morphologie der im Temperaturversuch verwendeten Kulturen	117
Abbildung 53: Verschiedene Wuchsformen von <i>M. olivacea</i>	118
Abbildung 54: Wachstumsgeschwindigkeit von <i>S. sapinea</i>	118
Abbildung 55: Wachstumsgeschwindigkeit von <i>S. polyspora</i>	119
Abbildung 56: Verschiedene Dualkulturen im Antagonistentest	120
Abbildung 57: Kontaktlose Hemmung im Antagonistentest	121
Abbildung 58: Antagonistentest, Überwachsen von <i>S. sapinea</i>	121
Abbildung 59: Hypheninterferenz von <i>S. sapinea</i>	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Diplodia</i> -Schadensfälle an Kiefer	8
Tabelle 2: Übersicht über die Untersuchungsflächen	25
Tabelle 3: Übersicht über forstliche Kenngrößen und Standortmerkmale	26
Tabelle 4: Schadstufen für Symptome des <i>Diplodia</i> -Triebsterbens	28
Tabelle 5: Auf den Untersuchungsflächen erhobene Daten	29
Tabelle 6: Schadstufen für das Vorkommen der Kiefernmitel	32
Tabelle 7: Verschiedene Varianten der Oberflächensterilisierung	38
Tabelle 8: Versuchsreihen mit verschiedenen Segmentlängen	39
Tabelle 9: PCR-Ansatz	43
Tabelle 10: Primer für die ITS und LSU-Region	44
Tabelle 11: Vergleichskulturen von CBS und DSMZ	45
Tabelle 12: Wachstumsbedingungen zur Identifizierung der Endophyten	46
Tabelle 13: Für die Temperaturuntersuchungen verwendete Isolate	52
Tabelle 14: Gemessene Temperaturen der verwendeten Thermoschränke	53
Tabelle 15: Endophytischer Nachweis von <i>S. sapinea</i>	60
Tabelle 16: Ergebnis der Aufnahme von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms	65
Tabelle 17: Ergebnis der Kartierung von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms	65
Tabelle 18: Ergebnisse bezüglich endophytischer Besiedlung	68
Tabelle 19: Übersicht über alle untersuchten Proben	75
Tabelle 20: Isolierte Pilze aus Triebsegmenten von Kiefernzweigen	76
Tabelle 21: Verwendete Stämme der Gattung <i>Truncatella</i>	79
Tabelle 22: Ergebnis der Sporenmessung	79
Tabelle 23: 90 isolierte Pilze aus Kieferntrieben	81
Tabelle 24: Ergebnisse des Abklatsches	86
Tabelle 25: Erfolgskontrolle der Oberflächensterilisierung V15 (Versuch 3)	87
Tabelle 26: Erfolgskontrolle der Oberflächensterilisierung V15 (Versuch 4)	88
Tabelle 27: Isolierte OTUs nach unterschiedlichen Lagerungszeiten	89
Tabelle 28: Isolierte OTUs aus unterschiedlich langen Triebsegmenten	90
Tabelle 29: Versuch zur Lokalisierung der Endophyten	91
Tabelle 30: Ergebnisse zum endophytischen Vorkommen von <i>S. sapinea</i>	96
Tabelle 31: Ergebnis der Isolation von Endophyten im Jahresverlauf	101
Tabelle 32: Vorkommen der Endophyten nach Alter der Triebsegmente	103
Tabelle 33: Übersicht über publizierte Arbeiten zu den Endophyten	104

Tabelle 34: Übersicht der wissenschaftlichen Arbeiten zu Endophyten.....	105
Tabelle 35: Bisher bekannte Endophyten aus <i>P. sylvestris</i> und <i>Pinus</i> spp.	106
Tabelle 36: Erstmalig endophytisch isolierte Pilzarten.....	110
Tabelle 37: Ökologische Eingruppierung der isolierten Endophyten	111
Tabelle 38: Ergebnis des Temperaturversuchs von verschiedenen Pilzstämmen..	117
Tabelle 39: Verschiedene Formen der Hemmung von <i>S. sapinea</i>	120
Tabelle 40: Antagonistentest nach der Zellophan-Methode.....	123

1. Einleitung

1.1 *Diplodia*-Triebsterben

Das *Diplodia*-Triebsterben der Kiefer wird durch den Schlauchpilz *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) DYKO & B. SUTTON (Abbildung 1 und Abbildung 2) ausgelöst und verursacht weltweit Schäden an Arten der Gattungen *Pinus* L. (Burgess et al. 2004b; CABI 2014).

In Mitteleuropa trat *S. sapinea* erst seit den 1980er Jahren als Krankheitserreger in Erscheinung. In den Niederlanden wurden erstmals Symptome an *Pinus nigra* J.F. ARNOLD und *Pinus sylvestris* L. beobachtet (Swart und Wingfield 1991). Doch wurde der Pilz bereits 1908 als Erreger für ein Triebsterben bei *Pinus radiata* D. DON in Südafrika beschrieben (Swart und Wingfield 1991). In Deutschland wurde *S. sapinea* als Erreger des *Diplodia*-Triebsterbens an *P. nigra* und *P. sylvestris* seit Mitte der 1990er Jahre beobachtet (Heydeck und Dahms 2012).

1.1.1 Der Erreger - *Sphaeropsis sapinea*

Sphaeropsis sapinea (FR.) DYKO & B. SUTTON, in Sutton, The Coelomycetes (Kew): 120 (1980)

Basionym: *Sphaeria sapinea* Fr., Syst. mycol. (Lundae) 2(2): 491 (1823)

Synonyme laut INDEX FUNGORUM (abgerufen am 27.10.2016)

Botryodiplodia pinea (Desm.) Petr., Annls mycol. 20(5/6): 308 (1922)

Coniothyrium pinastri (Lév.) Tassi, Bulletin Labor. Orto Bot. de R. Univ. Siena 5: 25 (1902)
Diplodia conigena Desm., Annls Sci. Nat., Bot., sér. 3 6: 69 (1846)

Diplodia pinastri Grove, J. Bot., Lond. 54: 193 (1916)

Diplodia pinastri (Lév.) Desm., Annls Sci. Nat., Bot., sér. 3 11(2): 281 (1849)

Diplodia pinea (Desm.) J. Kickx f., Fl. Crypt. Flandres (Paris) 1: 397 (1867)

Diplodia sapinea (Fr.) Fuckel, Jb. nassau. Ver. Naturk. 23-24: 393 (1870) [1869-70]

Diplodia sapinea var. lignicola Sacc., Syll. fung. (Abellini) 3: 356 (1884)

Diplodia sapinea var. pinsapo Brunaud, Act. Soc. linn. Bordeaux 40: 2 [repr.] (1886)

Diplodia sapinea (Fr.) Fuckel, Jb. nassau. Ver. Naturk. 23-24: 393 (1870) [1869-70]
var. *sapinea*

Granulodiplodia pinea (Desm.) Zambett., Bull. trimest. Soc. mycol. Fr. 70(3): 331 (1955) [1954]

Granulodiplodia sapinea (Fr.) Zambett., Bull. trimest. Soc. mycol. Fr. 70(3): 331 (1955) [1954]

Macrophoma pinea (Desm.) Petr. & Syd., Feddes Repert., Beih. 42: 116 (1926)
Macrophoma pinea (Desm.) Petr. & Syd., Feddes Repert., Beih. 42: 116 (1926) var. *pinea*
Macrophoma sapinea (Fr.) Petr., Sydowia 15(1-6): 311 (1962) [1961]
Macroplodia ellisii (Sacc.) Kuntze, Revis. gen. pl. (Leipzig) 3(2): 492 (1898)
Macroplodia pinastri (Lév.) Kuntze, Revis. gen. pl. (Leipzig) 3(2): 492 (1898)
Phoma pinastri Lév., Anns Sci. Nat., Bot., sér. 3 5: 282 (1846)
Sphaeria pinea Desm., Anns Sci. Nat., Bot., sér. 2 15: 14 (1842)
Sphaeropsis ellisii Sacc., Syll. fung. (Abellini) 3: 300 (1884)
Sphaeropsis ellisii var. *abietis* Fautrey
Sphaeropsis ellisii var. *chromogena* Goid., Boll. R. Staz. Patalog. Veget. Roma, N.S. 15(3): 458 (1935)
Sphaeropsis ellisii Sacc., Syll. fung. (Abellini) 3: 300 (1884) var. *ellisii*
Sphaeropsis ellisii var. *laricis* Peck, Ann. Rep. Reg. N.Y. St. Mus. 44: 135 (1891)
Sphaeropsis pinastri (Lév.) Sacc., Syll. fung. (Abellini) 3: 300 (1884)
Sphaeropsis pinastri Cooke & Ellis, Grevillea 7(no. 41): 5 (1878)

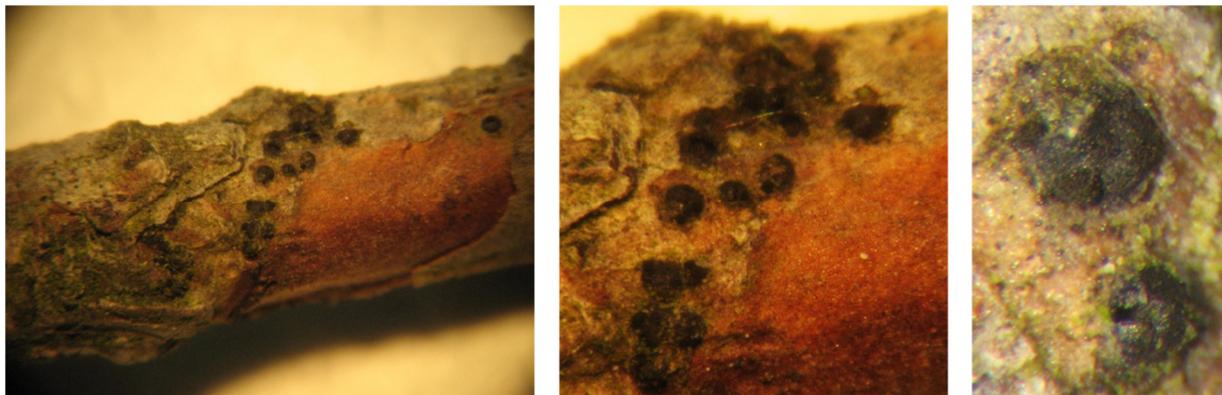


Abbildung 1: Pyknidien von *S. sapinea* auf Kiefernzweigen.

Viele Jahre war der Pilz unter dem Namen *Diplodia pinea* (DESM.) KICKX. bekannt, welcher ein Synonym des Basionyms, des ältesten (ersten) gültigen wissenschaftlichen Namens *Sphaeria sapinea* Fr. ist. Letzteres wurde später von Sutton und Dyko (1989) zu *Sphaeropsis sapinea* (FR.) DYKO & SUTTON neu kombiniert. Beschrieben wurde *S. sapinea* erstmals als *Sphaeria sapinea* FR. (1823) als Saprophyt an Kiefer (*Pinus* sp. L.) und Tanne (*Abies* sp. MILL., Fries 1821) in Südschweden von Elias Magnus Fries im 19ten Jahrhundert. Da die Exsikkatensammlung von Fries (*Scleromyceti Sueciae Exsiccati* no. 126. *Sphaeria sapinea* FRIES) teilweise in einem sehr schlechtem Zustand war, wurde von Sutton und

Dyko (1989) ein Lectotyp aus dem Exsikkatenwerk von Fries ausgewählt. Dieser befindet sich in dem Herbarium Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Zentraleinrichtung der Freien Universität Berlin. Weitere Isotypen finden sich in den Herbarien G, K, E, UPS, C, BR, FH. Von Phillips et al. (2013) wurde ein Epityp gewählt, der in der CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) Sammlung unter den Nummern CBS H-18340; MBT176178 (culture ex-epitype CBS 393.84) zu finden ist. Das Material für den Epityp wurde in den Niederlanden (Gelderland, Schovenhorst, Putten) in einem Pinetum auf Zapfen von *Pinus nigra* im Juni 1984 von H. A. van der Aa gesammelt.

S. sapinea wird der Familie der Botryosphaeriaceae und der Ordnung der Botryosphaerales zugeordnet (INDEX FUNGORUM). *S. sapinea* bildet auf geeignetem Pflanzengewebe schwarze Pyknidien mit einem Durchmesser von rund 250 µm (Abbildung 1 und Abbildung 2). Diese finden sich meist zu vielen, aber auch einzeln eingebettet in der Rinde des Wirtsbaumes. Die Konidien sind ovoid und an den Enden abgerundet, zuerst sind sie hyalin, später gelb bis dunkelbraun gefärbt und einfach septiert (Abbildung 2). Sie messen 30-55 × 11-18 µm (Sutton und Dyko 1989). Eine Hauptfruchtform (Teleomorph) ist bisher nicht bekannt. Genetische Analysen von Bihon et al. (2014) lassen vermuten, dass *S. sapinea* einen heterothallischen Fortpflanzungsmechanismus hat.

Das latente / endophytische Vorkommen von *S. sapinea* in Kiefernzweigen wurde weltweit bestätigt (Flowers et al. 2001; Stanosz et al. 2001; Langer et al. 2011; Bihon et al. 2012; Luchi et al. 2014). Weiterhin kommt *S. sapinea* auch saprophytisch auf Zapfen und abgestorbenem Holz vor (Swart und Wingfield 1991; Santini et al. 2008). *S. sapinea* gilt als ein wärmeliebender Schwächeopportunist und benötigt, um seinen Wirt zu schädigen, prädisponierende Stressfaktoren, wie zum Beispiel Wassermangel der Wirtsbäume (Swart und Wingfield 1991; Blodgett et al. 1997; Stanosz et al. 2001; Luchi et al. 2014). Deshalb sind Schäden, die durch *S. sapinea* ausgelöst werden, oft mit extremen Wetterereignissen verbunden, z. B. wiederholten Trockenperioden, gefolgt von kalten Wintern (Gonthier und Nicolotti 2013).

In der Vergangenheit wurde angenommen, dass Pilze aus der Familie der *Botryosphaeriaceae* ihren Wirt über Wunden infizieren. Heute ist bekannt, dass sie auch via Lentizellen, Stomata und andere Öffnungen in die Pflanze eindringen können (Michailides 1991; Slippers und Wingfield 2007). Es werden verschiedene Wege des

Eintritts von *S. sapinea* in die Pflanze diskutiert: via Stomata, über die Nadelbasis oder via nichtlignifizierter Triebteile (Waterman 1943; Brookhouser und Peterson 1971; Chou 1978; Rees und Webber 1988; Flowers et al. 2006).

Bis heute ist der geographische Ursprung bzw. die ursprüngliche Verbreitung von *S. sapinea* nicht bekannt (CABI 2014). In einer Studie zu nicht autochthonen Pilzarten in Frankreich von Desprez-Loustau et al. (2009) wird *S. sapinea* als kryptogenetisch eingestuft. Als kryptogenetisch definierten Desprez-Loustau et al. (2009) Arten mit unsicherem Ursprung, die aber verdächtigt werden, allochthonen Ursprungs zu sein. Auch im „Handbook of alien species in Europe“ wird *S. sapinea* als kryptogenetisch eingestuft (Desprez-Loustau 2009). *S. sapinea* könnte auch autochthon in Europa vorkommen, aber in den letzten Jahren sein Verhalten verändert haben, vom endophytischen zum pathogenen Pilz (Desprez-Loustau et al. 2009).

Eine nahverwandte Art, die früher als conspezifisch mit *S. sapinea* aufgefasst wurde, *Diplodia scrobiculata* J. DE WET, SLIPPERS & M.J. WINGF. ist in Nordamerika heimisch. In Europa wurde *D. scrobiculata* bisher nur vereinzelt in Frankreich und Italien nachgewiesen (Stanosz et al. 1999; Burgess et al. 2004a, 2004b; Linaldeddu et al. 2010). Die beiden nah verwandten Arten *S. sapinea* und *D. scrobiculata* können in Kultur unterschieden werden: Die Kultur von *D. scrobiculata* entwickelt ein dunkles Myzel, das an den Agar gepresst wächst. *S. sapinea* bildet hingegen ein leichtes und luftiges Myzel (Wet et al. 2003).

Bihon et al. (2012) haben die genetische Diversität von *S. sapinea* untersucht. Dazu führten sie sogenannte VC-Tests (engl. vegetative Compatibility \triangleq vegetative Kompatibilität) durch. Der VC-Test beruht auf dem „Verschmelzen“ bzw. der Barragebildung zweier Pilzstämmen in Reinkultur (Anagnostakis 1988). Pilzstämmen aus unterschiedlichen Kompatibilitätsgruppen bilden in der Kontaktzone eine Trennlinie, die „Barrage“ genannt wird. In der Kontaktzone entsteht eine Barrage mit letalen Anastomosen (Myzelverwachsungen). Die Bestimmung der VC-Gruppe ist im Vergleich zu Mikrosatelliten Markern eine einfache und kostengünstige Methode um genetische Diversität von Pilzen zu evaluieren (Milgroom und Cortesi 1999; Burgess et al. 2009).

1.1.2 Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens

Es ist bekannt, dass Arten der Gattung *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Thuja*, *Juniperus*, *Pseudotsuga* und 33 *Pinus*-Arten durch *S. sapinea* besiedelt werden können (Palmer et al. 1987; Flowers et al. 2006; Phillips et al. 2013). In Europa zeigen sich Schadsymptome typischerweise an *P. sylvestris* und *P. nigra*, daneben tritt der Pilz auch auf anderen Koniferen wie *Pseudotsuga* sp., *Abies* sp., *Picea* sp. und *Larix* sp. auf (Sinclair und Lyon 2005, CABI 2014).

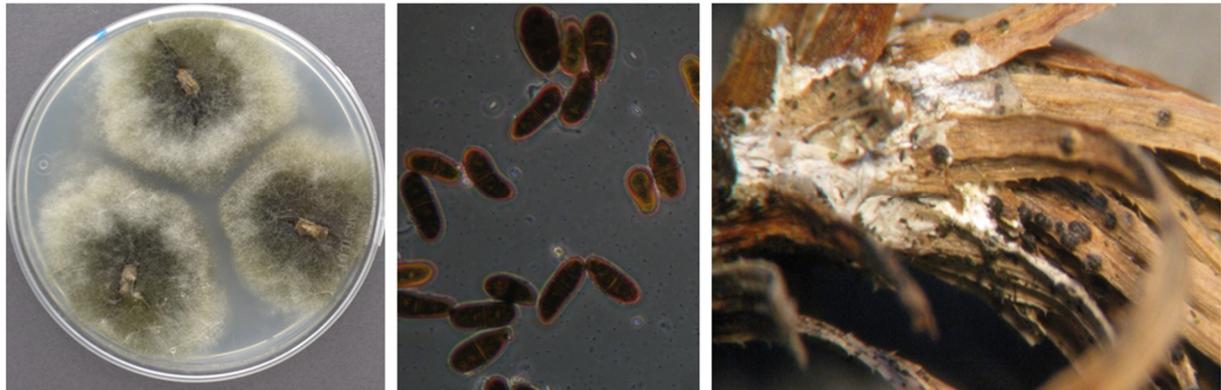


Abbildung 2: Makro- und mikroskopische Ansichten von *S. sapinea*: auf MYP-Medium auswachsend aus Kieferntriebsegmenten, Konidien (Vergrößerung 1000-fach) und Fruchtkörper von *S. sapinea* auf *P. sylvestris* (von links nach rechts).

Die ersten Ausbrüche des *Diplodia*-Triebsterbens der Kiefer wurden in Südafrika an *Pinus radiata* und *Pinus mugo* TURRA 1909 und 1911 beobachtet (Swart und Wingfield 1991). Die größten Schäden durch die Erkrankung wurden bisher in Plantagen mit gebietsfremden Kiefernarten in Nordamerika verzeichnet (Harrington und Wingfield 1998). Auch in Südafrika hat *S. sapinea* große wirtschaftliche Schäden angerichtet (Crous et al. 1990). Nach Slippers und Wingfield (2007) ist das *Diplodia*-Triebsterben eine der ökonomisch bedeutendsten Erkrankungen von Kiefernplantagen in der Südhemisphäre (Abbildung 3).

Die Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens äußern sich in einer Verbraunung und einem Harzfluss der Triebe, die zu einem Kronensterben führen können. Weiterhin sind Rindenschäden, Blauverfärbungen im Holz, Rindennekrosen, Wurzelfäule, Stammfäule bei Sämlingen und Wipfeldürre bis hin zum Absterben des Baumes typische Anzeichen der Erkrankung (Chou 1976, 1987; Zwolinski et al. 1990a und b; Swart und Wingfield 1991; Kreber et al. 2001; Stanosz et al. 2005; Langer et al. 2011). *S. sapinea* kann alle Altersklassen, von jungen Pflanzen bis hin zu hundertjährigen Bäumen, schädigen (Langer et al. 2011).

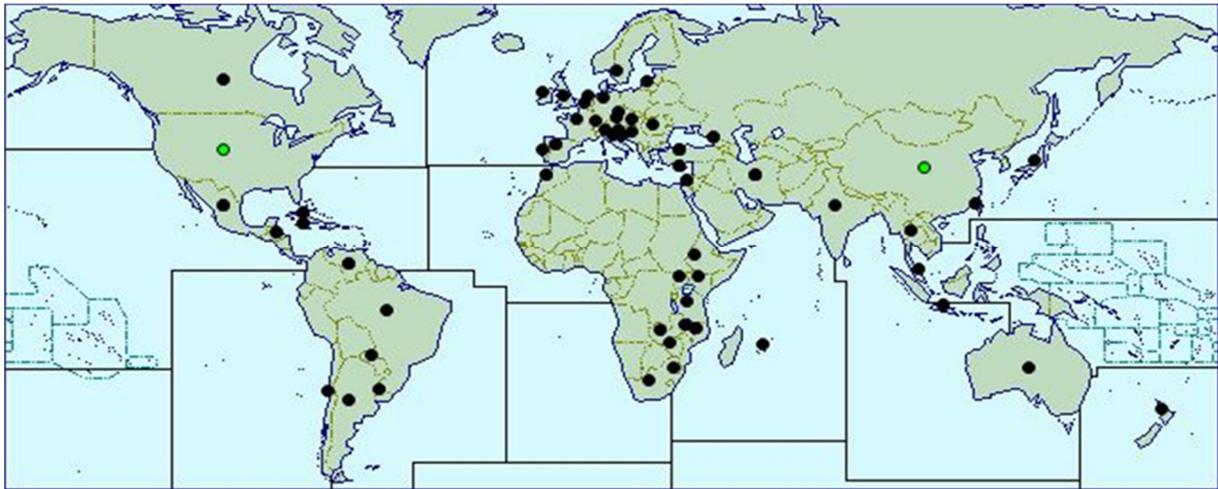


Abbildung 3: Verbreitung des *Diplodia*-Triebsterbens weltweit, jeder Punkt (grün / schwarz) steht für ein Vorkommen im jeweiligen Land (www.cabi.org).

In warmen und trockenen Sommern kann *S. sapinea* in gestressten Bäumen pathogen werden. Oft wird junges, sich im Wachstum befindliches Gewebe (Triebspitzen) befallen (Brookhouser und Peterson 1971). Feuchte Witterungsbedingungen während des Triebwachstums können die Infektionsbedingungen verbessern (Langer et al. 2011). Auch Verletzungen durch Hagelschlag und Insekten sind Eintrittspforten für den Pilz (Swart und Wingfield 1991). Unter trockenen Witterungsbedingungen wurde eine höhere Anfälligkeit der Wirtsbäume gegenüber pilzlichen Pathogenen beobachtet (Mattson und Haack 1987). Bei der Kiefer ist eine unzureichende Wasserversorgung der wichtigste Faktor für eine Verringerung der Vitalität (Rigling und Cherubini 1999; Dobbertin et al. 2005b; Bigler et al. 2006). Weiterhin steigt bei mangelnder Wasserversorgung der Kiefer die Vulnerabilität gegenüber der Mistel (Dobbertin und Rigling 2006).

Seit einigen Jahren treten verstärkt *Diplodia*-Schadensfälle in den Kiefernbeständen Sachsen-Anhalts, Niedersachsens und Hessens auf (Habermann et al. 2015). Auch in anderen Bundesländern wurden Schäden durch *S. sapinea* beobachtet (Tabelle 1). Begünstigt wurde die Erkrankung dort oftmals durch Vitalitätsverluste z. B. aufgrund von Trockenheit und Hitze und / oder durch Vorschädigungen durch Insektenfraß an Nadeln oder Hagelschlag (Habermann et al. 2015).



Abbildung 4: Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens und starker Befall mit Mistel, in Letzlingen (links) und Süd-Hessen (rechts).

Für die Verbreitung von phytopathogenen Krankheiten weltweit spielt die Einführung gebietsfremder Arten eine wichtige Rolle (Ramsfield et al. 2016), das zeigt sich z. B. am Erreger des Eschentriebsterbens *Hymenoscyphus fraxineus* (T. KOWALSKI) BARAL, QUELOZ & HOSOYA (Desprez-Loustau 2009). Phytopathogene Krankheiten könnten ebenfalls durch den Klimawandel zunehmen, da veränderte Umweltbedingungen ihre Verbreitung begünstigen und / oder ihre Virulenz erhöhen könnte (Garrett et al. 2006). Der Klimawandel beeinflusst entweder direkt die Wirt-Pathogen-Beziehung durch Veränderungen des Pathogenes oder indirekt durch physiologische Veränderungen im Wirt und der Resistenzfähigkeit (Fabre et al. 2011). Der direkte Einfluss kann eine erhöhte Verbreitung des Pathogens durch geeignetere klimatische Reproduktionsbedingungen, wie z. B. mildere Winter, mit sich bringen. Laut Fabre et al. (2011) ist es sehr schwer, direkte und indirekte Faktoren zu trennen. Der Einfluss des Klimawandels auf Pathogene ist bis heute wenig untersucht.

Schumacher (2012) stellte in Infektionsversuchen mit Waldkiefer-Sämlingen eine umso größere Anfälligkeit gegenüber *S. sapinea* fest, umso rauer die Klimabedingungen am Herkunftsstandort und je geringer die Wüchsigkeit der Pflanze waren. Er nimmt daher an, dass schwachwüchsigen Pflanzen weniger Energie zur Verfügung steht, um auf Störungen zu reagieren und der wärmeliebende Pilz schon länger in wärmeren Regionen vorkommen könnte. Weiterhin könnten diese Kiefern an

die trockeneren Bedingungen und eventuell auch an das endophytische Vorkommen von *S. sapinea* angepasst sein. Decourcelle et al. (2015) gehen davon aus, dass die zunehmende Bedeutung des *Diplodia*-Triebsterbens mit der Anpflanzung von Plantagen mit empfindlichen Kiefernarten, aber auch mit den sich ändernden Umweltbedingungen zusammenhängt. Ausbrüche der Krankheit gehen meist mit dem Auftreten von Stressfaktoren für die Kiefer einher: Trockenheit, Hagelschäden oder einem Überschuss an Stickstoff (Piou et al. 1991; Stanosz et al. 2001). Auch Veränderungen in der Physiologie des Baumes können zu einer Erkrankung am *Diplodia*-Triebsterben führen (Bachi und Peterson 1985; Blodgett et al. 1997; Stanosz et al. 2001; Desprez-Loustau et al. 2006).

Tabelle 1: *Diplodia*-Schadensfälle an Kiefer im Jahr 2014 in Deutschland, Datengrundlage: AFZ- Der Wald, Ausgabe 7 / 2015; KA = keine Angaben.

Bundesland	Meldung	Ha / Trend
Baden-Württemberg	KA	
Bayern	auffälliges Vorkommen	↑
Saarland	KA	
Rheinland-Pfalz	KA	
Hessen	auffälliges Vorkommen, wirtschaftlich fühlbar	↑
Thüringen	auffälliges Vorkommen	
Sachsen	unbedeutend	270
Nordrhein-Westfalen	wirtschaftlich fühlbar	20
Niedersachsen	wirtschaftlich fühlbar	↑
Sachsen-Anhalt	wirtschaftlich fühlbar	↑
Brandenburg	auffälliges Vorkommen, wirtschaftlich fühlbar	↑
Schleswig-Holstein	KA	
Mecklenburg-Vorpommern	KA	

De Kam (1985) hat drei mögliche Erklärungen für das pathogen werden von *S. sapinea* in Europa: die europäische Population von *Sphaeropsis* wurde durch einen virulenten Spezieskomplex *S. sapinea sensu lato* ausgetauscht (1), durch den Klimawandel (Hagel, Trockenheit, Hitzewellen) ist die Anfälligkeit des Wirtes und die Pathogenität von *S. sapinea* erhöht worden (2) oder eine erhöhte Anfälligkeit des Wirtes liegt vor, die z. B. durch anthropogene Stickstoffdisposition verursacht wurde (3).

Auch Diminić et al. (2012) haben in Kroatien an Schwarzkiefer (*P. nigra*) die Rolle des Stickstoffs untersucht. Dort treten seit 1992 Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens auf. Die Forschergruppe um Diminić et al. (2012) fand heraus, dass sowohl Trockenheit als auch Standortfaktoren zu einer Disposition für das *Diplodia*-Triebsterben beitragen können. Um diese These zu untermauern, untersuchten sie den Ernährungszustand, indem sie den Stickstoff- und Kalium-Gehalt der Nadeln und des Standortes ermittelten. An Standorten, an denen ein unausgeglichenes N / K-Verhältnis herrschte, traten die Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens häufiger auf (Diminić et al. 2012). Brown (1999) beschreibt, dass eine Zunahme an Stickstoff in der Baumernährung bei Laubbäumen zu einem Ungleichgewicht beim Verhältnis von ober- und unterirdischer Biomasse führen kann. Dieser Umstand führt zu erhöhtem Wasserstress, da die Wurzeln den Baum nicht ausreichend mit Wasser versorgen können. Dieser Zusammenhang wurde auch von anderen Forschergruppen bestätigt: De Kam et al. (1991) haben Düngungsversuche im Gewächshaus mit Schwarzkiefer durchgeführt und herausgefunden, dass bei einer ausschließlichen Düngung mit Ammoniumsulfat die Kiefern anfälliger gegenüber *S. sapinea* werden. Dijk et al. (1992) haben Stickstoffgehalte von *Pinus nigra* ssp. *laricio* (POIR.) MAIRE anhand von Nadel- und Bodenproben analysiert und wiesen nach, dass infizierte Schwarzkiefern-Bestände über eine höhere Stickstoffversorgung, vorliegend als freie Aminosäuren, verfügten. Stanosz et al. (2004) untersuchten gedüngte und ungedüngte Plantagen von *Pinus resinosa* AITON (Amerikanische Rot-Kiefer) in Wisconsin auf ihren Ernährungszustand hin. Es stellte sich heraus, dass in Plantagen mit einer höheren Nährstoffversorgung Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens öfter auftraten.

Das vorzeitige Absterben von Waldbäumen ist ein weltweites Phänomen, welches zunehmend beobachtet wird, ursächlich sind komplexe biotische und abiotische Faktoren (Allen et al. 2010; Cohen et al. 2016). Die „Decline-Spirale“ von Manion (1991) beschreibt ein Modell für multifaktoriell bedingte Komplexerkrankungen. Danach gibt es drei Kategorien schadauslösender Faktoren: Prädisponierende (predisposing), auslösende (incitants) und mitwirkende (contributing) Faktoren. Das bedeutet, dass die Mortalität durch ein auslösendes Ereignis an zuvor schon prädisponierten Bäumen verursacht wird, diese geschwächten Bäume sind dann angreifbar für sekundäre Schaderreger, die den Bäumen den „Todesstoß“ geben (Manion 1991). Ist zu viel photosynthetisch aktives Gewebe durch ein Pathogen abgetötet, stirbt der Baum, wenn er nicht genügend Ressourcen hat, um den Schaden

zu reparieren oder noch lebendes Gewebe nicht mehr erhalten kann. Besonders dramatisch ist ein Triebsterben bei Nadelbäumen, da sie besonders viel Kohlenstoff und Nährstoffe in ihren Nadeln speichern (Krause und Raffa 1996). Ein Triebsterben kann also sowohl als prädisponierender und auslösender Faktor wirken, als auch die Abwehrkräfte des Baumes gegenüber anderen Pathogenen herabsetzen (Oliva et al. 2016). Wang et al. (2012) erweiterten das Modell von Manion um positive Faktoren, die es dem Baum ermöglichen, zu regenerieren. Whyte et al. (2016) kritisierten an dem Modell von Manion, dass es sich um eine kontinuierliche Abwärtsspirale handelt und entwickelten das „*Tree Decline Recovery Seesaw*“-Modell, das im Gegensatz zur „Decline-Spirale“ von Manion (1991) Zeiten, in denen sich die Bäume vom Stress erholen können, beinhaltet.

1.2 *Pinus sylvestris*

Die Waldkiefer (*Pinus sylvestris*) ist eine stresstolerante, lichtbedürftige Pionierbaumart, mit einem der größten Verbreitungsgebiete europäischer Baumarten (Abbildung 6; Mason und Alía 2000; Richardson 2000). Die Waldkiefer findet man natürlich oder in Anpflanzungen in ganz Europa. Daher hat sie eine wichtige Bedeutung für die Holzproduktion (Mason und Alía 2000). Da die Kiefer sehr anpassungsfähig und leicht zu verzüngen ist, wurde sie in Deutschland in der Vergangenheit großflächig angebaut (NW-FVA 2008). In Deutschland hat sie einen Anteil von 22 % an der Waldfläche (Thünen-Institut 2014). Ihr Holz wird vielfältig verwendet, z. B. als Konstruktionsholz, früher spielte auch die Harznutzung eine Rolle (NW-FVA 2008). Waldbestände, in denen die Kiefer natürlich als Hauptbaumart auftritt, finden sich im nordostdeutschen Tiefland, auf Extremstandorten z. B. auf sehr armen und trockenen Sandböden oder auf Felsen (Abbildung 5, rechts) und an Moorrändern, da sie auf anderen Standorten gegenüber anderen Baumarten (z. B. der Buche, *Fagus sylvatica* L.) nicht konkurrenzfähig ist (Ellenberg und Leuschner 2010). Prägend in Deutschland sind hingegen forstwirtschaftsbedingt künstliche bzw. sekundäre Kiefernforsten (Landesforstanstalt Eberswalde (2007); Abbildung 5, links).



Abbildung 5: Kiefern auf verschiedenen Standorten, links: Kiefernforst (in Brandenburg) und rechts: Kiefer auf einem Extremstandort (Nationalpark Kellerwald-Edersee).



Abbildung 6: Natürliches Verbreitungsgebiet von *P. sylvestris*, in blau (EUFORGEN 2008).

1.3 Schaderreger an *Pinus sylvestris*

1.3.1 Kiefern-Mistel

Kiefern-Misteln (*Viscum album* subsp. *austriacum* (WIESB.) VOLLM.) sind hemiparasitische Blütenpflanzen aus der Familie der *Viscaceae* (Mistelgewächse, www.floraweb.de), ihre Samen werden von Vögeln verbreitet. Die Samen bilden bei der Keimung auf ihrem Wirt einen Senker, der durch die Rinde in das Holz eindringt. Misteln schwächen ihren Wirt, indem sie einen wesentlichen Teil des Transpirationsstroms des Baumes in die Mistel umleiten (Watson 2001; Zuber 2004). Die Mistel transpiriert über ihre Blätter bedeutende Mengen des aus dem Xylem des Baumes entnommenen Wassers und entzieht dem Xylemwasser zusätzlich Nährstoffe, insbesondere Kohlenhydrate und Aminosäuren (Popp und Richter 1998; Escher et al. 2004a, 2004b). Auch wird die Kronenstruktur durch die Mistel erheblich verändert und somit das photosynthetisch aktive Gewebe reduziert. Kürzere Äste, weniger Verästelungen und weniger Nadelmasse konnten bei mit Misteln infizierten Kiefern beobachtet werden (Rigling et al. 2010). Durch die oben beschriebenen Veränderungen kommt es zu einer Schwächung des Wasser- und Stickstoff-Haushalts der Wirtspflanze (Glatzel und Geils 2009). In trockenen Jahren können die Auswirkungen eines Mistelbefalls zu einer höheren Anfälligkeit der Kiefer gegenüber anderen Schaderregern, z. B. *Diplodia*-Triebsterben, führen.

Die Kiefern-Mistel breitet sich in den letzten Jahren stetig weiter in Deutschland aus und ist dort inzwischen auf großer Fläche vorhanden (Abbildung 7), sie profitiert von steigenden Temperaturen durch den Klimawandel (Dobbertin et al. 2005a). Auf Standorten mit geringer Wasserverfügbarkeit führt die Kiefernmistel zu auffälligen Vitalitätsverlusten (z. B. in der Rhein-Main-Ebene, NW-FVA 2014).

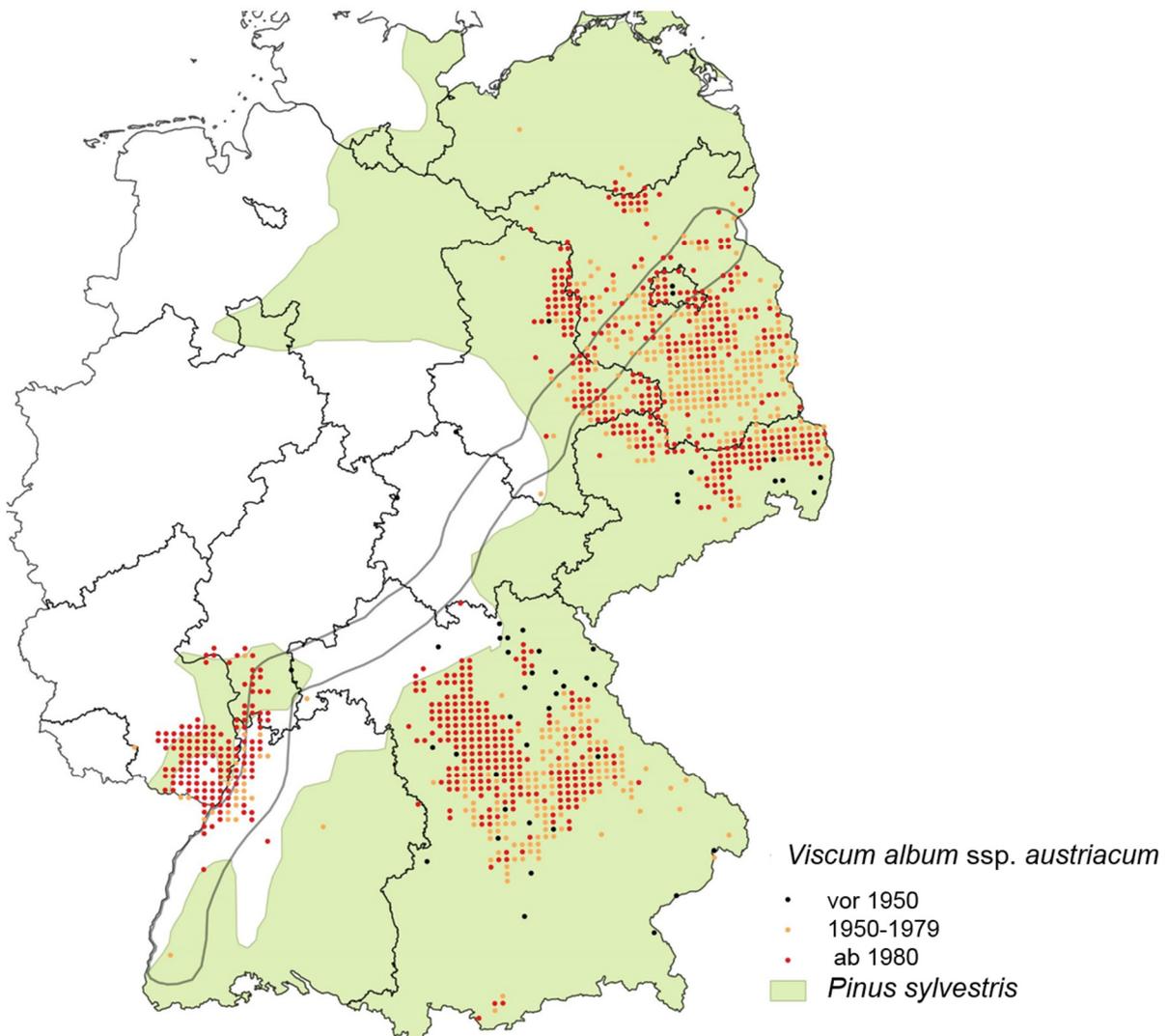


Abbildung 7: Das natürliche, zonale Verbreitungsgebiet von *P. sylvestris* in Deutschland (EUFORGEN 2008) und das Vorkommen der Kiefernmistel (BfN 2016, Stand Oktober 2013) mit WAHYKLAS-Transekt durch klimasensible Regionen; Hintergrund © GeoBasis-DE / BKG 2014.

1.3.2 Wurzelschwamm

Ein weiterer Faktor, der die Vitalität der Kiefer herabsetzen kann, ist der gemeine Wurzelschwamm (*Heterobasidion annosum* (FR.) BREF. s.l.). Der Wurzelschwamm ist einer der schwerwiegendsten Forstpathogene und gilt als die Kiefer schwächender bzw. zum Absterben führender Faktor (Abbildung 8). Es handelt sich um einen bodenbürtigen Basidiomyceten, der bei seinen Wirten eine Weißfäule erzeugt. In Europa kommt der Wurzelschwamm mit drei heimischen Arten mit unterschiedlichen Wirtsspektren vor (Woodward et al. 1998). Der Kiefernwurzelschwamm

(*Heterobasidion annosum* s. str., Abbildung 8 und Abbildung 12) hat das breiteste Spektrum. Er kommt zumeist an Kiefern vor, besiedelt aber auch viele der forstlich relevanten Baumarten Mitteleuropas (Metzler et al. 2013). *H. annosum* s. str. infiziert über die Wurzeln bevorzugt geschwächte Bäume und kann diese zum Absterben bringen, damit steht er am Anfang der Zersetzungskette. In vielen Kiefernbeständen Norddeutschlands sind derzeit geringe Schäden durch den Kiefernwurzelschwamm sichtbar, punktuell treten jedoch mittlere bis starke Schäden auf, die bis zur vollständigen Bestandesauflösung gehen können (Beermann 2011; NW-FVA 2015d). Das latente Vorkommen des Wurzelschwamms in Stammanläufen und Wurzeln in lebenden, augenscheinlich vitalen Kiefern beinhaltet ein ernst zu nehmendes, potenzielles Risiko von zukünftigen Schäden in Kiefernbeständen (NW-FVA 2015d).



Abbildung 8: Wurzelschwamm-Fruktkörper an einem Kiefernstübe (links) und Bestandeslücke im Kiefernbestand verursacht durch den Wurzelschwamm (rechts, Foto: NW-FVA)

1.3.3 Sonstige Schaderreger

Die Kiefer wird aus forstlicher Sicht durch eine Vielzahl von Pathogenen besiedelt. Einerseits ist sie durch zu Massenwechsel fähigen Insekten gefährdet (Schmetterlinge und Blattwespen), andererseits durch pilzliche Schaderreger. Durch die Altersstruktur der Kiefernbestände und ihre standörtlichen Gegebenheiten (Anbauflächen auf trockenen, armen Standorten) ist sie vielerorts prädisponiert für ein Fraßgeschehen durch die im Folgenden aufgelisteten Insektenarten (siehe auch Abbildung 9), deren Fraßaktivitäten zum Teil bestandesbedrohende Ausmaße annehmen können.

Untersuchungen zeigten, dass eine Erholung der Kiefer auf Grund ihrer Regenerationsfähigkeit möglich ist, wenn noch > 10 % Restbenadelung vorhanden ist (Landesforstanstalt Eberswalde 2007; NW-FVA 2008).

Forstlich relevante Insekten an Kiefer

Kiefernspinner, *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera, Lasiocampidae)

Forleule, *Panolis flammea* DEN. und SCHIFF. (Lepidoptera, Noctuidae)

Nonne, *Lymantria monacha* L. (Lepidoptera, Lymantriidae)

Kiefernspanner, *Bupalus piniaria* L. (Lepidoptera, Geometridae)

Kiefernbuschhornblattwespen, *Diprion* sp., *Gilpinia* sp., *Neodiprion sertifer* GEOFFR. (Hymenoptera, Diprionidae)

Kiefernnadelscheiden-Gallmücke, *Thecodiplosis brachyntera* SCHW. (Diptera, Cecidomyiidae)



Abbildung 9: Kiefern nach einem Fraß der Kiefernbuschhornblattwespe (Sachsen-Anhalt, Glücksburg 2016).

Unter den holz- und rindenbrütenden Insekten finden sich an der Kiefer Kiefernprachtkäfer (Coleoptera, Buprestidae), sowie weitere Kiefernborckenkäfer (*Ips* spp.), Kiefernrüßler (*Pissodes* spp.) und Bockkäfer (Coleoptera, Cerambycidae). Aus der Familie der Borckenkäfer spielen der Großer und Kleiner Waldgärtner, *Tomicus piniperda* L. und *T. minor* HARTIG (Coleoptera, Scolytidae) eine Rolle als Sekundärbesiedler an geschwächten Kiefern.

Holz- oder Wurzelfäulen können von verschiedenen Pilzarten hervorgerufen werden, wie z. B. dem Wurzelschwamm (*H. annosum*), dem Kiefern-Baumschwamm

(*Porodaedalea pini* (BROT.) MURRILL 1905, Synonym: *Phellinus pini*), dem Kiefern-Braunporling (*Phaeolus schweinitzii* (FR.) PAT. 1900) oder Arten der Gattung *Armillaria* (Hallimasch). In jungen Kiefernreinbeständen kann die Kieferschütte, verursacht durch den Ascomyceten *Lophodermium seditiosum* MINTER, STALEY & MILLAR 1978 zu vorzeitigem Nadelfall führen. Ebenfalls führt die *Naemacyclus*-Nadelschütte, die durch den Schlauchpilz *Cyclaneusma minus* (BUTIN) DICOSMO, PEREDO & MINTER 1983 (Synonym: *Naemacyclus minor* BUTIN 1973) verursacht wird, zu Nadelverlusten insbesondere in Jungbeständen.

Darüber hinaus gibt es eine Reihe an Schlauchpilzen, die Schädigungen an Nadeln oder Trieben der Kiefer hervorrufen. Zum Beispiel wird die *Scleroderris*-Krankheit, ein Triebsterben der Koniferen, durch den Pilz *Gremmeniella abietina* (LAGERB.) M. MORELET 1969 hervorgerufen und tritt bei feucht-kühler Witterung insbesondere an Küsten oder im Gebirge (Heydeck und Dahms 2012) auf. Das sogenannte Kieferntriebschwinden wird durch den Erreger *Cenangium ferruginosum* FR. 1818 ausgelöst. Die Pathogenität des Pilzes wird kontrovers diskutiert und die Bedeutung der Krankheit ist aktuell für Deutschland als gering einzuschätzen (Heydeck und Dahms 2012). Der Kiefernadelrost wird durch wirtswechselnde Rostpilze aus der Gattung *Coleosporium* ausgelöst. Diese Erkrankung der Nadeln spielt bei Sämlingen und Jungpflanzen eine Rolle, ist in der Forstwirtschaft aktuell aber ohne Bedeutung (Bräsicke und Hommes 2013).

Unter den Quarantäne-Schaderregern sind folgende Pilze, die *P. sylvestris* schädigen können, zu nennen. Der Ascomycet *Dothistroma septosporum* (DOROGIN) M. MORELET [as 'septospora'] 1968 löst die *Dothistroma*-Nadelbräune aus. Die Erkrankung wurde bis heute nur lokal in Baden-Württemberg (Waldschutzinfo 2/2014, Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg) und in einem Arboretum in Eberswalde (Heydeck et al. 2016) nachgewiesen. Der „Pitch Canker“ (Pechkrebs) wird durch den Erreger *Fusarium circinatum* NIRENBERG & O'DONNELL 1998 (Synonym *Gibberella circinata* NIRENBERG & O'DONNELL 1998) verursacht und wurde in Deutschland noch nicht festgestellt. In Frankreich, Spanien und Portugal wurde der Erreger bereits nachgewiesen (EPPO Global Database 2016). Die *Lecanosticta*-Nadelbräune der Kiefer wird durch den Schlauchpilz *Lecanosticta acicola* (THÜM.) SYD., in SYDOW & PETRAK 1924 verursacht. Die Erkrankung wurde erstmals 1994 in Bayern nachgewiesen und ist in Deutschland nur selten anzutreffen (Pehl 1995;

Heydeck und Dahms 2012). Der Kiefernholznermatode *Bursaphelenchus xylophilus* (STEINER & BUHRER) NICKLE, der in Nordamerika heimisch ist, wird durch Bockkäfer der Gattung *Monochamus* spp. verbreitet. Der Nematode wurde in Portugal im Freiland nachgewiesen (CABI 2016). In Importholz wurde er bereits in Deutschland, Frankreich, Finnland, Norwegen und Schweden festgestellt (Schröder 2004). In Deutschland wird derzeit ein Monitoring durchgeführt, um eine Einschleppung frühzeitig erkennen zu können.

1.4 Endophyten

Die aktuelle Bedeutung der Forschung zu Endophyten wird sichtbar, wenn man die wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu diesem Thema („Endophyte“) in der Datenbank „Web of Science™“ betrachtet: nahezu 7000 Veröffentlichungen im Zeitraum von 1980 - 2015 wurden im Mai 2016 angezeigt.

Als Endophyten wurden der ersten Definition nach alle innerhalb von Pflanzen lebenden Organismen bezeichnet, im Gegensatz zu Epiphyten, die außerhalb von Pflanzengewebe vorkommen (Bary 1866). Der Begriff Endophyt beinhaltet zunächst keine Definition über den Zustand des Pflanzengewebes (abgestorben oder lebend, in dem die Endophyten leben). 1924 entdeckte Lewis in lebenden, gesunden Teilen von Nadelhölzern Pilzmyzel. Es zeigte sich, dass Pilze symptomlos in Pflanzen vorkommen können. Das heutige Verständnis des Begriffs „Endophyten“ wurde laut Kehr (1998) wesentlich von Carroll und Petrini geprägt. Petrini (1991) zählte zu den Endophyten alle Pilze, die zu einem Zeitpunkt ihres Lebenszyklus symptomlos im Gewebe leben. Carroll (1986) zählte dazu hingegen nur jene, die nicht pathogen für ihre Wirtspflanze sind bzw. werden. Dabei scheinen die Übergänge zwischen einer parasitischen und endophytischen Lebensweise fließend zu sein. Nach Hyde und Soyong (2008) ist die geläufigste Definition jene von Petrini. Endophytische Pilze gehören meist zu den Ascomyceten bzw. Deuteromyceten (*Fungi imperfecti*), gelegentlich sind auch Basidiomyceten und Oomyceten unter ihnen (Kehr 1998; Rungjindamai et al. 2008). Sie wachsen inter- und intrazellulär, systemisch oder lokal in der Pflanze (Schulz und Boyle 2005; Rodriguez et al. 2009). Endophyten werden zumeist aus oberflächensterilisiertem Pflanzengewebe isoliert, welches auf

Nährmedium inkubiert wird. Es gibt Studien, die zeigten, dass nicht alle Endophyten *in vitro* kultivierbar sind (Duong et al. 2008; Tao et al. 2008).

Die ökologische Rolle der Endophyten ist bis heute wenig verstanden (Giordano et al. 2009; Oono et al. 2015; Sanz-Ros et al. 2015). Viele Endophyten gelten als von ihrem Wirt tolerierte Parasiten oder als opportunistische bzw. latente Pathogene (Sanz-Ros et al. 2015). Eine weitere Rolle der Endophyten ist die als Primärbesiedler, d. h. sie liegen im Baum zunächst in einer physiologischen Ruhephase vor. In der Seneszenz des Wirtes können sie Fruchtkörper und Sporen bilden (Chapela und Boddy 1988; Griffith und Boddy 1988; Kehr 1998; Osono 2006; Oses et al. 2008; Sanz-Ros et al. 2015). Es stellt sich die Frage, wie Endophyten die Abwehr einer Pflanze überwinden und sie kolonisieren können. Dies könnte entweder durch die Absonderung von Metaboliten durch den Endophyt geschehen (Peters et al. 1998; Schulz et al. 2002, 2015) oder durch die Veränderung des Phytohormonhaushaltes des Baumes (Navarro-Meléndez und Heil 2014). Weiterhin ist denkbar, dass der Endophyt Abwehrmetaboliten des Baumes durch Absonderung von lysisch wirksamen Enzymen unwirksam macht (Schulz et al. 1998; Suryanarayanan et al. 2012).

In vitro produzieren Endophyten eine Vielzahl an sekundären Metaboliten, die als Herbizide, Fungizide und Antibiotika wirken können (Schulz et al. 2002; Kusari et al. 2012). Schulz et al. (2015) vermuten, dass Endophyten dies auch *in planta* tun, da die Produktion sekundärer Metaboliten energieaufwendig ist. Die Metaboliten können in der Pflanze dazu dienen, zahlreiche Balancen aufrecht zu erhalten; Balancen zwischen Endophyten und Wirt, aber auch zwischen anderen endophytischen Pilzen und Bakterien. Schulz et al. (2002) zeigten, dass die Wirtspflanze auch die Ausscheidungen ihres endophytischen Pilzes kontrolliert. Endophyten können auch mit Herbivoren der Wirtspflanze interagieren (Suryanarayanan 2013). Carroll (1988) und Miller et al. (2008) konnten zeigen, dass Endophyten biologisch aktive Substanzen produzieren, um Herbivoren abzuwehren. Manche Endophyten können auch als Antagonisten gegen potentielle Pathogene wirken (Arnold et al. 2003; Ganley et al. 2008; Rungjindamai et al. 2008). Ob ein Endophyt als Antagonist gegenüber einem Pathogen wirkt, kann *in vitro* durch sogenannte Antagonistentests überprüft werden (Santamaría et al. 2012; Romeralo et al. 2015a). Dabei lässt man den Endophyten und das Pathogen in einer Petrischale gemeinsam wachsen. Nach einer bestimmten Zeit wird das Wuchsverhalten beider Pilze überprüft. Nach Tong-Kwee und Keng 1990

können Pilze der Gattung *Trichoderma* als Antagonisten Hyphenspiralen, vergrößerte Hyphenspitzen und kurze Hakenhyphen bilden, auch kann es zur Vakuolisierung, Granulation und Koagulation des Zytoplasmas durch *Trichoderma* sp. kommen.

Unter bestimmten Umständen können Endophyten zu Pathogenen werden (Ragazzi et al. 2003; Hyde und Soyong 2008). Zudem können sie endophytisch in einer und parasitisch in einer anderen Wirtspflanze auftreten (Sanz-Ros et al. 2015). Manche endophytisch isolierten Pilze scheinen keine wichtige ökologische Rolle zu spielen, da sie z. B. zufällig als ungekeimte Spore in der Epidermis vorliegen und die Oberflächensterilisierung überstehen (Sanz-Ros et al. 2015). Verschiedene Studien zeigten, dass Endophyten von Bäumen vermutlich meist horizontal, via Sporen von Baum zu Baum, übertragen werden (Petrini et al. 1992; Helander et al. 1993; Wilson und Carroll 1994; Saikkonen et al. 1998; Arnold und Herre 2003). Saikkonen (2007) unterstützt diese These durch die Argumentation, dass Endophyten nicht durch verschiedene holzige Gewebe wachsen können und dass auch die lange Dauer der Samenverbreitung bei Bäumen gegen eine vertikale Verbreitung spricht. Endophyten können durch Wind, Regen und Tiere von älteren Gewebeteilen in neue Regionen übertragen werden (Saikkonen 2007). Ihre Sporen gelangen über die Cuticula, Stomata oder Wunden in das Pflanzengewebe (Juniper 1991).

Zahlreiche AutorInnen haben verschiedene Gewebe der Waldkiefer untersucht: Carroll und Carroll (1978); Petrini und Fisher (1988); Fisher et al. (1991); Kowalski und Kehr (1992); Kowalski (1993); Sieber et al. (1999); Kowalski und Zych (2002); Guo et al. (2003, 2008); Pirttilä et al. (2003); Zamora et al. (2008); Giordano et al. (2009); Botella et al. (2010); Lygis et al. (2010); Menkis und Vasaitis (2010); Peršoh et al. (2010); Terhonen et al. (2011); Martínez-Álvarez et al. (2012); Millberg et al. (2015); Sanz-Ros et al. (2015). So haben Martínez-Álvarez et al. (2012) Pilzkulturen okular bestimmt und in den von ihnen untersuchten Kiefernzweigen 10 verschiedene Pilzarten gefunden. Dazu zählte eine Art des *Alternaria alternata*-Komplex *NESS* ex Fr., *Aspergillus niger* VAN TIEGHEM, *Aureobasidium pullulans* VIALA & BOYER, *Chaetomium cochliodes* PALLISER, *Cladosporium* spp., *Diplodia* spp., *Penicillium* spp. und drei Deuteromyceten. Kowalski (1993) hat als Probematerial Nadeln von fünf bis acht Jahre alten Kiefern (*P. sylvestris*) untersucht. Es zeigte sich, dass 80,1 % der Nadeln mit Pilzen besiedelt waren. Die 86 isolierten Taxa konnten 63 Spezies zugeordnet werden (Kowalski 1993). Dabei war auffällig, dass nur sieben Arten mit einer Häufigkeit von

über fünf Prozent vorkamen. Kowalski (1993) konnte einen Einfluss des Nadelalters und der Jahreszeit auf die Artenzusammensetzung feststellen.

Die Arbeitsgruppe um Giordano et al. (2009) untersuchte das Splintholz von über 600 Waldkiefern auf vier Standorten in Spanien und isolierte aus 2024 Holzstückchen 143 Taxa. *Alternaria alternata*, *Cladosporium chlorocephalum*, *C. cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium* spp. und *Trichoderma* spp. waren die Arten, die auf jedem Standort vorkamen (Giordano et al. 2009). Trotz Verwendung eines Selektivmediums konnten nur wenige Basidiomyceten isoliert werden. Pilze der Klasse der *Leotiomycetes* wurden in den Arbeiten von Arnold (2007) und Sieber (2007) als dominante Klasse bei Endophyten in Kieferngewächsen charakterisiert. Peršoh et al. (2010) hingegen fanden fast keine Pilze aus der Klasse der *Leotiomycetes*. Von Zamora et al. (2008) wurden *Dothideomycetes* gefolgt von *Sordariomycetes* und *Leotiomycetes* als häufigste Klassen beschrieben. Ergebnisse von Endophytenisolationen verschiedener WissenschaftlerInnen miteinander zu vergleichen ist schwierig, da das Ergebnis stark von der Isolationsmethode, dem Typ des Pflanzengewebes, dem verwendeten Nährmedium, dem Pflanzenalter, den Lagerungsbedingungen und der Vegetation in der Umgebung der Probestämme abhängt.

Herausfordernd ist insbesondere die Identifizierung der Endophyten aufgrund mangelnder Ausbildung von Bestimmungsmerkmalen in Reinkultur oder fehlender Vergleichsliteratur (Gazis et al. 2011). Lacap et al. (2003) verglichen in ihrer Arbeit drei verschiedene Theorien der Arterkennung bzw. Abgrenzung für Pilze miteinander. Die Einteilung nach dem System der „Morphological species recognition (MRS)“ basiert auf phänotypischen Gesichtspunkten und ist relativ simpel anzuwenden, oft fehlen dazu aber bei Pilzen vegetative sexuelle oder asexuelle Stadien. Die Artabgrenzung nach der Methode der Biological species recognition (BSR) ist für endophytische Pilze nur schwer anwendbar, da der Kreuzungstyp (engl. Mating type) nicht bekannt ist oder sexuelle Reproduktion *in vitro* nicht stattfindet (Lacap et al. 2003). Als dritte Methode zur Artabgrenzung kann die Einordnung über DNA-Sequenzen erfolgen: phylogenetic species recognition (PSR).

Probleme bei der Isolation von Endophyten bereitet das Auswachsen von Epiphyten, welches durch unzureichende Oberflächensterilisierung begünstigt wird. Weiterhin werden in Kultur häufiger schnell wachsende Pilze isoliert, langsam wachsende werden überwachsen und so nur selten oder nie isoliert (Guo et al. 2001;

Suryanarayanan et al. 2003; Hyde und Soytong 2007; Duong et al. 2008). Die Sterilisierung der Pflanzenoberfläche erfolgt meist durch eine Abfolge von Waschen unter (sterilem) Leitungswasser, Einwirken von 70 %igem Ethanol, Sterilisierung in NaOCl (0,5 - 10 %) und abschließendem Waschen in Ethanol und / oder Wasser (Carroll 1988; Sieber 1988; Schulz et al. 1998; Arnold et al. 2000; Guo et al. 2000; Flowers et al. 2001; Davis et al. 2003; Pirttilä et al. 2003; Pinto et al. 2006; Promptuttha et al. 2007; Sánchez Márquez et al. 2007; Rungjindamai et al. 2008; Zamora et al. 2008; Giordano et al. 2009; Peršoh et al. 2010; Kim et al. 2013; Rajala et al. 2013; Pawłowska et al. 2014). Der Erfolg einer Sterilisationsmethode wird getestet, indem ein zuvor sterilisierter Zweig in eine Agar-Petrischale gedrückt wird (Abklatsch) oder das zuletzt verwendete Waschwasser ausplattiert wird (Slippers und Wingfield 2007). Um die Effektivität einer Sterilisationsmethode zu testen ist es nicht ausreichend zu vergleichen, wie viele und welche Pilze als Epiphyten vor der Sterilisation und als Endophyten nach der Sterilisierung auswachsen, da horizontal übertragende Endophyten als Sporen vorliegen können oder einige Endophyten auch eine Phase als Epiphyten haben können (Schulz und Boyle 2005). Um dies auszuschließen, sollte das Probematerial in einer sporulierenden Kultur gerollt werden. Bei der Methode zur Oberflächensterilisierung muss zwischen einer zu geringen und zu starken Wirkung (Eindringen des Sterilisationsmittels z. B. Natriumhypochlorid in die Rinde) abgewogen werden. Weiterhin ist die Art des verwendeten Nährmediums bei der Isolation von Endophyten von Bedeutung, da nicht alle Pilzgruppen auf jedem Medium gleich gut wachsen können (Kehr 1998; Wyk van et al. 2007). Insbesondere für die Isolation von Basidiomyceten sollten Spezialnährmedien verwendet werden (Kehr 1998). Nach Hyde und Soytong (2008) hängt die Anzahl der isolierten Endophytenarten sehr stark von der Anzahl der Proben ab. Die Größe der inkubierten Gewebeproben hat zudem einen Einfluss auf das Isolationsergebnis. Durch kleinere Stücke werden mehr Flächen zum Auswachsen geschaffen und somit die Konkurrenz verschiedener Arten beim Auswachsen verringert (Carroll 1995; Gamboa et al. 2003).

1.4.1 Diversität und Ordination

Um die Diversität von Endophytengemeinschaften beschreiben zu können, werden sogenannte Diversitätsindizes verwendet (Arnold 2007). Bei den Diversitätsindizes handelt es sich um Streuungsmaße für kategoriale Häufigkeitsverteilungen. Sie bilden nicht nur die Artanzahl, sondern auch ihre relative Abundanz ab. Unter Biodiversität oder biologischer Vielfalt wird die Vielfalt der Organismen und Lebensräume verstanden. In der Wissenschaft wird zwischen drei Ebenen von Diversität unterschieden. Unter Alpha-Diversität versteht man die Artenvielfalt innerhalb eines Lebensraumes, Beta-Diversität bezeichnet die Artenvielfalt zwischen räumlich getrennten Lebensräumen und Gamma-Diversität die Artenvielfalt in einer Landschaft.

Der Diversitätsindex H' (Shannon-Index, Shannon und Weaver (1949)) wird in der Ökologie verwendet, um die Artenvielfalt zu charakterisieren. Er nimmt Werte zwischen null und $\ln k$ an (k beschreibt die Anzahl der Kategorien bzw. Arten). H' ist null wenn nur eine von mehreren Kategorien auftritt. Bei einer Gleichverteilung, d. h. in allen Kategorien tritt die gleiche Häufigkeit auf, nimmt H' seinen maximalen Wert an, abhängig von der Artanzahl. Um die Diversität von Verteilungen zu untersuchen, die unterschiedliche Anzahlen von k beinhalten, normiert man die Diversität H' mit ihrem maximalen Wert $\ln k$ (Evenness: $E = H' / \ln k$).

Bei der Ordination handelt es sich um ein mathematisches Verfahren, bei dem das Ziel eine grafische Darstellung der Daten in einem Koordinatensystem ist. Es ist eine Form der explorativen Datenanalyse, die eine Dimensionsreduktion bietet. Zugrunde liegt die Annahme, dass bei einem Datensatz mit Erhebung der Arten die Artzusammensetzung nicht willkürlich variiert, sondern dass es z. B. Standorteigenschaften gibt, die die Zusammensetzung beeinflussen. Bei einer Ordination wird dann ein Gradient gesucht, der die Artverteilung abbildet, deshalb spricht man auch von einer Gradientenanalyse. Dabei unterscheidet man verschiedene Vorgehensweisen: bei der indirekten Gradientenanalyse fließen keine gemessenen Umweltvariablen in die Berechnung der Ordination mit ein, sie dienen später nur bei der Interpretation der Achsen. Bei der direkten Gradientenanalyse hingegen werden die Artaufnahmen nach gemessenen Umweltvariablen geordnet, wie dies z. B. in Ökogrammen der Fall ist.

1.5 Ziele der Arbeit

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen des *Diplodia*-Triebsterbens entlang eines Transekts innerhalb von Deutschland zu untersuchen (Abbildung 7). Dabei wurde auch das endophytische Vorkommen von *S. sapinea* eruiert. Es sollten Faktoren ermittelt werden, die eine *Diplodia*-Erkrankung auslösen. Weiterhin sollte die Zusammensetzung der Mykozönose von lebenden Kiefernzweigen (*Pinus sylvestris*) auf verschiedenen Standorten entlang eines Transekt durch Deutschland analysiert werden. Dabei wurden verschiedene Kenngrößen zur Diversität berechnet und untersucht, ob das Auftreten der Endophyten bestimmten Verteilungsmustern unterliegt (z. B. Nord-Südgefälle, Höhe des Standorts, Umgebungsvegetation). Der Transekt, an dem sich die Untersuchungen orientieren verläuft von Nord-Ost Brandenburg bis Süd-West Baden-Württemberg quer durch die Bundesländer Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Hessen, Bayern und Baden-Württemberg. Dabei liegt der Transekt (Abbildung 7) in klimasensiblen Regionen, die im Rahmen des WAHYKLAS-Projekts festgelegt wurden (Waldhygienische Anpassungsstrategien für das steigende Potential von Schadorganismen in vulnerablen Regionen unter Berücksichtigung von Klimawandel und zunehmenden Restriktionen; gefördert vom BMELV (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz) und BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) im Waldklimafond, Förderkennzeichen: 28W-C-4-031-01).

Teilziele der Arbeit waren Untersuchungen zum / zur:

- Einfluss verschiedener Labormethoden auf das Ergebnis der Isolation der Endophyten
- Lokalisierung der Endophyten im Kiefernzweig (Rinde, Kambialbereich, Holz)
- Einfluss der Jahreszeiten auf die Zusammensetzung der Endophyten
- Vergleich der Zusammensetzung der Endophyten in vitalen und erkrankten Kiefern
- Einfluss eines Befalls mit Mistel und Wurzelschwamm (*H. annosum*) auf das *Diplodia*-Triebsterben
- Bewertung der potentiellen Pathogenität der in Zweigen der Waldkiefer vorkommenden endophytischen Arten
- Potentiellen antagonistischen Wirkung der isolierten Pilze aus Kiefernzweigen gegen *S. sapinea* durch Antagonistentests *in vitro*

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchte Kiefernbestände

Im Rahmen der Arbeit fanden verschiedene Probenahmen statt. Die 106 untersuchten Standorte sind in Abbildung 10 dargestellt, die sich in folgende Gruppen einteilen lassen (im digitalen Anhang findet sich eine Tabelle mit den Standortangaben).

2.1.1 Beprobungen von Kiefernbeständen mit Verdacht auf oder vorherigem Befalls mit *Diplodia*-Triebsterben und entsprechende Nullflächen, Standorte Abbildung 10, rote Punkte.

2.1.2 Systematische Beprobung auf dem BZE- / WZE-Raster von Kiefernbeständen entlang des WAHYKLAS-Transekts (Standorte Abbildung 10, kleine Punkte).

2.1.3 Monatliche Probennahme einer Kiefer (Standort Dransfeld, Süd-Niedersachsen, Abbildung 10, gelber Punkt).

2.1.4 Zusätzliche Versuche mit Kiefernmaterial aus Dransfeld und dem Isetal in Niedersachsen (Standorte Abbildung 10, gelbe Punkte).

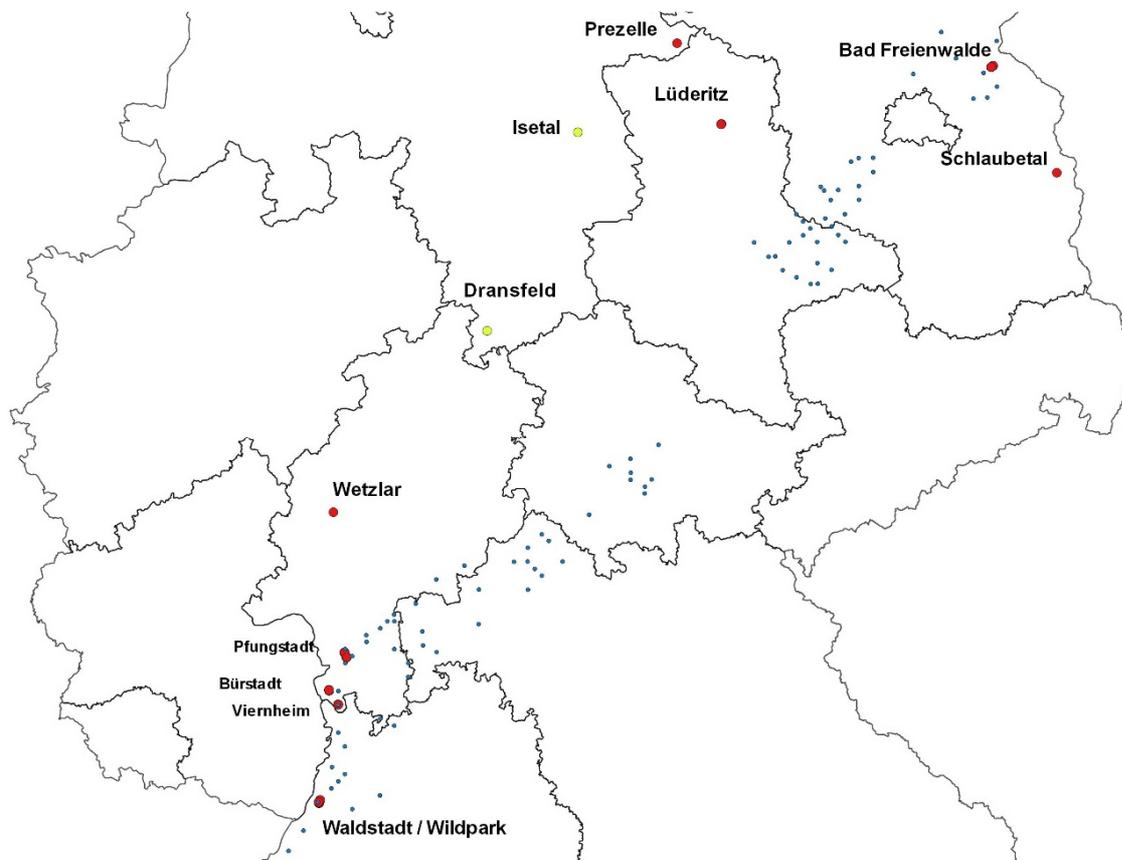


Abbildung 10: Untersuchte Probeflächen mit *P. sylvestris*, rote Punkte kennzeichnen intensiv untersuchte Kiefernbestände, gelbe Punkte stehen für Kiefernbestände, aus denen Zweigmaterial für Laborversuche gewonnen wurde, die kleinen Punkte zeigen Kiefernbestände an, die im Rahmen der systematischen Beprobung untersucht wurden; Hintergrund ©GeoBasis-DE/BKG 2014.

2.1.1 Beprobungen von Kiefernbeständen mit Verdacht auf oder mit vorherigem Befall mit *Diplodia*-Triebsterben und entsprechende Nullflächen

In Vorbereitungen wurden Kiefernbestände in geografischer Nähe des Transekts aufgesucht und auf Symptome des *Diplodia*-Triebsterben hin untersucht. Als Untersuchungsflächen dienten jedoch nur Bestände mit akuten Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens. Zu diesen erkrankten Beständen kam, wenn möglich, jeweils noch eine Kontroll- / Nullfläche hinzu, die keine sichtbaren Symptome der Erkrankung aufwies. Alle Untersuchungsflächen sind in Tabelle 2 und Abbildung 10 dargestellt. Die Untersuchungen fanden von Juni 2014 bis Mai 2016 statt. Jeder Bestand wurde aufgesucht und es wurden die in Tabelle 5 genannten Parameter erhoben. Die Probennahme der Kiefernzweige in den Untersuchungsbeständen (Tabelle 2) im Jahr 2014 und 2015 erfolgte von erkrankten und gesunden Kiefern entweder an gefällten Bäumen oder die Zweige wurden durch einen Baumkletterer geworben. Pro Untersuchungsfläche wurden in der Regel von 6 Bäumen Proben genommen. Von diesen 6 Bäumen wurden je drei Äste entnommen. Im Labor wurde von diesen Ästen jeweils zwei Triebspitzen, die drei bis vier Jahre alt waren, zur Endopyhtenisolation verwendet. Die bei der Probennahme abgeschnittenen Kiefernzweige wurden bei ca. 8 °C gekühlt und innerhalb von 7 Tage weiter verarbeitet.

Tabelle 2: Übersicht über die Untersuchungsflächen mit und ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens, siehe Abbildung 10 (rote Punkte).

Probefläche	Bundesland	Beprobung	Flächencharakter
Prezelle	Niedersachsen	2014 - 2016	Kiefernspinner-Flächen
Bad Freienwalde (FW650/FW312)	Brandenburg	2015 Sommer	Diplodia-Schadfläche / 0 - Fläche
Lüderitz (LU4451)	Sachsen-Anhalt	2014 Sommer / Herbst	Diplodia-Schadfläche
Schlaubetal	Brandenburg	2014	Nadelscheidengallmücke-Fläche
Pfungstadt (PF59)	Hessen	2014 Sommer	Diplodia-Schadfläche / Mistel-Schadfläche
Pfungstadt (PF122)	Hessen	2014 Sommer	0 - Fläche
Bürstadt	Hessen	2016 Frühling	Diplodia-Schadfläche / Mistel-Schadfläche
Viernheim (VN0226)	Hessen	2014 Sommer	Mistel- Schadfläche
Wildpark (WP0714 und WP0710)	Baden-Württemberg	2014 Sommer	Mistel- Schadfläche / 0 - Fläche
Waldstadt (WS0305)	Baden-Württemberg	2014 Sommer	Mistel-Schadfläche

Tabelle 3: Übersicht über forstliche Kenngrößen und Standortmerkmale zu den Untersuchungsflächen, Alter und BHD (Brusthöhendurchmesser) sind für die untersuchten Kiefern angegeben (arithmetisches Mittel); siehe Abbildung 10 (rote Punkte).

Probe- fläche	Bestandestyp	Alter / BHD	Standort
Prezelle	Einschichtige Kiefer	55-80 Jahre, BHD 23 cm	Mäßig sommertrocken, im tieferen Unterboden mäßig frische Standorte, schwach mit Nährstoffen versorgt, Sande z. T. schwach verlehmt oder kiesig, auch mit Steinen und Kies
Bad Freienwalde (FW650/-FW312)	Oberstand: Kiefer, Zwischen- und Unterstand: Ulme Traubeneiche, Vogelbeere, Roteiche	BHD 36 cm	Fläche auf Choriner Moränenkomplex, Stamm-Nährkraftstufe „kräftig“
Lüderitz (LU4451)	Oberstand: Kiefer, Mittelschicht: Eiche, Unterschicht: Vogelbeere, Birke, Holunder	ca. 110-jährig, BHD 40 cm	Wuchsgebiet Mittleres nordost-deutsches Altmoränenland; Bodenart: Geschiebelehm-Sand-Kalk; Bodenfeuchte: mittelfrisch, grundwasserfern, Nährkraftstufe: kräftig; Klima: trockenes Tiefland
Pfungstadt (PF59)	Oberstand: Kiefer, mit geringen Anteilen an Robinie, Roteiche und Birke	55 Jahre, BHD 24 cm	Hessische Rheinebene, Zentrale Eichen-Mischwald-Zone, schwach subkontinental, Geländewasserhaushalt: frisch, Trophie: mesotroph; Bodenart: Sand, über sandigem Sand, Skelett < 5 %, sehr tiefgründig
Pfungstadt (PF122)	Oberstand: Kiefer, Unterstand: Traubenkirsche	60 Jahre, BHD 34 cm	Hessische Rheinebene, Zentrale Eichen-Mischwald-Zone, schwach subkontinental, Geländewasserhaushalt: frisch, Trophie: mesotroph; Bodenart: Sand, carbonathaltiger sandiger Schluff, über schluffigem Sand
Bürstadt	Oberstand: Kiefer	Ca. 60 Jahre	Hessische Rheinebene, Zentrale Eichen-Mischwald-Zone, schwach subkontinental, Substrat: Sand, Bodenart: schluffiger Sand, tiefgründig, Trophie: eutroph bis mesotroph, Geländewasserhaushalt: mäßig frisch
Viernheim (VN0226)	Oberstand: Kiefer, Unterstand: Traubenkirsche	Ca. 70-jährig, BHD 22 cm	Hessische Rheinebene, Zentrale Eichen-Mischwald-Zone, schwach subkontinental, Geländewasserhaushalt: mäßig frisch/ frisch, Trophie: mesotroph
Wildpark (WP0710)	Oberstand: Kiefer, Unterstand: Traubenkirsche, Traubeneiche, Birne, Fichte (vereinzelt)	BHD 25 cm	Flugsandsediment, mäßig trockener anlehmiger Sand, mäßig trocken
Wildpark (WP0714)	Oberstand: Kiefer, Unterstand: Hainbuche, Traubeneiche, Traubenkirsche	BHD 34 cm	Würm-Schotter, mäßig trockener anlehmiger Sand, mäßig trocken bis mäßig frisch
Waldstadt (WS0305)	Oberstand: Kiefer, Unterstand: Fichte, Traubenkirsche und Buche	BHD 28 cm	Flugsandsediment, mäßig trockener anlehmiger Sand, mäßig trocken bis mäßig frisch

2.1.2 Systematische Beprobung von Kiefernbeständen entlang des Transekts

Die Probennahme wurde an Kiefern entlang des Transekts vorgenommen. (Abbildung 11). Als Raster dienten die Standorte der WZE (Waldzustandserhebung) und BZE (Bodenzustandserhebung). Dazu wurden auf bzw. entlang des Transekts WZE-Punkte ausgewählt, die einen Kiefernanteil von mindestens 50 % aufwiesen. Das Alter der Kiefern musste mindestens 50 Jahre betragen. Das Mindestalter wurde gewählt, damit nur adulte Kiefern (vergleichbare Altersstufen) untersucht wurden, um somit die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsflächen besser vergleichen zu können. Die Untersuchungen fanden von Juli bis Anfang September 2015 statt. An jedem der insgesamt 91 Probepunkte wurden vor Ort die in Tabelle 5 genannten Parameter erhoben. In Brandenburg wurden 20, in Sachsen-Anhalt 18, in Thüringen 9, in Bayern 15, in Hessen 16 und in Baden-Württemberg 13 Probepunkte untersucht. Im Zuge der systematischen Probennahme wurde von jeweils einer Kiefer pro Standort ein Ast mit einer Astschere in 5 m Höhe abgeschnitten. Wenn dies nicht möglich war, wurde mit Pfeil und Bogen ein Ast einer Kiefer heruntergeschossen. Im Labor wurden pro Standort fünf 3-jährige Triebspitzen untersucht. Die Proben lagerten bei ca. 8 °C und wurden innerhalb von 5 Tagen verarbeitet.



Abbildung 11: Untersuchte Probeflächen entlang des Transekts, an WZE-Standorten durch Deutschland, Hintergrund ©GeoBasis-DE/BKG 2014.

Tabelle 4: Schadstufen für Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens gemessen in Prozentanteilen an der Gesamtkrone der Kiefer, die Verfärbungen an den Nadeln aufweisen.

Schadstufe	Prozentanteile
0	keine Schäden
1	< 5
2	5-10
3	11-20
4	21-30
5	31-40
6	41-50
7	51-70
8	71-90
9	> 90
10	100, Baum abgestorben

Tabelle 5: Auf den Untersuchungsflächen erhobene Daten.

Aufnahme- parameter	Definition	Aufnahme- parameter	Definition
Land	Bundesland	Ästigkeit	feinastig, mittelastig, grobastig, starkastig
Forstamt	Forstamt, soweit bekannt	Blüte / Mast	ohne, gering, mittel, stark
Abteilung	Abteilung, soweit bekannt	Schäden	Beschreibung im Klartext
Datum	Aufnahmedatum	Vegetation / Baumarten	Misch- und Nebenbaumarten und häufigste, auffälligste Bodenvegetation
Koordinate	Koordinate der Fläche im Format Gauß-Krüger	<i>Diplodia</i>	Vorkommen von <i>Diplodia</i> -Schadsymptomen (rot/braune Nadeln) im Bestand, Gesamtzahl der Bäume. Stärke des mittleren Einzelbaumbefalls (Tabelle 4)
		Kiefernmistel	Vorkommen der Mistel im Bestand, Gesamtzahl der Bäume. Stärke des mittleren Einzelbaumbefalls (Tabelle 6)
Bestandes- schluss	gedrängt, geschlossen, locker, licht, räumdig, lückig, ungleichmäßig	Wurzelschwamm-Fruchtkörper	Funde von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms
Schaft	gerade, bogig, knickig, drehwüchsig, beulig, stark abholzig	Lage / Exposition	Lage und Exposition
Krone	groß, mittel, klein, allseitig, einseitig, eingeklemmt, fahnenförmig, beschädigt	Besonderheiten	Besonderheiten, die die Fläche beeinflussen können

2.1.3 Monatliche Probennahme einer Kiefer

Für die monatliche Probennahme wurden Zweige einer Kiefer aus dem Stadtwald von Dransfeld verwendet (Süd-niedersachsen, Abbildung 10). Dazu wurde von September 2015 bis April 2016 zu Beginn jeden Monats ein Ast derselben Kiefer geerntet. Im Labor wurden dann monatlich zehn vier Jahre alte Triebspitzen untersucht.

2.1.4 Zusätzliche Versuche mit Kiefernzweigen

Für die Laborversuche (Kapitel 2.5), bei denen der Einfluss verschiedener Methoden auf das Ergebnis der Endophytenisolation untersucht werden sollte, wurden jeweils frisch geerntete Kiefernzweige aus Dransfeld oder aus dem Isetal (Niedersachsen, Abbildung 10) verwendet. Dazu wurde je nach Versuch unterschiedlich viel frisches Probematerial (Kiefernzweige) geerntet.

2.2 Erhebung des Wurzelschwammvorkommens

Auf den *Diplodia*-Schadflächen und auf unbefallenen Flächen wurde das Vorkommen von Wurzelschwamm-Fruchtkörpern an Stubben und abgestorbenen Bäumen erhoben. Der Wurzelschwamm kommt als Saprophyt bevorzugt an abgestorbenem Holz vor, deshalb wurden keine vitalen Bäume untersucht. Die Kartierung wurde an folgenden Terminen durchgeführt:

9. und 10.12.2014 Pfungstadt

21.10.2014, Letzlingen

27. und 28.10.2014, Pfungstadt

Um das Vorhandensein / Nichtvorhandensein von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms zu erheben, wurde mit einer Hacke bei jedem Stubben und abgestorbenem Baum die Streu beiseitegeschoben. Informationen wie Fund eines Wurzelschwamm-Fruchtkörpers, Baumart und Alter des besiedelten Stubbens wurden mit Hilfe eines GPS Geräts (GARMIN, GPSMAP 64s) aufgenommen und die Stubben farblich markiert.



Abbildung 12: Kiefernstubben mit Fruchtkörpern von *H. annosum* s.str.

Auf den Untersuchungsflächen in Pfungstadt (PF122 und PF59) wurden für die Probenahme der Zweige ohnehin jeweils 6 Kiefern gefällt. Im Hinblick auf die Wurzelschwamm-Untersuchungen wurde vom Stammfuß eine ca. 20 cm dicke basale Stammscheibe abgeschnitten. Diese wurde vor Ort direkt mit 70 %igem Ethanol benetzt und einzeln verpackt. Vor der Weiterbearbeitung im Labor wurde bei den Stammscheiben auf beiden Seiten mehrere Zentimeter mit einer Bandsäge abgeschnitten, um Oberflächen zu schaffen, die nicht der Waldluft ausgesetzt waren. Anschließend wurden die Scheiben einer Inkubation (Methode verändert nach Rishbeth (1951) und Langer und Bressemer (2017)) unterzogen: Dazu wurden die Stammscheiben in sterilen Plastiksäcken verpackt und bei 8 °C über mehrere Wochen vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde jede Scheibe einzeln in feuchtes Zeitungspapier eingewickelt und bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) unter Plastikfolie inkubiert (Hauptinkubation). Nach der Hauptinkubation der Stammscheiben wurden diese nach 7, 14 bzw. 21 Tagen mit Hilfe eines Binokulars und eines Mikroskops untersucht, um die typischen Konidienträger des Wurzelschwammes (*Spiniger meineckellus*, Abbildung 13), festzustellen. Das Auffinden dieser Nebenfruchtform gilt als Nachweis einer Besiedlung der Stammscheibe bzw. des Baumes mit dem Wurzelschwamm (Garbelotto und Gonthier 2013).

Im Zuge der systematischen Beprobung entlang des Transekts wurde das Vorhandensein von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms ebenfalls erhoben. Dazu wurden die nächsten 10 Stubben im direkten Umfeld zur beprobten Kiefer gesucht und mit einer Hacke bei jedem Stubben Streu beiseitegeschoben, um Fruchtkörpern des Wurzelschwamms erkennen zu können.

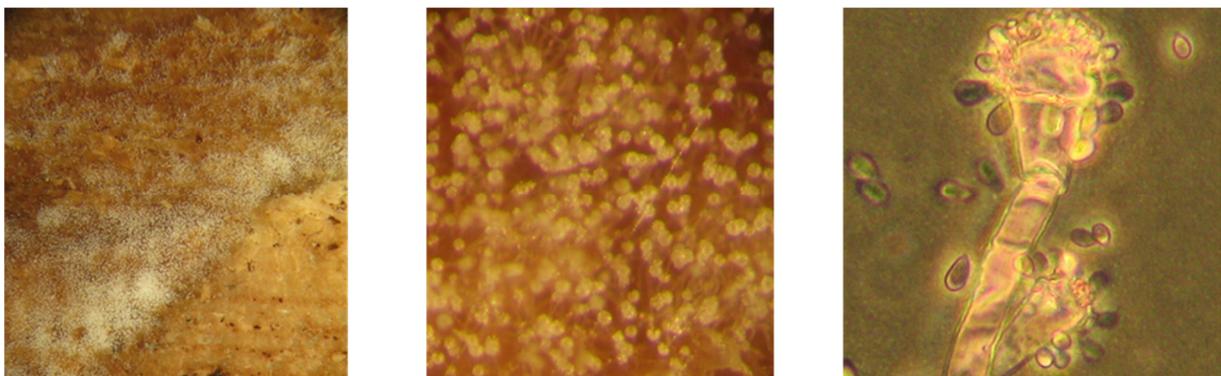


Abbildung 13: Mikroskopische Ansichten von *Spiniger meineckellus* unter dem Binokular (links und Mitte) sowie unter dem Lichtmikroskop (rechts), Fotos NW-FVA.

2.3 Erfassung des Mistelvorkommens an Kiefern

Das Vorkommen der Mistel (*Viscum album* subsp. *austriacum*) an den Probebäumen und im Bestand wurde kartiert (Tabelle 5). Dazu wurde in Prozentstufen der Anteil der Kiefern eines Bestandes, an denen Misteln wuchsen, erfasst. Weiterhin wurde aufgenommen, welchen Anteil die Mistel an der grünen Biomasse einer Kiefer einnahm. Die Prozentangaben wurden in 4 Klassen eingeteilt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Schadstufen für das Vorkommen der Kiefernmistel (0-3), klassifiziert nach Anteil der Mistel an der grünen Krone der Kiefer.

Stufe	Klasse	Anteil der Mistel in Prozent
0	kein	0
1	wenig	10 - 20
2	mittel	30 - 40
3	viel	> 40

2.4 Isolation von Endophyten

Da die Methode, wie die pilzlichen Endophyten isoliert werden, sehr bedeutend für das Isolationsergebnis ist (Hyde und Soytong 2008), wurden zahlreiche Einflussfaktoren bei der Isolation untersucht (siehe dazu Kapitel 2.4.1).

Die zu untersuchenden Triebspitzen wurden von dem gewonnenen Probematerial (Kiefernzweige Durchmesser von 0,2 cm - 1 cm) zufällig ausgewählt und auf die gewünschte Länge zugeschnitten, dann entnadelt und unter fließendem Leitungswasser mit einer Zahnbürste äußerlich gesäubert. Anschließend wurde der Zweig vermessen, dabei wurde die Länge der Zweige nach Jahrgängen bestimmt (Abbildung 14), in der Regel wurden die letzten drei bis vier Nadeljahrgänge untersucht. Die Länge eines Jahrgangs des Kieferntriebs variierte dabei erheblich, so waren die untersuchten Jahrgänge zwischen 0,5 und 16 cm lang. Der Kiefernzweig wurde in einer Sicherheitswerkbank (THERMO ELECTRON CORPORATION, HERASAFE KSP, Werkbank der Sicherheitsklasse 2) chemisch oberflächen-sterilisiert (Kapitel 2.5.1) und mit einem abgeflamten Skalpell in fünf Millimeter große Triebsegmente geschnitten (Abbildung 15). Ein Abflammen des Skalpells fand nach jedem Schnitt statt, danach musste das Skalpell erst auskühlen.

Pro Petrischale (MYP-Nährmedium, Durchmesser 9 cm) wurden drei Triebsegmente bei Raumtemperatur inkubiert (Abbildung 15).

Die Kontrolle der ausgewachsenen Pilzkolonien fand nach 7 und 14 Tagen, im Einzelfall auch nach 21-28 Tagen statt (siehe auch Kapitel 2.4, Identifikation der Pilzkulturen). Eine Woche nach Inkubationsbeginn wurden die Petrischalen auf ausgewachsene Pilze hin untersucht und ausgewachsene Myzelien wurden durch den Transfer von kleinen Myzelstückchen in Reinkulturen gebracht. Diese dienen zur Bestimmung und Stammhaltung.

Das Auswachsen einer Pilzart aus einem Kieferntriebstück mit einer Länge von 0,5 cm wurde als ein endophytisches Vorkommen gewertet, unabhängig von der Anzahl der Kolonien, die aus einem Holzstück auswachsen. Die relative Häufigkeit des Auftretens einer Pilzart gibt an, wie hoch der prozentuale Anteil der Holzstücke ist, die von dem jeweiligen Pilz besiedelt waren. Die absolute Häufigkeit gibt an, wie hoch der prozentuale Anteil der Pilzart an allen Isolationen war.

$$\text{Relative Häufigkeit (\% RH)} = \frac{N_{\text{bes}}}{N_t} * 100$$

$N_{\text{bes}} = \sum \text{Triebsegmente kolonisiert vom jeweiligen Pilz}$
 $N_t = \sum \text{Triebsegmente untersucht}$

In der Summe kann die Prozentzahl RH > 100 sein, da ein Triebsegmente von mehr als einer Pilzart besiedelt sein kann (siehe Besiedlungsrate).

$$\text{Absolute Häufigkeit (\% AH)} = \frac{N_{\text{bes}}}{N_A} * 100$$

$N_{\text{bes}} = \sum \text{Triebsegmente kolonisiert vom jeweiligen Pilz}$
 $N_A = \sum \text{aller Pilzauswüchse}$

Die Besiedlungsrate $\frac{N_A}{N_t}$ gibt an, mit wie vielen verschiedenen Pilzarten ein Triebsegment im Durchschnitt (arithmetisches Mittel) besiedelt war.



Abbildung 14: Entnadelter Kieferntrieb, rot markiert sind die Internodien, die die Jahrgangsübergänge markieren.



Abbildung 15: Isolation von Endophyten auf MYP-Medium, links: Triebsegmente von Kiefernzweigen auf Nährmedium, Mitte und rechts: Auswuchs von Pilzkolonien aus Holzstücken nach 7 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur.

Für die Isolation und zur Bestimmung der Pilzkulturen wurden nachfolgende sterile Nährmedien verwendet. Jede Petrischale (Durchmesser 9 cm) wurde mit ca. 20 ml Nährmedium befüllt.

Benomyl-Agar nach Summerbell (1993)

6,25 g Malzextrakt (MERCK), 6,25 g Maltose (FLUKA), 1,25 g Kaliumhydrogenphosphat (MERCK), 1 g Hefe (FLUKA), 0,625 g Magnesiumsulfat (SIGMA-ALDRICH), 0,625 g Pepton (MERCK) und 20 g Agar (SIGMA-ALDRICH) werden in 1 l demin. Wasser gelöst und autoklaviert. Wenn die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt ist, werden 5 mg Benomyl (FLUKA) in 1 ml Dimethylsulfoxid (ALDRICH) gelöst und zur Nährlösung hinzugegeben.

CHA (Cherry decoction agar) verändert nach Samson (2010)

9 Kirschextrakt Tabletten („Cherry fruit extract Tabletten“, SOURCENATURALS, entsprechen 1 kg Kirschen) in 15 g Agar (FLUKA) werden zerstoßen und in 1 l demin. H₂O aufgelöst und autoklaviert.

CMA (Corn Meal Agar) nach Angaben des Herstellers

17 g CMA (FLUKA) werden in 1 l demin. H₂O gelöst und autoklaviert.

MEA (Malt Extract Agar)

20 g Malz (MERCK) und 15 g Agar (FLUKA) werden in 1 l demin. H₂O gelöst und autoklaviert.

MYP (Malz-Yeast-Pepton), nach Langer (1994)

7,0 g Malz (MERCK), 1 g Pepton (MERCK), 0,5 g Hefe (FLUKA), 15 g Agar (SIGMA-ALDRICH) werden in 1 l demin. H₂O gelöst und autoklaviert.

MYP mit Bromkresolgrün verändert nach Powell (1995)

7,0 g Malz (MERCK), 1 g Pepton (MERCK), 0,5 g Hefe (FLUKA), 15 g Agar (SIGMA-ALDRICH) werden in 1 l demin. H₂O gelöst und autoklaviert. Wenn die Nährlösung auf ca. 60 °C abgekühlt ist, werden 50 mg des Farbstoffs und pH-Indikators Bromkresolgrün (SIGMA-ALDRICH) hinzugefügt.

OA (Oat Meal Agar) nach Angaben des Herstellers

72,5 g OA (FLUKA) werden in 1 l demin. H₂O gelöst und autoklaviert.

OPP nach Barnard et al. (1985)

20 g Malzextrakt (MERCK), 17 g Agar (SIGMA-ALDRICH), 2,5 ml einer Lösung aus 0,24 g Orthophenylphenol (SAFC) in 10 ml 95%igem Ethanol (MERCK) und 0,5 ml Milchsäure (FLUKA) werden in 1 l demin. Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden 100 mg Streptomycinsulfat (SIGMA) hinzugegeben.

PBA (Pine Bark Agar)

30 g getrocknete und fein gemahlene Kiefernrinde (von maximal 3 cm dicken Kiefernästen) werden mit 20 g Agar (SIGMA-ALDRICH) auf 1 l H₂O aufgefüllt und zweimal autoklaviert.

PCA (Potato Carrot Agar) nach Samson (2010)

20 g geschälte und gewürfelte Kartoffeln (aus biologischer Landwirtschaft) und 20 g geschälte und gewürfelte Karotten (aus biologischer Landwirtschaft) werden für 30 min in 250 ml H₂O gekocht und anschließend zu Brei gemixt, dann werden 20 g Agar (SIGMA-ALDRICH) hinzugegeben und auf 1 l H₂O aufgefüllt. Anschließend werden 0,01g ZnSO₄·7H₂O (SIGMA-ALDRICH) und 0,005 g CuSO₄·5H₂O (SIGMA-ALDRICH) hinzugegeben

PDA (Potato dextrose agar) nach Angaben des Herstellers

39 g PDA (FLUKA) werden in 1 l demin. H₂O gelöst und autoklaviert.

PNA (Pine Needle Agar, verändert nach Luchi et al. (2007))

30 g getrocknete und fein gemahlene Kiefernadeln werden mit 20 g Agar (SIGMA-ALDRICH) auf 1 l H₂O aufgefüllt und zweimal autoklaviert.

PWA (Pine Wood Agar)

30 g getrocknetes und fein gemahlene Kiefernholz werden mit 20 g Agar (SIGMA-ALDRICH) auf 1 l H₂O aufgefüllt und zweimal autoklaviert.

SNA (Synthetischer Nährstoffarmer Agar) nach Nirenberg (1976)

1 g Kaliumhydrogenphosphat (MERCK), 1 g Kaliumnitrat (SIGMA-ALDRICH), 0,5 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (SIGMA-ALDRICH), 0,5 g Kaliumchlorid (MERCK), 0,2 g Glucose (SIGMA) und 0,2 g Saccharose (SIGMA) werden mit 20 g Agar (SIGMA-ALDRICH) versetzt und auf 1 l demin. H₂O aufgefüllt und autoklaviert.

2.4.1 Versuche zum Einfluss der Isolationsmethode

Versuche zur Oberflächensterilisierung

Probennahme Sommer 2014

Für die Oberflächensterilisierung wurde wie folgt vorgegangen (Tabelle 7, V1): Die Triebspitzen wurden für zwei Minuten in 70 % Ethanol gegeben, danach zweimal in autoklaviertes Leitungswasser getaucht. Ein Tausch des Ethanols / Wassers erfolgte je nach Trübungsgrad nach zwei Kieferntrieben. Dafür wurden je nach Größe der Proben autoklavierte Glasgefäße (180 ml, 5 cm x 9 cm) oder große Reagenzgläser (100 ml, 30 x 200 mm) verwendet. Der Transfer der Proben von einem zum anderen Gefäß erfolgte mit einer abgeflammt Pinzette. Nach dem letzten Schritt wurde der Zweig mit Hilfe eines autoklavierten Filterpapiers trocken getupft. Anschließend wurden die Kieferntriebe mit einem sterilen Skalpell in 0,5 cm große Triebsegmente geschnitten, nach jedem Schnitt wurde das Skalpell abgeflammt und ausgekühlt. Waren die Holzstücke zu dick, um mit einem Skalpell durchgeschnitten zu werden, wurden die Holzstücke nach der Oberflächensterilisierung mit einer desinfizierten Rosenschere zerkleinert.

Da der Abklatsch von sterilisierten Kiefernzweigen zeigte, dass die Triebe mit der Behandlung von Ethanol nicht ausreichend oberflächensteril waren, wurde zur Optimierung der Oberflächensterilisierung ein Versuch mit verschiedenen Konzentrationen von Natriumhypochlorit (NaOCl) und Vor- und Nachbehandlungen durchgeführt (Tabelle 7).

Versuch 1

Der Erfolg einer Sterilisationsvariante wurde mit Hilfe eines Abklatsches überprüft (Schulz et al. 1998; Sánchez Márquez et al. 2007). Bei einem Abklatsch wird der Zweig oberflächensterilisiert, trockengetupft und anschließend wird ein Abdruck auf einer MYP-Platte angefertigt (Abbildung 40). Die Platten wurden mehrere Wochen beobachtet, um zu prüfen ob und welche Pilzkulturen auswachsen. Mit einer Auswahl

an Sterilisationsvarianten wurde eine Endophytenisolation durchgeführt. Der Auswuchs von Endophyten nach erfolgter Oberflächensterilisierung stellte sicher, dass die Sterilisierung nicht zu aggressiv ist, d. h. Endophyten im Gewebe abtötet.

Versuch 2

Ein weiterer Schritt, den Erfolg einer Oberflächensterilisierung zu testen war es, die Zweige nach erfolgter Oberflächensterilisierung in sterilem Leitungswasser zu schütteln und dieses Wasser auf Nährmedium auszuplattieren.

Versuch 3

Dieser Versuch benutzte ebenfalls die Methode des Abklatsches, dazu wurde ein Kiefernzweig in einer sporulierenden Pilzkultur (*Diaporthe* sp., NW-FVA 2710) gewälzt und dann beobachtet, ob der entsprechende Pilz nach dem Sterilisierungsvorgang noch auswächst. Dazu wurden Kieferntriebe in 8 cm lange Stücke geschnitten, entnadelt, gebürstet und 20 dieser Stücke zuerst in der sporulierenden Kultur gerollt und anschließend sterilisiert. Mit jedem sterilisierten Trieb wurde ein Abklatsch angefertigt. Nach ein bis drei Wochen wurde kontrolliert, ob Pilzkulturen auswachsen und ob es sich dabei um den Stamm 2710 handelte.

Versuch 4

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, wann die sterilisierende Wirkung des NaOCl abnimmt. Dazu wurden Kieferntriebe in 8 cm lange Stücke geschnitten und 30 dieser Stücke nacheinander sterilisiert. Mit jedem sterilisierten Trieb wurde ein Abklatsch angefertigt. Später wurde kontrolliert, ob es Unterschiede beim Auswachsen von Pilzkolonien gibt, in Abhängigkeit von der Reihenfolge ihrer Sterilisierung.

Diese Versuche geben Hinweise, inwiefern die Oberfläche des Kiefernzweigs nach der Behandlung mit Natriumhypochlorit steril ist und wie lange das Mittel verwendet werden kann.

Probennahme 2015 / 2016

Zur Oberflächensterilisierung wurde wie folgt vorgegangen: Die Holzstücke wurden vor der Behandlung unter fließendem Leitungswasser mit einer weichen Bürste gereinigt, anschließend unter der Sterilwerkbank 1 min lang mit 70 % Ethanol benetzt, danach 5 min in einer 3 % NaOCl-Lösung sterilisiert und zum Entfernen des NaOCl 1 min in 70 % Ethanol getaucht. Das weitere Vorgehen war identisch mit dem aus der Probennahme Sommer 2014.

Tabelle 7: Verschiedene Varianten der Oberflächensterilisierung (V1-V25) für die Kiefernzweige.

Variante	Bürsten	Vorbehandlung	Sterilisation	Nachbehandlung
V1	ohne Bürsten	-	2 min 70 % EtOH	2x spülen H ₂ O
V2	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 6 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V3	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 6 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V4	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 6 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V5	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 6 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V6	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 3 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V7	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 3 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V8	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 3 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V9	ohne Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 3 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V10	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 6 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V11	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 6 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V12	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 6 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V13	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 6 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V14	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 3 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V15	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 3 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V16	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 3 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V17	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 3 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V 18	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 9 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V19	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 9 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V20	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	2 min 9 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V21	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	5 min 9 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V22	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	10 min 3 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V23	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	10 min 3 % NaOCl	2x spülen H ₂ O
V24	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	10 min 6 % NaOCl	1 min 70 % EtOH
V25	mit Bürsten	1 min 70 % EtOH	10 min 6 % NaOCl	2x spülen H ₂ O

Versuche zum Einfluss der Lagerungsdauer

In diesem Experiment wurde geklärt, welchen Einfluss die Lagerung im Kühlschrank bei 8 °C auf die Endophytenzusammensetzung hat und ob die Verarbeitung des Probematerials innerhalb von sieben (2014) oder fünf (2015) Tagen Auswirkungen auf das Isolationsergebnis hat. Es wurden Kiefernzweige aus Dransfeld als Probematerial gewonnen. Diese wurden am Tag der Ernte, nach 7, 14 und 28 Tagen Lagerung im Kühlschrank auf die Zusammensetzung der Endophyten untersucht. Je Lagerungszeitraum wurden fünf Triebspitzen untersucht.

Versuche zur Länge der Triebsegmente

Kieferntriebe wurden in verschiedene Segmentlängen (2, 1, 0.5, 0.25, 0.1 cm) geschnitten und beobachtet, wie viele und welche Pilze auswachsen (Tabelle 8). Die Endophyten wurden auf ihre Artenzusammensetzung, Artenanzahl und Häufigkeit hin untersucht. Weiterhin sollte geprüft werden, ob z. B. langsam wachsende Pilzarten vermehrt auswachsen. Bei dem ersten Versuch (LA 1 - 4), der den Einfluss der Länge der Triebsegmente klären sollte, ergab sich je nach Segmentlänge eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen. Bei der Untersuchung von 2 cm-Segmentlänge ergaben sich nur 4 Wiederholungen bzw. Triebsegmente aus einem 8 cm langen Kiefertrieb. Bei 0,15 cm Segmentlänge ergaben sich 60 Wiederholungen bzw. Triebsegmente aus einem 8 cm langen Kiefertrieb (Tabelle 28). Um den Effekt der häufigeren Wiederholung berücksichtigen zu können, wurde der Versuch mit einer anderen Versuchsanordnung wiederholt (LA 5 - 9, Tabelle 28). Untersucht wurden 80 Triebsegmente je Segmentlänge (80 Triebsegmente à 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1 cm Segmentlänge; Tabelle 28, LA5 - LA9). Bei diesem Versuch unterschied sich die Länge des Probematerials (verwendeter Kiefertrieb): bei 2 cm Segmentlänge betrug die Länge der untersuchten Kiefernzweige insgesamt 1,6 m. Bei 0,1 cm Segmentlänge betrug die Länge der untersuchten Kiefernzweige hingegen nur 8 cm.

Tabelle 8: Versuchsreihen mit verschiedenen Segmentlängen (LA1-LA9), zur Ermittlung des Einflusses der Länge der Triebsegmente auf die Isolation der Endophyten.

Name	Segmentlänge (cm)	Länge des Probematerials (cm)	Anzahl untersuchter Triebsegmente
LA1	2	8	4
LA2	1	8	8
LA3	0,5	8	16
LA4	0,15	8	60
LA6	1	80	80
LA7	0,5	40	80
LA8	0,25	20	80
LA9	0,1	8	80

Versuche zur Lokalisierung der Endophyten

In diesem Experiment wurde geprüft, in welchen Gewebebereichen die Endophyten im Kiefernzweig vorkommen. Insbesondere wurde auch geprüft, aus welchem Gewebe *S. sapinea* isoliert werden kann. Dafür wurde jeweils ein zuvor oberflächensterilisierter Kiefernzweig in die Teile Holz, Kambialbereich und Rinde getrennt (Abbildung 16). Je Gewebetyp (Rinde, Kambialbereich und Holz) wurden 416 Triebsegmente à 5 mm inkubiert und untersucht (1248 Proben). Das Probematerial stammte aus Dransfeld und bestand aus ca. 8 cm langen Trieben. Aus technischen Gründen wurde der aktuelle Jahrgang nicht untersucht, da sich unverholztes Gewebe schlecht in die verschiedenen Gewebetypen trennen lässt.



Abbildung 16: Kieferntrieb für den Versuch zur Lokalisierung der Endophyten, als Beispiel, getrennt in verschiedenen Gewebetypen, von links nach rechts: Holz, Kambialbereich, Rinde (Innenansicht), Rinde (Außenansicht).

Versuche zur Isolierung von Basidiomyceten

Eine Literaturrecherche ergab, dass die Isolation von Basidiomyceten besser mit Spezialnährmedien gelingen kann. Deshalb wurden zusätzlich Pilzisolierungen mit zwei Spezialnährmedien für Basidiomyceten durchgeführt: OPP nach Barnard et al. (1985) und ein Nährmedium mit Benomyl nach Summerbell (1993). Je Agar (OPP-Agar und Benomylagar) wurden 140 Triebsegmente à 5 mm inkubiert und untersucht (\cong 280 Segmentstücke).

Versuche zum saisonalen Einfluss auf die Endophyten

Für die monatliche Probennahme wurde jeweils in der ersten Woche eines Monats ein Ast von ein und derselben Kiefer aus Dransfeld abgeschnitten und 20 Triebspitzen (à 4 Nadeljahrgänge) untersucht. Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die Endophytenzusammensetzung einer saisonalen Schwankung unterliegt. Der Versuch wurde vom September 2015 bis April 2016 durchgeführt.

2.5 Identifizierung der Pilzkulturen

2.5.1 Einordnung nach Morphotypen

Alle ausgewachsenen Pilzkolonien wurden, wenn sie nicht direkt eindeutig einem Morphotypen bzw. einer OTU (OTU, operational taxonomic unit) zugeordnet werden konnten, in Reinkultur gebracht. Dort zeigten diese oft ein anderes und eindeutigeres Wachstum und konnten mikroskopiert werden. Die Pilzisolat wurden nach Form, Höhe und Farbgebung der Kultur einem Morphotyp zugeordnet. Weiterhin wurden Oberflächenstruktur, Wachstumsgeschwindigkeit, Einwachstiefe der Kultur in das Medium, Abgrenzung zu anderen Arten und Merkmale in der Wachstumszone berücksichtigt (Kim et al. 2013). Es wurden auch molekulargenetische Methoden zur Identifizierung verwendet (siehe Kapitel 2.5.2).

Die wissenschaftlichen Namen der Pilze in dieser Arbeit orientieren sich an aktuellen Einträgen im INDEX FUNGORUM (www.indexfungorum.org) oder MYCOBANK (www.mycobank.org).

Im Weiteren wurden die isolierten Pilze in ökologische Gruppen eingeteilt (Tabelle 37). Die Einteilung erfolgte auf Grund einer umfangreichen Literaturrecherche zu den isolierten Arten bzw. Gattungen. Folgende Gruppen wurden gebildet:

- Generalisten
- Saprophyten
- Epiphyten
- als Endophyten in Kiefer bekannt
- mit Laubholz assoziierte Pilze
- potentielle Pathogene (an holzigen Pflanzen)

2.5.2 DNA-Analyse

Von jedem OTU wurden ein bis zwei Pilzstämme molekulargenetisch untersucht. Dazu wurde der Pilz auf MYP-Platten in Reinkultur gebracht und nach ca. 7 Tagen geerntet. Alle Arbeitsschritte von der DNA-Isolierung bis hin zur PCR wurden zunächst selbstständig im Labor des Fachgebietes Ökologie der Universität Kassel durchgeführt und später routinemäßig von dem Labor des Fachgebietes Ökologie der Universität Kassel durchgeführt.

Die Extraktion der DNA erfolgte mit der Mikrowellen-Methode verändert nach Izumitsu et al. (2012). Dazu wurden 1 mg Pilzmyzel in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß (SARSTEDT) überführt. Das Material wurde in 100 µl 1 x TRIS-EDTA (TE)-Puffer suspendiert. Das halb verschlossene Eppendorfgefäß erhitze man bei 600 Watt für 1 min in der Mikrowelle (CASO CM 1000, BRAUKMANN GmbH). Danach erfolgte eine Inkubation von 30 sec bei Raumtemperatur. Dann wurde das Eppendorfgefäß erneut bei 600 Watt für 1 min in der Mikrowelle erhitzt, abschließend für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Um festes und flüssiges Material zu trennen wurde die Probe bei 10 000 rpm 5 min zentrifugiert (BIOFUGE FRESCO, HERAEUS). Der Überstand (ca. 50-70 µl) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) verwendet. Die isolierte DNA wurde 1:100 verdünnt und jeweils 5 µl als DNA-Template für die PCR verwendet. Mit spezifischen ITS-Primern wurde die DNA mit Hilfe einer PCR amplifiziert (Tabelle 10). In Einzelfällen wurde die LSU- Region untersucht.

Der PCR-Ansatz enthielt die in Tabelle 9 aufgeführten Bestandteile. Das Programm im PCR-Thermocycler (BIOMETRA T-GRADIENT, BIOMETRA) wurde wie in Abbildung 17 dargestellt programmiert. Anschließend wurde die DNA in einem 1,5 %igen Agarosegel (100 ml TRIS-Borat-EDTA Puffer mit 1g Agarose) mit dem Farbstoff GelRed (BIOTIUM) und einem TBE-Puffer sichtbar gemacht. Als Längenstandard wurde der DNA-Leiter GeneRuler 100bp (THERMO FISHER) genutzt. Eine Negativ-Kontrolle lief im Gel gleichzeitig mit. Die Gelelektrophorese wurde mit einer Laufzeit von 45 min bei 88 V vorgenommen. Unter ultraviolettem Licht werden die DNA-Banden sichtbar und konnten fotografiert werden (Dokumentationsgerät BioDocAnalyze BDA5, BIOMETRA GMBH). Wurden Banden im Gel sichtbar, erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification-Kit (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers. Nach der Aufreinigung wurden die PCR-Produkte ohne weitere Klonierung für die Sanger-Sequenzierung zu der Firma GATC Biotech geschickt.

Die ermittelten Sequenzen wurden mit dem Programm MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura et al. 2013) bearbeitet. Und die editierten Sequenzen wurden mit in der NCBI Datenbank (Morgulis et al. 2008) vorhandenen Sequenzen verglichen. Dazu wurde mit der BLAST-Funktion (Basic Local Alignment Search Tool , Zhang et al. 2000) eine Liste von Sequenzen aufgestellt, die identisch oder ähnlich der eingegebenen ITS Sequenz sind. Angaben zur Ähnlichkeit (Identity und Query cover in %) und zum Ursprung der Sequenz sind in Tabelle 23 dargestellt.

Für die Bestimmung auf Artebene wurde eine 98 - 100 % Übereinstimmung mit der ITS-Sequenz vorausgesetzt, für die Gattung 94 - 97 % und für Ordnungsebene 80 - 93 %. Die ITS-Sequenzen mussten mindestens 90 % der eingegebenen Sequenz abdecken (Cover). Für jeden OTU wurden mehrere Übereinstimmungen in der NCBI Datenbank angeschaut (best matches). Für die höchsten bzw. besten Übereinstimmungen wurde für die spezifische Art bzw. Gattung Literatur zur Bestimmung gesucht. Dabei wurden bevorzugt publizierte Sequenzen ausgewählt. Artmerkmale der OTUs wurden dann mit den in der Literatur publizierten Merkmalen verglichen. Ein Arname wurde also nicht nur auf Grund der Übereinstimmung mit einer ITS-Sequenz gewählt, sondern es mussten gleichzeitig noch morphologische Artmerkmale übereinstimmen. Wenn der Blast und die Bestimmung an Hand von morphologischen Merkmalen nicht eindeutig war, wurde eine niedrigere übereinstimmende Taxonomische Einheit gewählt (Peršoh et al. 2010; Millberg et al. 2015).

Tabelle 9: PCR-Ansatz für eine Probe 50 µl.

Bestandteile	Menge
H ₂ O bidest	4,3 µl
10 x PCR-Puffer (mit MgCl ₂), (CoralLoad, QIAGEN)	5 µl
MgCl ₂ 25 (QIAGEN)	1,5 µl
dNTPs (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)	2 µl
Primer ITS1/ITS1-f	1 µl
Primer ITS4/ITS4-b	1 µl
Taq-Polymerase (QIAGEN)	0,2 µl
DNA	5 µl
Total	50 µl

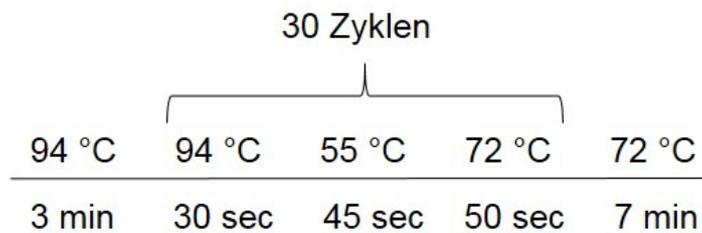


Abbildung 17: Verwendetes PCR-Programm mit den Schritten zur Denaturierung, Annealing und Elongation.

Tabelle 10: Primer für die ITS und LSU-Region nach White et al. (1990) und Gardes und Bruns (1993).

Primer	Primer-Sequenz (5'- 3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS1-f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4-b	CAGGAGACTTGTACACGTCCAG
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC
LR5	TCCTGAGGGAACTTCG

2.5.3 Kulturversuche zur Bestimmung der isolierten Endophyten

Mit den gewonnenen ITS-Sequenzen wurden BLAST-Suchanfragen in der NCBI-Datenbank durchgeführt. Nicht immer ließ sich mit Hilfe der ITS-Sequenzen ein Artnamen für das zu identifizierende OTU zuweisen, teilweise wurden die OTUs lediglich auf Gattungs-, Familien- oder Ordnungsniveau charakterisiert. Für Artnamen mit hoher Übereinstimmung im Sequenzbereich (Querycover) und Ähnlichkeit (Identity), wurden Erstbeschreibungen gesucht oder weiterführende Bestimmungsliteratur genutzt, um die entsprechenden Pilze mit den Beschreibungen in der Literatur zu vergleichen (Tabelle 12).

Es wurden Experimente (Tabelle 12), wie z. B. Wachstumstests auf bestimmten Nährmedien und unter bestimmten Bedingungen durchgeführt. Die Pilzkulturen wurden auf unterschiedliche Nährmedien bei verschiedenen Temperaturen inkubiert

(OA, CMA, SNA, PDA, MEA, MYP), um ihr Aussehen mit publizierten Beschreibungen oder Fotos zu vergleichen.

Zur Identifikation der isolierten Ascomyceten sind Sporen (Konidien oder Ascosporen) hilfreich. Zur Anregung der Sporulation kamen verschiedene Lichtregime mit UV- oder Weißlicht und unterschiedliche Nährböden zum Einsatz. Weiterhin wurden einige Pilze auf einem Agar aus Kiefernadeln und Kiefernrinde (PNA / PBA) inkubiert oder auf autoklavierte Kiefernadeln im Nährboden angeimpft. Die Versuche zur Anregung der Sporulation wurden wöchentlich auf das Vorhandensein von Fruktifikationsstadien hin untersucht. Zudem wurden Kulturen von CBS (CBS-KNAW, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre) und vom DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) bestellt und als Vergleichskulturen herangezogen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleichskulturen von CBS und DSMZ.

Stammnummer	Wissenschaftlicher Name
CBS 262.85	<i>Allantophomopsis lycopodina</i> (HÖHN.) CARRIS
CBS 398.81	<i>Anthostomella formosa</i> KIRSCHST.
CBS 119219	<i>Camarosporium brabeji</i> M.J. WINGF. & CROUS
DSMZ Nr. 4845	<i>Cenangium ferruginosum</i> FR.
CBS 137.38	<i>Chaetomium elatum</i> KUNZE
CBS 857.68	<i>Chaetomium globosum</i> KUNZE EX FR.
CBS 110433	<i>Chaunopycnis pustulata</i> BILLS, POLISHOOK & J.F. WHITE
CBS 170.58	<i>Crumenulopsis pinicola</i> (REBENT.) J.W. GROVES
CBS 439.82	<i>Diaporthe cotoneastri</i> (PUNITH.) UDAYANGA, CROUS & K.D. HYDE
CBS 200.39	<i>Diaporthe nobilis</i> SACC. & SPEG.
CBS 113201	<i>Diaporthe rudis</i> (FR.) NITSCHKE (Epitype of <i>Diaporthe viticola</i> NITSCHKE)
CBS 336.78	<i>Microsphaeropsis olivacea</i> (BONORD.) HÖHN.
CBS 263.85	<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i> VERKLEY, GÖKER & STIELOW
DSMZ Nr. 63184	<i>Phoma herbarum</i> WESTEND.
CBS 317.33	<i>Rhinocladiella atrovirens</i> NANNF.
CBS 234.83	<i>Trybliopsis pinastri</i> (PERS.) P. KARST.

Tabelle 12: Wachstumsbedingungen zur Identifizierung der Endophyten. Wenn keine Bedingung angegeben ist, fand der Versuch bei Raumtemperatur (RT) statt. Alle OTUs wurden Lichtmikroskopisch untersucht. Ist in der Tabelle ein Feld leer, bedeutet dies, dass keine Vergleichskultur, bzw. Wachstums-, Sporulationsbedingungen, Beschreibung auf Medium oder Literaturangabe vorhanden war.

OTU	Vergleichskultur	Wachstumsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Sporulationsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht)	Beschreibung auf Medium (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Literatur
1	NW-FVA 2467 (<i>S. polyspora</i>) und 2637 (<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> vom JKI)	MEA; 16 °C; dunkel; 10 d	PNA; RT		Sutton und Waterston (1970); Talgø et al. (2010)
2	CBS 336.78	MEA; 15 °C; Weißlicht hell / dunkel; 7 d	OA, PNA; RT		Domsch et al. (1993); Kinsey (2002); Samson et al. (2010)
	DSZM 63184	OA, MEA; 22 °C; dunkel; 7 d	PNA; RT		Crous et al. (2011); Chen et al. (2015); Liu et al. (2015)
6		OA; RT; hell / dunkel; täglich	PNA; RT		Domsch et al. (1993); Minter (2006a, 2006b, 2006c); Samson et al. (2010)
7			MEA; 23-28 °C; UV hell / dunkel	MEA, PDA, RT; 7 d	Fávaro et al. (2011); Samson et al. (2010)
8			PNA; RT		Lindau (1922)
9			PNA; RT		Lundqvist (1972)
10			PNA; RT		Sivanesan und Holliday (1971); Domsch et al. (1993)
11	NW-FVA 3623 und 3624 <i>Truncatella conorum-piceae</i> (aus Brandenburg, leg. und det. P. Heydeck); NW-FVA 2068, 3803		PNA; RT		Tubeuf (1889); Steyaert (1949); Guba (1961); Jeewon et al. (2002)
12			PNA, PBA, PDA, OA, MEA; 20 °C; UV hell / dunkel		Punithalingam (1979, 1990); Gomes et al. (2013)
13			PCA; 22-24 °C; Weißlicht hell / dunkel	PDA, PCA 25 °C, 7 d	Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010)
14		MEA; 20 °C; 10 d	PNA; RT		Arevalo et al. (2009)
		OA; 25 °C; 14 d	PNA; RT		Zare und Games (2003)

OTU	Vergleichskultur	Wachstumsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Sporulationsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht)	Beschreibung auf Medium (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Literatur
16	CBS113201, CBS200.39 CBS439.82		PNA, PBA, PDA, OA, MEA; 20 °C; UV hell / dunkel		Punithalingam (1979, 1990); Gomes et al. (2013)
19			PNA, PBA; RT	MEA	Paul (1971); Shoemaker (1962)
21			PNA; RT		Fournier und Magni (2004a); Petrini und Petrini (2005)
26			PBA; RT		Fournier (2014)
27			PBA; RT		Sivanesan und Holliday (1972); Fournier (2014)
29			SNA; RT	PDA, RT; 7-14 d	Samson et al. (2010)
30			PBA, PNA; RT		Bell und Mahoney (1997)
32			PBA, PNA; RT		Petrini und Müller (1986); Petrini und Rogers (1986); Fournier und Magni (2004b)
34			PBA, PNA; RT		www.pilzbestimmer.de (2017)
35			PBA, PNA; RT		Domsch et al. (1993)
37		OA; RT; hell / dunkel; täglich	PNA; RT		Domsch et al. (1993); Minter (2006a, 2006b, 2006c); Samson et al. (2010)
38			PBA, PNA; RT		Petrini und Petrini (2005); Fournier und Magni (2004c)
41	NW-FVA 2710 (<i>Diaporthe</i> sp.), CBS200.39 CBS439.82		PNA, PDA, OA, MEA; 20 °C; UV hell / dunkel		Punithalingam (1979, 1990); Gomes et al. (2013)
46		OA; RT; hell / dunkel	PNA; RT		Domsch et al. (1993); Minter (2006a, 2006b, 2006c); Samson et al. (2010)
47		PDA; 28 °C; dunkel; 7 d	SNA, SNA & PNA; RT		Weber (2002)
50			PBA; RT		Kirk (1994)
51	CBS 170.58		PNA; RT		Hennebert (1973)
52			PNA; RT		Jong und Rogers (1972); Henriques et al. (2014); Henriques et al. (2015)
57			PNA, OA, PDA; RT		Kliejunas (1985); Domsch et al. (1993)

OTU	Vergleichskultur	Wachstumsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Sporulationsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht)	Beschreibung auf Medium (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Literatur
59			PNA; RT	MEA	Greenhalgh und Chesters (1968); Rogers et al. (2002); Ju und Rogers (1996)
60		PDA; 28 °C; dunkel; 7 d	SNA, SNA & PNA; RT		Weber (2002)
61			PNA; RT		Brady (1979)
63			PNA; RT		Kirk (1991)
67	CBS 119219		PNA; RT		Marincowitz et al. (2008)
68			PBA, PNA; RT		Arx (1981)
69			PBA, PNA; RT		Arx (1975); Stichgel et al. (2002)
71		PDA, SNA; 25 °C, 35 °C; dunkel; 3 d	PDA; 30 °C; dunkel		Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010); Samuels et al. (2015)
73			PNA; RT	MEA	Greenhalgh und Chesters (1968); Collado et al. (2001)
74			PBA, PNA; RT		Breitenbach und Kränzlin (1984); Arx (1981)
75		OA; 20 °C; 8-11 d	PNA; RT	OA nach 2 bzw. 4 Wochen	Minter (2006d); Stadler et al. (2014)
77		OA; 20 °C; 6-8 d	PNA; RT	OA nach 2 bzw. 4 Wochen	Rogers et al. (2002); Stadler et al. (2014)
78		PDA; 28 °C; dunkel; 7 d	SNA, SNA & PNA; RT		Kokaew et al. (2011); Ivanová et al. (2016)
80		MEA; 20 °C; 10 d	PNA; RT		Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010)
81			PCA; 22-24 °C; Weißlicht hell / dunkel	PDA, PCA 25 °C, 7 d	Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010)
85			PBA, PNA, PCA; Weißlicht hell / dunkel	PDA, PCA 25 °C, 7 d	Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010)
86		MEA; RT; hell / dunkel; 7 d	PNA; RT	PDA, MEA	Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010)
89		MEA; RT; 7 d, 10 d	MEA; RT		Rappaz (1987)
93			PBA, PNA; RT		
94		MEA; RT; dunkel; 7 d	PNA; RT		Samson et al. (2010)
95		SNA; 25 °C; dunkel; 7 d	PNA; RT	PDA, 14 d	Schubert et al. (2007)
		PDA; 25 °C; dunkel; 14 d	PNA; RT		Schubert et al. (2007)

OTU	Vergleichskultur	Wachstumsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Sporulationsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht)	Beschreibung auf Medium (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Literatur
96			PNA; RT		Mirza und Cain (1969); Lundqvist (1972); Arx (1981)
97			PDA, OA, MEA; RT		Crous und Groenewald (2013)
98		OA, MEA; RT; hell / dunkel; 10 d	OA; 18 °C; UV hell / dunkel	MEA	Verkley et al. (2014)
99			PNA; RT		Chesters und Greenhalgh (1964); Fournier und Magni (2004a)
101			PNA; RT	PDA, MEA	Greenhalgh und Chesters (1968); Hawksworth (1972); Rogers et al. (2002); Ju und Rogers (1996)
102			PNA; RT		Bernichia und Gorjón (2010)
104		OA; 20-22 °C; 7 d	PNA; RT		Boerema und Dorenbosch (1973); Samson et al. (2010)
105		MEA; 23 °C; hell / dunkel; 15 d	PNA; RT		Petrini und Rogers (1986)
106			MEA; PDA; RT	MEA, 28 d	Diederich et al. (2007); Lawrey et al. (2012)
107		MEA; RT; 7 d	MEA; RT	MEA	Lundqvist (1972); Hilber und Hilber (1979); Chang und Wang (2005)
108			PDA, OA, MEA; 22 °C; UV hell / dunkel		Arenal et al. (2007); Kruys et al. (2006); Domsch et al. (1993)
109			PNA; RT	PDA	Samuels und Hallett (1983)
110		OA, MEA; 18 °C; UV hell / dunkel; 7, 10, 14, 16, 21 d	OA, PNA, PBA; 18 °C; UV hell / dunkel	OA	Verkley (1999)
111			PNA; RT		Meyer und Gams (2003)
112			PBA, PNA; RT		Zhao et al. (2016)
113			PBA, PNA; RT		
114		MEA, PDA; 23 °C; Weißlicht hell / dunkel, 7 d	WA mit steril Kiefern-Nadel; 25 °C; UV hell / dunkel		Rossmann et al. (2008); Sogonov et al. (2008)
		PDA, 25 °C; UV hell / dunkel; 7 d			Rossmann et al. (2008); Sogonov et al. (2008)
115	CBS 262.85		PNA; RT	OA, PDA	Crous et al. (2014)

OTU	Vergleichskultur	Wachstumsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Sporulationsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht)	Beschreibung auf Medium (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Literatur
116			PNA; RT		Samson et al. (2010)
117	CBS 263.85	OA; RT; hell / dunkel; 10 d	OA; 18 °C; UV hell / dunkel		Verkley et al. (2014)
118			PNA; RT		Hughes (1958); Guba (1961)
119		PDA, 25 °C; UV; dunkel; 7 d	PNA; RT		Guba (1961)
120		OA, MEA; 18 °C; UV hell / dunkel; 7, 10, 14, 16, 21 d	OA, PNA, PBA; 18 °C; UV, hell / dunkel	OA	Verkley (1999)
121			PNA; RT		Punithalingam (1979, 1990); Gomes et al. (2013)
122	NW-FVA 34 (<i>Apiognomonia</i> sp.) und 2322 (<i>Fusicoccum</i> sp.)	MEA, MYP, PDA; 23 °C; hell / dunkel; 14 d	PNA; RT		Monod (1983); Sogonov et al. (2007)
123		OA, MEA; 18 °C; UV hell / dunkel; 7, 10, 14, 16, 21 d	OA, PNA, PBA; 18 °C; UV hell / dunkel	OA	Verkley (1999); Yuan und Verkley (2015)
124		OA, MEA; 18 °C; UV hell / dunkel; 7, 10, 14, 16, 21 d	OA, PNA, PBA; 18 °C; UV hell / dunkel	OA	Verkley (1999)
125		OA, MEA; 18 °C; UV hell / dunkel; 7, 10, 14, 16, 21 d	OA, PNA, PBA; 18 °C; UV hell / dunkel	OA	Verkley (1999)
126		MEA, MYP, PDA; 23 °C; hell / dunkel; 14 d	PNA; RT		Sogonov et al. (2007)
127		MEA, MYP, PDA; 23 °C; hell / dunkel; 14 d	PNA; RT	PDA 7 d	Strømeng und Stensvand (2011)
128			PNA; RT		Guba (1961)
129			PNA; RT		Levine (1914)
130			PNA; RT		Domsch et al. (1993)
131			PNA; RT		Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010)

OTU	Vergleichskultur	Wachstumsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Sporulationsbedingungen (Medium; Temperatur; Licht)	Beschreibung auf Medium (Medium; Temperatur; Licht; Dauer)	Literatur
132			PNA; RT		Kruys et al. (2006); Arenal et al. (2007); Domsch et al. (1993)
133			PNA; RT		Domsch et al. (1993)
134			PNA; RT		Schelchte (1986)
135			PNA; RT		Domsch et al. (1993)

2.6 Untersuchungen zu ausgewählten Endophyten

Bereits abgestorbene, braune Zweige wurden äußerlich mit einer weichen Bürste gereinigt und in einer sogenannten „feuchten Kammer“ bei Raumtemperatur inkubiert (Abbildung 18). Das Probematerial wurde dabei in eine große Glaspetrischale (Durchmesser 20 cm) auf ein angefeuchtetes Filterpapier ausgelegt und für einige Tage inkubiert. Anschließend wurden mit einem Binokular (ZEISS STEMI SV8) Fruchtkörper von *S. sapinea* gesucht und durch Messung der Sporen unter dem Lichtmikroskop (AXIOSTAR PLUS, ZEISS) bestätigt. Von mikroskopischen Merkmalen wurden Fotos angefertigt (CANON POWERSHOT A649).



Abbildung 18: Kiefernzweige in der feuchten Kammer.

2.6.1 Temperaturversuche

Um die Optimal-, Kardinal-, Minimal-Temperatur zu bestimmen, wurden vier verschiedene *S. sapinea*-Stämme, *Sydowia polyspora*, *Microsphaeropsis olivacea*

und *Truncatella conorum-piceae* auf MYP-Medium bei unterschiedlichen Temperaturregimen im Thermoschrank inkubiert und ihr Myzelwachstum dokumentiert (Tabelle 13, Juli 2016). Die Optimaltemperatur ist die Temperatur, bei welcher der entsprechende Pilz sein größtes Koloniewachstum aufweist. Die Minimaltemperatur ist charakterisiert als die kälteste Temperatur, bei der der Pilz noch physiologische Aktivität zeigt. Kardinaltemperatur ist die höchste Temperatur die der Pilzstamm ertragen kann. Zur Durchführung wurden 19 Thermoschränke verwendet (siehe Tabelle 14). Das Wachstum der Pilze wurde bei 18 verschiedene Temperaturstufen untersucht.

Die Inokula wurden vom Rand einer jeweils 7 Tage alten Kultur gewonnen. Die Tests wurden in 5-facher Wiederholung durchgeführt. Das Myzelwachstum wurde entlang zweier Achsen nach 1, 2, 4 und 7 Tagen gemessen. Das Wachstum der Kulturen wurde nicht täglich bestimmt, da angenommen wurde, dass bei Pilzen keine Beschleunigung des Wachstums mit der Zeit stattfindet. Dies haben Brancato und Golding (1953) in Experimenten mit Arten der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* nachgewiesen. Es kamen, die in Tabelle 13 aufgelisteten Pilzstämme zur Verwendung.

Tabelle 13: Für die Temperaturuntersuchungen verwendete Isolate aus Zweigen von *P. sylvestris*.

NW-FVA Nr. / Art	Probenherkunft	Material für die Isolierung
2703 / <i>S. sapinea</i>	TH07 (Thüringen / Illmenau)	Aus gesundem Gewebe
2738 / <i>S. sapinea</i>	Pfungstadt PF59 (Hessen)	Aus Pyknidien von erkranktem Gewebe
2740 / <i>S. sapinea</i>	Pfungstadt PF59 (Hessen)	Aus erkranktem Gewebe
2715 / <i>S. sapinea</i>	BW03 (Mannheim / Baden-Württemberg)	Aus gesundem Gewebe
2201 / <i>S. polyspora</i>	Wetzlar (Hessen)	Aus erkranktem Gewebe
2202 / <i>M. olivacea</i>	Wetzlar (Hessen)	Aus erkranktem Gewebe
2215 / <i>Truncatella conorum-piceae</i>	Wetzlar (Hessen)	Aus erkranktem Gewebe

Tabelle 14: Gemessene Temperaturen der verwendeten Thermoschränke zur Ermittlung des Wachstums verschiedener Pilzstämmen; Minimum, Maximum, Mittelwerte und Schwankungen der Temperaturen in °C, während der zweiwöchigen Versuchsreihe. * Ergebnisse dieser Thermoschränke wurden nicht verwendet, auf Grund zu großer Schwankungen.

NR	Thermoschränke	Minimum	Maximum	Mittelwert	Schwankungen
1*	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	28	30,6	30,0	2,6
2*	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	20,2	23,2	21,3	3
3	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	28,4	29,1	28,8	0,7
4	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	24,3	26,3	25,4	2
6*	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	25,9	29,7	27,7	3,8
7	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	21	22,1	21,6	2,1
8	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	35,4	36,1	35,7	0,7
9	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	8,1	9,2	8,8	0,9
10	Klimaprüfschrank, Rumed, Typ 4000	11,5	13,1	12,3	1,6
11	Kühlschrank, Liebherr, Premium BioFresh	-0,6	1	0,3	0,4
12	Brutschrank, Memmert, Typ BKE 30	27,9	28,1	27,9	0,2
13	Universalschrank, Memmert, Typ UM 700	45,0	45,2	45,2	0,2
14	Kühlbrutschrank, Memmert, ICE 500	30	30,4	30,3	0,4
15	Präzisionsprüfschrank, Rumed, P530	11,9	12,2	12,0	0,3
16	Präzisionsprüfschrank, Rumed, P530	7,8	8	7,9	0,2
17	Brutschrank, Memmert, Typ BKE 30	26,8	27	26,9	0,2
18	Universalschrank, Memmert, Typ UM 700	39,7	40,1	39,9	0,3
19	Kühlbrutschrank, Memmert ICE 500	26	26,2	26,1	0,2

2.6.2 VC-Test mit verschiedenen *S. sapinea*-Stämmen

Um die vegetative Kompatibilität verschiedener *S. sapinea*-Stämme zu testen, wurden sogenannte VC-Tests durchgeführt. Für einen VC-Test wurden jeweils Inokula von 12 *S. sapinea*-Stämmen paarweise in eine Petrischale geimpft (Abbildung 19). Die Inokula wurden von der Wachstumszone einer jeweils 7 Tage alten Kulturen überimpft. Die Tests wurden so angelegt, dass jeder Stamm mit jedem gepaart wächst und als Kontrolle jeder Stamm gegen sich selbst. Die Petrischalen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei und nach vier Wochen wurden die Tests auf das Vorhandensein von „Barrage-Linien“ kontrolliert. Dabei war das Erkennen dieser Linien nicht immer einfach (Abbildung 19).

Die verwendeten *S. sapinea*-Stämme wurden von der Untersuchungsfläche Pfungstadt 59 aus einer an *Diplodia*-Triebsterben erkrankten Waldkiefer isoliert. Dazu wurden *S. sapinea*-Isolate aus zwei geschädigten Zweigstücken (2016-PF59-1-1 und 1-2) endophytisch gewonnen. Aus dem Ast 2016-PF59-1-1 wurden 29 *S. sapinea* Stämme isoliert, aus dem zweiten Ast 2016-PF59-1-2 wurden 16 *S. sapinea*-Stämme für den VC-Test gewonnen.

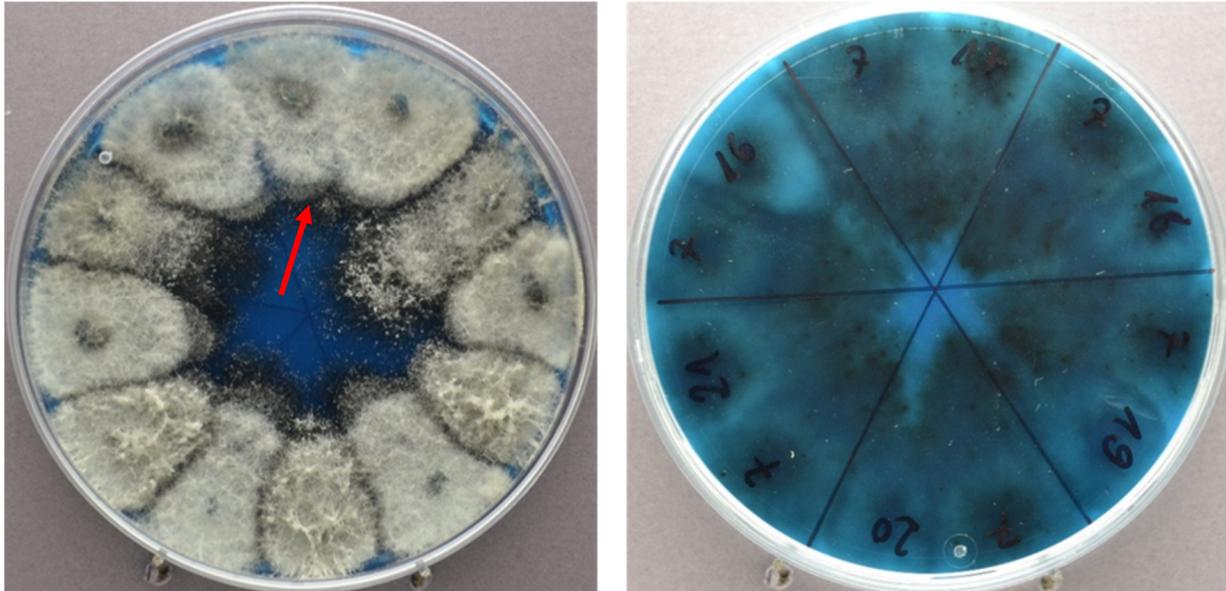


Abbildung 19: VC-Test mit 12 *S. sapinea*-Stämmen aus einem Zweig (PF59), inkubiert auf mit Bromkresolgrün versetztem MYP-Nährmedium, Vorder- und Rückseite der Petrischale, nach 2 Wochen Inkubation bei Raumtemperatur; kompatible Stämme (D7-D17, roter Pfeil).

2.6.3 Antagonistentests mit *S. sapinea* und Endophyten

Um zu prüfen, ob es potentielle Antagonisten gegenüber *S. sapinea* unter den isolierten Endophyten gibt, wurden Antagonistentests durchgeführt. Die *S. sapinea*-Stämme für die Antagonistentests wurden aus einer Probestfläche in Südhessen isoliert (Pfungstadt). Auf der aktuell vom *Diplodia*-Triebsterben befallenen Fläche wurden im Sommer 2015 Probezweige von *P. sylvestris* gewonnen. *S. sapinea* wurde endophytisch aus dem erkrankten Kiefernast isoliert (Stammnummer NW-FVA 2740). Weiterhin wurde aus Konidien von *S. sapinea* eine Reinkultur gewonnen (NW-FVA 2738).

Für den Antagonistentest wurden jeweils in eine Petrischale (Durchmesser 9 cm) mit MYP-Medium an eine Seite ein *S. sapinea*-Stamm gesetzt und an die gegenüberliegende Seite der Petrischale ein isolierter Kiefernendophyt, um ihr Wachstum und Wuchsverhalten bestimmen zu können (Abbildung 20, rechts). Beide Inokula wurden von der Wachstumszone einer 7 Tagen alten Kulturen überimpft. Wie in Abbildung 20, Mitte, zu sehen ist wurden zwei Inokula des gleichen Pilzes an die gegenüberliegenden Seiten einer Petrischale gesetzt und wuchsen für 7 Tage gegeneinander. Zusätzlich wuchs *S. sapinea* sowie auch der Endophyt jeweils alleine in einer Petrischale (Abbildung 20, links).

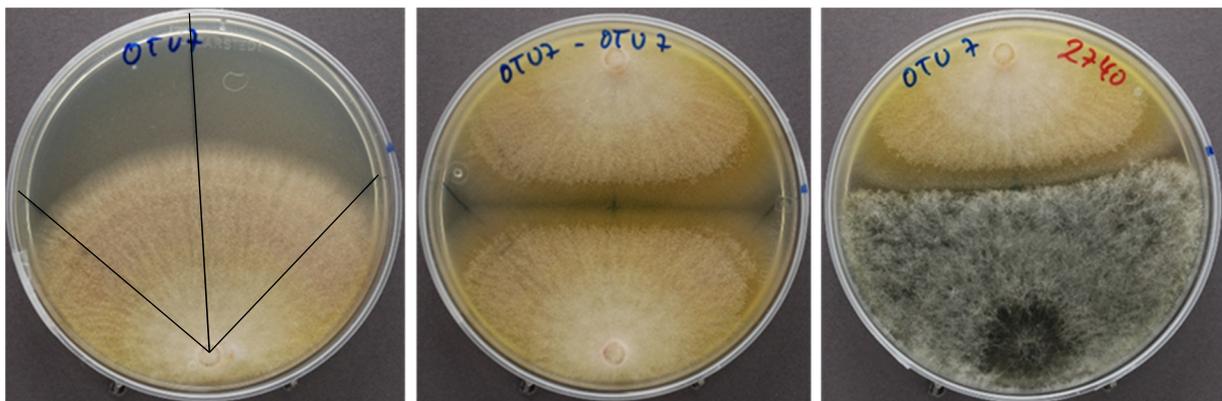


Abbildung 20: Wuchsverhalten der Pilzkulturen im Antagonistentest (von links nach rechts): Endophyt (OTU7, *Epicoccum nigrum*) allein, Endophyt gegen sich selbst und Endophyt gegen *S. sapinea*-Stamm; auf MYP-Medium, nach 10 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur.

Um nicht nur die Größe der Kultur messen zu können, sondern auch ihre Verformung zu dokumentieren, wurde das Wachstum der Pilzkulturen an drei Achsen in der Petrischale (Zentral, rechte und linke Achse; Abbildung 20, links) nach 7 Tagen gemessen (Methode nach Santamaría et al. 2007). Von allen Petrischalen wurden Fotos angefertigt, sowie die Kombination Endophyt - *S. sapinea* beschrieben. Dabei wurde jede Paarung folgendermaßen kategorisiert: Formveränderung von *S. sapinea*; Barragebildung zwischen *S. sapinea* und Endophyt; Endophyt überlagert *S. sapinea*; Endophyt wird von *S. sapinea* überlagert.

Die Versuche mit *S. sapinea* und dem endophytischen Pilz wurden jeweils dreimal wiederholt. Insgesamt belief sich die Anzahl der Versuchsansätze damit auf 724 (89 x 3 Endophyten x *S. sapinea* NW-FVA 2740, 89 x 3 Endophyten x *S. sapinea* NW-FVA 2738, 89 x Endophyt gegen sich selbst, 89 x Endophyt alleine, 3 x *S. sapinea*

NW-FVA 2740 alleine, 3 x *S. sapinea* NW-FVA 2740 gegen sich selbst, 3 x *S. sapinea* NW-FVA 2738 alleine, 3 x *S. sapinea* NW-FVA 2738 gegen sich selbst).

2.6.3.1 Zellophan-Versuch

Der Zellophan-Versuch bzw. die „cellophane overlay“ Technik wurde nach der Methode von Dennis und Webster (1971) durchgeführt. Dazu wurde ein rundes Cellulosehydrat (Cellophane®) oder auch Zellglas genanntes Kunststoffgewebe in ein Becherglas mit Leitungswasser gegeben und 2-mal autoklaviert. Das Zellophan wurde in eine Petrischale mit Nährmedium (MYP) platziert. Das Zellophan trocknete zunächst in der Sterilwerkbank für ca. 30 min. Dann wurde der Antagonist mittig auf dem Zellophan platziert und entweder 2 Tage (*Trichoderma* sp. (OTU71) und *Sordaria fimicola* (OTU9)) oder 3 Tage (*Chaetomium* sp. 2, *Alternaria* sp., *Pezicula eucrita* und *Pezicula neosporulosa*), je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird angenommen, dass die Ausscheidungen des Antagonists durch das Zellophan das Wachstum von *S. sapinea* hemmen. Der Versuch wurde mit fünf Wiederholungen mit einer Auswahl an Pilzstämmen durchgeführt, die in dem zuvor durchgeführten Antagonistentest eine hemmende Wirkung auf *S. sapinea* zeigten (siehe Kapitel 2.7.3). Das Zellophan mit der Pilzkultur wurde anschließend entfernt und *S. sapinea* wurde mittig auf dem Nährboden in derselben Petrischale angeimpft. Nach 3 Tagen wurde das Wuchsverhalten von *S. sapinea* kontrolliert und an zwei Achsen in der Petrischale gemessen. Aus den Messergebnissen wurde ein arithmetischer Mittelwert gebildet. Es sollte geprüft werden, ob gegebenenfalls in das Medium diffundierte Substanzen des Endophyts *S. sapinea* hemmen. Der Versuch wurde mit folgenden Pilzstämmen durchgeführt: *S. sapinea* (NW-FVA 2740), *Sordaria fimicola* (OTU9), *Chaetomium* sp. 2 (OTU46), *Trichoderma* sp. (OTU71), *Alternaria* sp. (OTU81), *Pezicula eucrita* (OTU110) und *Pezicula neosporulosa* (OTU123). Zeitgleich wuchs *S. sapinea* auf dem gleichen Nährmedium ohne und mit vorheriger Inkubation eines Zellophans. Diese Varianten dienten dazu, das Wuchsverhalten von *S. sapinea* mit vorangegangener Inkubation des Antagonisten bzw. des Zellophans und ohne Wirkung des Antagonisten bzw. des Zellophans vergleichen zu können.

2.6.3.2 Hypheninteraktion in vitro

Um zu prüfen, wie der Antagonist *in vitro* gegen *S. sapinea* wirkt, wurden Versuche zum Wuchsverhalten durchgeführt.

In diesem Versuch wurde beobachtet, wie sich der potentielle Antagonist (endophytischer Pilz *Chaetomium* sp. 2 (OTU46), *Trichoderma* sp. (OTU71), *Alternaria* sp. (OTU81), *Pezicula eucrita* (OTU110) und *Pezicula neosporulosa* (OTU123)) in einer Petrischale auf das Wuchsverhalten bzw. die Hyphen von *S. sapinea* auswirkt. Dazu wurde ein steriler Objektträger in eine Petrischale gelegt und dünn mit MYP-Medium begossen. Nach einer Woche wurde an jede Seite des Objektträgers ein Pilzinokulum gesetzt. Nach 4 Tagen wurde ein Foto angefertigt und nach 4, 7 und 10 Tagen der Übergang (roter Kasten, Abbildung 21) mikroskopiert. Hier wurde auf Veränderung der Hyphen von *S. sapinea* geachtet.

Um die Hyphen von *Trichoderma* sp. und *S. sapinea* unter dem Mikroskop unterscheiden zu können, wurde die zu mikroskopierende Stelle mit Baumwollblau (bestehend aus: 20 g Phenol (MERCK), 20 g Milchsäure (FLUKA), 40 g Glycerin (SIGMA-ALDRICH), 0,05 g Baumwollblau (SIGMA-ALDRICH) und 20 ml Aqua demin.) angefärbt (Kriegelsteiner und Kaiser 2000).

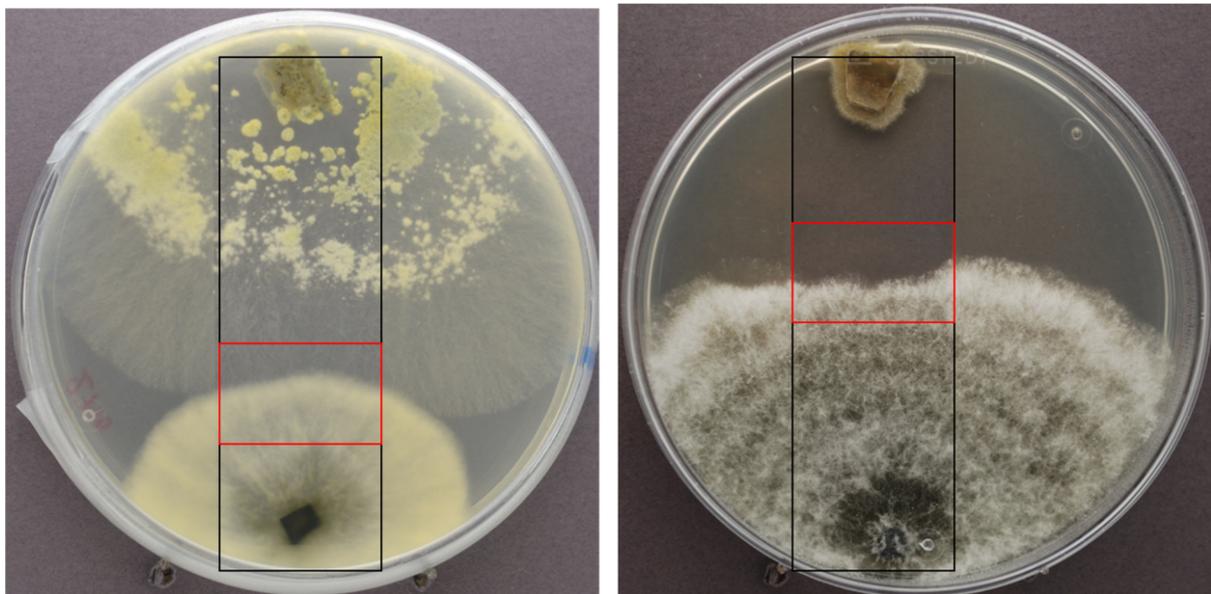


Abbildung 21: Test zur Hypheninterferenz; links OTU71 (*Trichoderma* sp., oben) und *S. sapinea* (unten) nach 4 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur (Rückansicht), rechts OTU110 (*Pezicula eucrita*, oben) und *S. sapinea* (unten) nach 7 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur; rot markiert ist der Bereich, der nach verschiedenen Zeiten mikroskopisch untersucht wurde.

2.7 Datenanalyse

Zur Berechnung der Diversitätsindices (H' Shannon und E Eveness) an verschiedenen Standorten, Jahreszeiten, usw. wurden die erhobenen Daten mit der Statistiksoftware R (<https://www.r-project.org>) und dem Paket *Vegan* (Oksanen et al. 2016) ausgewertet. Artenakkumulationskurven (Colwell und Coddington 1994) und Artenschätzungsmodelle (Chao et al. 2005) wurden mit dem Paket *Vegan* berechnet. Die Schätzung der nicht gefundenen Arten wurde ebenfalls mit dem Paket *Vegan* berechnet. Dabei kamen verschiedene Modelle zum Einsatz: CHAO (Chao 1987; Chiu et al. 2014) JACKKNIFE, BOOTSTRAP (Smith und van Belle 1984).

Mit Ordinationen wurde versucht, die Artenverteilung entlang des Transekts zu beschreiben. Ordinationen des erhobenen Endophytenvorkommens und der Umweltparameter wurden mit der Statistiksoftware R und dem Paket *CA* (Greenacre et al. 2016) durchgeführt. Dazu wurde zuerst eine Korrespondenzanalyse (CA = correspondence analysis und DCA = Detrended correspondence analysis) erstellt. Beide Verfahren entwickeln einen indirekten Gradienten. Jede Ordinationsachse hat einen Eigenwert (Eigenvalue), der als Maß für die Auftrennung der Artwerte entlang der Achse gesehen wird. Werte von 0,5 werden in der Literatur als günstig angegeben.

Weiterhin wurde das Programm *iNEXT* (Hsieh et al. 2013) zur Analyse des Stichprobenumfangs verwendet.

Die Karten wurden mit *QGIS* (Version 2.6.0, www.qgis.org) erstellt.

Mit den ITS-Sequenzen wurde ein Suchlauf mit Hilfe der *BLAST*-Funktion (Basic Local Alignment Search Tool, Zhang et al. 2000) in der *NCBI* (National Center for Biotechnology Information) -Datenbank durchgeführt.

Phylogenetische Berechnungen zu den ITS-Sequenzen wurden mit dem Programm *MEGA* (Version 6) errechnet (Tamura et al. 2013). Als Alignment Programm wurde *MULTALIN* verwendet (Corpet 1988).

3. Ergebnisse

3.1 Schadenskartierung

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Kiefernbeständen sind in folgender Reihenfolge dargestellt:

- Systematische Beprobung entlang des Transekts
- Beprobungen mit Verdacht auf oder vorherigem Befalls mit *Diplodia*-Triebsterben und entsprechende Nullflächen, von Nord nach Süd
- Beratungsfälle der NW-FVA

Es werden Ergebnisse hinsichtlich der Schadensfälle des *Diplodia*-Triebsterbens, zum Vorkommen der Mistel und des Wurzelschwamms, sowie zu auffälligen Endophytenvorkommen dargestellt.

Systematische Beprobung

An keinem der 91 untersuchten Probepunkte entlang des Transekts wurden im Zuge der Probennahme im Sommer 2015 Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens festgestellt. *S. sapinea* wurde in den untersuchten Kiefernzweigen endophytisch in unterschiedlichem Umfang isoliert (Abbildung 22). An 12 Probepunkten konnte aus den untersuchten Kiefernzweigen kein *S. sapinea* isoliert werden. An den anderen Probepunkten variierte das endophytische Vorkommen von *S. sapinea* zwischen 1 - 68 % RH. Elf der Probepunkte lagen über 400 m über NN. An diesen höher gelegenen Standorten wurde *S. sapinea* tendenziell mit einer geringeren relativen Häufigkeit isoliert. Der Korrelationswert nach Bravais und Pearson zwischen Höhe über NN des Probepunkts und der RH von *S. sapinea* lag bei - 0,3.

Sydowia polyspora (OTU1) wurde an jedem der 91 Probepunkte festgestellt, *Microsphaeropsis olivacea* (OTU2) an nur zwei Probepunkten nicht (ST06, BB12). *Truncatella conorum-piceae* (OTU11) wurde an 90 der 91 Probepunkte endophytisch detektiert, mit einer RH zwischen 1 - 53 %. Auffällig war das gehäufte Vorkommen von *Desmazierella acicola* (OTU34) an den Probepunkten in Brandenburg. Dort wurde *D. acicola* an allen 20 Probepunkten festgestellt mit einer RH zwischen 4 - 64 %. Weiterhin wurde *Gnomoniaceae* sp. (OTU114) an 40 der 91 Probepunkte endophytisch aus Kiefertriebsegmenten isoliert, mit einer relativen Häufigkeit zwischen 1 - 44 %.

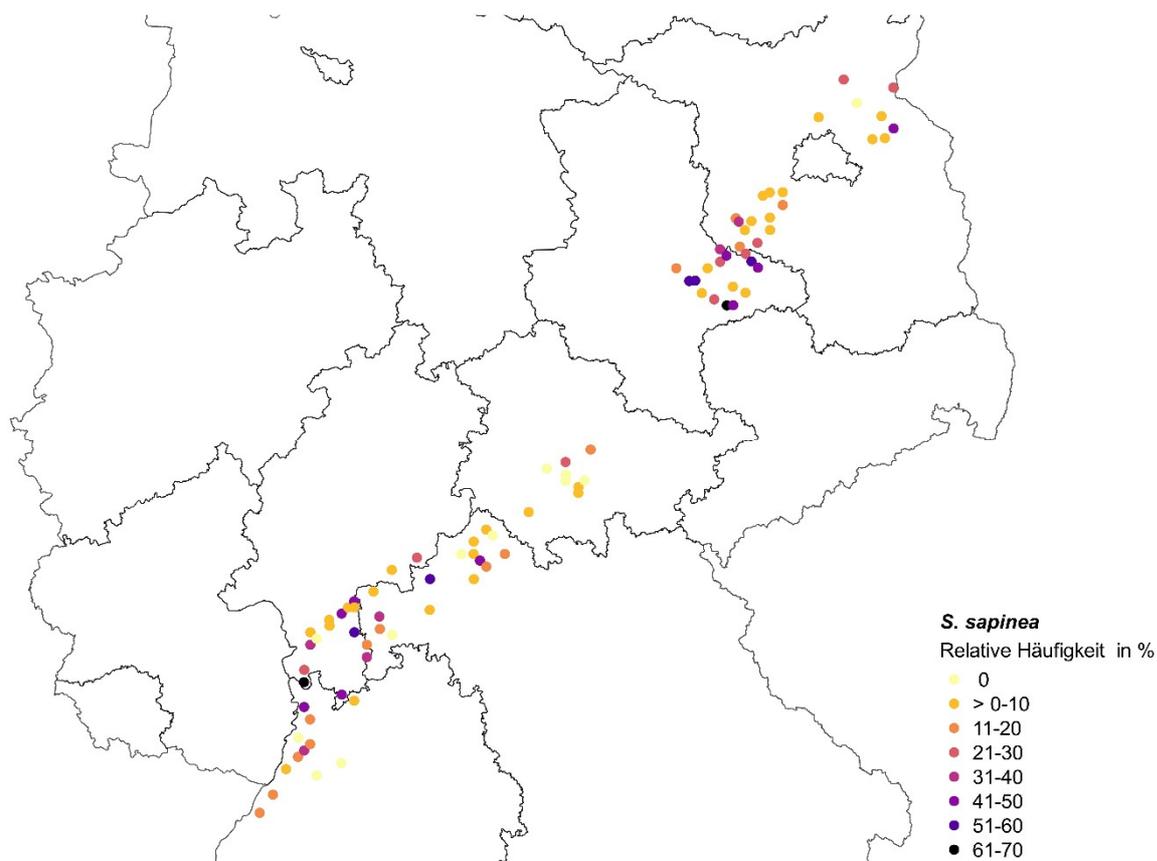


Abbildung 22: Endophytisches Vorkommen von *S. sapinea*-Stämmen in gesunden Zweigproben, relative Häufigkeit in Prozent, an 91 Probepunkten; Hintergrund ©GeoBasis-DE/BKG 2013.

Tabelle 15: Endophytischer Nachweis von *S. sapinea* in den 91 untersuchten Kiefern an den 91 Probepunkten entlang des Transekts, Probennahme erfolgte im Sommer 2015, je Punkt wurde ein Baum untersucht, Standorte siehe Abbildung 11.

	Anzahl Probepunkte	RH von <i>S. sapinea</i> endophytisch in %	Anzahl untersuchter Triebsegmente
Brandenburg	20	14	1580
Sachsen-Anhalt	18	32	1572
Thüringen	9	6	724
Bayern	15	14	1152
Hessen	16	25	1227
Baden-Württemberg	13	18	1025
Summe	91	-	7270

Bei der Probennahme an 91 WZE-Standorten wurde auch das Vorkommen der Fruchtkörper des **Wurzelschwamms** erhoben. An 30 der 91 Standorte wurden Fruchtkörper des Wurzelschwamms an Baumstubben nachgewiesen (Abbildung 23). Dabei zeigte sich ein verstärktes Vorkommen auf den Flächen in Südhessen und Baden-Württemberg.

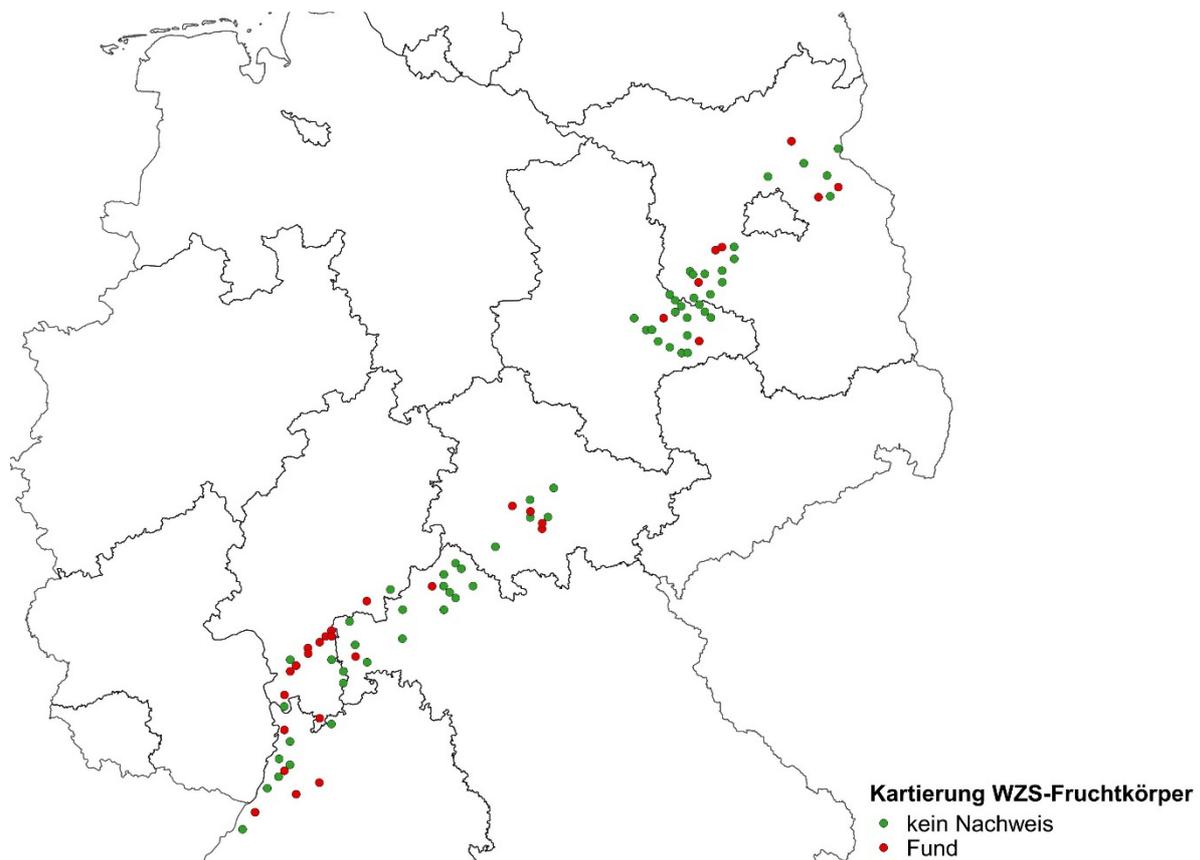


Abbildung 23: Kartierung der Fruchtkörper des Wurzelschwamms an Kiefernstubben, an 91 WZE-Punkten, Hintergrund ©GeoBasis-DE/BKG 2013.

Die Untersuchungen zum Vorkommen der **Kiefernmistel** entlang des Transekts zeigten, dass die Kiefernmistel auf 25 der 91 Probepunkte vorhanden war (Abbildung 24). An den Probepunkten in Bayern und Thüringen wurde keine Mistel an Kiefer beobachtet. In Hessen und Baden-Württemberg war die stärkste Intensität des Mistelbefalls festzustellen (Abbildung 24). Ein weiterer Verbreitungsschwerpunkt zeigte sich im Gebiet der Altmark / Fläming im Grenzbereich zwischen Sachsen-Anhalt und Brandenburg, dort kam die Mistel aber in geringerer Intensität vor.

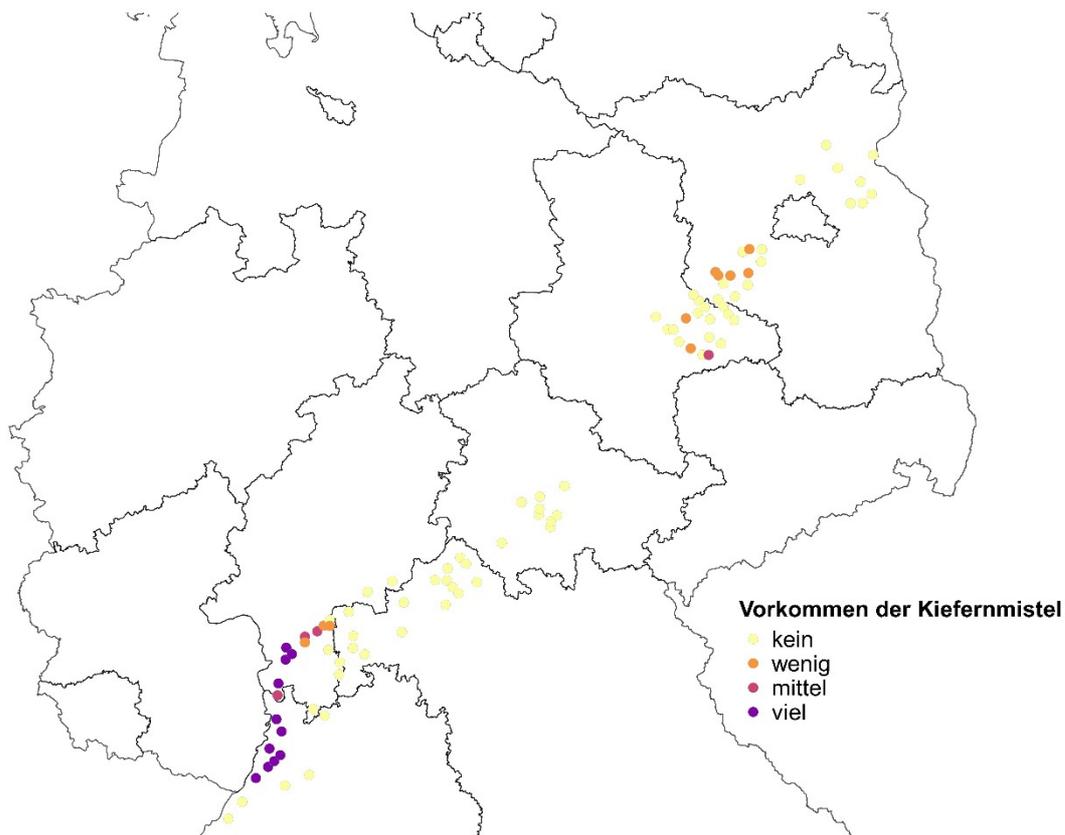


Abbildung 24: Kartierung des Mistelvorkommens an der Waldkiefer, (siehe Tabelle 6) an 91 WZE Punkten; Hintergrund ©GeoBasis-DE/BKG 2013.

Beprobungen mit Verdacht auf oder mit vorherigem Befall mit *Diplodia*-Triebsterben und entsprechende Nullflächen (von Nord nach Süd)

Im Folgenden werden die untersuchten Flächen hinsichtlich des Schadgeschehens charakterisiert, dabei werden nicht alle isolierten Endophyten genannt, sondern nur auffällige Ergebnisse dargestellt. Die vollständige Übersicht über alle isolierten Endophyten findet sich im digitalen Anhang.

Weder auf den Untersuchungsflächen in den Kiefernreinbeständen in **Prezelle** (Niedersachsen), noch auf der Untersuchungsfläche **Schlaubetal** (Brandenburg) zeigten sich, nach einem Fraß des Kiefernspinners (*Dendrolimus pini* L.) bzw. der Nadelscheidengallmücke (*Thecodiplosis brachyntera*), im Beobachtungszeitraum (2014 - 2016) Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens. Endophytisch wurde *S. sapinea* in den 10 untersuchten Kiefern auf der Untersuchungsfläche Schlaubetal mit einer RH von 5 % nachgewiesen. Auffällig war, dass rund 50 % der Triebsegmente mit Schimmelpilzen verunreinigt waren. *S. polyspora* (OTU1) und *Truncatella conorum-*

piceae (OTU11) traten jeweils mit einer RH von rund 20 % auf. Auf der Untersuchungsfläche Prezelle trat *S. sapinea* (endophytisch) mit einer RH von rund 4 % auf. Das gehäufte Vorkommen von *Truncatella conorum-piceae* mit einer RH von rund 80 % war bemerkenswert.

In **Bad Freienwalde** (FW650, Brandenburg) einem ca. 80-jährigen Kiefernbestand mit Buche und Traubenkirsche im Unterstand wurden Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens, sowie *S. sapinea* als Pathogen nachgewiesen werden. Als vitalitätsmindernder Faktor geht vermutlich die Kuppenlage des Bestandes mit einer angespannten Wasserversorgung einher. Hinzu kommt ein ausgeprägter Mistelbefall der Kiefern. Die untersuchten Kiefern mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens (FW650) wiesen eine deutlich erhöhte endophytische Besiedlung mit *S. sapinea* auf, bis zu 60 % der Triebsegmente waren von dem Pilz besiedelt. In dem Bestand FW650 (90-jährig mit Eiche im Oberstand und vereinzelt Laubbäumen im Unterstand) wuchs hingegen aus < 2 % der Triebsegmente *S. sapinea* aus. Drei Pilze (*S. polyspora*, *M. olivacea* und *Truncatella conorum-piceae*) konnten von jedem der 6 untersuchten Bäume isoliert werden. Gehäuft kam noch *D. acicola* vor (zwischen 1-16 % relative Häufigkeit pro Kiefer), *Biscogniauxia mediterranea* (OTU52) konnte an 9 von 12 Kiefern mit einer RH unter 3 % isoliert werden. Aus den Zweigen von Kiefern der beiden Untersuchungsflächen FW650 und FW312 konnten jeweils insgesamt 23 verschiedene OTUs isoliert werden. In Bad Freienwalde (FW650) wurde in allen sechs Prohebäumen die Nebenfruchtform des Wurzelschwamms nachgewiesen werden (Tabelle 16). In dem erkrankten Untersuchungsbestand (FW650) war die Mistel ebenfalls vorhanden. 30 % der Kiefern des Bestandes wiesen einen Mistelbesatz auf, der einen durchschnittlichen Anteil von 15 % an der Kiefernkrone ausmachte. Auf der dazugehörigen Nullfläche (FW312) wurde ebenfalls bei 30 % der Kiefern ein Mistelbefall festgestellt, mit einem Anteil von durchschnittlich 5 % an der Kiefernkrone.

In **Lüderitz** (LU4451, Sachsen-Anhalt), einem reinen Kiefernbestand (110-jährig), ist als krankheitsauslösender Faktor für das *Diplodia*-Triebsterben ein starker Hagelschlag im Juni 2013 identifiziert worden. Die exponierte Lage in einer Feldmark und die vielen Bestandesränder verstärkten das Schadgeschehen, da Bestandesränder besonders stark besonnt werden. Die untersuchten Kiefern mit und ohne Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens wiesen eine hohe endophytische Besiedlung mit *S. sapinea* auf (zwischen 33-90 %). Auch auf der Untersuchungsfläche

Lüderitz war kein Verteilungsmuster des Wurzelschwamm-vorkommens zu erkennen (Abbildung 26). Aus den Zweigen von Kiefern mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens konnten insgesamt 32 OTUs isoliert werden, aus denen von vitalen Kiefern hingegen nur 18 verschiedene OTUs.

Auf der Untersuchungsfläche in **Pfungstadt** (PF59, Hessen) mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens spielen viele verschiedene, die Kiefer schwächende Faktoren eine Rolle: die Lage im Oberrheingraben, Grundwasserabsenkung (NW-FVA 2013), trockener Standort (Bodenart: Sand über sandigem Sand, Skelett < 5 %, sehr tiefgründig), starker Mistelbefall und Maikäferfraß an den Wurzeln der Kiefer. Die untersuchten Kiefern mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens wiesen eine deutlich erhöhte endophytische Besiedlung mit *S. sapinea* auf, bis zu 56 % der Triebsegmente waren von dem Pilz besiedelt. Die Kiefern ohne Symptome (PF122) hingegen wiesen ein endophytisches Vorkommen von *S. sapinea* von 0 - 5 % auf. *Truncatella conorum-piceae* konnte häufig endophytisch (bis zu 25 % besiedelt) in Kieferntrieben auf beiden untersuchten Beständen in Pfungstadt isoliert werden. An den Kiefernzweigen einiger gefällter Kiefern wurden Fruchtkörper von *Cenangium ferruginosum* Fr. gefunden, jedoch wurde der Pilz als Endophyt nicht nachgewiesen. Aus den Kiefernzweigen wurden von den Untersuchungsflächen PF59 und PF110 insgesamt jeweils 34 bzw. 33 verschiedene OTUs isoliert. Folgende Pilze konnten in jeder der zwölf untersuchten Kiefern in Pfungstadt isoliert werden: *S. polyspora* (OTU1), *M. olivacea* (OTU2), *N. oryzae* (OTU10), *Truncatella conorum-piceae* (OTU11) und *X. longipes* (OTU26). Es stellte sich heraus, dass im Hinblick auf die Häufigkeit des Wurzelschwammvorkommens auf den Untersuchungsflächen in Pfungstadt kein Unterschied in dem Bestand mit und ohne *Diplodia*-Schadsymptomen festgestellt werden konnte. Auf beiden Untersuchungsflächen (PF59 und PF122) wurden an 20 % der Kiefernstubben Fruchtkörper des Wurzelschwamms nachgewiesen (Tabelle 17). Bei dem Auftreten der Fruchtkörper des Wurzelschwamms war kein Verteilungsmuster zu erkennen, d. h. es wurden auf der Fläche relativ gleichmäßig Fruchtkörper des Wurzelschwamms gefunden, es fielen keine Häufungen auf (Abbildung 25 und Abbildung 26). Bei dem Nachweis der Nebenfruchtform des Wurzelschwamms zeigte sich folgendes Bild: In allen untersuchten Stammscheiben der Kiefern auf den Probestellen in Pfungstadt (n = 12) konnte *Spiniger meineckellus* nachgewiesen werden (Tabelle 16). Auf der Untersuchungsfläche Pfungstadt 59 trat die Mistel massiv an den Kiefern auf. Nahezu alle Kiefern des Bestandes waren mit Misteln besetzt und

diese füllten einen großen Teil der grünen Kiefernkrone aus (bis zu 50 %). Oft war zu beobachten, dass die Kronenspitze der Kiefer durch eine Mistel überformt wurde und dann der darüber liegende Kiefernkroneanteil abgestorben war.

Tabelle 16: Ergebnis der Aufnahme von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms und Untersuchung der basalen Stammscheibe, nach Inkubation nachgewiesene Nebenfruchtform des Wurzelschwamms (*Spiniger meineckellus*), KU = Keine Untersuchungen durchgeführt.

Probefläche	Wurzelschwamm-Fruchtkörper Nachweis	Wurzelschwamm-Nebenfruchtform Nachweis
Prezelle	positiv	positiv
Bad Freienwalde (FW650 und FW312)	negativ	FW650: 100 % (n = 6), FW312: KU
Lüderitz (LU4451)	positiv	KU
Schlaubetal	positiv	90 % positiv (n = 10)
Pfungstadt (PF59)	positiv	100 % positiv (n = 6)
Pfungstadt (PF122)	positiv	100 % positiv (n = 6)
Bürstadt	positiv	KU
Viernheim (VN0226)	positiv	KU
Wildpark (WP0714 und WP0710)	positiv	100 % positiv (n = 12)
Waldstadt (WS0305)	positiv	100 % positiv (n = 3)

Tabelle 17: Ergebnis der Kartierung von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms an Stubben von Kiefer, Eiche, Birke und Mehlbeere, ¹prozentualer Anteil der Kiefernstubben mit Fruchtkörpern des Wurzelschwamms.

	Lüderitz	Pfungstadt 122	Pfungstadt 59
Flächengröße in Hektar	4,7	10	8
Aufgenommene Stubben	335	822	1214
davon Kiefern-Stubben	115	714	1119
Kiefer mit Wurzelschwamms FK % ¹	35	20	20

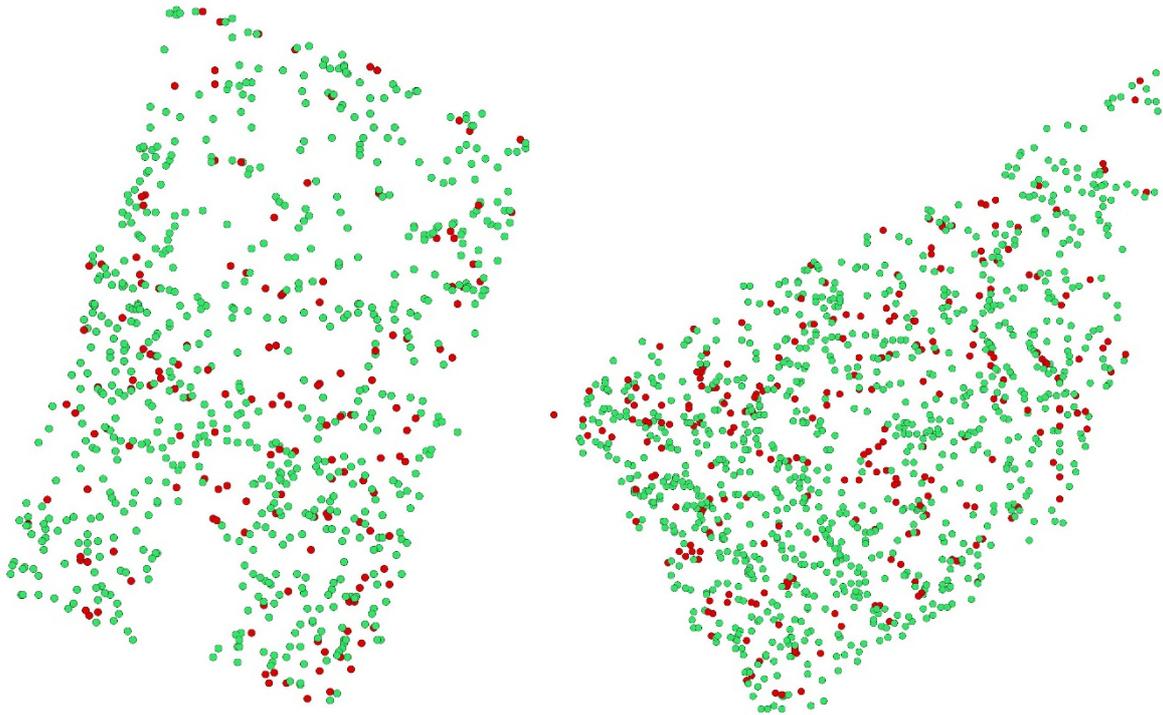


Abbildung 25: Kartierung der Wurzelschwamm-Fruktkörper an Stubben aller Baumarten in den Untersuchungsflächen Pfungstadt PF122 (links) und PF59 (rechts), Stubben ohne Wurzelschwamm-Fruktkörper sind grün • dargestellt, Stubben mit Wurzelschwamm-Fruktkörper rot •.

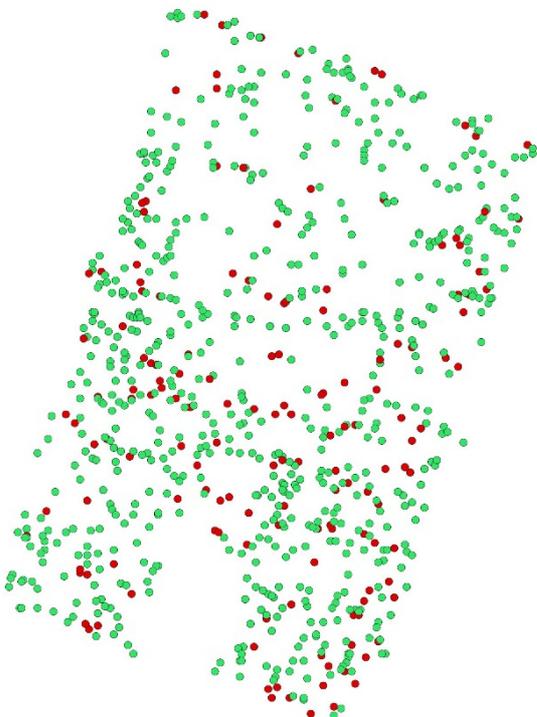


Abbildung 26: Lage der kartierten Stubben und der Wurzelschwamm-Fruktkörper an allen Baumarten auf der Untersuchungsfläche Lüderitz. Stubben ohne Wurzelschwamm-Fruktkörper sind grün • dargestellt, Stubben mit Wurzelschwamm-Fruktkörper rot •.

In **Bürstadt** (Hessen) fiel im Sommer 2015 wenig Niederschlag, dazu herrschten hohe Lufttemperaturen. Dies ist in den folgenden Diagrammen (Abbildung 28- 23) dargestellt, sie zeigen die monatlichen Niederschlagsmengen aus Lampertheim und durchschnittliche Lufttemperaturen aus Mannheim (nächst gelegene Stationen für Lufttemperatur und Niederschlag des DWDs). Die Niederschlagsmengen lagen in fast allen Monaten in den Jahren 2014 und 2015 deutlich unter dem langjährigen Mittel (1961-1990, Abbildung 28). Die Tagesminima und Maxima sind dargestellt, um zu zeigen, welche hohen Lufttemperaturen im Sommer teilweise gemessen wurden (Abbildung 30). Weiterhin sank die Lufttemperatur an manchen Tagen nicht unter 20 °C (Abbildung 31). Die *Diplodia*-Schadfläche in Bürstadt hat einen Bestandesrand nach Süd-West ausgerichtet. Dort wehte im Sommer 2015 ein warmer Wind vom Feld auf den Bestandesrand. Auch zeigten Funde von Fruchtkörpern des Wurzelschwamms, dass er als schwächender Faktor in dem Kiefernbestand eine Rolle spielt, daneben war ein starker Befall mit Mistel festzustellen (10 - 50 % Anteil der Mistel an der Kiefernkrone; Abbildung 27). Neben den Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens zeigte sich noch ein anderes Schadbild in diesem Bestand: Großflächig waren an den Kieferntrieben nur 1 ¼ Nadeljahrgänge zu beobachten, der damals aktuelle Jahrgangstrieb (2015) war in seinem Längenwachstum verkürzt und auch die Nadeln an den betroffenen Trieben waren kürzer als gewöhnlich. Zudem war nur noch ¼ des 2014er Nadeljahrgangs vorhanden (Abbildung 27, rechts). Als weiterer schwächender Faktor kommt hinzu, dass die Bestände teilweise überbestockt waren, das bedeutet, dass zu viele Bäume pro Fläche vorhanden sind. Als Probematerial wurden Zweige von drei verschiedenen Kiefern durch Fällung gewonnen, die Ergebnisse der Pilzisolierung sind in Tabelle 18 dargestellt.



Abbildung 27: Mistelvorkommen auf der Untersuchungsfläche Bürstadt (links, Mitte) und Trieb- und Nadelverkürzungen (rechts).

Tabelle 18: Ergebnisse bezüglich endophytischer Besiedlung für die Untersuchungsfläche Bürstadt; dargestellt sind Isolationsergebnisse von auffälligen endophytischen Pilzarten: *S. sapinea*, *Sydowia polyspora* (OTU1), *Microsphaeropsis olivacea* (OTU2), *Truncatella conorum-piceae* (OTU11), *Biscogniauxia mediterranea* (OTU52), Vorkommen der Endophyten angegeben als relative Häufigkeit in Prozent.

Probe	Symptome	<i>S. sapinea</i>	OTU1	OTU2	OTU11	OTU52
1	Kiefer mit starken Symptomen des <i>Diplodia</i> -Triebsterben, nur noch 20 % der Triebe sind vital, starker Mistelbefall, teilweise sind Misteln bereits abgestorben, Bläue im Stammholz, Schildlausbefall an den Nadeln	30	28	26	24	3
2	Kiefer mit verkürzten Trieben und Nadeln	5	30	41	22	24
3	Kiefer vital	17	23	44	30	6

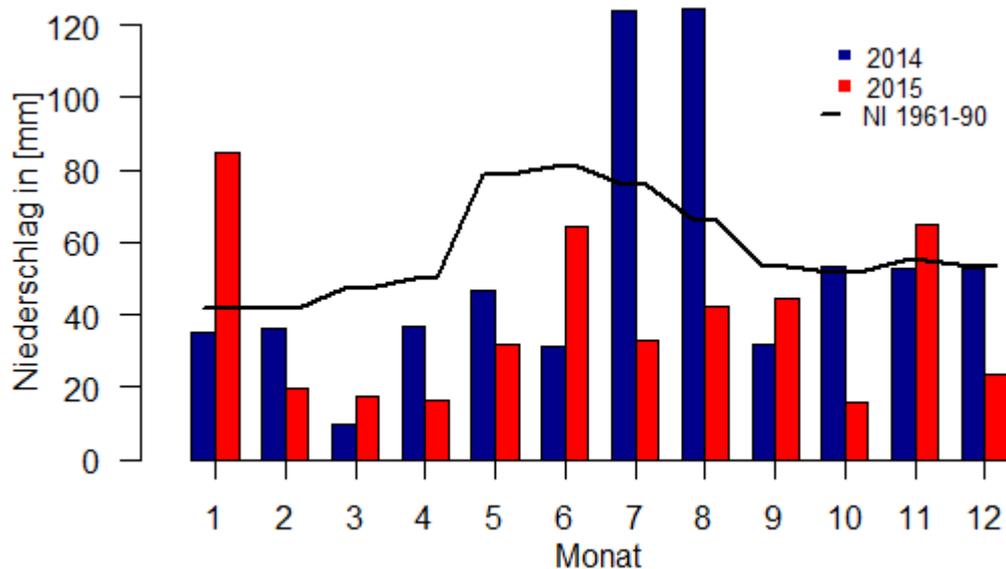


Abbildung 28: Niederschlagsmengen pro Monat für Lampertheim 2014 / 2015, mit langjährigem Mittel 1961-1990. Datengrundlage Deutscher Wetterdienst.

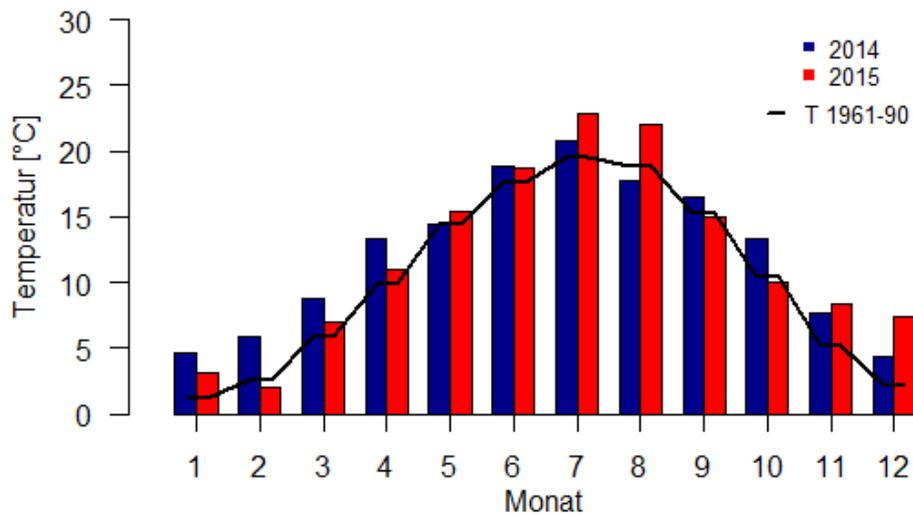


Abbildung 29: Durchschnittliche monatliche Temperatur für Mannheim 2014 / 2015 mit langjährigem Mittel 1961-1990. Datengrundlage Deutscher Wetterdienst.

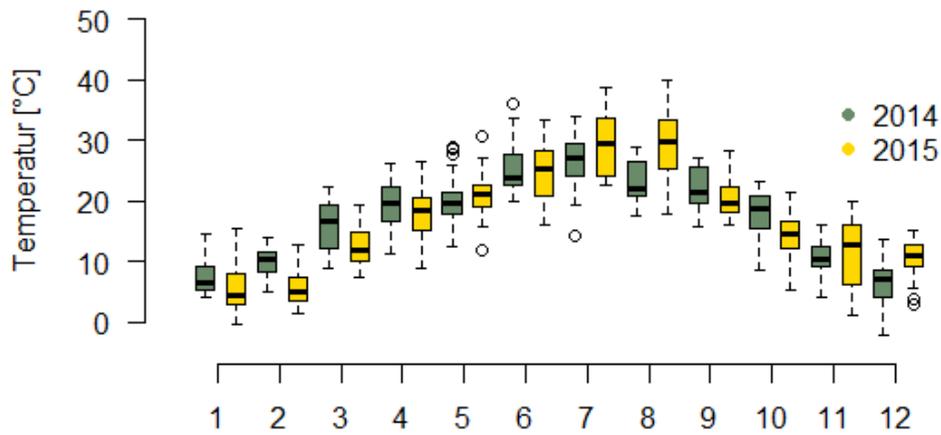


Abbildung 30: Tagesmaximal-Temperatur der Wetterstation in Mannheim 2014 / 2015. Datengrundlage Deutscher Wetterdienst.

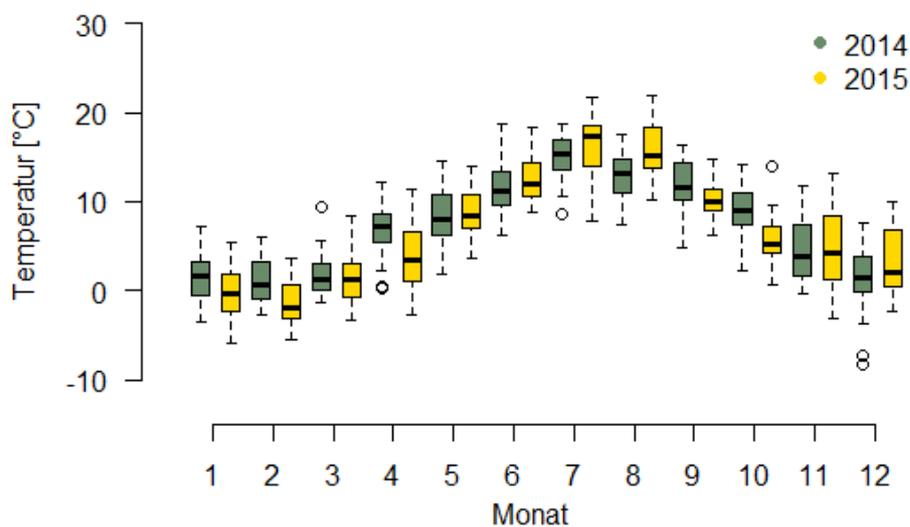


Abbildung 31: Tagesminimal-Temperatur für die Wetterstation in Mannheim 2014 / 2015, Datengrundlage Deutscher Wetterdienst.

In **Viernheim** (VN0226, Hessen) wurde der Einfluss der Mistel auf die Endophytenzusammensetzung der Kiefer analysiert. Dazu wurden acht Kiefern mit unterschiedlichem Mistelbesatz beprobt. Sechs dieser Kiefern hatten einen Mistelbesatz zwischen 0 und 50 % (Anteil der Mistel an der Kiefernkrone). Zwei der untersuchten Kiefern wiesen keine Misteln auf. In 7 von 8 beprobten Kiefern wurde in den Zweigen *S. sapinea* endophytisch nachgewiesen (RH zwischen 0,9 - 36 %). Aus den Zweigen der Bäume mit Mistelbesatz konnten 34 verschiedene Pilzarten isoliert werden (6 untersuchte Kiefern, Anzahl Triebsegmente ~700, Abbildung 32). Aus den Zweigen der Bäume ohne Mistelbesatz wurden 24 Arten isoliert, von diesen wurden nur zwei Bäume mit ca. 300 Triebsegmenten untersucht. Die nachgewiesene Artengemeinschaft in Kiefernzweigen von Bäumen mit und ohne Mistelbesatz überlappen sich in großen Teilen (Abbildung 32).

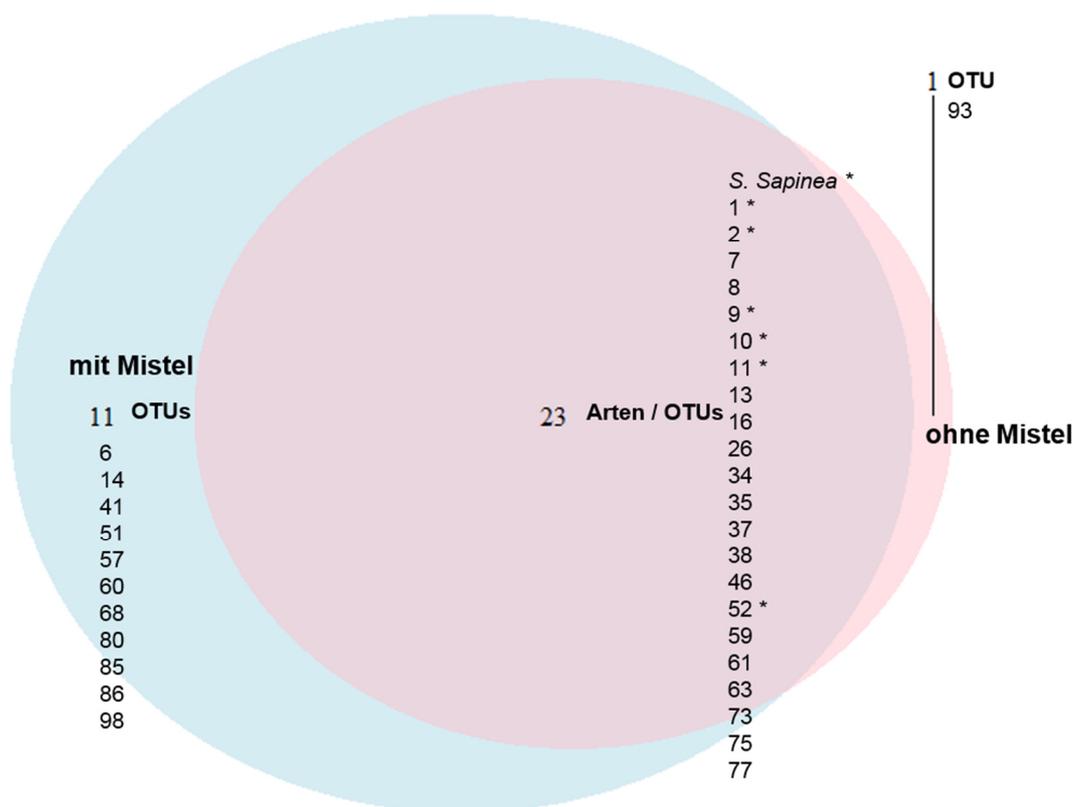


Abbildung 32: Venn-Diagramm zum Vorkommen der OTUs auf der Untersuchungsfläche Viernheim, in Kiefernzweigen von Bäumen mit (blau) und ohne Mistelbesatz (rosa), OTUs mit einer relativen Häufigkeiten von > 5 % sind mit einem * gekennzeichnet.

Auf den Untersuchungsflächen **Wildpark** (Baden-Württemberg) wurden 6 Kiefern mit Misteln (WP0714), deren Anteil an der Kiefernkrone zwischen 11 und 50 % betrug und 6 Kiefern ohne Mistelbesatz (WP0710) untersucht. Im Rahmen der Untersuchungen wurden rund 270 Triebsegmente von Zweigen von Bäumen ohne Mistelbesatz untersucht und daraus 20 verschiedene Pilzarten isoliert (Abbildung 33). Aus ca. 220 Triebsegmenten von mit Mistel befallenen Bäumen wurden 27 verschiedene Arten isoliert und bestimmt (Abbildung 33). Die nachgewiesene Artengemeinschaft in Kiefernzweigen von Bäumen mit und ohne Mistelbesatz überlappen sich in großen Teilen (Abbildung 33).

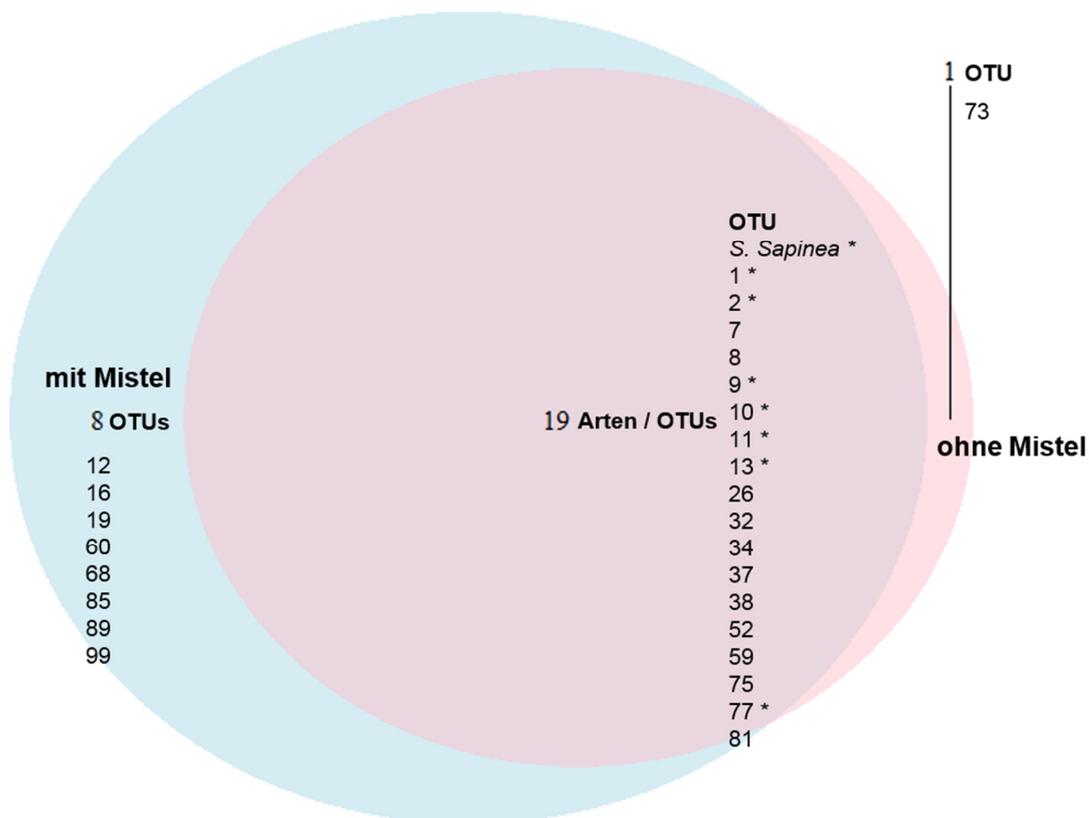


Abbildung 33: Vorkommen der OTUs dargestellt im Venn-Diagramm für die Untersuchungsfläche Wildpark, in Kiefernzweigen von Bäumen mit (blau) und ohne Mistelbesatz (rosa), OTUs mit einer relativen Häufigkeiten von > 5 % sind mit einem * gekennzeichnet.

Beratungsfälle

In den Trägerländern der NW-FVA (Niedersachsen, Hessen, Sachsen-Anhalt und Schleswig-Holstein) wurden in den Jahren 2006 bis 2014 knapp 100 Schadensfälle mit der Hauptabsterbeursache *Diplodia*-Triebsterben an verschiedenen Baumarten in unterschiedlicher Intensität und mit unterschiedlichen Schadensausmaß untersucht und bestätigt (Abbildung 35 und Abbildung 34). Junge Kiefern waren besonders empfindlich gegenüber *S. sapinea* (Abbildung 34, rechts). Befallene Baumarten waren in erster Linie *P. sylvestris* und *Pseudotsuga menziesii*. Zusätzlich traten einzelne Schadensfälle an Küstentanne (*Abies grandis*), Bergkiefer (*Pinus mugo*) und Fichte (*Picea abies*) auf. Die Auswertung der Beratungsfälle ergab, dass bei vielen Schadereignissen zahlreiche verschiedene schadauslösende und schadverstärkende Faktoren ermittelt werden konnten. Bei Jungpflanzen, vornehmlich an Douglasien, spielten Wurzeldeformationen eine große Rolle. In 8 Beratungsfällen wurden Rindenverletzungen durch Hagel festgestellt. Weiterhin spielten Befall mit Läusen, Borkenkäfern, Rüsselkäfern, andere Pilzen wie *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea*, *Phomopsis* sp., *Cenangium ferruginosum*, Wurzelschwamm, Hallimasch, sowie abiotische Faktoren wie Trockenheit, Frost und Nährstoffmangel eine Rolle.

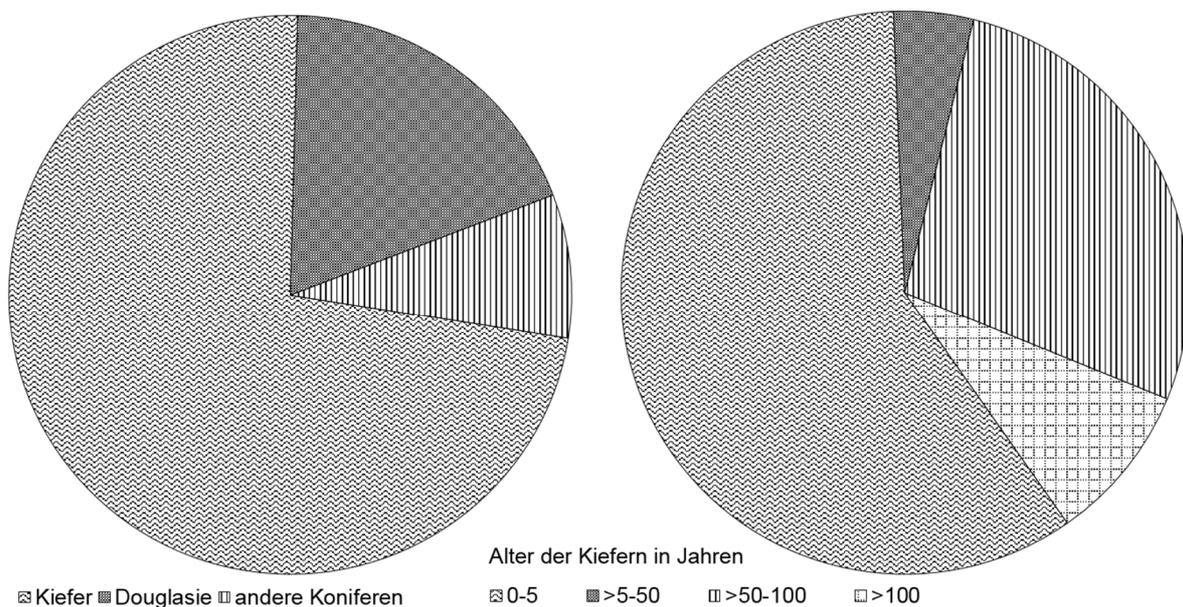


Abbildung 34: Grafische Darstellung der Beratungsfälle zu *Diplodia*-Erkrankungen nach verschiedenen Baumarten (links, n = 96), rechts: Bestandesalter der betroffenen Kiefern (n = 66; bei 4 Beratungsfällen war kein Bestandesalter dokumentiert); Quelle: interne Daten aus dem Zuständigkeitsgebiet der NW-FVA, Abteilung Waldschutz, Sachgebiet 3, aus den Jahren 2006 - 2014.



Abbildung 35: Kartografische Darstellung der Beratungsfälle zu *Diplodia*-Erkrankungen, Quelle: interne Daten aus dem Zuständigkeitsgebiet der NW-FVA, Abteilung Waldschutz, Sachgebiet 3, aus den Jahren 2006 - 2014.

3.2 Isolierte und identifizierte Endophyten und Schaderreger

Bei der Isolation der Endophyten aus Trieben von 190 Kiefern in 106 Beständen zeigte sich, dass insgesamt wenige Hefen und sekundäre Schimmelinfectionen auswuchsen (Tabelle 19). Insbesondere nach Verschärfung der Sterilisationsmethode wuchsen fast keine Verunreinigungen wie Schimmelpilze (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.), Hefen und Zygomyceten aus den inkubierten Triebsegmente mehr aus. Die Anzahl der untersuchten Triebsegmente beläuft sich auf rund 24 000 inklusive der Laborversuche. Ohne Laborversuche wurden 20 807 Triebsegmente untersucht (Tabelle 19).

In Tabelle 20 sind die aus Kieferntrieben isolierten Pilze aufgelistet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 90 Pilzarten isoliert und bestimmt, die unter den Bezeichnungen OTU 1-135 aufgeführt werden (Auswahl in Abbildung 36). Zusätzlich zu den 90 endophytisch isolierten Pilzarten wurden wenige Pilze aus der Abteilung der

Zygomyceten, diverse Hefen (2,5 % relative Häufigkeit, Tabelle 19) und nicht näher bestimmte Ascomyceten (2,5 % relative Häufigkeit, Tabelle 19) nachgewiesen. Die Anzahl der Holzstücke, aus denen keine Pilzkultur auswuchs war gering (3,5 %, Tabelle 19).

Es handelt sich bei den 90 isolierten Pilzen vornehmlich um Ascomyceten. Nur zwei Arten wurden den Basidiomyceten zugerechnet (*Peniophora pini* und *Coprinellus* sp.), sie kamen sehr selten vor (Tabelle 20). Vier Arten wurden mit einer relativen Häufigkeit von > 10 % isoliert (*S. sapinea*, *S. polyspora*, *M. olivacea*, *Truncatella conorum-piceae*), fünf Arten mit einer relativen Häufigkeit von > 5 % (...und *S. fimicola*), und 17 Arten wurden mit einer relativen Häufigkeit von > 1 % isoliert (...und *Epicoccum nigrum*, *Nigrospora oryzae*, *Alternaria alternata*, *Diaporthe* sp. 2, *Xylaria longipes*, *Nemania diffusa*, *Desmazierella acicola*, *Rosellinia* sp. 2, *Biscogniauxia mediterranea*, *Nemania serpens*, *Pezicula eucrita*, *Pezicula* sp. 1; siehe Tabelle 20 und Abbildung 45, Seite 97).

Obwohl an einigen der untersuchten Kiefern *Cenangium ferruginosum* fruktifizierte, konnte der Pilz in den untersuchten Triebsegmenten, die allerdings keine Fruchtkörper aufwiesen, endophytisch nicht nachgewiesen werden. Der Erreger der Kiefernschütte *Lophodermium* sp. wurde ebenfalls nicht aus den untersuchten Kiefernzweigen isoliert. Symptome der Schütte-Erkrankungen wurden ebenfalls nicht festgestellt. Quarantäneschaderreger wie *Gibberella circinata* und *Dothistroma septosporum* traten im Zuge der Untersuchungen nicht auf, *D. scrobiculata* wurde ebenfalls nicht isoliert.

Die Verwendung von spezifischen Selektivmedien (Benomyl-Agar nach Summerbell (1993) und OPP nach Barnard et al. (1985)) bei der Pilzisolierung aus Kieferntrieben führte nicht zur Detektion zusätzlicher Pilze aus der Abteilung der Basidiomyceten.

Probleme bei der Bestimmung der Pilzarten

Einige isolierte Pilze sporulierten zu Anfang, mit fortschreitender Stammhaltung und nach mehrmaligem Abimpfen ging ihre Vitalität verloren, sie wuchsen langsamer und die Farben ihrer Myzelien wurden blasser. Um diese Pilze wieder aufzufrischen, wurden sie auf Kiefernadelagar (PNA), Kiefernrindenagar (PBA) und Kiefernholzagar (PWA) kultiviert. Trotz zahlreicher Versuche zur Anregung der Sporulation (Tabelle 12) blieben von 90 isolierten OTUs 17 Pilze unter den gewählten Wachstumsbedingungen in Kultur steril. Dies entspricht einem Anteil von 19 % der isolierten Endophyten. Es

handelte sich dabei um folgende Arten: *Drechslera* sp. (OTU19), *Rosellinia* sp. 1 (OTU21), *D. acicola* (OTU34), *Rosellinia* sp. 2 (OTU38), *Trichocladium* sp. (OTU50), *H. fragiforme* (OTU59), *Ascomycet* sp. 1 (OTU69), *P. domesticum* (OTU74), *Ascomycet* sp. 2 (OTU93), *H. rubiginosum* (OTU101), *Lambertella* sp. (OTU112), *Ascomycet* sp. 3 (OTU113), *Diaporthe* sp. 4 (OTU121), *Coprinellus* sp. (OTU129), *Pleosporaceae* sp. (OTU130), *Preussia* sp. 2 (OTU132), *S. sapinea*.



Abbildung 36: Vielfalt der Endophyten, von oben links nach unten rechts: *Epicoccum nigrum* (OTU7), *Microsphaeropsis olivacea* (OTU2), *Fusarium* sp. (OTU29), *Nemania diffusa* (OTU32), *Hypoxylon fragiforme* (OTU59), *Microsphaeropsis olivacea* (OTU2), *Chaetomium* sp. 2 (OTU46), *Biscogniauxia mediterranea* (OTU52); nach einem Monat Inkubation auf MYP-Medium bei Raumtemperatur.

Tabelle 19: Übersicht über alle untersuchten Proben, Anzahl der Triebsegmente von Kiefernästen und die relative Häufigkeit der isolierten Pilze in Prozent (RH); Pilze, die als *Fungus* sp. aufgeführt werden, konnten nicht näher bestimmt werden; KA = kein Auswuchs; Anzahl ohne Laborversuche.

Triebsegmente, n	Bäume, n	Bestände, n	Arten, n	KA, RH	Schimmel, RH	Hefe, RH	Fungus. sp, RH
20 807	190	106	90	3,5	4,4	2,5	2,5

Tabelle 20: Isolierte Pilze aus Triebsegmenten von Kiefernzweigen (n = 20807 Triebsegmente mit 29286 Isolaten, Besiedlungsrate $\hat{=} 1,4$) und ihre relative Häufigkeit (RH) aller untersuchten Triebsegmente in Prozent; in der Spalte Standorte ist angegeben, in wie vielen der 106 untersuchten Bestände der jeweilige Pilz auftrat; mit * markiert sind einmalig isolierte Pilzarten (einmaliger Auswuchs).

OTU	Endophyt	RH	Stand- orte	OTU	Endophyt	RH	Stand- orte
	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	19,0	92	81	<i>Alternaria</i> sp.	0,1	4
1	<i>Sydowia polyspora</i>	30,7	104	85	<i>Alternaria infectoria</i>	0,5	32
2	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	24,6	102	86	<i>Cladosporium</i> sp. 1	<0,01	1*
6	<i>Chaetomium globosum</i>	0,2	11	89	<i>Xylaria</i> sp. 2	<0,01	1*
7	<i>Epicoccum nigrum</i>	1,8	50	93	Ascomycet2	0,01	3
8	<i>Sordaria</i> sp.	0,1	9	94	<i>Acremonium</i> sp.	<0,01	2
9	<i>Sordaria fimicola</i>	7,6	24	95	<i>Cladosporium</i> sp. 2	<0,01	1
10	<i>Nigrospora oryzae</i>	2,1	16	96	<i>Podospora curvicolla</i>	<0,01	1
11	<i>Truncatella conorum-piceae</i>	15,1	103	97	<i>Arthrimum kogelbergense</i>	<0,01	1*
12	<i>Diaporthe</i> sp. 1	0,7	26	98	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	<0,01	1*
13	<i>Alternaria alternata</i>	2,2	63	99	<i>Nemania serpens</i>	1,8	53
14	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	0,1	4	101	<i>Hypoxyton rubiginosum</i>	<0,01	1*
16	<i>Diaporthe</i> sp. 2	3,0	63	102	<i>Peniophora pini</i>	<0,01	1*
19	<i>Drechslera</i> sp.	0,2	3	104	<i>Phoma</i> sp. 1	<0,01	1*
21	<i>Rosellinia</i> sp. 1	0,03	1	105	<i>Xylaria</i> sp. 3	0,02	2
26	<i>Xylaria longipes</i>	1,1	45	106	<i>Phoma</i> sp. 2	<0,01	1*
27	<i>Xylaria polymorpha</i>	0,03	6	107	<i>Jugulospora rotula</i>	<0,01	1*
29	<i>Fusarium</i> sp.	0,5	25	108	<i>Preussia</i> sp. 1	0,02	1
30	<i>Sordariales</i> sp.	<0,01	2	109	<i>Microdochium nivale</i>	<0,01	2
32	<i>Nemania diffusa</i>	1,1	37	110	<i>Pezicula eucrita</i>	1,1	28
34	<i>Desmazierella acicola</i>	2,8	46	111	<i>Umbelopsis isabellina</i>	0,01	2
35	<i>Pezizomycetes</i> sp. 1	0,2	17	112	<i>Lambertella</i> sp.	<0,01	1
37	<i>Chaetomium</i> sp. 1	0,5	13	113	Ascomycet sp. 3	0,02	3
38	<i>Rosellinia</i> sp. 2	1,1	40	114	<i>Gnomoniaceae</i> sp.	0,9	41
41	<i>Diaporthe</i> sp. 3	0,4	16	115	<i>Phacidium lacerum</i>	0,2	14
46	<i>Chaetomium</i> sp. 2	0,05	5	116	<i>Penicillium</i> sp.	<0,01	1*
47	<i>Lecythophora</i> sp. 1	0,02	2	117	<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	0,1	3
50	<i>Trichocladium</i> sp.	0,1	4	118	<i>Truncatella</i> sp. 2	0,01	1
51	<i>Chromelosporium carneum</i>	<0,01	2	119	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	<0,01	1
52	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	2,7	51	120	<i>Pezicula</i> sp. 1	2,1	1
57	<i>Phoma eupyrena</i>	0,05	6	121	<i>Diaporthe</i> sp. 4	0,6	3
59	<i>Hypoxyton fragiforme</i>	0,9	30	122	<i>Apiognomonina</i> sp. 1	0,03	5
60	<i>Lecythophora</i> sp. 2	0,2	11	123	<i>Pezicula neosporulosa</i>	0,4	1
61	<i>Beauveria bassiana</i>	0,1	2	124	<i>Pezicula cinnamomea</i>	0,5	1

OTU	Endophyt	RH	Stand-orte	OTU	Endophyt	RH	Stand-orte
63	<i>Nigrospora</i> sp.	0,03	2	125	<i>Pezicula</i> sp. 3	0,1	1
67	<i>Camarosporium brabeji</i>	0,8	32	126	<i>Apiognomonina</i> sp. 2	0,01	1
68	<i>Xylaria</i> sp. 1	0,1	13	127	<i>Leotiomyces</i> sp.	<0,01	1
69	Ascomycet sp. 1	<0,01	2	128	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	<0,01	1*
71	<i>Trichoderma</i> sp.	0,04	7	129	<i>Coprinellus</i> sp.	<0,01	1
73	<i>Biscogniauxia nummularia</i>	1,0	41	130	<i>Pleosporaceae</i> sp.	0,01	1
74	<i>Pyronema domesticum</i>	0,4	15	131	<i>Phoma</i> sp. 3	<0,01	1*
75	<i>Daldinia concentrica</i>	0,2	19	132	<i>Preussia</i> sp. 2	<0,01	1*
77	<i>Daldinia childiae</i>	0,7	7	133	<i>Periconia</i> sp.	<0,01	1*
78	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	0,1	9	134	<i>Peziza varia</i>	<0,01	1*
80	<i>Botrytis cinerea</i>	0,1	6	135	<i>Pezizomyces</i> sp. 2	<0,01	1*

OTU11 (*Truncatella conorum-piceae*)

Da OTU11 der viert häufigste Pilz in den hier vorgenommenen Endophytenisolationen und eine Bestimmung via ITS nicht möglich war, wurden weiterführende Untersuchungen mit diesem Pilz vorgenommen. Für diese Untersuchungen wurden OTU11 (NW-FVA 2215) und zum Vergleich vier weitere Stämme der Gattung *Truncatella* (NW-FVA 2068, 3803 und 3623, 3624, siehe Tabelle 21) untersucht. Gemessen wurden jeweils 100 (bzw. 30) Konidien, die von einer Kiefernadelagar-Kultur gewonnen wurden (Abbildung 37). Die Konidien von OTU11 (Abbildung 37) messen (18) 22-26 (30) \varnothing 24 μm x (5) 6-8 \varnothing 6,7 μm . Die Konidien haben 2-4, meist 3 unverzweigten Setulae, die (15) 25-30 (37) \varnothing 28 μm messen. Die Pedizelle misst (4) 4-7 (14) μm \varnothing 6 μm und ist hinfällig (Tabelle 22). Die beiden mittleren Zellen sind olivbraun und am Septum nur leicht eingeschnürt (Abbildung 37). Die Pedizelle ist bei allen untersuchten Stämmen hinfällig. Bei der Kultur von NW-FVA 2068 wurden 6-mal verzweigte Setulae beobachtet. Eine wellige Hülle wurde bei den Stämmen OTU11 und 2068 beobachtet. Diese Hülle scheint um die beiden mittleren Zellen herum gewickelt zu sein, wie in Abbildung 37 (Mitte) zu sehen ist.

Der Stamm NW-FVA 2068, der ebenfalls dem Morphotyp OTU11 zugeordnet wurde, wurde statt OTU11 für die Messung verwendet werden, da OTU11 im Zuge des Sporulationsversuchs im Jahr 2016 keine Konidiosporen mehr bildete. Die Ergebnisse der Messung von jeweils 100 Konidiosporen von Stamm NW-FVA 2068, 3803, 3623,

3624 finden sich in Tabelle 22 und in Abbildung 39. Steyaert (1949) beschrieb die Konidiosporen von *Truncatella conorum-piceae* wie folgt: (15) 17 - 20,2 - 23 (25) x 6 - 7 - 8 µm groß; mit 2, meist 3 Setulae und einer hyaline Epispore, die Pedizelle ist hinfällig.

Von der Art *Truncatella conorum-piceae* ist in der NCBI Datenbank lediglich eine Sequenz der LSU-Region von der Himalaya-Zeder (*Cedrus deodara* (D. DON) G. DON) aus Neuseeland (GenBank AF382384 von Jeewon et al. (2002)) eingestellt. Die Sequenz von AF382384 und die von OTU11 überlappen sich zu 96 % und sind zu 99 % identisch. Die LSU-Sequenzen von NW-FVA 3624 (*Truncatella conorum-piceae* aus Brandenburg) und OTU11 sind zu 100 % identisch.

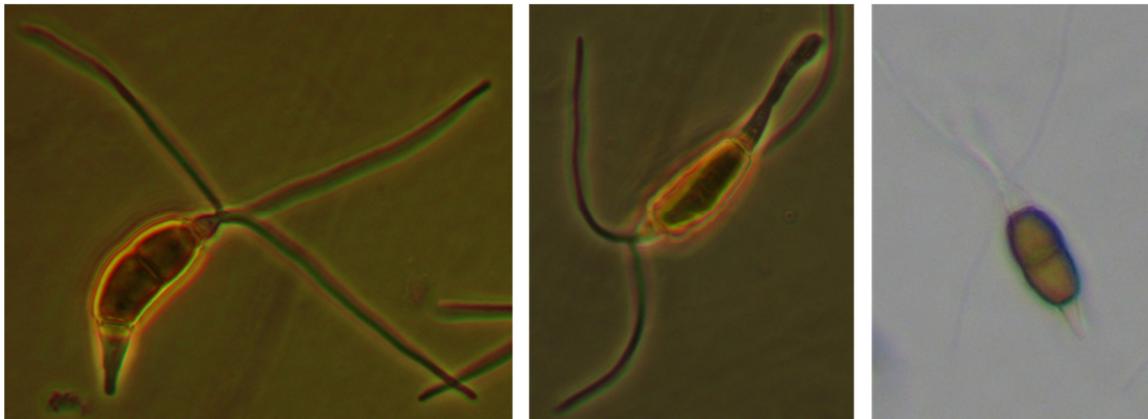


Abbildung 37: Konidien von OTU11 (*Truncatella conorum-piceae*), von Kiefernadelagar.

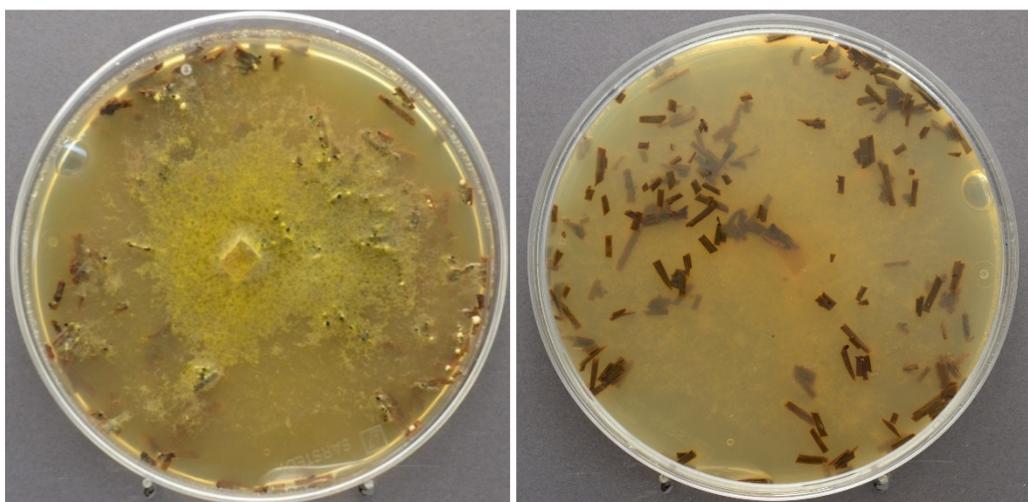


Abbildung 38: Reinkultur von OTU11 auf Kiefernadelagar, Vorder- und Rückseite, Bildung von Pyknidien (schwarze Punkte), nach 1 Monat Inkubation bei Raumtemperatur.

Tabelle 21: Verwendete Stämme der Gattung *Truncatella*, Ursprung und Herkunft der Isolate und durchgeführte Untersuchungen; * Messungen der Konidiosporen auf Kiefernadel-Agar.

NW-FVA Nr.	Name	Ursprung	Herkunft	Untersuchungen
2215 / OTU11	<i>Truncatella</i> sp.	Endophytisch aus Zweigen von <i>P. sylvestris</i>	Hessen	30 Messungen*, ITS, LSU
2068	<i>Truncatella</i> sp.	Endophytisch aus Zweigen von <i>P. sylvestris</i>	Niedersachsen	100 Messungen*, ITS
3803	<i>Truncatella</i> sp.	Endophytisch aus Zweigen von <i>P. sylvestris</i>	Hessen	100 Messungen*
3623	<i>Truncatella conorum-piceae</i>	Nadeln von <i>P. sylvestris</i> , leg. und det. P. Heydeck 2016	Brandenburg	100 Messungen*
3624	<i>Truncatella conorum-piceae</i>	Nadeln von <i>P. sylvestris</i> , leg. und det. P. Heydeck 2016	Brandenburg	100 Messungen ITS, LSU

Tabelle 22: Ergebnis der Sporenmessung von verschiedenen *Truncatella*-Stämmen in µm, von Reinkulturen auf PNA, nach einem Monat Inkubation. Länge und Breite der 4-zelligen Konidien ohne Setulae und Pedizelle. Für OTU11 (NW-FVA 2215) beträgt die Anzahl der Messungen 30; bei NW-FVA 2068, 3623, 3624 und 3803 wurden jeweils 100 Sporen gemessen; MW = Mittelwert / arithmetisches Mittel.

NW-FVA Nr.	Länge				Breite				Setulae	
	Min	Mittel	Max	MW	Min	Mittel	Max	MW	Länge MW	Anzahl
2215	18	22-26	30	24	5	6-8	8	6,7	28	2-4
2068	15	18-20	25	19	6	6-7	9	6,8	24	2-4
3623	17	20-22	25	21	7	7-8	8	7,5	26	1-3
3624	17	19-21	23	20	7	7-8	8	7,3	26	2-3
3803	18	20-21	25	21	6	7	8	7,3	25	1-3

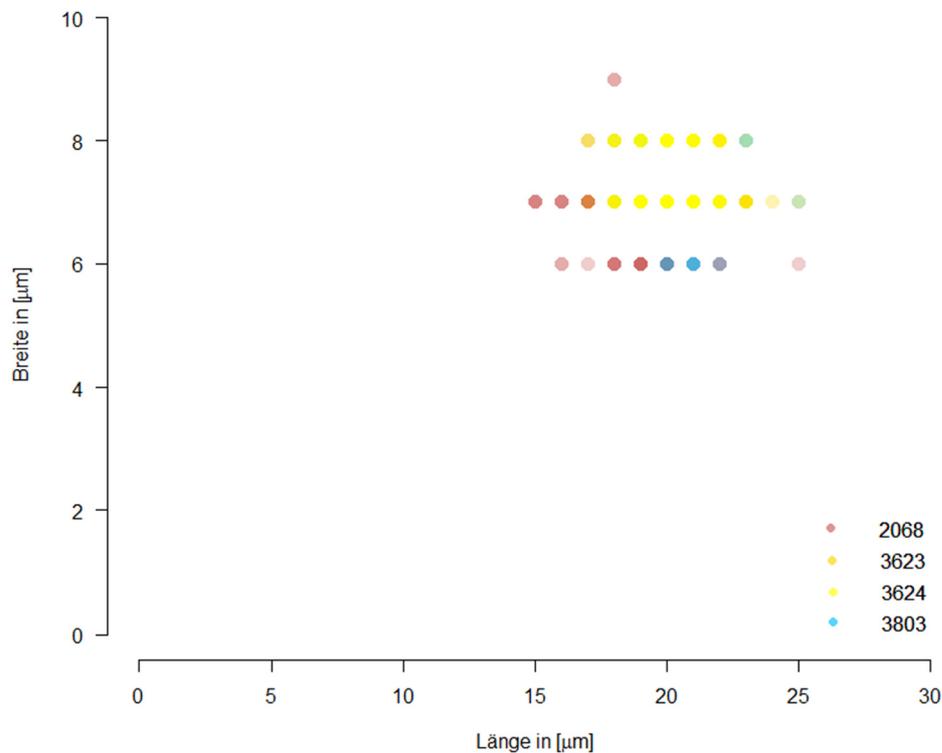


Abbildung 39: Längen und Breiten der Konidiosporen von *Truncatella*-Stämmen (NW-FVA 2068, 3623, 3624, 3803). Dort wo sich die Länge und Breite der Sporen der Pilzstämmen überlappen vermischen sich die Farben der Punkte im Diagramm.

Im Anhang sind die für die 90 isolierten Endophyten bestimmten wissenschaftlichen Artnamen aufgelistet. In Tabelle 23 sind Angaben zur molekulargenetischen Bestimmung der Pilze aufgeführt. Bei den gewonnenen Sequenzen handelt es sich meist um ITS-Sequenzen. Bei *Chaetomium* sp. 1 (OTU37) und *Lecanicillium psalliotae* (OTU14) konnte nur eine LSU-Sequenz isoliert werden. Mit allen Sequenzen wurde der Blast in der NCBI Datenbank im Mai 2016 durchgeführt. Bei OTU71 (*Trichoderma* sp.) gelang die Gewinnung der ITS-Sequenz auch nach mehrmaligen Wiederholungen nicht.

Tabelle 23: 90 isolierte Pilze aus Kieferntrieben (OTU 1 bis OTU 135); * Match stimmt nach Überprüfung der Kulturmerkmale nicht mit der isolierten Pilzart überein. Angaben zum Blast und Akzessionsnummer für die NCBI-Datenbank sind verzeichnet. Länge der Sequenz ist in Anzahl der Basenpaaren angegeben.

OTU	Identifiziert als (Artnamen)	NW-FVA Nr.	Akzessionsnummer für den OTU	Länge der Sequenz	Abdeckung in %	Ähnlichkeit in %	Artnamen (Blast)	Akzessionsnummer (Blast)	Autor
	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	2744	MG098333	559	100	100	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	KF766159	Slippers et al. 2013
1	<i>Sydowia polyspora</i>	2201	MG098248	590	100	99	<i>Sydowia polyspora</i>	GQ412728	Talgo et al. 2009
2	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	2202	MG098249	560	97	100	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	JX681101	Verkley et al. 2012
6	<i>Chaetomium globosum</i>	2205	MG098250	606	99	99	<i>Chaetomium globosum</i>	FN868476	Botella et al. 2010
7	<i>Epicoccum nigrum</i>	2206	MG098251	504	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	GU566259	Bukovska et al. 2010
8	<i>Sordaria sp.</i>	2208	MG098252	618	99	99	<i>Sordaria sp.</i>	JN207268	Loro et al. 2011
9	<i>Sordaria fimicola</i>	2242	MG098253	600	99	99	<i>Sordaria fimicola</i>	FN868475	Botella et al. 2010
10	<i>Nigrospora oryzae</i>	2209	MG098254	577	97	99	<i>Nigrospora oryzae</i>	EU436680	Miles et al. 2008
11	* <i>Truncatella conorum-piceae</i>	2215	MG098255	593	89	99	<i>Pestalotiopsis besseyi</i>	FN868480.	Botella et al. 2010
12	<i>Diaporthe sp. 1</i>	2214	MG098256	331	100	100	<i>Diaporthe sp.</i>	KC145855	Johnston et Park 2012
13	<i>Alternaria alternata</i>	2213	MG098257	588	99	100	<i>Alternaria alternata</i>	KU179665	Vicent 2015
14	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	2212	MG098334	898	97	99	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	AY261180	Li et al. 2003
16	* <i>Diaporthe sp. 2</i>	2218	MG098258	612	99	100	<i>Diaporthe rudis/viticola</i>	EF155490	Volkenant et Langer 2006
19	<i>Drechslera sp.</i>	2221	MG098259	587	93	99	<i>Drechslera sp.</i>	GU067763	Vasaitis. et al. 2009
21	<i>Rosellinia sp. 1</i>	2223	MG098260	566	90	99	<i>Rosellinia sp.</i>	FN435734	Persoh et al. 2009
26	<i>Xylaria longipes</i>	2228	MG098261	610	97	98	<i>Xylaria longipes</i>	JX501293	Mathieu et al. 2012
27	<i>Xylaria polymorpha</i>	2229	MG098262	632	93	98	<i>Xylaria polymorpha</i>	GU322460	Hsieh et al.
29	<i>Fusarium sp.</i>	2231	MG098263	563	100	99	<i>Fusarium sp.</i>	HQ630964	Shrestha et al. 2010
30	* <i>Sordariales sp.</i>	2232	MG098264	585	99	93	<i>Podospora appendiculata</i>	AY999126	Cai et al. 2005
32	<i>Nemania diffusa</i>	2234	MG098265	563	99	100	<i>Nemania diffusa</i>	KT323181	Martinez-Alvarez et al. 2015
34	<i>Desmazierella acicola</i>	2236	MG098266	653	90	100	<i>Desmazierella acicola</i>	LN589957	Koukol et al. 2014
35	<i>Pezizomyces sp. 1</i>	2237	MG098267	534	100	99	<i>Pezizomyces sp.</i>	GQ153018	Arnold et al. 2009
37	* <i>Chaetomium sp. 1</i>	2267	MG098335	758	100	99	<i>Chaetomidium pilosum</i>	FJ666356	Greif et al. 2009

OTU	Identifiziert als (Artnamen)	NW-FVA Nr.	Akzessionsnummer für den OTU	Länge der Sequenz	Abdeckung in %	Ähnlichkeit in %	Artname (Blast)	Akzessionsnummer (Blast)	Autor
38	* <i>Rosellinia</i> sp. 2	2268	MG098268	581	96	100	<i>Rosellinia corticium</i>	KC311485	Gorfer et al.
41	* <i>Diaporthe</i> sp. 3	2261	MG098269	597	100	99	<i>Diaporthe nobilis</i>	KJ609006	Dissanayake et al. 2014
46	* <i>Chaetomium</i> sp. 2	2281	MG098270	515	99	99	<i>Chaetomium globosum</i>	KT371334	Chandra Sekhar et al. 2015
47	* <i>Lecythophora</i> sp. 1	2273	MG098271	591	98	100	<i>Coniochaeta</i> sp.	KF367565	Oliveira et al. 2013
50	* <i>Trichocladium</i> sp.	2272	MG098272	572	100	99	<i>Trichocladium asperum</i>	KC311502	Gorfer et al. 2012
51	<i>Chromelosporium carneum</i>	2264	MG098273	637	93	99	<i>Chromelosporium carneum</i>	FJ872075	Lygis et al. 2009
52	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	2274	MG098274	602	93	100	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	KT823762	Meyer et al. 2015
57	<i>Phoma eupyrena</i>	2198	MG098275	557	97	100	<i>Phoma eupyrena</i>	AJ890436	Ronhede et al. 2005
59	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	2331	MG098276	648	100	100	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	EF155528	Volkenant et Langer 2006
60	<i>Lecythophora</i> sp. 2	2332	MG098277	605	92	98	<i>Lecythophora</i> sp.	KT264687	Torres Cruz et al. 2015
61	<i>Beauveria bassiana</i>	2333	MG098278	548	99	100	<i>Beauveria bassiana</i>	KM114549	Hallmann et al. 2014
63	* <i>Nigrospora</i> sp.	2335	MG098279	545	100	99	<i>Nigrospora sphaerica</i>	KC505176	Chong et al. 2013
67	<i>Camarosporium brabeji</i>	2387	MG098280	611	100	99	<i>Camarosporium brabeji</i>	EU552105	Groenewald et al. 2008
68	<i>Xylaria</i> sp. 1	2388	MG098281	590	92	100	<i>Xylaria</i> sp.	AY315404	Davis et al. 2003
69	Ascomycet sp. 1	2389	MG098282	603	94	99	<i>Fungal endophyte</i>	EF42004	Arnold et al. 2007
71	<i>Trichoderma</i> sp.	2391							
73	<i>Biscogniauxia nummularia</i>	2393	MG098283	550	100	100	<i>Biscogniauxia nummularia</i>	EF155488	Volkenant et Langer 2006
74	<i>Pyronema domesticum</i>	2396	MG098284	602	99	100	<i>Pyronema domesticum</i>	HQ115722	Gorfer et al. 2010
75	<i>Daldinia concentrica</i>	2401	MG098285	603	99	99	<i>Daldinia concentrica</i>	AM292046	Srutka et al. 2006
77	<i>Daldinia childiae</i>	2403	MG098286	563	100	99	<i>Daldinia childiae</i>	KJ957789	Choi et Eom 2014
78	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	2404	MG098287	593	99	99	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	AY198390	Lopez et al. 2002
80	<i>Botrytis cinerea</i>	2415	MG098288	558	99	99	<i>Botrytis cinerea</i>	CP009808	van Kan 2014
81	* <i>Alternaria</i> sp.	2418	MG098289	550	99	100	<i>Alternaria arborescens</i>	KJ789851	Domiciano et al. 2014
85	<i>Alternaria infectoria</i>	2444	MG098290	558	100	100	<i>Lewia infectoria</i>	JQ781841	Trovao et al. 2012
86	<i>Cladosporium</i> sp. 1	2445	MG098291	571	100	100	<i>Cladosporium</i>	KM520367	Busby 2014
89	* <i>Xylaria</i> sp. 2	2448	MG098292	616	93	97	<i>Diatrype stigma</i>	JX515704	Urbez-Torres et al. 2012

OTU	Identifiziert als (Artnamen)	NW-FVA Nr.	Akzessionsnummer für den OTU	Länge der Sequenz	Abdeckung in %	Ähnlichkeit in %	Artnamen (Blast)	Akzessionsnummer (Blast)	Autor
93	* Ascomycet sp. 2	2452	MG098293	757	96	99	<i>Morchella elata</i>	AJ698477	Kellner et al. 2007
94	* <i>Acremonium</i> sp.	2460	MG098294	591	99	100	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	KJ194115	Li et al. 2014
95	<i>Cladosporium</i> sp. 2	2461	MG098295	500	100	99	<i>Cladosporium</i> sp.	HF952649	Garcia-Anton et al. 2013
96	<i>Podospora curvicolla</i>	2462	MG098296	589	99	100	<i>Podospora curvicolla</i>	GQ922546	Peay et Dunkirk 2015
97	<i>Arthrimum kogelbergense</i>	2463	MG098297	467	100	100	<i>Arthrimum kogelbergense</i>	KF144895	Crous et Groenewald 2013
98	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	2464	MG098298	621	97	100	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	JX496092	Verkley et al. 2012
99	<i>Nemania serpens</i>	2465	MG098299	600	100	99	<i>Nemania serpens</i>	EF155504	Volkenant et Langer 2006
101	<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	2522	MG098300	597	95	99	<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	KC968929	Kuhnert et al. 2013
102	<i>Peniophora pini</i>	2523	MG547963	648	100	99	<i>Peniophora pini</i>	EU118651	Larsson 2007
104	* <i>Phoma</i> sp. 1	2527	MG098301	497	100	99	<i>Phoma herbarum</i>	JX421725	Sanz et al. 2012
105	* <i>Xylaria</i> sp. 3	2528	MG098302	558	98	99	<i>Xylariales</i> sp.	HQ823756	Larkin et al. 2010
106	* <i>Phoma</i> sp. 2	2565	MG098303	606	100	96	<i>Phoma foliaceiphila</i>	JQ318008	Lawrey et al. 2011
107	* <i>Jugulospora rotula</i>	2597	MG098304	570	99	99	<i>Cercophora coprophila</i>	AY999136	Cai et al. 2005
108	<i>Preussia</i> sp. 1	2525	MG098305	464	100	100	<i>Preussia</i> sp.	FJ210518	Pan et May 2008
109	<i>Microdochium nivale</i>	2646	MG098306	570	99	99	<i>Microdochium nivale</i>	AM502266	Ernst et al. 2007
110	<i>Pezicula eucrita</i>	2644	MG098307	579	99	100	<i>Pezicula eucrita</i>	KR859188	Chen et al. 2016
111	<i>Umbelopsis isabellina</i>	2657	MG098308	636	99	99	<i>Umbelopsis isabellina</i>	AJ876493	Renker et al. 2005
112	* <i>Lambertella</i> sp.	2658	MG098309	1005	54	90	<i>Lambertella exophiala</i>	KF499362	Galan et al. 2013
113	Ascomycet sp. 3	2686	MG098310	585	94	100	<i>foliar endophyte Pecia</i>	AY561220	Stefani et Berube 2004
114	<i>Gnomoniaceae</i> sp.	2687	MG098311	618	99	94	<i>Gnomoniaceae</i> sp.	DQ872667	Weber et al. 2006
115	<i>Phacidium lacerum</i>	2688	MG098312	572	99	99	<i>Phacidium lacerum</i>	KU942438	Diaz et al. 2016
116	<i>Penicillium</i> sp.	2689	MG098313	587	100	99	<i>Penicillium</i> sp.	KF367536	Oliveira et al. 2013
117	<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	2690	MG098314	597	97	99	<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	JX496059	Verkley et al. 2012
118	* <i>Truncatella</i> sp. 2	2747	MG098315	606	100	100	<i>Truncatella angustata</i>	GU566260	Bukovska et al. 2010

OTU	Identifiziert als (Artnamen)	NW-FVA Nr.	Akzessionsnummer für den OTU	Länge der Sequenz	Abdeckung in %	Ähnlichkeit in %	Artnamen (Blast)	Akzessionsnummer (Blast)	Autor
119	* <i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	2748	MG098316	622	97	100	<i>Pestalotiopsis hollandica</i>	KM199328	Maharachchikumbura et al. 2008
120	* <i>Pezicula</i> sp. 1	2746	MG098317	575	99	100	<i>Pezicula neocinnamomea</i>	KR859220	Chen et al. 2015
121	<i>Diaporthe</i> sp. 4	2788	MG098318	565	98	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC343205	Gomes et al. 2012
122	* <i>Apiognomonina</i> sp. 1	2749	MG098319	526	95	100	<i>Apiognomonina hystrix</i>	EU255016	Sogonov et al. 2008
123	<i>Pezicula neosporulosa</i>	2789	MG098320	461	100	99	<i>Pezicula neosporulosa</i>	KR859231	Chen et al. 2015
124	<i>Pezicula cinnamomea</i>	2752	MG098321	756	100	100	<i>Pezicula cinnamomea</i>	KR859162	Chen et al. 2015
125	* <i>Pezicula</i> sp. 3	2816	MG098322	576	100	100	<i>Pezicula sporulosa</i>	AF141166	Abeln et al. 1999
126	* <i>Apiognomonina</i> sp. 2	2814	MG098323	601	95	99	<i>Apiognomonina errabunda</i>	AJ888475	Bahnweg et al. 2005
127	<i>Leotiomyces</i> sp.	2866	MG098324	542	95	99	<i>Godronia cassandrae</i>	KC595271	Weber 2013
128	* <i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	2867	MG098325	618	100	99	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	EU552147	Marincowitz et al. 2008
129	* <i>Coprinellus</i> sp.	2881	MG098326	335	98	99	<i>Coprinellus micaceus</i>	KM010302	Bont et Rigling 2014
130	<i>Pleosporaceae</i> sp.	2880	MG098327	619	99	100	<i>Pleosporaceae</i> sp.	KT268913	Glynou et al. 2015
131	* <i>Phoma</i> sp. 3	2882	MG098328	556	100	99	<i>Didymella pinodella</i>	EU167565	Simon et al. 2007
132	<i>Preussia</i> sp. 1	3083	MG098329	551	98	99	<i>Preussia</i> sp.	JN225886	Johnston et al. 2011
133	<i>Periconia</i> sp.	3085	MG098330	644	99	99	<i>Periconia</i> sp.	JX981482	Pawlowska et al. 2014
134	<i>Peziza varia</i>	3086	MG098331	625	99	99	<i>Peziza varia</i>	FN868472	Botella et Diez 2010
135	<i>Pezizomyces</i> sp. 2	3087	MG098332	641	99	94	<i>Pezizomyces</i>	FN868473	Botella et Diez 2010

3.2.1 Einfluss der Isolationsmethode auf die Diversität der Endophyten

Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um den Einfluss der Methode auf die Diversität der isolierten Endophyten zu überprüfen. Dazu werden im Folgenden die Ergebnisse der Versuche zur Methode der Oberflächensterilisierung, zum Einfluss der Lagerung, zum Einfluss der Länge der Triebsegmente und zur Lokalisierung der Endophyten im Kiefernzweig vorgestellt.

Oberflächensterilisierung, Versuch 1

Bei den Versuchen zu verschiedenen Vor- und Nachbehandlungen der Kiefernzweige und unterschiedlichen Konzentrationen von NaOCl zeigte sich, dass die Variante V15 (Bürsten unter Leitungswasser, 1 min Inkubation in 70 % EtOH, 5 min Inkubation in 3 % NaOCl und abschließen 1 min Inkubation in 70 % EtOH) die besten Sterilisationsergebnisse von den getesteten Varianten erzielte (Tabelle 24 und Abbildung 40). Danach wurde am wenigsten Auswuchs von Pilzen nach Anfertigung des Abklatsches festgestellt. Aus 35 % der Abklatsche nach dieser Variante wuchs nur eine Pilzart aus (*Sydowia polyspora* OTU1, *Fusarium* sp. OTU29, *Desmazierella acicola* OTU34, *Phoma eupyrena* OTU57, *Daldinia childiae* OTU77, *Nemania serpens* OTU99, Tabelle 24). Auch das Ergebnis der Isolation von Endophyten nach der erfolgten Oberflächensterilisierung mit der Variante V15 zeigte eine bekannte Diversität, d. h. es wuchsen zahlreiche verschiedene Pilzarten aus. Das bedeutet, dass bei der gewählten Methode V15 die Konzentration und Dauer der NaOCl-Sterilisation nicht zu stark ist, da sie den Kiefernzweig nicht durchdringt. Jedoch war der Auswuchs von *S. fimicola* deutlich geringer, wenn die Variante V15 angewendet wurde, im Gegensatz zu der Behandlung des Zweiges ausschließlich mit Ethanol.



Abbildung 40: Abklatsch eines Kiefernzweiges auf MYP-Medium, nach 10 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur, von links nach rechts: unsterilisiert, mit Methode V1 (70 % Ethanol) sterilisiert und optimierte Methode V15 mit Natriumhypochlorid-Lösung.

Tabelle 24: Ergebnisse des Abklatsches der Variante V15, mit 20 Wiederholungen; KA bedeutet kein Auswuchs festgestellt.

Wiederholungsnummer	Ausgewachsene OTUs	Wiederholungsnummer	Ausgewachsene OTUs
1	KA	11	99
2	57	12	77
3	1	13	KA
4	73	14	99
5	KA	15	29
6	KA	16	KA
7	KA	17	KA
8	KA	18	34
9	KA	19	KA
10	KA	20	KA

Überprüfung der gewählten Methode

Versuch 2

Der Versuch, 20 Kiefertriebe mit der gewählten Methode V15 zu sterilisieren und anschließend die oberflächensterilen Zweige in sterilem Leitungswasser zu schütteln und dieses Wasser auf Nährmedium auszuplattieren zeigte, dass nach zwei Wochen Inkubation keine Pilzkolonien auf dem Nährmedium auswuchsen.

Versuch 3

Der Versuch, Kiefertriebe vor der Oberflächensterilisierung in einer sporulierenden Pilzkultur zu rollen (*Diaporthe* sp. NW-FVA 2710) und nach erfolgter Oberflächensterilisierung ein Abklatsch anzufertigen zeigte, dass in 4 von 20 Fällen (20 %) *Diaporthe* sp. auswachsen konnte (Tabelle 25). Die Negativkontrolle (ein Kiefernast wurde in einer *Diaporthe*-Kultur gerollt und der Ast wurde anschließend nicht oberflächensterilisiert) zeigte, dass die entsprechenden Nährmedien schon nach fünf Tagen Inkubation vollständig mit *Diaporthe* sp. (2710) bewachsen waren.

Tabelle 25: Erfolgskontrolle der Oberflächensterilisierung V15 (Versuch 3), Sterilisierung von 20 Kiefertrieben nach vorangegangenem Wälzen in einer sporulierenden *Diaporthe*-Kultur (NW-FVA 2710), anschließend wurde ein Abklatsch angefertigt; KA bedeutet kein Auswuchs festgestellt.

Wiederholungsnummer	Ausgewachsener Pilzstamm	Wiederholungsnummer	Ausgewachsener Pilzstamm
1	KA	11	KA
2	KA	12	KA
3	KA	13	KA
4	KA	14	KA
5	NW-FVA 2710	15	KA
6	NW-FVA 2710	16	KA
7	KA	17	NW-FVA 2710
8	KA	18	KA
9	KA	19	KA
10	NW-FVA 2710	20	KA

Versuch 4

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob und wann sich die NaOCl-Lösung während der Sterilisierung mehrerer Kiefertriebe unwirksam wird. Dazu wurden 30 Kiefertriebe à 8 cm nacheinander mit der Methode V15 sterilisiert und mit jedem sterilisierten Kiefertrieb ein Abklatsch angefertigt. Es zeigte sich kein Unterschied in dem Auswachsen von Pilzkulturen nach dem Abklatsch von 30 sterilisierten Kiefertrieben, in 9 von 30 Fällen (30 %) wurde ein Auswuchs nach Anfertigung des Abklatsches festgestellt (Tabelle 26). Das heißt, die NaOCl-Lösung (100 ml im Reagenzglas, 30 x 200 mm) ist für mindestens 30 Kiefertriebe bedenkenlos nutzbar, ohne dass es zur Minderung der Sterilisationsleistung kommt. Bei den Arbeiten im Labor wurden die Alkohol- und NaOCl-Lösungen standardmäßig nach 20 Kiefertrieben gewechselt.

Tabelle 26: Erfolgskontrolle der Oberflächensterilisierung V15 (Versuch 4), Ergebnis der Sterilisierung von 30 Kieferntrieben mit NaOCl-Lösung, KA bedeutet kein Auswuchs festgestellt.

Wiederholungsnummer	Ausgewachsene OTUs	Wiederholungsnummer	Ausgewachsene OTUs
1	59	16	132
2	KA	17	75, 99
3	KA	18	KA
4	73	19	KA
5	KA	20	KA
6	99	21	KA
7	59, 99	22	KA
8	KA	23	KA
9	KA	24	KA
10	KA	25	KA
11	KA	26	99
12	KA	27	KA
13	KA	28	KA
14	KA	29	99
15	99	30	KA

Einfluss der Lagerung auf das Probematerial

Bei dem Versuch zeigte sich, dass die Artenanzahl und das Artenspektrum bei einer Lagerung von 14 Tage stabil blieben. Wurde die Isolation der Endophyten am Tag der Ernte durchgeführt zeigten sich ähnliche Isolationsergebnisse wie nach 7 und 14 Tagen (Tabelle 27). Nach 4 Wochen Lagerung war die Anzahl der isolierten Pilzarten deutlich geringer (9 OTUs). Das Spektrum der aus den Triebsegmenten ausgewachsenen Arten war an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nicht identisch. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden *S. polyspora* (OTU1), *M. olivacea* (OTU2), *Truncatella conorum-piceae* (OTU11) und *Desmazierella acicola* (OTU34) isoliert.

Tabelle 27: Isolierte OTUs nach unterschiedlichen Lagerungszeiten aus Kiefernzweigen (1, 7, 14 und 28 Tagen nach der Ernte), je Zeitraum wurden 5 Triebspitzen untersucht.

Tage nach der Ernte	Anzahl OTU	Ausgewachsene OTU
1	13	1, 2, 9, 11, 12, 13, 16, 34, 37, 52, 67, 99, <i>S. sapinea</i>
7	12	1, 2, 7, 9, 10, 11, 13, 16, 34, 38, 59, 67
14	14	1, 2, 7, 11, 13, 26, 32, 34, 35, 38, 67, 71, 75, 99
28	9	1, 2, 7, 11, 16, 32, 34, 67, <i>S. sapinea</i>

Einfluss der Länge der Triebsegmente

Der Versuch, der den Einfluss der Länge der Triebsegmente klären sollte, erbrachte insgesamt 26 verschiedene Pilze, die bei jeder getesteten Segmentlänge auswuchsen (Tabelle 28). Ist die Anzahl der Wiederholungen (Anzahl untersuchter Triebsegmente) konstant (LA5-LA9), nimmt die Anzahl der isolierten OTUs mit kleiner werdender Segmentlänge ab. Ist hingegen die Länge des Probematerials konstant (LA1-LA4), nimmt die Artanzahl mit kleiner werdenden Segmenten zu. Es zeigte sich, dass auch bei einer Segmentlänge von 2 cm langsam wachsende Pilze, wie z. B. *Nemania serpens* (OTU99) und *Pezizula eucrita* (OTU110) auswachsen konnten. Die hier standardmäßig verwendete Segmentlänge von 0,5 cm erwies sich als gut geeignet, um auch langsam wachsende Pilze isolieren zu können. Die verwendete Segmentlänge von 0,5 cm ist ein Kompromiss aus Durchführbarkeit (Probenanzahl) und Isolationsergebnis.

Tabelle 28: Isolierte OTUs aus unterschiedlich langen Triebsegmenten aus Kiefernzweigen.

Versuchsbezeichnung	Segmentlänge (cm)	Länge Probenmaterial (cm)	Anzahl Triebsegmente	Anzahl isolierte OTUs	Ausgewachsene OTUs
LA1	2	8	4	5	1, 2, 11, 34 <i>S. sapinea</i>
LA2	1	8	8	5	1, 2, 11, 34, <i>S. sapinea</i>
LA3	0,5	8	16	5	2, 11, 13, 16, 34
LA4	0,15	8	60	10	1, 2, 7, 11, 26, 34, 73, 99, 110, <i>S. sapinea</i>
LA5	2	160	80	21	1, 2, 7, 9, 11, 13, 16, 26, 34, 35, 38, 52, 59, 60, 99, 110, 115, 121, 124, 125, <i>S. sapinea</i>
LA6	1	80	80	17	1, 2, 7, 11, 13, 16, 32, 34, 38, 71, 99, 115, 121, 124, 125, 127, <i>S. sapinea</i>
LA7	0,5	40	80	15	1, 2, 9, 13, 16, 34, 38, 59, 73, 99, 110, 115, 124, 125, 127
LA8	0,25	20	80	13	1, 2, 16, 38, 59, 73, 99, 110, 115, 121, 124, 125, <i>S. sapinea</i>
LA9	0,1	8	80	11	1, 2, 7, 16, 59, 73, 74, 99, 121, 125, 127

Lokalisierung der Endophyten

Im Rahmen des Versuches wurden aus den drei verschiedenen Gewebetypen insgesamt 32 verschiedene Pilzarten isoliert (Tabelle 29). Der Versuch zur Lokalisierung der Endophyten in den Kiefernzweigen zeigte, dass die größte Anzahl an endophytischen Pilzen aus dem Rindengewebe isoliert werden konnte (n = 26 Arten, 81 % der isolierten Arten). Weniger Arten als aus der Rinde konnten aus dem Kambialgewebe isoliert werden (n = 20 Arten, 62 % der isolierten Arten). Die geringste Anzahl (n = 9 Arten, 32 % der isolierten Arten) an endophytischen Pilzarten fand sich im Holz, darunter aber zwei Arten, die nur dort isoliert werden konnten (*Umbelopsis isabellina* OTU111, *Phacidium lacerum* OTU115). Dort war auch der Anteil der Segmente, aus denen kein Auswuchs festgestellt werden konnte, am

höchsten (91 %, Tabelle 29). *S. sapinea* wurde in diesem Versuch nur im Rinden- und Kambialgewebe isoliert. Im Rahmen eines weiteren Versuches konnte *S. sapinea* aus symptomfreiem Holz eines Zweiges einer erkrankten Kiefer (Lu4451-122) isoliert werden. Dazu wurde der Zweig wie in dem oben beschriebenen Versuch in Rindengewebe und verholztes Gewebe getrennt. Fünf Pilzarten ließen sich in allen Gewebetypen isolieren: *S. polyspora* (OTU1), *M. olivacea* (OTU2), *B. nummularia* (OTU73), *Nemania serpens* (OTU99) und *Pezicula eucrita* (OTU110).

Bei dem Versuch, den Kiefertrieb in Rinde, Kambialbereich und Holz zu trennen, ergaben sich technische Schwierigkeiten bei der Trennung von Rinde und Kambialbereich. Besonders erschwert wurde der Versuch, da der Kiefernzweig erst im ganzen oberflächensterilisiert werden musste und dann steril in die verschiedenen Teile geschnitten wurde.

Tabelle 29: Versuch zur Lokalisierung der Endophyten – isolierte OTUs, je Gewebetyp wurden 415 (insgesamt 1245) Kiefertriebsegmente untersucht.

Gewebetyp	Anteil der Triebsegmente ohne Auswuchs in %	Anzahl isolierte OTUs	Ausgewachsene OTUs
Rinde	7	26	1, 2, 6, 9, 11, 13, 16, 26, 29, 32, 35, 37, 38, 59, 71, 73, 85, 96, 99, 110, 121, 123, 124, 125, 127, <i>S. sapinea</i>
Kambialbereich	74	20	1, 2, 9, 11, 16, 19, 29, 59, 71, 73, 85, 99, 106, 110, 112, 115, 123, 124, <i>S. sapinea</i>
Holz	92	9	1, 2, 26, 32, 73, 99, 110, 111, 115

3.2.2 Analyse der Endophytendiversität in Abhängigkeit von verschiedenen Methoden

Die 90 aus Kieferntrieben isolierten endophytischen Pilzarten lassen sich 6 verschiedenen Klassen (Abbildung 41) und 15 verschiedenen Ordnungen (Abbildung 42) zuordnen, deren Einteilung nach Daten vom Index fungorum (Stand Juli 2016) erfolgte. In beiden Diagrammen sind Isolationen, die nicht näher bestimmt werden konnten (Fungus sp.), Isolationen mit Verunreinigungen durch Schimmel, Hefen oder Zygomyceten nicht dargestellt. Im Rahmen der Untersuchungen von Kieferntrieben stellte sich heraus, dass die meisten Pilzisolatate (57 % absolute Häufigkeit) sich der Klasse der Dothideomycetes zuordnen ließen, 21 der 90 bestimmten Arten gehören dieser Klasse an. Die artenreichste Klasse waren die Sordariomycetes mit 47 Arten und 31 % absoluter Häufigkeit. Der Klasse der Pezizomycetes ließen sich 6 Arten zurechnen, die einen Anteil von 2,4 % an allen Isolationen hatten. Pilze aus der Klasse der Leotiomyces kommen mit einer AH (absolute Häufigkeit) von 3 % vor und beinhalten 9 Arten. Bei 88 der 90 detektierten Arten aus Kieferntrieben handelte es sich um Ascomyceten, nur zwei Arten (OTU102 *Peniophora pini* und OTU129 *Coprinellus* sp.) wurden den Basidiomyceten zugeordnet.

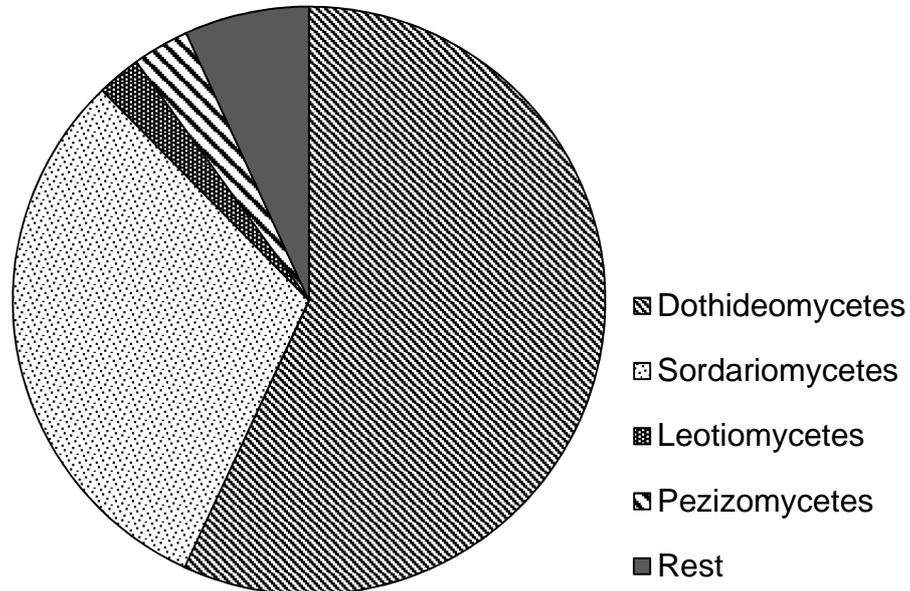


Abbildung 41: Anteil der verschiedenen Klassen an der absoluten Häufigkeit (AH) aller Endophytenisolationen aus Kieferntrieben. OTU69, 93, 113 (Ascomyceten sp.) konnten nicht in das Diagramm aufgenommen werden, da sie nicht bis zur Klassenebene bestimmt werden konnten. Ebenso sind Klassen, die mit einem Anteil unter < 1 % AH (Agaricomycetes, Eurotiomycetes) vorkommen, nicht aufgeführt.

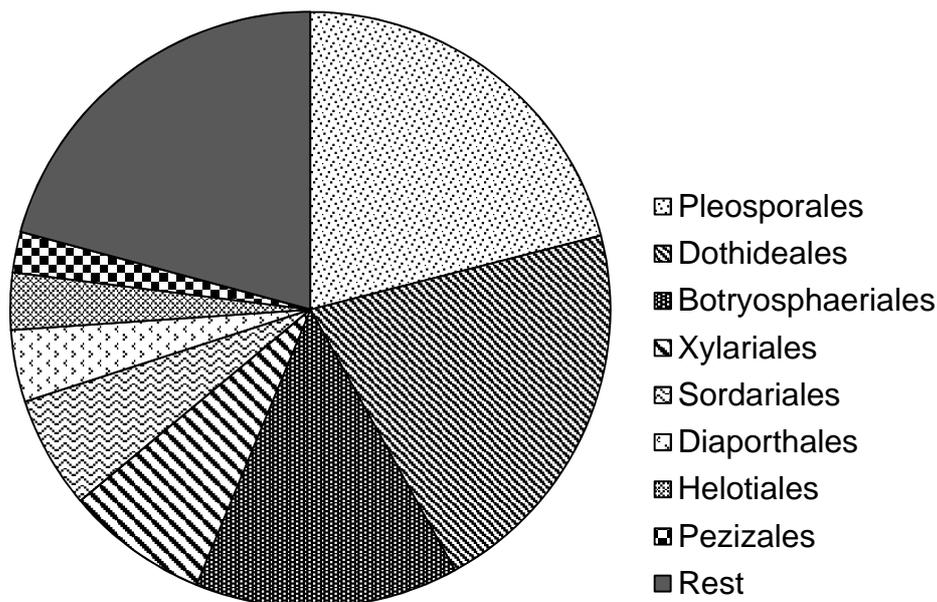


Abbildung 42: Anteil der verschiedenen Ordnungen an der absoluten Häufigkeit (AH), aller Endophytenisolationen aus Kieferntrieben. *Pezizomyces* sp. 1, *Ascomycet* sp. 1, *Ascomycet* sp. 2, *Ascomycet* sp. 3, *Leotiomyces* sp., *Pezizomyces* sp. 2 (OTU 35, 69, 93, 113, 127, 135), die nicht bis zur Ordnung bestimmt wurden, konnten nicht in das Diagramm aufgenommen werden, ebenso Arten für die die Ordnung nicht feststeht (z. B. OTU 97, *Arthrinium kogelbergense*). Weiterhin sind Ordnungen, die mit einem Anteil unter < 1 % AH (*Hypocreales*, *Coniochaetales*, *Mucorales*, *Agaricales*, *Capnodiales*, *Eurotiales*, *Russulales*) vorkommen, nicht aufgeführt.

Betrachtet man die Zusammensetzung der Pilzarten, die aus gesunden Zweigen (ca. 18 000 untersuchte Triebsegmente) isoliert wurden im Vergleich zu denen, die aus Kiefern mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens (ca. 2800 untersuchte Triebsegmente) isolierten wurden, zeigte sich, dass *S. sapinea* mit einer durchschnittlichen relativen Häufigkeit (RH) von 50 % der Triebsegmente von erkrankten Bäumen isoliert werden konnte. Aus den Triebsegmenten von vitalen Kiefernzweigen wurde *S. sapinea* mit einer RH von nur 13 % nachgewiesen (Abbildung 44). In den Triebsegmenten von erkrankten Kiefern konnten nur rund 45 OTUs isoliert werden, in denen aus gesunden Kiefern hingegen 90 OTUs (Abbildung 43). Alle Pilzarten (n = 45), die aus Triebsegmenten von Bäumen mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens isoliert wurden, kamen auch in Kieferntriebsegmenten von vitalen Bäumen vor, deshalb ist der rosa Kreis in Abbildung 43 vollständig von dem blauen Kreis umschlossen. Da *S. sapinea* in Kultur schnellwüchsig ist (Flowers et al. 2001), überwächst der Pilz oft andere langsam wachsende Endophyten.

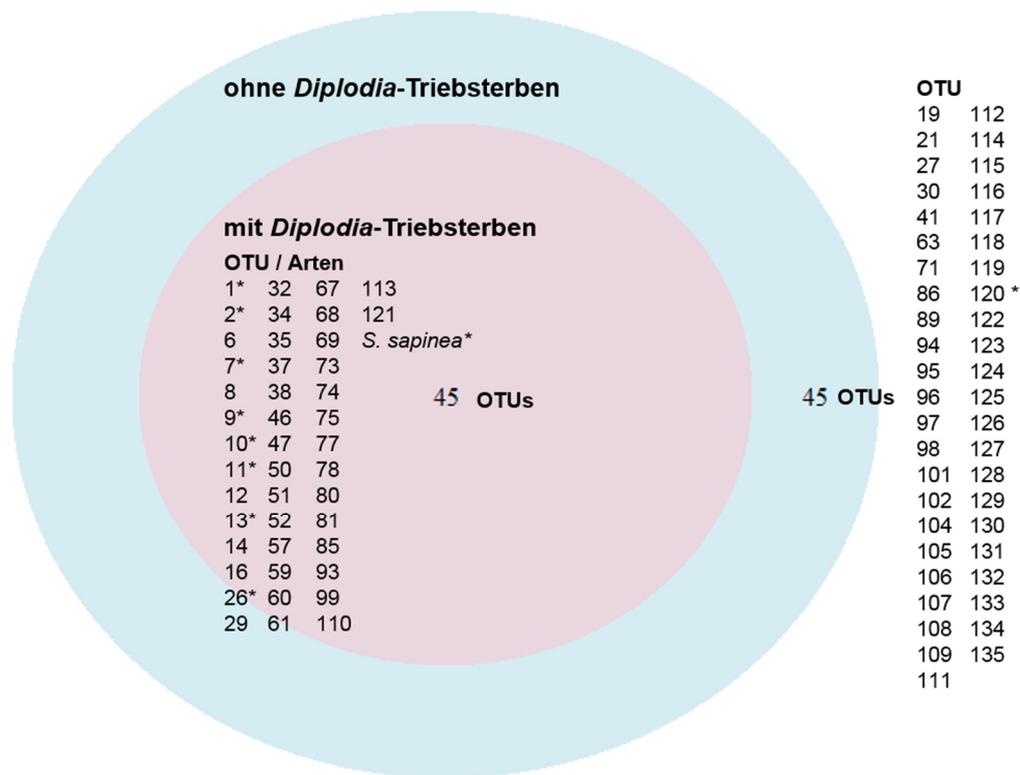


Abbildung 43: Venn-Diagramm des Vorkommens der OTUs in Kiefernzweigen von Bäumen mit (rosa) und ohne (blau) Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens, alle Arten mit einer relativen Häufigkeit von > 1 % sind mit einem * gekennzeichnet.

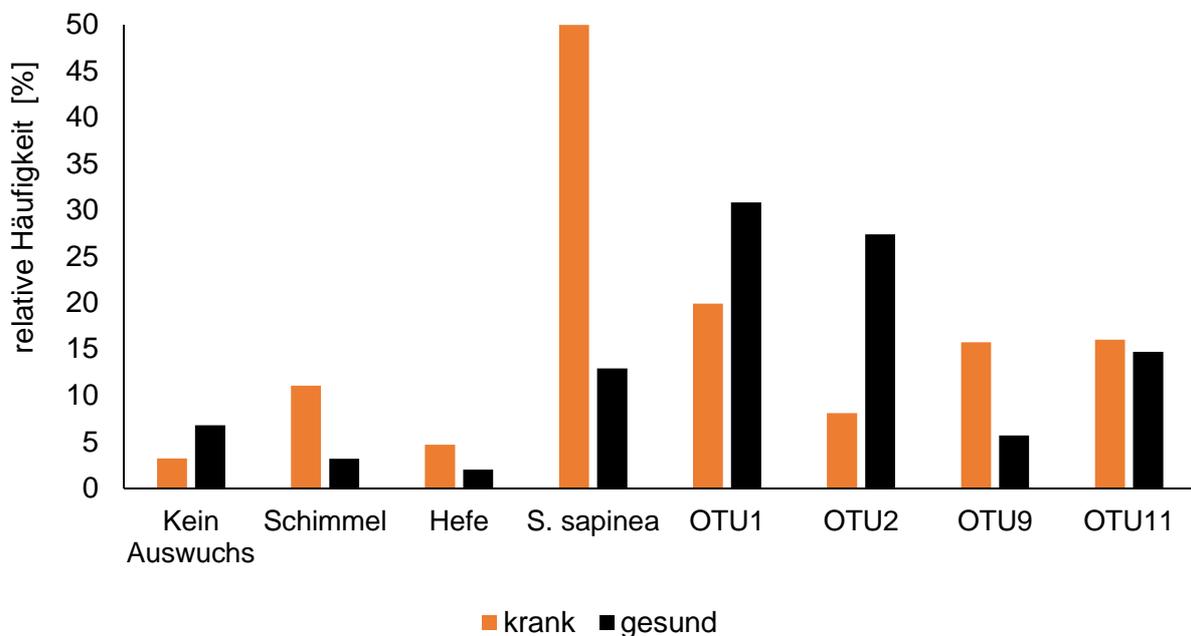


Abbildung 44: Relative Häufigkeiten ausgewählter OTUs in Triebsegmenten von Bäumen mit (krank) und ohne Symptome (gesund) des *Diplodia*-Triebsterbens.

In Tabelle 30 finden sich Angaben zu publizierten Arbeiten anderer Autoren über das endophytische Vorkommen von *S. sapinea*. Es zeigte sich in diesen Studien, dass das endophytische Vorkommen von *S. sapinea* in unterschiedlichem Umfang nachgewiesen werden konnte (Flowers et al. 2001, Flowers et al. 2003, Maresi et al. 2007, Bihon et al. 201, Tabelle 30). In weiteren Studien, die die Endophyten von *Pinus*-Gewächsen ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens untersuchten, wurde *S. sapinea* meist mit einer geringen Häufigkeit isoliert: Bei Kowalski und Kehr (1992) waren 2,1 % der Kiefernzweige mit *S. sapinea* besiedelt. Petrini und Fisher (1988) wiesen in 7 % der untersuchten Kiefernweigstücke (n = 200) *S. sapinea* nach. Martínez-Álvarez et al. (2012) wiesen *Diplodia* spp. mit einer relativen Häufigkeit von 3,7 % in Zweigen von *P. sylvestris* nach. Aus den Nadeln von *P. sylvestris* wurde *S. sapinea* von Kowalski (1993) mit einer Häufigkeit von unter 0,5 % und von Romeralo et al. (2012) mit einer RH von 3,9 % nachgewiesen. In Geweben von *P. nigra* wurde *S. sapinea* aus Zweigen mit einer Häufigkeit von 1,4 % von Kowalski und Zych (2002) isoliert. Bei Untersuchungen der Nadeln wurden 0,8 % der Isolate als *S. sapinea* identifiziert (Jurc et al. 1999). Hohe Infektionsraten mit *S. sapinea* wurden von Botella et al. (2010) gefunden, dort war *S. sapinea* der viert häufigste Pilz in Nadeln und Zweigen von absterbenden *P. halepensis*.

Tabelle 30: Ergebnisse zum endophytischen Vorkommen von *S. sapinea* in anderen publizierten Studien; - bedeutet keine Untersuchungen bzw. Angaben vorhanden.

Autor	Baumart	Anzahl unter-suchte Bäume		Anzahl Trieb-segmente	% -Anteil der vitalen Kiefern mit <i>S. sapinea</i>	% -Anteil der erkrankten Kiefern mit <i>S. sapinea</i>	
		vital	krank			Triebe mit Symptomlose Triebe	Triebe mit Symptomen
Diese Arbeit	<i>P. sylvestris</i>	166	24	~20 000	89	100	-
Flowers et al. 2001	<i>P. nigra</i> <i>P. sylvestris</i>	31	65	-	39	55	100
Flowers et al. 2003	<i>P. nigra</i>	-	13	325	-	77	-
Maresi et al. 2007	<i>P. nigra</i>	27	-	1300	59	-	-
Bihon et al. 2011a	<i>P. patula</i>	5	-	276	100	-	-

Die Abundanz der Arten (Abbildung 45) zeigt, dass nur wenige Pilzarten häufig vorkommen (RH > 5 %) und viele isolierte Arten selten auftreten. Die Artenakkumulationskurve beschreibt: je mehr Bäume untersucht wurden, desto mehr Arten wurden isoliert. Das heißt, würden mehr Kiefernzweige untersucht werden, würden vermutlich noch mehr Arten detektiert werden. Das legt auch die Schätzung der Arten mit verschiedenen Modellen nahe: Die Schätzung der zu findenden Arten durch verschiedene Methoden ergab nach CHAO insgesamt 118 Arten (Standardabweichung 17), nach JACKKNIFE1 110 Arten (Standardabweichung 7) und nach der Methode BOOTSTRAP 98 Arten (Standardabweichung 3,5).

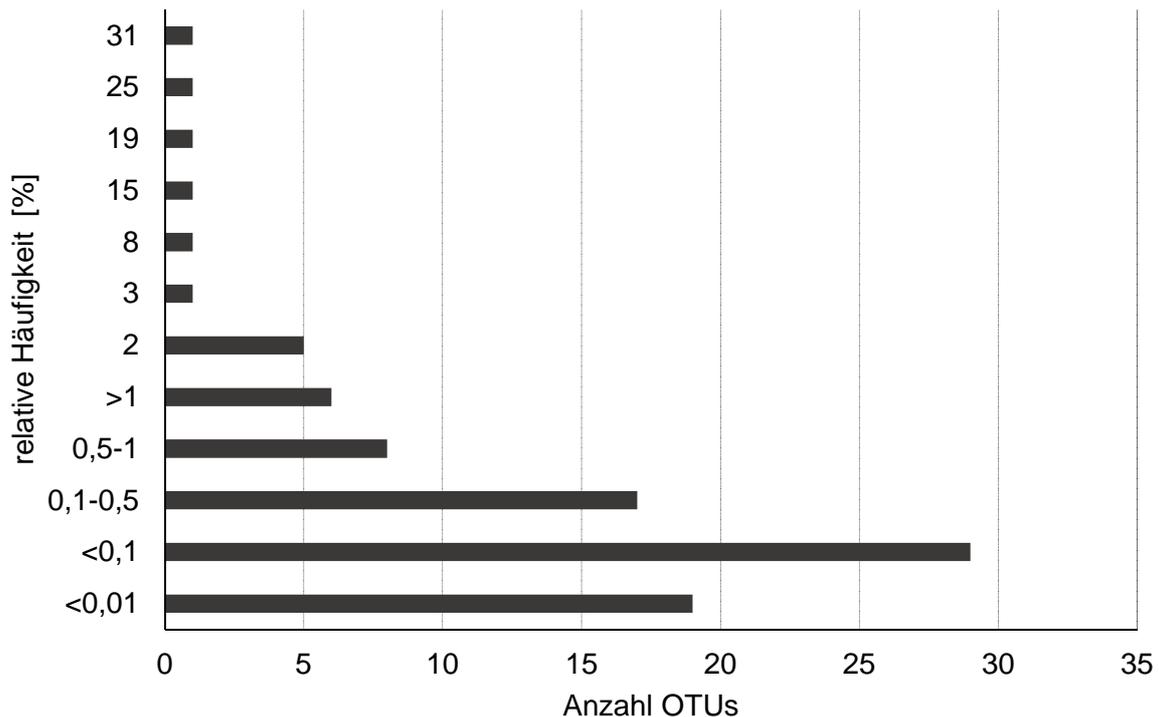


Abbildung 45: Gerundete relative Häufigkeit der OTUs in Prozent in allen untersuchten Kiefertriebsegmenten.

Diversität der Endophyten entlang des Transekts

In der Regel war kein Verteilungsmuster der Pilzarten hinsichtlich ihrer Häufigkeit und Auffinden entlang des Transekts festzustellen (Abbildung 47 - Abbildung 49). Eine Ausnahme für die Variation der Endophyten entlang des Längengrads und in Abhängigkeit von der Umgebungsvegetation ist der Pilz *Biscogniauxia mediterranea* (OTU52, Abbildung 46). *B. mediterranea* kam im Süden des Transekts und an Standorten mit Laubbäumen häufiger vor, als im Norden, wo zumeist reine Kiefernbestände an den Probepunkten vorhanden waren. Es gab aber Ausnahmen: so konnte z. B. an dem Probepunkt ST03 im Osten Sachsen-Anhalts (Abbildung 46) *B. mediterranea* häufig isoliert werden. *B. mediterranea* kam hier mit einer relativen Häufigkeit von 22 % vor, d. h. 22 % der untersuchten Triebsegmente waren mit dem Pilz besiedelt. An dem Standort ST03 (Pfeil, Abbildung 46) findet sich die Baumart Eiche mit der Kiefer im Oberstand.

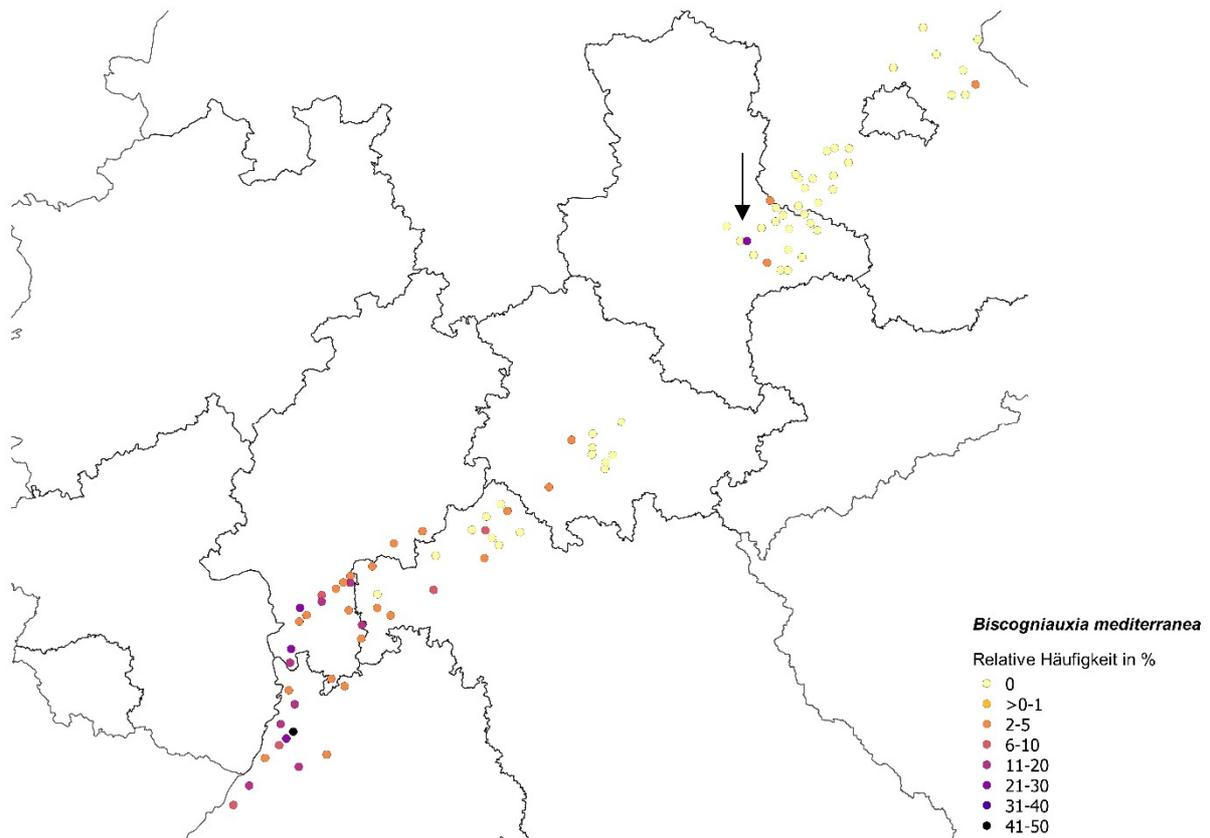


Abbildung 46: Endophytisches Vorkommen von *Biscogniauxia mediterranea* (OTU52) an 91 WZE-Punkten (% relative Häufigkeit); Hintergrund ©GeoBasis-DE/BKG 2013.

Die Variabilität der Endophytenzusammensetzung ließ sich auch nicht durch die durchgeführten Ordinationen erklären: diese zeigten, dass die zur Verfügung stehenden Variablen (Längengrad, Höhe über NN) die Muster in der Artenzusammensetzung nicht beschreiben konnten. Bei der Ordination mit den Aufnahmedaten der 91 Standorte entlang des Transekts hatten die ersten beiden Ordinationsachsen einen Eigenwert von nur 0,24 bzw. 0,21 (Abbildung 47). Bei der kanonischen Korrespondenzanalyse (CCA, Abbildung 49) kommen noch Umweltvariablen hinzu, dazu wird ein lineares Regressionsmodell benutzt. Sollte die Umweltvariable (z. B. der Längengrad) als Erklärung der Hauptvariation in der Artenstruktur stehen, müssten die Arten und Aufnahmen der DCA (Abbildung 48) und CCA (Abbildung 49) ungefähr in gleicher Position zu den Achsen liegen, was hier nicht der Fall war.

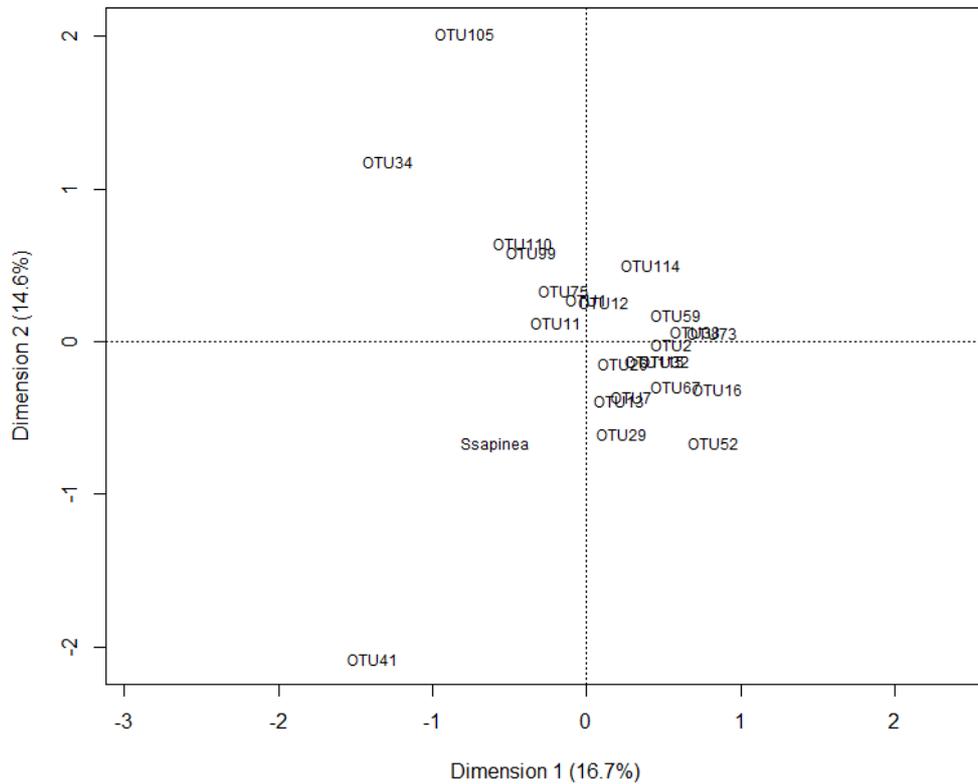


Abbildung 47: CA-Korrespondenzanalyse mit ausgewählten OTUs (CA / correspondence analysis).

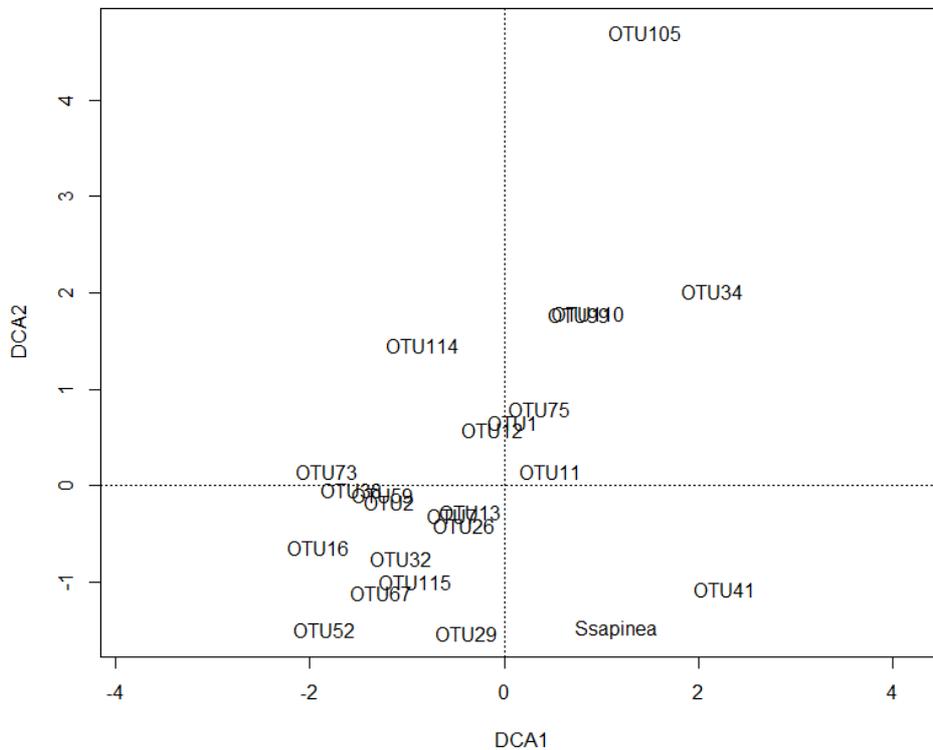


Abbildung 48: DCA-Korrespondenzanalyse mit ausgewählten OTUs (DCA / detrended correspondence analysis). Eigenwerte 0,2 (x-Achse und y-Achse), Länge der 2,2 SD / 2 SD (x-Achse / y-Achse).

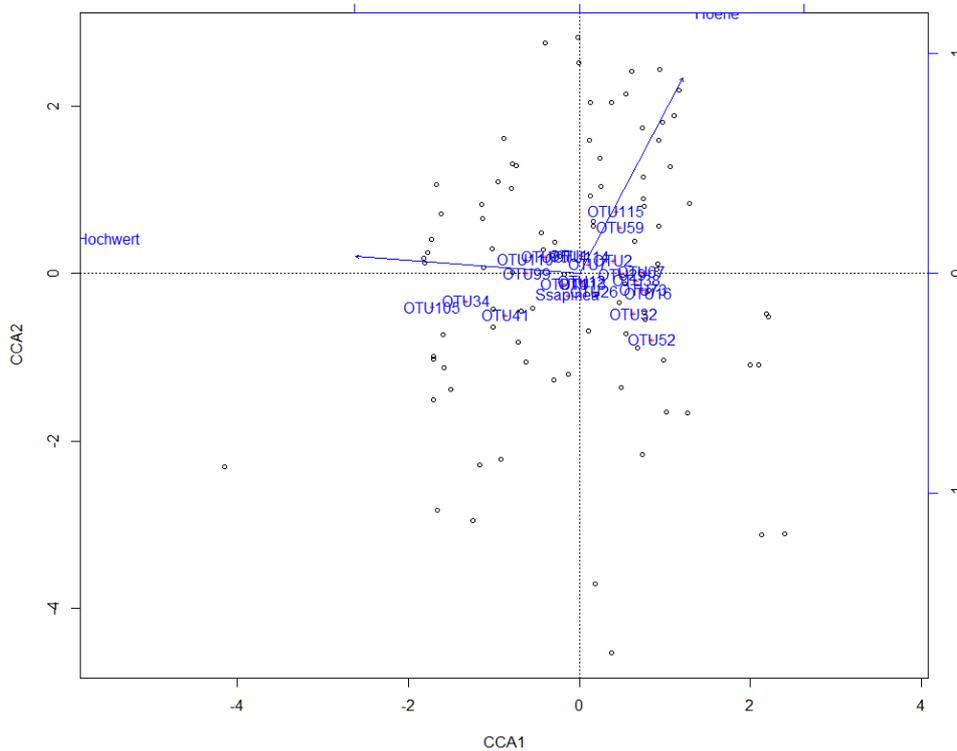


Abbildung 49: Kanonische Korrespondenzanalyse mit ausgewählten OTUs, (CCA / correspondence analysis) und den Variablen Höhe über NN und Hochwert (geographische Länge). Eigenwerte 0,2 / 0,17 (x-Achse / y-Achse).

Monatliche Untersuchung der Endophyten

Für diesen Versuch wurde stets die selbe, adulte Kiefer in Dransfeld zu Anfang jeden Monats von September 2015 bis April 2016 beprobt, die Ergebnisse sind in Tabelle 31 dargestellt. Die Anzahl der isolierten Pilzarten aus Kieferntrieben, die Besiedlungsrate und die Evenness waren bei den Beprobungen im Winter, insbesondere im Januar deutlich geringer als in den anderen Monaten (Tabelle 31). Die Vorkommen von *S. polyspora* und *M. olivacea* zeigten ein gegenläufiges Muster im Jahresverlauf in ihrer relativen Häufigkeit (Abbildung 50). Das Vorkommen von *S. polyspora* nahm in den Wintermonaten stark ab, das Vorkommen von *M. olivacea* hingegen stieg stark an (Abbildung 50).

Tabelle 31: Ergebnis der Isolation von Endophyten im Jahresverlauf, in den Monaten September 2015 - April 2016.

Monat	OTU Anzahl					Relative Häufigkeit in %		
	Gesamt	RH > 1 %	RH > 5 %	Besiedlungs- rate Ø	Eveness E	<i>S. polyspora</i>	<i>M. olivacea</i>	<i>S. sapinea</i>
Sep	28	15	6	1,6	0,7	38	37	1,4
Okt	30	10	7	1,5	0,6	24	51	0,0
Nov	32	13	5	1,3	0,6	20	51	0,3
Dez	27	12	4	1,2	0,5	15	73	1,3
Jan	24	9	2	1,2	0,4	5	81	2,5
Feb	28	10	4	1,3	0,5	15	65	1
März	28	10	5	1,4	0,5	12	74	2
April	24	13	4	1,4	0,6	19	64	0,5

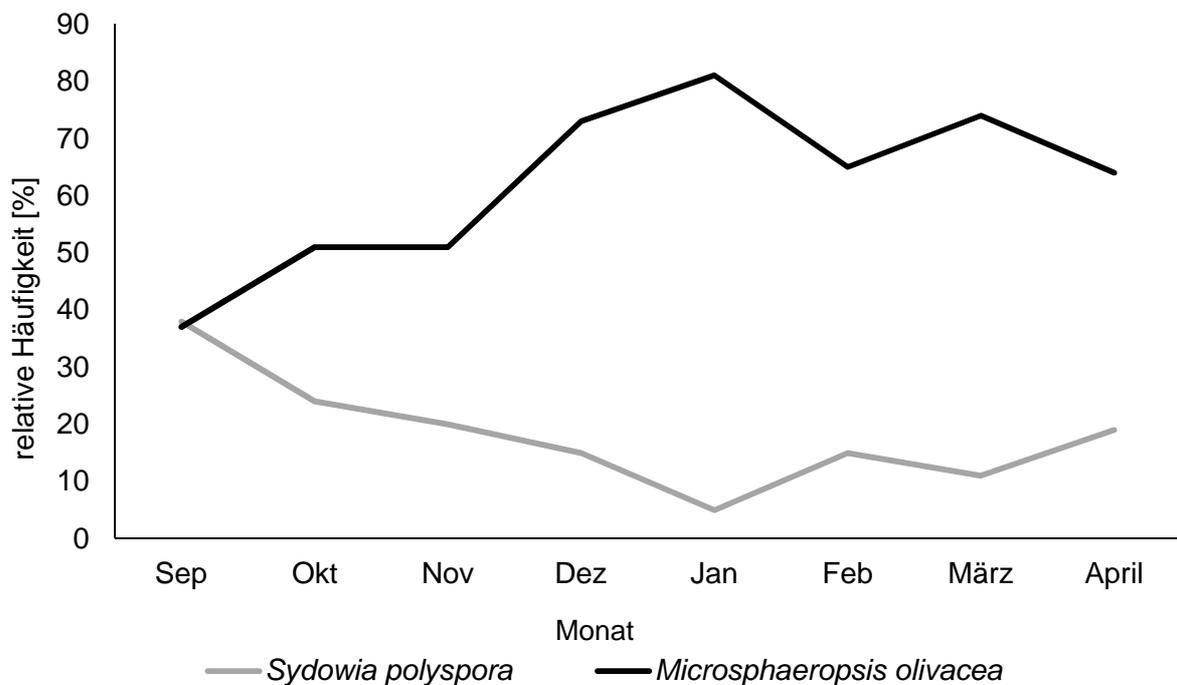


Abbildung 50: Relative Häufigkeit der Isolation von *S. polyspora* und *M. olivacea* im Jahresverlauf von September 2015 bis April 2016, relative Häufigkeit der endophytisch vorkommenden Pilzarten in Prozent von Triebsegmenten einer Kiefer aus Dransfeld.

Alter der Triebsegmente

Im Rahmen der Untersuchungen wurden 20 136 Holzsegmente inkubiert, bei denen das Alter bekannt war (Tabelle 32). *S. sapinea* kam in allen untersuchten Jahrgängen ungefähr gleich häufig vor (Abbildung 51). Bei Triebsegmenten des jüngsten Jahrgangs (1) wuchs in ca. 10% der Triebsegmente kein Pilz aus. Mit zunehmendem Alter der Triebsegmente erhöhte sich die Besiedlungsrate mit Pilzen (Tabelle 32). Bei *S. polyspora* und *M. olivacea* zeigte sich ein gegenläufiges Vorkommen, abhängig vom Alter. *S. polyspora* kam insbesondere in jüngeren Triebsegmenten gehäuft vor (Abbildung 51), das Vorkommens von *M. olivacea* hingegen nahm mit zunehmendem Alter der Triebsegmente zu (Abbildung 51). Bei allen anderen isolierten Pilzen ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Triebsegmente und ihrer Abundanz erkennen. Es stellte sich heraus, dass mit zunehmendem Alter der Triebsegmente die Anzahl an OTUs, die mit einer relativen Häufigkeit von > 1 bzw. > 5 % vorkommen, zunahm (Tabelle 32).

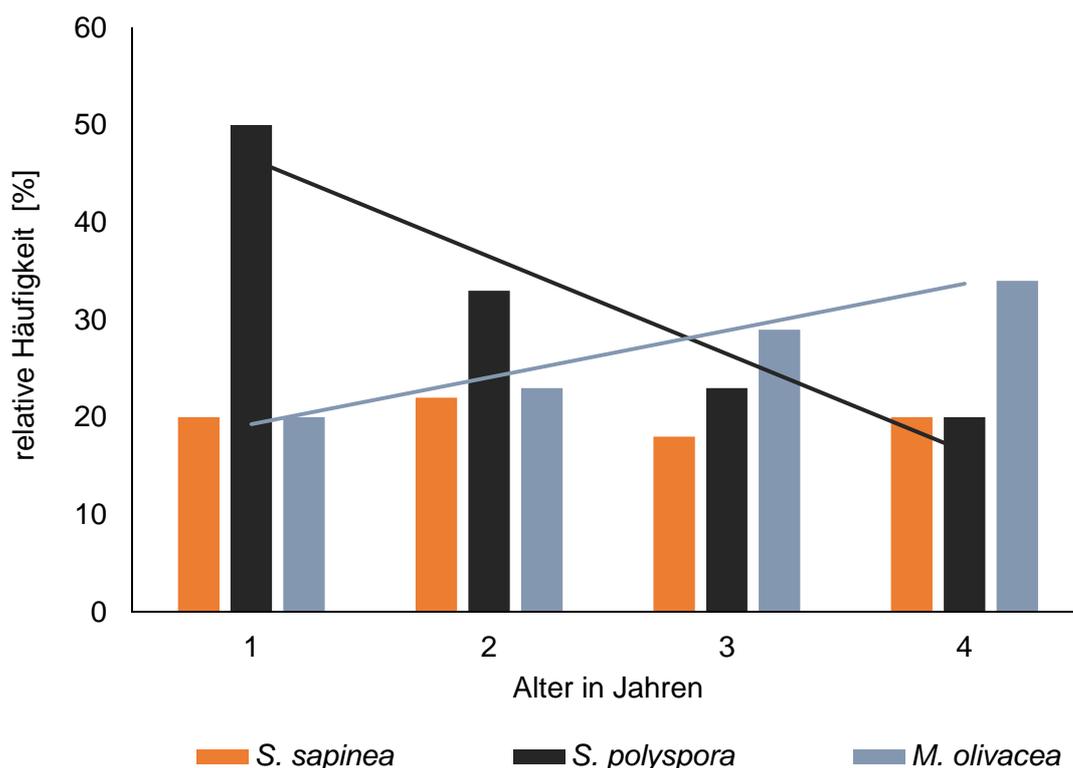


Abbildung 51: Alter der untersuchten Triebsegmente von Kiefer nach Alter in Jahren (1-4).

Tabelle 32: Vorkommen der Endophyten nach Alter der Triebsegmente. ¹arithmetisches Mittel der Besiedlungsrate (Anzahl Isolationen / Anzahl Triebsegmente), RH: relative Häufigkeit in Prozent; Jahrgang 1 ist der aktuelle, Jahrgang 4 der älteste der im Rahmen der Untersuchungen analysiert wurde. In die Analyse flossen folgende Anzahlen an Triebsegmenten mit ein: Jahrgang 1 (aktuell): 5369, Jahrgang 2: 5647, Jahrgang 3: 5566, Jahrgang 4: 3554.

Jahrgang	OTU-Anzahl	Kein Auswuchs RH	OTU-Anzahl mit RH > 1 %	OTU-Anzahl mit RH > 5 %	Besiedlungs- rate ¹	Eveness E	<i>S. sapinea</i> RH	<i>S. polyspora</i> RH	<i>M. olivacea</i> RH
1	58	10	12	6	1,3	0,57	20	50	20
2	66	1	17	11	1,5	0,63	22	33	23
3	66	1	20	12	1,4	0,66	18	23	29
4	63	0,3	21	13	1,4	0,65	20	20	34

3.2.3 Bewertung der Endophyten hinsichtlich Pathogenität und ökologischer Bedeutung

In Tabelle 33 finden sich Angaben zu vergleichbaren Studien anderer Autoren in denen ebenfalls Endophyten aus Kiefernzweigen isoliert wurden. Die Tabelle verdeutlicht, wie unterschiedlich der Umfang, das methodische Vorgehen und auch die isolierten Arten in den verschiedenen Studien waren. Durch die unterschiedlichen Angaben und den Umfang der Proben war ein Vergleich der Ergebnisse schwierig.

Tabelle 33: Übersicht über publizierte Arbeiten zu den Endophyten aus Zweigen von *P. sylvestris*. * Artanzahl exklusive nicht aufgeführter seltener Arten.

Quelle	Anzahl Isolate	Anzahl isolierte Arten	Häufigste Arten	Standort; Probenart; Sterilisationsmethode; Nährmedium; Inkubationszeit; Determination
Diese Arbeit	~ 20 000	90	<i>Sydowia polyspora</i> <i>Microsphaeropsis olivacea</i> <i>Sphaeropsis sapinea</i>	Deutschland; 1-4 jährige Zweige von adulten Bäumen; 5 min 3 % NaOCl; MYP; 1-4 Wochen; MT, Sporulation, ITS
Petrini und Fisher (1988)	400	19*	<i>Desmazierella acicola</i> <i>Phymatotrichopsis</i> sp. <i>Sordaria macrospora</i>	England; 2 - 3 jährige Zweige von adulten Bäumen; - ; 2 % MEA mit 250 mg / l Terramycin; 5 - 14 Tage; Sporulation
Kowalski und Kehr (1992)	ca. 1000	44	<i>Pezicula eucrita</i> <i>Sirodothis</i> spp. <i>Sydowia polyspora</i>	Deutschland und Polen; Zweigstücke unterschiedlich alter Bäume; 5 min 4 % NaOCl; 2 % MEA mit 100 mg / l Streptomycin; einige Wochen; Sporulation
Persoh et al. (2010)	Keine Angabe	13	Keine Angaben getrennt nach Nadeln und Zweigen vorhanden	Deutschland; Nadeln, Stammsegmente; 3 min 1,2 % NaOCl; MEA mit 0,1 % Tetracyclin; tägliche Kontrolle; MT und ITS
Martinez-Alvarez et al. (2012)	216	10	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Deuteromycet</i> <i>Cladosporium</i> sp.	Spanien; Zweigstücke und Nadeln; 5 - 7 min 2 % NaOCl; PDA; 1 Monat dunkel; Sporulation und MT
Sanz-Ros et al. (2015)	360	42	<i>Phoma herbarum</i> <i>Sydowia polyspora</i> <i>Alternaria infectoria</i>	Spanien; Zweigstücke; 5 min 6% NaOCl; PDA; bis zu einem Monat; ITS

Im Rahmen einer Literaturrecherche zu Endophyten, die aus *Pinus* spp. isoliert wurden, wurden 38 publizierte Arbeiten analysiert (Tabelle 34 / Tabelle 33). Die Angaben (insgesamt 1950 Artnennungen) wurden mit den 90 hier isolierten Pilzarten und ihren 595 Synonymen (Index Fungorum) verglichen. Die verschiedenen Autoren unterscheiden dabei Isolate aus:

- Zweigen von *P. sylvestris*
- verschiedenen Organen (Nadel, Knospe, Wurzel, Splintholz) von *P. sylvestris*
- Arten der Gattung *Pinus* (Nadel, Knospe, Wurzel, Splintholz) ohne *P. sylvestris*

Der Vergleich von verschiedenen publizierten Arbeiten zu Endophyten in *Pinus*-Gewächsen (Tabelle 35) zeigte, dass im Rahmen dieser Arbeit 13 Endophyten-

arten neu für die Gattung *Pinus* beschrieben worden sind, 20 endophytische Pilze für verschiedene Gewebe von *P. sylvestris* und 26 endophytische Pilzarten erstmalig aus Zweigen von *P. sylvestris* isoliert wurden (Tabelle 36).

Tabelle 34: Übersicht der wissenschaftlichen Arbeiten zu Endophyten von *P. sylvestris* und *Pinus* spp., die Zahl, die hinter den Autoren angegeben ist, ist die Referenznummer für Tabelle 35.

Isolationen aus Zweigen von <i>Pinus sylvestris</i>	Isolationen aus Nadeln, Knospen, Wurzeln, Splint von <i>Pinus sylvestris</i>	Isolationen aus verschiedenen Gewebetypen von <i>Pinus</i> spp.
Kowalski und Kehr (1992)	Menkis und Vasaitis (2010) 1	Carroll et al. (1977) 5
Sanz-Ros et al. (2015)	Terhonen et al. (2011) 2	Guo et al. (2003) 6
Petrini und Fisher (1988)	Pirttilä et al. (2003) 3	Kowalski und Zych (2002) 7
Martínez-Álvarez et al. (2012)	Kwaśna (2008) 4	Lygis et al. (2010) 9
Peršoh et al. (2010)	Carroll et al. (1977) 5	Hata und Futai (1996) 10
	Fisher et al. (1991) 8	Martínez-Álvarez et al. (2012) 12
	Lygis et al. (2004) 11	Wang und Guo (2007) 13
	Martínez-Álvarez et al. (2012) 12	Botella und Diez (2011) 14
	Peršoh et al. (2010) 15	Sieber et al. (1999) 18
	Millberg et al. (2015) 16	Guo et al. (2008) 19
	Kowalski (1993) 17	Zamora et al. (2008) 21
	Giordano et al. (2009) 20	Min et al. (2014) 22
	Romeralo et al. (2012) 26	Larkin et al. (2012) 23
	Pinto et al. (2006) 33	Hoff et al. (2004) 24
	Menkis et al. (2006) 36	Qadri et al. (2014) 25
		Ganley und Newcombe (2006) 27
		Ganley et al. (2015) 28
		Carroll und Carroll (1978) 29
		Hata und Futai (1995) 30
		Jurc et al. (1996) 31
		Jurc et al. (1999) 32
		Pinto et al. (2006) 33
		Alonso et al. (2011) 34
		Lee et al. (2014) 35
		Lygis et al. (2014) 37

Tabelle 35: Bisher bekannte Endophyten aus *P. sylvestris* und *Pinus* spp., für die Referenznummern siehe Tabelle 34; die Nummer ist **fett** gedruckt, wenn die Art gefunden wurde, normal gedruckt, wenn nur die Gattung isoliert wurde.

OTU	Name	<i>P. sylvestris</i> Zweige					alle Gewebetypen	alle Gewebetypen
		Kowalski und Kehr 1992	Sanz-Ros et al. 2015	Martínez-Álvarez et al. 2012	Petrini und Fisher 88	Peršoh et al. 2010	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinus</i> spp.
	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	x		x	x		17,26	7,14,32,37
1	<i>Sydowia polyspora</i>	x	x				2,5,16,17,36	5,7,18,23,27,31,34,35,37
2	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	x			x		1,17,36	7,18,25,31,34
6	<i>Chaetomium globosum</i>			x			1,8,12,17,26,36	12,14,22,23
7	<i>Epicoccum nigrum</i>	x					2,12,17,20,26,36	7,12,13,14,21,23,24,25,28,34,37
8	<i>Sordaria</i> sp.	x	x		x		16,17	12,14,21,25
9	<i>Sordaria fimicola</i>	x	x		x		16,17	12,14,21,25
10	<i>Nigrospora oryzae</i>		x			x		10,25,34,35
11	<i>Truncatella conorum-piceae</i>						1,2,36	12,13,14,19,22,25,30
12	<i>Diaporthe</i> sp. 1	x			x			7,10,13,14,19,21,22,25,27,30,31,34,35
13	<i>Alternaria alternata</i>	x	x	x			1,2,12,17,20,26,36	7,12,13,14,19,21,24,25,30,31,34,35,37
14	<i>Lecanicillium psalliotae</i>							
16	<i>Diaporthe</i> sp. 2	x			x			7,10,13,14,19,21,22,25,27,30,31,34,35
19	<i>Drechslera</i> sp.						2,17	7,19,28,34
21	<i>Rosellinia</i> sp. 1						2,17	6,10,23,25
26	<i>Xylaria longipes</i>		x				5,11,17	6,7,13,14,18,23,25,31,34,35
27	<i>Xylaria polymorpha</i>		x				5,11,17	6,7,13,14,18,23,25,31,34,35
29	<i>Fusarium</i> sp.		x				1,11,16,20,26,33,36	14,19,22,25,33,34
30	Sordariales							
32	<i>Nemania diffusa</i>						15	6,23,27
34	<i>Desmazierella acicola</i>	x			x		17	7
35	<i>Pezizomycetes</i> sp. 1							
37	<i>Chaetomium</i> sp. 1			x			1,8,12,17,26,36	12,14,22,23

		<i>P. sylvestris</i> Zweige					alle Gewebetypen	alle Gewebetypen
		Kowalski und Kehr 1992	Sanz-Ros et al. 2015	Martínez-Álvarez et al. 2012	Petrini und Fisher 88	Peršoh et al. 2010		
OTU	Name						<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinus</i> spp.
38	<i>Rosellinia</i> sp. 2						2,10,17	6,23,25
41	<i>Diaporthe</i> sp. 3	x			x			7,10,13,14,19,21,22,25,27,30,31,34,35
46	<i>Chaetomium</i> sp. 2			x			1,8,12,17,26,36	12,14,22,23
47	<i>Lecythophora</i> sp. 1	x			x		1,17,36	7,18,25
50	<i>Trichocladium</i> sp.						17	
51	<i>Chromelosporium carneum</i>						17	23,37
52	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>		x				15	6,35
57	<i>Phoma eupyrena</i>		x				20,36	13,14,19,22,23,25,27,31,34
59	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	x			x	x	2,15,17	6,7,18,31,35
60	<i>Lecythophora</i> sp. 2	x			x		1,17,36	7,18,25,37
61	<i>Beauveria bassiana</i>		x				11,20	27
63	<i>Nigrospora</i> sp.		x			x		10,25,34
67	<i>Camarosporium brabeji</i>							14
68	<i>Xylaria</i> sp. 1		x				5,11,17	6,7,13,14,18,23,25,31,34,35
69	Ascomycet sp. 1							
71	<i>Trichoderma</i> sp.		x				1,2,4,8,11,20,33,36	9,12,14,21,22,25,33,34,37
73	<i>Biscogniauxia nummularia</i>		x				15	6,35
74	<i>Pyronema domesticum</i>							14
75	<i>Daldinia concentrica</i>		x		x		2	6,23
77	<i>Daldinia childiae</i>		x		x		2	6,23
78	<i>Coniochaeta ligniaria</i>				x		17	23,25
80	<i>Botrytis cinerea</i>						11,16,17	7,12
81	<i>Alternaria</i> sp.	x	x	x			2,12,17,20,26,36	7,9,12,13,14,21,24,25,30,31,34
85	<i>Alternaria infectoria</i>	x	x	x			2,12,17,20,26,36	7,9,12,13,14,21,23,24,25,30,31,34,37
86	<i>Cladosporium</i> sp. 1	x		x			8,12,16,17,20,26	7,12,14,18,19,21,22,23,24,25,27,28,31,34,35
89	<i>Xylaria</i> sp. 2		x				5,11,17	6,7,13,14,18,23,25,31,34,35
93	Ascomycet sp. 2							

OTU	Name	<i>P. sylvestris</i> Zweige					alle Gewebetypen	alle Gewebetypen
		Kowalski und Kehr 1992	Sanz-Ros et al. 2015	Martínez-Álvarez et al. 2012	Petrini und Fisher 88	Peršoh et al. 2010	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinus</i> spp.
94	<i>Acremonium</i> sp.		x				16,20	22,31,34
95	<i>Cladosporium</i> sp. 2	x		x			8,12,15,16,17,20,26	7,12,14,18,19,21,22,23,24,25,27,28,31,34,35,37
96	<i>Podospora curvicolla</i>						20	35
97	<i>Arthrinium kogelbergense</i>						17	10,19,21,34
98	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>						16	
99	<i>Nemania serpens</i>	x					1,15	5,6,23,27,31
101	<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	x			x	x	2,15,17	6,7,18,31,35
102	<i>Peniophora pini</i>						16,20	
104	<i>Phoma</i> sp. 1		x				20,36	13,14,19,22,23,25,27,31,34
105	<i>Xylaria</i> sp. 3		x				5,11,17	6,7,13,14,18,23,25,31,34,35
106	<i>Phoma</i> sp. 2		x				20,36	13,14,19,22,23,25,27,31,34
107	<i>Jugulospora rotula</i>							
108	<i>Preussia</i> sp. 1						16	12,14,23,25,35
109	<i>Microdochium nivale</i>							
110	<i>Pezicula eucrita</i>	x	x					6,7,37
111	<i>Umbelopsis isabellina</i>						11,20	9,22,24
112	<i>Lambertella</i> sp.							
113	Ascomycet sp. 3							
114	<i>Gnomoniaceae</i> sp.							
115	<i>Phacidium lacerum</i>	x						6,31
116	<i>Penicillium</i> sp.		x	x			1,2,8,12,16,20,26,36	9,12,14,21,22,23,24,25,31,37
117	<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>						16	
118	<i>Truncatella</i> sp. 2						1,2,36	12,13,14,19,22,25,30
119	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1							12,13,14,19,22,25,30,31,34
120	<i>Pezicula</i> sp. 1	x	x					6,7
121	<i>Diaporthe</i> sp. 4	x			x			7,10,13,14,19,21,22,25,27,30,31,34,35
122	<i>Apiognomonia</i> sp. 1							

		<i>P. sylvestris</i> Zweige					alle Gewebetypen	alle Gewebetypen
		Kowalski und Kehr 1992	Sanz-Ros et al. 2015	Martínez-Álvarez et al. 2012	Petrini und Fisher 88	Peršoh et al. 2010		
OTU	Name						<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinus</i> spp.
123	<i>Pezicula neosporulosa</i>	x	x					6,7,37
124	<i>Pezicula cinnamomea</i>	x	x					6,7,37
125	<i>Pezicula</i> sp. 3	x	x					6,7,37
126	<i>Apiognomonina</i> sp. 2							
127	<i>Leotiomyces</i> sp.							
128	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2							12,13,14,19,22,25,30,31,34
129	<i>Coprinellus</i> sp.							36
130	Pleosporaceae sp.							
131	<i>Phoma</i> sp. 3		x				20,36	13,14,19,22,23,25,27,31,34
132	<i>Preussia</i> sp. 2						16	12,14,23,25,35
133	<i>Periconia</i> sp.							23
134	<i>Peziza varia</i>							14,23
135	<i>Pezizomyces</i> sp. 2							

Die ökologische Eingruppierung der Endophyten findet sich in Tabelle 37. Viele isolierte Pilze wurden bereits in anderen Studien an Kieferngewächsen isoliert. Es finden sich zahlreiche Saprophyten unter den Pilzen, potentielle Pathogene sind auch detektiert worden, wobei die meisten aber bisher nicht an *Pinus* sp. in Erscheinung getreten sind. Auffällig war, dass viele isolierte Pilzstämme typische mit Laubholz assoziierte Pilze sind (Tabelle 37).

Tabelle 36: Erstmalig endophytisch isolierte Pilzarten aus verschiedenen Gewebetypen von *Pinus* spp., verschiedenen Gewebetypen von *P. sylvestris* und Zweigen von *P. sylvestris*.

<i>Pinus</i> spp. ohne <i>P. sylvestris</i>	<i>P. sylvestris</i>	Zweige <i>P. sylvestris</i>
<i>Truncatella conorum-piceae</i>	<i>Truncatella conorum-piceae</i>	<i>Truncatella conorum-piceae</i>
<i>Lecanicillium psalliotae</i>	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	<i>Lecanicillium psalliotae</i>
<i>Nemania diffusa</i>	<i>Nemania diffusa</i>	<i>Nemania diffusa</i>
<i>Pyronema domesticum</i>	<i>Pyronema domesticum</i>	<i>Pyronema domesticum</i>
<i>Daldinia childiae</i>	<i>Daldinia childiae</i>	<i>Daldinia childiae</i>
<i>Coniochaeta ligniaria</i>	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	<i>Coniochaeta ligniaria</i>
<i>Podospora curvicolla</i>	<i>Podospora curvicolla</i>	<i>Podospora curvicolla</i>
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	<i>Arthrinium kogelbergense</i>	<i>Arthrinium kogelbergense</i>
<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>
<i>Jugulospora rotula</i>	<i>Jugulospora rotula</i>	<i>Jugulospora rotula</i>
<i>Microdochium nivale</i>	<i>Microdochium nivale</i>	<i>Microdochium nivale</i>
<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>
<i>Pezicula neosporulosa</i>	<i>Pezicula neosporulosa</i>	<i>Pezicula neosporulosa</i>
	<i>Camarosporium brabeji</i>	<i>Camarosporium brabeji</i>
	<i>Peziza varia</i>	<i>Peziza varia</i>
	<i>Xylaria longipes</i>	<i>Xylaria longipes</i>
	<i>Xylaria polymorpha</i>	<i>Xylaria polymorpha</i>
	<i>Chromelosporium carneum</i>	<i>Chromelosporium carneum</i>
	<i>Daldinia concentrica</i>	<i>Daldinia concentrica</i>
	<i>Hypoxyton rubiginosum</i>	<i>Hypoxyton rubiginosum</i>
		<i>Phoma eupyrena</i>
		<i>Biscogniauxia nummularia</i>
		<i>Chaetomium globosum</i>
		<i>Botrytis cinerea</i>
		<i>Peniophora pini</i>
		<i>Umbelopsis isabellina</i>

Tabelle 37: Ökologische Eingruppierung der isolierten Endophyten. Die Pilze sind nach Familien geordnet aufgelistet. Die Spalte „potentielles Pathogen“ beschreibt Pilze, die schon mal an holzigen Gewächsen als Schaderreger in Erscheinung getreten sind. Für Pilze, die nur bis zur Gattung bestimmt sind, beziehen sich die Angaben auf andere Pilzarten aus derselben Gattung. Die Literaturstellen für die bereits in *Pinus*-Gewächsen assoziiert beschriebenen Pilze finden sich in Tabelle 35.

Art	Familie	OTU	Potentielles Pathogen	Saprophyt	Bereits als Endophyt in <i>Pinus</i> spp. beschrieben	Typischer Laubholzbesiedler	Epiphyt	Generalist	Quelle
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	Apiosporaceae	97	x	x				x	Crous und Groenewald (2013)
<i>Truncatella conorum-piceae</i>	Bartaliniaceae	11	x	x					Guba (1961); Maharachchikumbura et al. (2011); Landeskompetenz-zentrum Forst Eberswalde (2016)
<i>Truncatella</i> sp. 2	Bartaliniaceae	118	x	x	x				Guba (1961)
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	Bartaliniaceae	119	x	x	x				Guba (1961)
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	Bartaliniaceae	128	x	x	x				Guba (1961)
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Botryosphaeriaceae		x	x	x		x		Swart und Wingfield (1991)
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetomiaceae	6	x	x	x		x	x	Minter (2006b); Samson et al. (2010)
<i>Chaetomium</i> sp. 1	Chaetomiaceae	37	x	x	x		x	x	Minter (2006b); Samson et al. (2010)
<i>Chaetomium</i> sp. 2	Chaetomiaceae	46	x	x	x		x	x	Minter (2006b); Samson et al. (2010)
<i>Trichocladium</i> sp.	Chaetomiaceae	50		x	x			x	Kirk (1994)
<i>Desmazierella acicola</i>	Chorioactidaceae	34		x	x				Przybył et al. (2008); Martinović et al. (2016)
<i>Cladosporium</i> sp. 1	Cladosporiaceae	86	x		x			x	Samson et al. (2010)
<i>Cladosporium</i> sp. 2	Cladosporiaceae	95	x		x				Samson et al. (2010)
<i>Lecythophora</i> sp. 1	Coniochaetaceae	47	x	x	x				Domsch et al. (1993); Damm et al. (2010)
<i>Lecythophora</i> sp. 2	Coniochaetaceae	60	x	x	x				Domsch et al. (1993); Damm et al. (2010)
<i>Coniochaeta ligniaria</i>	Coniochaetaceae	78		x				x	Weber (2002)

Art	Familie	OTU	Potentielles Pathogen	Saprophyt	Bereits als Endophyt in Pinus spp. beschrieben	Typischer Laubholzbesiedler	Epiphyt	Generalist	Quelle
<i>Lecanicillium psalliotae</i>	Cordycipitaceae	14		x				x	Zare und Games (2003); Arevalo et al. (2009); Entomopathogen
<i>Beauveria bassiana</i>	Cordycipitaceae	61			x			x	Brady (1979); Entomomathogen
<i>Pezicula eucrita</i>	Dermateaceae	110	x	x	x				Verkley (1999)
<i>Pezicula sp. 1</i>	Dermateaceae	120	x		x				Verkley (1999)
<i>Pezicula neosporulosa</i>	Dermateaceae	123	x						Yuan und Verkley (2015)
<i>Pezicula cinnamomea</i>	Dermateaceae	124	x		x	x			Verkley (1999)
<i>Pezicula sp. 3</i>	Dermateaceae	125	x		x				Verkley (1999)
<i>Diaporthe sp. 1</i>	Diaporthaceae	12	x	x	x	x			Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe sp. 2</i>	Diaporthaceae	16	x	x	x	x			Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe sp. 3</i>	Diaporthaceae	41	x	x	x	x			Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe sp. 4</i>	Diaporthaceae	121	x	x	x	x			Gomes et al. (2013)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Didymellaceae	7		x	x		x	x	Fávaro et al. (2011); Samson et al. (2010)
<i>Phoma eupyrena</i>	Didymellaceae	57	x		x				Domsch et al. (1993); Hansen et al. (2013) bodenbürtig
<i>Phoma sp. 1</i>	Didymellaceae	104		x	x		x	x	Aveskamp et al. (2010); Samson et al. (2010)
<i>Phoma sp. 2</i>	Didymellaceae	106		x	x		x	x	Aveskamp et al. (2010); Samson et al. (2010)
<i>Phoma sp. 3</i>	Didymellaceae	131		x	x		x	x	Aveskamp et al. (2010); Samson et al. (2010)
<i>Sydowia polyspora</i>	Dothioraceae	1	x	x	x				Sutton und Waterston (1970); Brener et al. (1974); Talgø et al. (2010); Heydeck (1991); Heydeck und Dahms (2012);
<i>Gnomoniaceae sp.</i>	Gnomoniaceae	114	x			x			Sogonov et al. (2008)

Art	Familie	OTU	Potentiell Pathogen	Saprophyt	Bereits als Endophyt in Pinus spp. beschrieben	Typischer Laubholzbesiedler	Epiphyt	Generalist	Quelle
<i>Apiognomonia sp. 1</i>	Gnomoniaceae	122	x			x			Sogonov et al. (2008)
<i>Apiognomonia sp. 2</i>	Gnomoniaceae	126	x			x			Sogonov et al. (2008)
<i>Trichoderma sp.</i>	Hypocreaceae	71	x		x			x	Samson et al. (2010)
<i>Daldinia concentrica</i>	Hypoxylaceae	75		x	x	x			Breitenbach und Kränzlin (1984); Stadler et al. (2014)
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	Hypoxylaceae	59		x	x	x			Greenhalgh und Chesters (1968); Breitenbach und Kränzlin (1984); Rogers et al. (2002),
<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	Hypoxylaceae	101			x	x			Breitenbach und Kränzlin (1984); Rogers et al. (2002)
<i>Podospora curvicolla</i>	Lasiosphaeriaceae	96		x					Mirza und Cain (1969); Lundqvist (1972)
<i>Jugulospora rotula</i>	Lasiosphaeriaceae	107		x					Lundqvist (1972); Brandstellen
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	Montagnulaceae	2			x			x	Chen et al. (2015); Liu et al. (2015)
<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	Montagnulaceae	98						x	Verkley et al. (2014)
<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	Montagnulaceae	117						x	Verkley et al. (2014)
<i>Fusarium sp.</i>	Nectriaceae	29	x	x	x			x	Samson et al. (2010)
<i>Chromelosporium carneum</i>	Pezizaceae	51		x	x				Hennebert (1973)
<i>Peziza varia</i>	Pezizaceae	134		x	x				Breitenbach und Kränzlin (1984)
<i>Phacidium lacerum</i>	Phacidiaceae	115			x				Nawrot-Chorabik et al. (2013, 2016); Crous et al. (2014)
<i>Alternaria alternata</i>	Pleosporaceae	13		x	x			x	Samson et al. (2010)
<i>Drechslera sp.</i>	Pleosporaceae	19			x				
<i>Alternaria sp.</i>	Pleosporaceae	81	x		x			x	Samson et al. (2010)
<i>Alternaria infectoria</i>	Pleosporaceae	85	x		x			x	Samson et al. (2010)

Art	Familie	OTU	Potentiell Pathogen	Saprophyt	Bereits als Endophyt in Pinus spp. beschrieben	Typischer Laubholzbesiedler	Epiphyt	Generalist	Quelle
<i>Pleosporaceae sp.</i>	Pleosporaceae	130							KA
<i>Microdochium nivale</i>	Phlogicylindriaceae	109							Chang et al. (2011) Pathogen an Getreide/Rasen
<i>Pyronema domesticum</i>	Pyronemataceae	74							Breitenbach und Kränzlin (1984); Brandstellen
<i>Lambertella sp.</i>	Rutstroemiaceae	112	x	x					Zhao et al. (2016)
<i>Botrytis cinerea</i>	Sclerotiniaceae	80	x		x				Domsch et al. (1993); Samson et al. (2010)
<i>Sordaria sp.</i>	Sordariaceae	8			x			x	Lundqvist (1972)
<i>Sordaria fimicola</i>	Sordariaceae	9		x	x			x	Lundqvist (1972)
<i>Preussia sp. 1</i>	Sporormiaceae	108		x	x				Domsch et al. (1993)
<i>Preussia sp. 2</i>	Sporormiaceae	132		x	x				Domsch et al. (1993)
<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	116			x			x	Samson et al. (2010)
<i>Umbelopsis isabellina</i>	Umbelopsidaceae	111		x	x				Meyer und Gams (2003); bodenbürtig und cropophil
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	Xylariaceae	52	x		x	x			Jong und Rogers (1972); Breitenbach und Kränzlin (1984) Henriques et al. (2014)
<i>Rosellinia sp.1</i>	Xylariaceae	21	x		x	x			Fournier und Magni (2004c); Petrini und Petrini (2005); Butin (2011)
<i>Xylaria longipes</i>	Xylariaceae	26			x	x			Breitenbach und Kränzlin (1984)
<i>Xylaria polymorpha</i>	Xylariaceae	27			x	x			Breitenbach und Kränzlin (1984)
<i>Nemania diffusa</i>	Xylariaceae	32		x		x			Fournier und Magni (2004b); Balasuriya und Adikaram (2009)
<i>Rosellinia sp. 2</i>	Xylariaceae	38	x		x	x			Fournier und Magni (2004c); Petrini und Petrini (2005)

Art	Familie	OTU	Potentielle Pathogen	Saprophyt	Bereits als Endophyt in Pinus spp. beschrieben	Typischer Laubholzbesiedler	Epiphyt	Generalist	Quelle
<i>Xylaria sp. 1</i>	Xylariaceae	68		x	x				Petrini und Petrini (1985)
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	Xylariaceae	73	x	x	x	x			Fournier und Magni (2004d); Luchi et al. (2006)
<i>Daldinia childiae</i>	Xylariaceae	77		x		x			Stadler et al. (2014)
<i>Xylaria sp. 2</i>	Xylariaceae	89		x	x				Petrini und Petrini (1985)
<i>Nemania serpens</i>	Xylariaceae	99			x	x			Breitenbach und Kränzlin (1984)
<i>Xylaria sp. 3</i>	Xylariaceae	105		x	x				Petrini und Petrini (1985)
<i>Nigrospora oryzae</i>	Incertae sedis	10		x	x			x	Sivanesan und Holliday (1971)
<i>Nigrospora sp.</i>	Incertae sedis	63	x	x	x			x	Domsch et al. (1993)
<i>Camarosporium brabeji</i>	Incertae sedis	67	x		x				Botella und Diez (2011)
<i>Acremonium sp.</i>	Incertae sedis	94		x	x				Samson et al. (2010)
<i>Periconia sp.</i>	Incertae sedis	133							Domsch et al. (1993); Bodenzpilz
Leotiomycetes sp.		127							KA
<i>Sordariales</i>		30		x					Zhang et al. (2006)
Pezizomycetes sp. 1		35		x					Hansen et al. (2013)
Pezizomycetes sp. 2		135		x					Hansen et al. (2013)
Ascomycet sp. 1		69							KA
Ascomycet sp. 2		93							KA
Ascomycet sp. 3		113							KA
<i>Peniophora pini</i>	Peniophoraceae	102		x	x				Bernicchia und Gorjón (2010)
<i>Coprinellus sp.</i>	Psathyrellaceae	129		x					Gminder (2010)

3.3 Untersuchungen zu ausgewählten Endophyten

3.3.1 Temperaturversuche

Die ermittelten Temperaturen für die Minimal-, Optimal- und die Kardinaltemperaturen für das Myzelwachstum der vier *S. sapinea*-Stämme, *S. polyspora* (OTU1), *M. olivacea* (OTU2) und *Truncatella conorum-piceae* (OTU11) sind in Tabelle 38 dargestellt, Fotos der untersuchten Pilzstämmen finden sich in Abbildung 52. Alle getesteten *S. sapinea*-Isolate zeigten ein Wuchsoptimum *in vitro* bei Temperaturen um 26 °C (Abbildung 54). Es waren keine Unterschiede zwischen den endophytischen Stämmen aus vitalen Kieferngeweben (NW-FVA 2703 und 2715) bzw. den parasitischen *S. sapinea*-Stämmen aus erkrankten Geweben (NW-FVA 2738 und 2740) zu erkennen (Abbildung 54).

M. olivacea zeigte ein Wuchsoptimum *in vitro* bei einer Temperatur von 12,3 °C (Abbildung 55). *S. polyspora* und *Truncatella conorum-piceae* zeigten ein Wuchsoptimum *in vitro* bei einer Temperatur von 21,6 °C (Abbildung 55). Bei höheren Temperaturen (35,7 °C) zeigten *S. sapinea*-Stämme ein sehr geringes Wachstum. In der Temperaturstufe 35,7 °C wurde bei *S. polyspora*, *M. olivacea* und *Truncatella conorum-piceae* hingegen kein Wachstum festgestellt, auch nach Beendigung des Versuchs wurde keine Wachstumsaktivität mehr festgestellt. Bei 40 und 45 °C wiesen die *S. sapinea*-Stämme kein Wachstum mehr auf (Abbildung 54). Nach Beendigung des Versuchs und Inkubation bei Raumtemperatur wuchsen die *S. sapinea*-Kulturen nach vorangegangener Inkubation bei 40 °C jedoch weiter, bei 45 °C hingegen war kein Wachstum nach Ende des Versuchs mehr zu beobachten. Bei der tiefsten Temperatur (0,3 °C) zeigten *S. polyspora* und die *S. sapinea*-Stämme kein Wachstum mehr, *M. olivacea* und *Truncatella conorum-piceae* hingegen wuchsen sehr gering. Einige der verwendeten Stämme waren während des Versuchs in ihrer Vitalität geschwächt bzw. von Hefen verunreinigt und konnten deshalb nicht über die gesamte Versuchsdauer beobachtet werden (Abbildung 54). Die Wachstumsversuche mit *M. olivacea* wurden teilweise erschwert bzw. waren nicht auszuwerten, da *M. olivacea* verschiedene Wuchsformen ausbildet (Abbildung 53).

Tabelle 38: Ergebnis des Temperaturversuchs von verschiedenen Pilzstämmen, Minimal-, Optimal- und Kardinaltemperaturen in °C.

Stamm	Minimal	Optimal	Kardinal
<i>S. sapinea</i>	zwischen 0 - 8	26	zwischen 36-40
OTU1	zwischen 0 - 8	22	zwischen 29-35
OTU2	< 0,3	12	zwischen 29-35
OTU11	< 0,3	22	zwischen 29-35

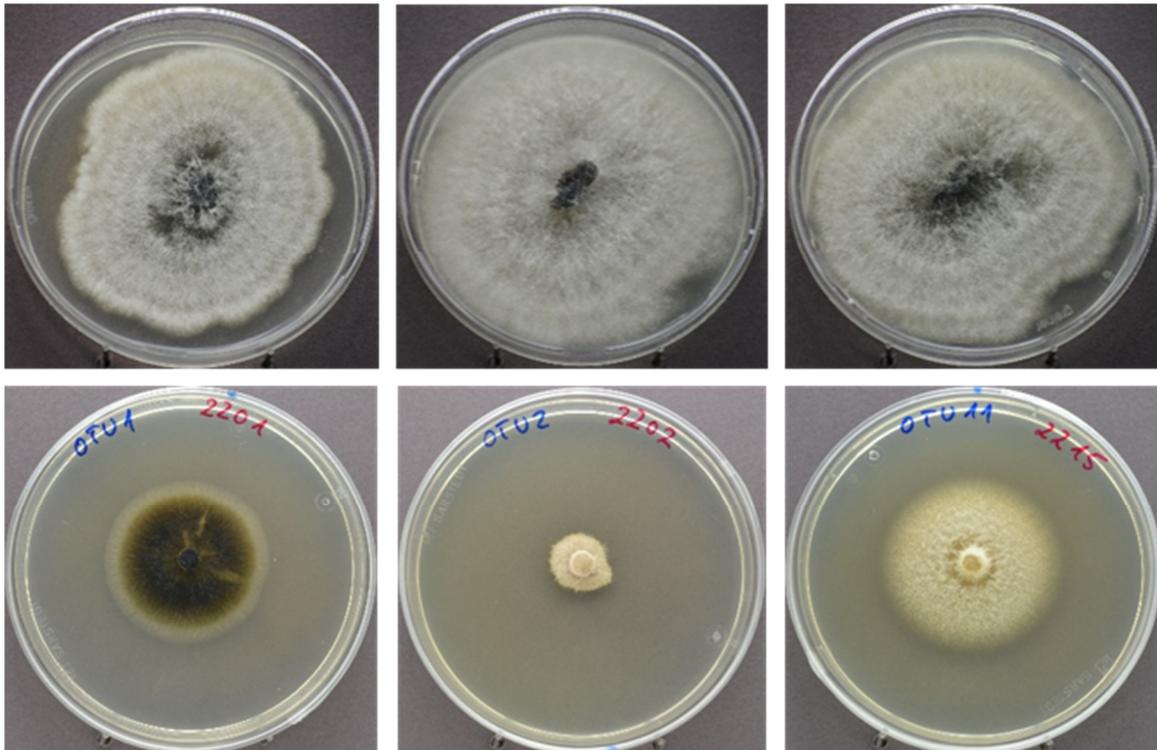


Abbildung 52: Morphologie der im Temperaturversuch verwendeten Kulturen: *S. sapinea*-Stämme (oben NW-FVA 2703, 2715, 2740), *S. polyspora* (OTU1, NW-FVA 2201), *M. olivacea* (OTU2, NW-FVA 2202) und *Truncatella conorum-piceae* (OTU11, NW-FVA 2215) in Kultur nach 7 Tagen bei RT auf MYP-Medium, obvers.

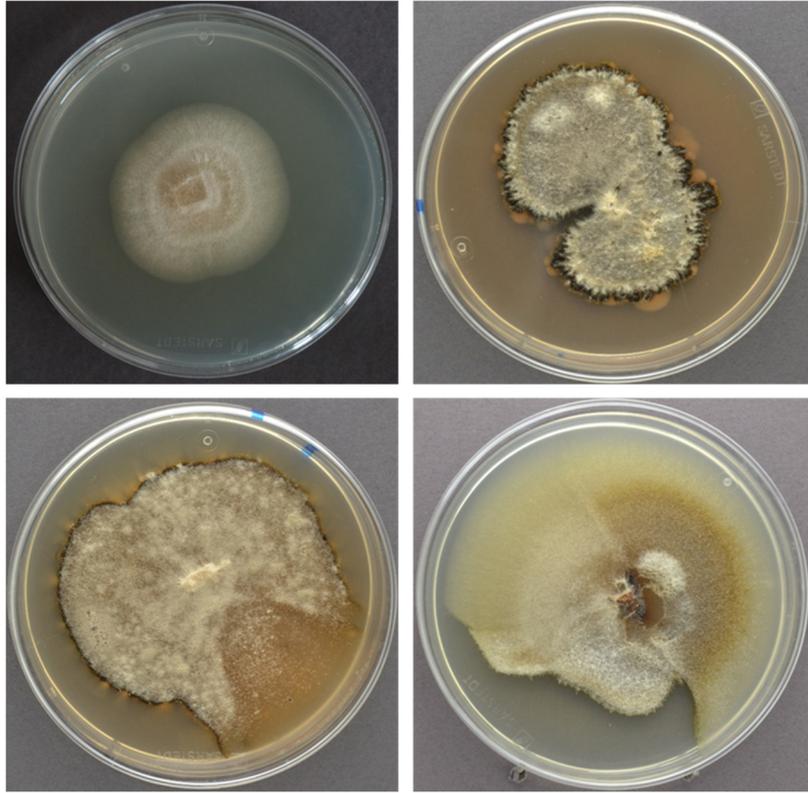


Abbildung 53: Verschiedene Wuchsformen von *M. olivacea* (OTU2, NW-FVA 2202), nach 7 bzw. 14 Tagen, auf MYP-Medium bei Raumtemperatur inkubiert.

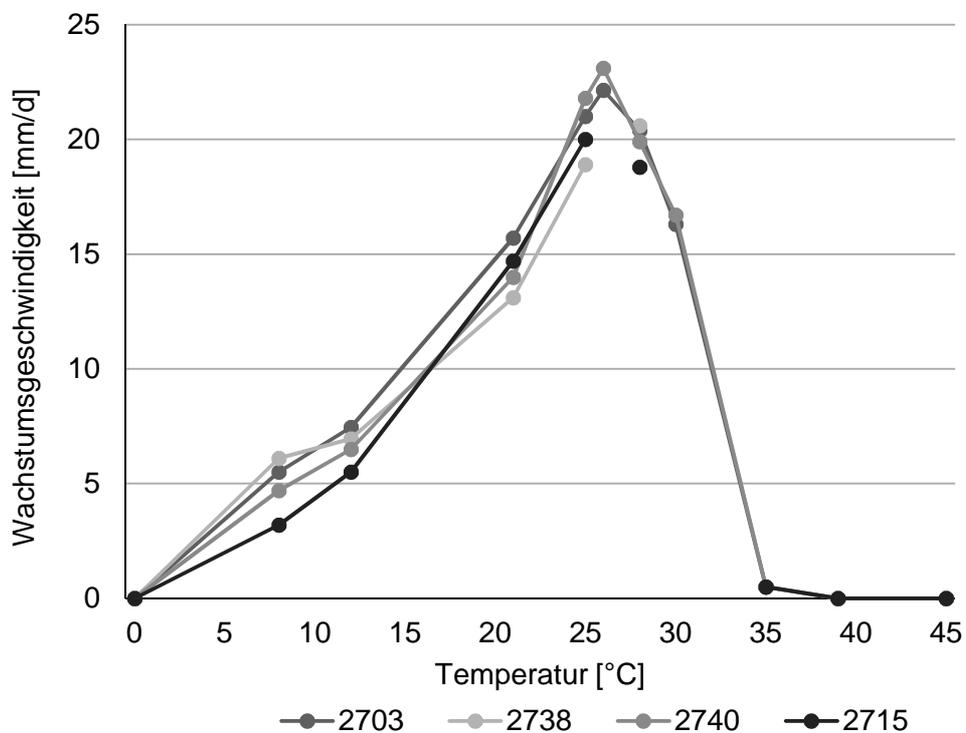


Abbildung 54: Wachstumsgeschwindigkeit von *S. sapinea*-Stämmen (NW-FVA 2703, 2715, 2738, 2740), die bei verschiedenen Temperaturen auf MYP-Medium inkubiert wurden.

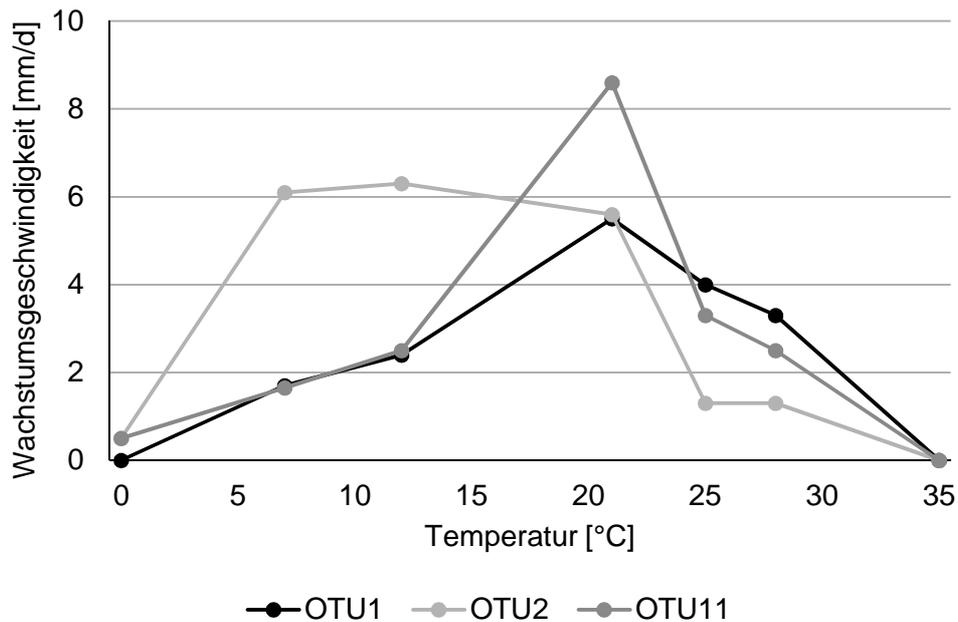


Abbildung 55: Wachstumsgeschwindigkeit von *S. polyspora* (OTU1, NW-FVA 2201), *M. olivacea* (OTU2, NW-FVA 2202) und *Truncatella conorum-piceae* (OTU11, NW-FVA 2215), die bei verschiedenen Temperaturen auf MYP-Medium inkubiert wurden.

3.3.2 VC-Test

Der VC-Test mit *S. sapinea*-Stämmen (aus an *Diplodia*-Triebsterben erkrankten Kiefern) zeigte, dass eine hohe Diversität des Pilzes vorhanden ist. Aus einem Kiefertrieb (2016-PF59-1-1) ließen sich 29 *S. sapinea*-Stämme isolieren, die 24 verschiedenen VC-Gruppen zugeordnet werden konnten. Aus einem zweiten Kiefertrieb (2016-PF59-1-2) wurden 16 *S. sapinea*-Stämme isoliert, die in 14 VC-Gruppen eingeteilt werden konnten.

3.3.3 Antagonistentests

Die Antagonistentests mit den 89 aus Kiefernzweigen isolierten Endophyten und Reinkulturen von *S. sapinea* unterschiedlichen Ursprungs (je ein *S. sapinea*-Stamm, der endophytisch aus Kieferntrieben isoliert wurde (NW-FVA 2740) und ein *S. sapinea*-Stamm, der aus Pyknidien von der Rinde eines Kiefernzweiges isoliert wurde (NW-FVA 2738) zeigten, dass *S. sapinea in vitro* nur von wenigen getesteten Endophyten im Wachstum gehemmt wurde. Es ließ sich kein Unterschied zwischen dem endophytisch isolierten *S. sapinea*-Stamm und dem aus Pyknidien isolierten Stamm erkennen.

Grundsätzlich ließen sich drei verschiedene Typen der Hemmung von *S. sapinea* durch die 89 getesteten endophytisch isolierten Pilze erkennen (Tabelle 39):

1.) Kontaktlose Hemmung von *S. sapinea* durch den Endophyten (Abbildung 56 links und Abbildung 57)

2.) *S. sapinea* wird durch das schnelle Wachstum des Endophyten überwachsen (Abbildung 56, Mitte)

3.) *S. sapinea* hatte ein verringertes Wachstum (Abbildung 56, rechts). Das heißt, dass das Wachstum von *S. sapinea* im Vergleich zu der Kombination *S. sapinea* / *S. sapinea* ein geringeres Wachstum aufwies (Wachstum von *S. sapinea* < 3,7 cm (Mittelwert der Messungen nach 7 Tage entlang der Zentral-Achse).

Tabelle 39: Verschiedene Formen der Hemmung von *S. sapinea* (NW-FVA 2738 und 2740) *in vitro*, es wurde das Wachstum von *S. sapinea* (arithmetische Mittel von 6 Wiederholungen je Stamm) in Millimetern nach 7 Tagen Inkubation zusammen mit einem potentiellen Antagonisten entlang der Zentral-Achse gemessen.

Kontaktlose Hemmung		<i>S. sapinea</i> wird von dem Endophyten überwachsen		Verringertes Wachstum von <i>S. sapinea</i>	
OTU	<i>S. sapinea</i>	OTU	<i>S. sapinea</i>	OTU	<i>S. sapinea</i>
<i>Chaetomium</i> sp. 2	39	<i>Sordaria</i> sp.	25	<i>N. oryzae</i>	35
<i>Alternaria</i> sp.	39	<i>S. fimicola</i>	25	<i>Fusarium</i> sp.	35
<i>P. eucrita</i>	38	<i>Trichoderma</i> sp.	21	<i>C. carneum</i>	31
<i>Pezicula</i> sp. 1	42	<i>P. domesticum</i>	17	<i>B. mediterranea</i>	33
<i>P. neosporulosa</i>	43	<i>D. concentrica</i>	26	<i>Nigrospora</i> sp.	34
<i>Pezicula</i> sp. 3	47			<i>B. cinerea</i>	31
				<i>A. kogelbergense</i>	36

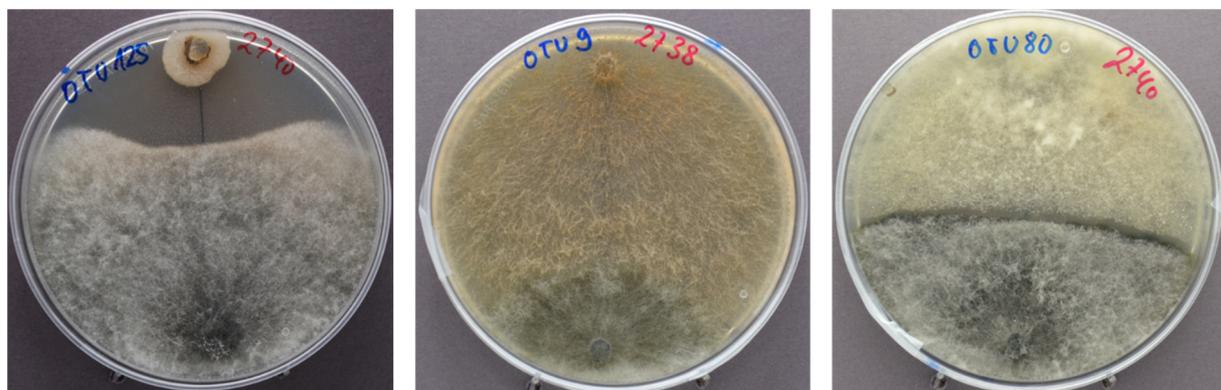


Abbildung 56: Verschiedene Dualkulturen im Antagonistentest, *S. sapinea*-Stamm versus links: *Pezicula* sp. 3 (OTU125), Mitte: *Sordaria fimicola* (OTU9) und rechts: *Botrytis cinerea* (OTU80), alle Fotos Aufsicht auf MYP-Medium nach 10 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur.

So ergaben die Antagonistentests, dass rund 7 % der Endophyten das Wachstum von *S. sapinea* kontaktlos hemmen (Typ 1, Abbildung 57).

- OTU81 (*Alternaria* sp.),
- OTU46 (*Chaetomium* sp.),
- OTU110, OTU120, OTU123 und OTU125 (*Pezizula* spp.)

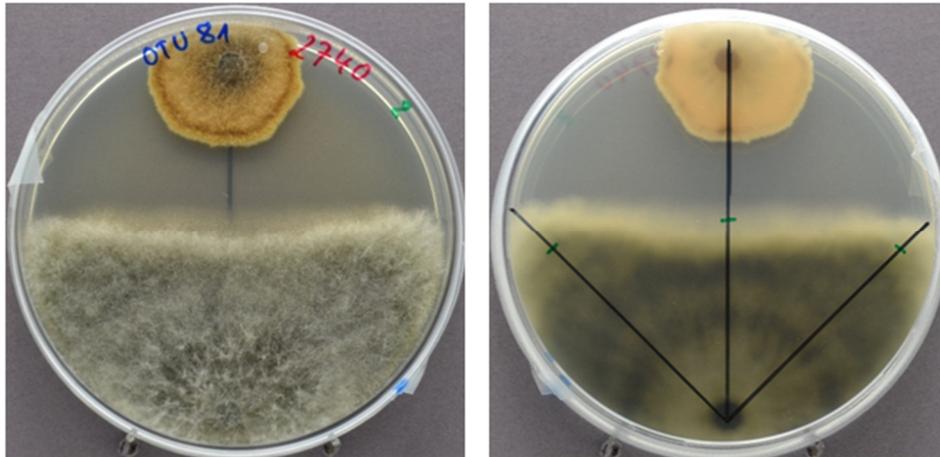


Abbildung 57: Kontaktlose Hemmung im Antagonistentest, *S. sapinea*-Stamm (NW-FVA 2740) und OTU81 (*Alternaria* sp.), Petrischalen-Aufsicht und -Rückansicht, auf MYP-Medium nach 10 Tagen Inkubation.

Rund 6 % der Endophyten konnten durch schnelles Wachstum *S. sapinea* hemmen und die *S. sapinea*-Kultur überwachsen (Typ 2, Abbildung 56):

- OTU8 (*Sordaria* sp.),
- OTU9 (*Sordaria fimicola*),
- OTU71 (*Trichoderma* sp.),
- OTU74 (*Pyronema domesticum*),
- OTU75 (*Daldinia concentrica*)

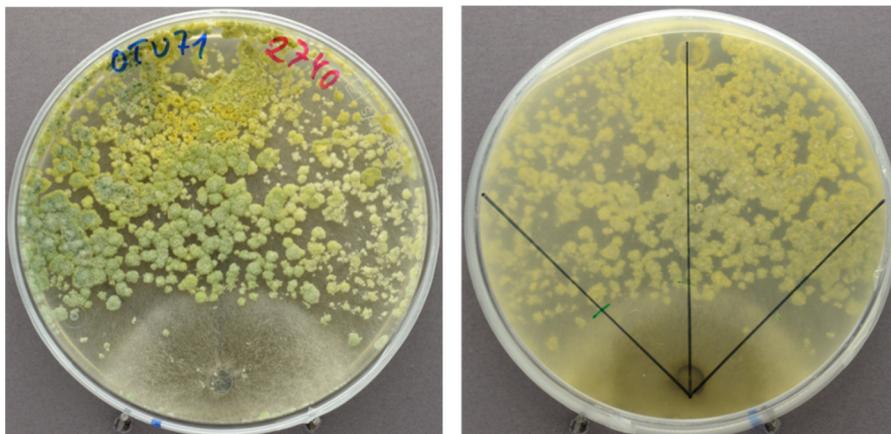


Abbildung 58: Antagonistentest, Überwachsen von *S. sapinea* durch *Trichoderma* sp., *S. sapinea*-Stamm (NW-FVA 2740) und OTU71 (*Trichoderma* sp.), Petrischalen-Aufsicht und -Rückansicht, auf MYP-Medium nach 10 Tagen Inkubation.

Trotz der hemmenden Wirkung von *S. sapinea in vitro* wurden einige der 18 festgestellten potentiellen Antagonisten *in vivo* als Begleitarten zusammen mit *S. sapinea* im selben Triebsegment festgestellt: *Sordaria* sp. (OTU8), *S. fimicola* (OTU9), *Chaetomium* sp. 2 (OTU46), *Alternaria* sp. (OTU81).

S. sapinea wurde mit folgenden Endophyten im Zuge der Untersuchungen niemals aus demselben Kiefertriebsegment isoliert (Endophyten mit einer potentiellen antagonistischen Wirkung gegenüber *S. sapinea*, die *in vitro* durch Antagonistentest beobachtet wurde, sind mit einem * markiert): *Drechslera* sp. (OTU19), *Rosellinia* sp. 1 (OTU21), *X. polymorpha* (OTU27), *Sordariales* (OTU30), *N. diffusa* (OTU32), *Lecythophora* sp. 1 (OTU47), *C. carneum* (OTU51), *H. fragiforme* (OTU59), *Nigrospora* sp. (OTU63), Ascomycet sp. 1 (OTU69), *Trichoderma* sp. (OTU71)*, *P. domesticum* (OTU74), *C. ligniaria* (OTU78), *B. cinerea* (OTU80), *Cladosporium* sp. 1 (OTU86), *Xylaria* sp. 2 (OTU89), *Acremonium* sp. (OTU94), *Cladosporium* sp. 2 (OTU95), *Podospora curvicolla* (OTU96), *A. kogelbergense* (OTU97), *P. neglecta* (OTU98), *Hypoxyton rubiginosum* (OTU101), *Peniophora pini* (OTU102), *Phoma* sp. 1 (OTU104), *Xylaria* sp. 3 (OTU105), *Phoma* sp. 2 (OTU106), *Preussia* sp. 1 (OTU108), *M. nivale* (OTU109), *P. eucrita* (OTU110)*, *U. isabellina* (OTU111), *Lambertella* sp. (OTU112), Ascomycet sp. 3 (OTU113), *Penicillium* sp. (OTU116), *Pestalotiopsis* sp. 1 (OTU119), *Pezicula* sp. 1 (OTU120)*, *Apiognomonina* sp. 1 (OTU122), *P. neosporulosa* (OTU123)*, *P. cinnamomea* (OTU124), *Pezicula* sp. 3 (OTU125)*, *Apiognomonina* sp. 2 (OTU126), *Leotiomyces* sp. (OTU127), *Pestalotiopsis* sp. 2 (OTU128), *Coprinellus* sp. (OTU129), *Pleosporaceae* sp. (OTU130), *Phoma* sp. 3 (OTU131), *Preussia* sp. 2 (OTU132), *Periconia* sp. (OTU133), *P. varia* (OTU134), *Pezizomyces* sp. 2 (OTU135).

Zellophan-Versuch

Nach vorangegangener Inkubation der acht potentiellen Antagonisten auf der Zellophan-Membran zeigte sich, dass je nach Art ein deutlich gehemmtes Wachstum von *S. sapinea* hervorgerufen wurde (Tabelle 40). Die Kontrolle, ein Wachstumsversuch mit *S. sapinea* nach vorangegangener Inkubation einer Zellophan-Membran ohne antagonistischen Pilz, zeigte jedoch, dass auch das Zellophan selbst einen negativen Einfluss auf das Wachstum der *S. sapinea*-Kultur hervorrief (Tabelle 40, Spalte Kontrolle). Bei vorangegangener Inkubation von

Chaetomium sp. 2 (OTU46) und *Alternaria* sp. (OTU81) zeigte sich kein Wachstum von *S. sapinea*. Nach dem Entfernen von *Chaetomium* sp. 2, *Pezicula eucrita*, *Pezicula* sp. 1 mit dem Zellophan war eine Gelbfärbung des Zellophans und des Agars sichtbar.

Tabelle 40: Antagonistentest nach der Zellophan-Methode, verzeichnet ist das durchschnittliche Kulturwachstum in Millimetern (5 Wiederholungen, nach 3 Tagen) von *S. sapinea* (2740): nach 1) ohne Inkubation des Zellophans, Spalte *S. sapinea*, 2) die Kontrolle: Wachstum von *S. sapinea* mit vorangegangener Inkubation des Zellophans ohne antagonistischen Pilz und 3) vorangegangener Inkubation der Endophyten OTU9, OTU110, OTU71, OTU123. Bei OTU120 und 125 zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei OTU110.

Wiederholung	<i>S. sapinea</i>	Kontrolle	OTU 9	OTU 110	OTU 71	OTU 123
1	42,5	34,5	21,5	10	16	14,5
2	42,5	34	20	8	12,5	11,5
3	41	31,5	28,5	22,5	13	11,5
4	39	34	27,5	8	11	9,5
5	42	-	-	-	-	10,5
Mittelwert	41,4	33,5	24,4	12,1	13,1	11,5

Hypheninteraktion *in vitro*

In diesem Experiment wurde untersucht, ob und wie sich die Hemmung von *S. sapinea* durch die ermittelten potentiellen Antagonisten an den Hyphen von *S. sapinea* zeigt. Veränderungen wurden an Hyphen von *S. sapinea* nur beobachtet, wenn *P. neosporulosa* (OTU123) gegenüber in der Petrischale wuchs. Durch Lichtmikroskopie konnten bei dieser Dualkultur veränderte Hyphenspitzen von *S. sapinea* (Abbildung 59, Mitte) beobachtet werden, die teilweise aufplatzten (Abbildung 59, links) und Hyphen, die sich wellten (Abbildung 59, rechts). Wenn *Trichoderma* sp. und *S. sapinea* in einer Petrischale zusammen wuchsen und ihre Hyphen unter dem Mikroskop untersucht wurden, war nicht erkennbar welche Hyphen zu welchem Pilz gehörten. Um dieses Problem zu lösen, wurde die zu mikroskopierende Stelle mit Baumwollblau angefärbt. Doch erbrachte auch das

Anfärben mit Baumwollblau keinen Erfolg, da die Hyphen von *S. sapinea* und *Trichoderma* sp. beide cyanophil sind und nun alle Hyphen blau eingefärbt waren.

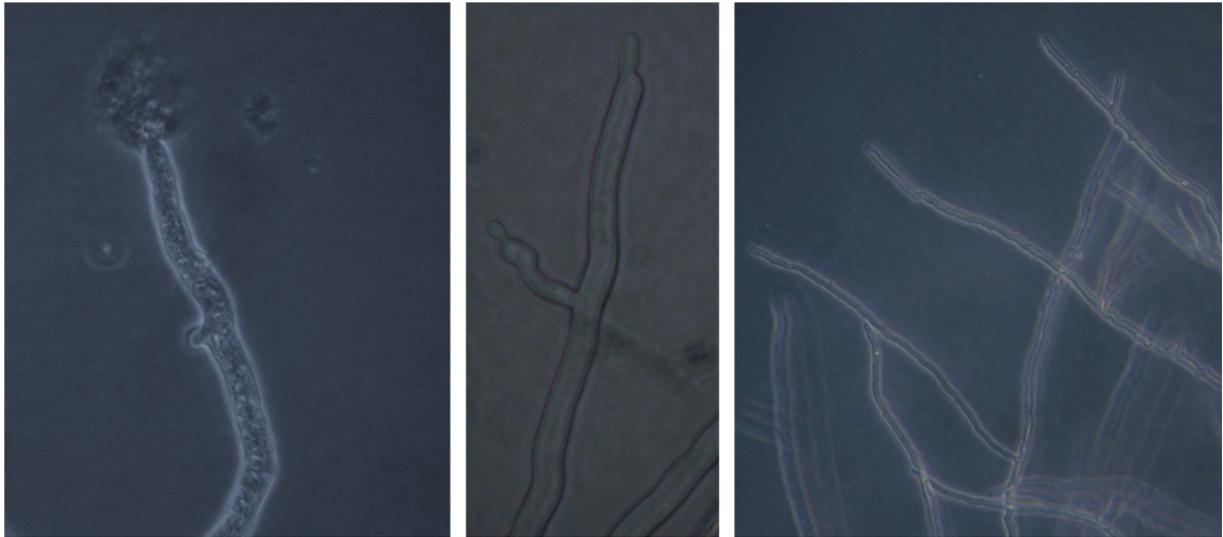


Abbildung 59: Hypheninterferenz von *S. sapinea* unter Einfluss von *P. neosporulosa*; (OTU123) in Dualkultur: granulöse Struktur des Zellinhalts und Austritt des Zellinhalts (links), veränderte Hyphenspitzen (Mitte) und Veränderung der Hyphen (wellig, rechts).

4. Diskussion

4.1. Auslösende Faktoren für ein *Diplodia*-Triebsterben

In Europa wurde in jüngster Vergangenheit eine hohe Mortalitätsrate der Kiefer von verschiedenen Autoren beschrieben (Cech und Perny 2000; Dobbertin et al. 2005a; Eilmann et al. 2006; Thabeet et al. 2009; Vacchiano et al. 2012). Als Absterbeursache wurden meist Kombinationen multipler Faktoren wie Trockenheit, Konkurrenz und Mistelbefall diskutiert.

Deshalb werden im Folgenden verschiedene untersuchte Faktoren diskutiert, die oft im Zusammenspiel bei einer Erkrankung am *Diplodia*-Triebsterben zusammen wirken. Die Untersuchungsergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Waldbestände verdeutlichen das pathogene Potential von *S. sapinea*. Die Kausalität von *S. sapinea* an den Symptomen der untersuchten Kiefern wurde durch die Isolierung des Pathogenes bestätigt. Die untersuchten Kiefernbestände sind exemplarische Einzelfälle und ihre Erkrankungsgeschichte lässt sich nicht direkt auf andere Standorte bzw. Gebiete übertragen. Die untersuchten geschädigten Kiefernwälder mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens sind nicht repräsentativ für den Vitalitätszustand der Kiefer im Untersuchungszeitraum in Deutschland insgesamt (siehe Waldzustandsberichte 2015/2016 der NW-FVA für Sachsen-Anhalt, Hessen und Niedersachsen, NW-FVA (2015a, 2015b, 2015c, 2016a, 2016b, 2016c).

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Erkrankung einer Kiefer mit dem *Diplodia*-Triebsterben nicht zwangsläufig das Absterben des Baumes bedeutet. Sind die Umweltbedingungen in der Folgezeit der Schädigung für die Kiefer günstig, können sich die Bestände zumindest teilweise regenerieren. Jedoch ist durch den Klimawandel mit den prognostizierten Dürreperioden, Niederschlagsverschiebungen und gehäuften Extremwetterereignissen (z. B. Hagel, Jentsch et al. (2007)) mit einer Zunahme an Schäden durch *S. sapinea* zu rechnen, insbesondere in klimasensiblen Räumen und Standorten. Die Frage, wodurch das vermehrte pathogene Auftreten von *S. sapinea* gefördert wird, ob dies durch direkte oder indirekte Faktoren geschieht, konnte auch in dieser Arbeit nur teilweise geklärt werden. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Eine direkte Beeinflussung könnte durch günstige Umweltbedingungen für *S. sapinea*, einen wärmeliebenden Pilz, z. B. durch einen Temperaturanstieg hervorgerufen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Temperaturoptimum *in vitro* auf einem

MYP-Nährmedium für das Myzelwachstum verschiedener *S. sapinea*-Stämme aus Deutschland von rund 26 °C ermittelt, ähnlich hohe Temperaturoptima konnten auch von anderen Studien bestätigt werden (siehe Diskussion 4.4.1 Temperaturversuche, Seite 163).

Neben den Kontrollflächen wurden insgesamt vier Kiefernbestände (Bad Freienwalde FW650 / Brandenburg, Lüderitz LU / Sachsen-Anhalt, Pfungstadt PF59 / Hessen, Bürstadt BS / Hessen) mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens näher untersucht. Auf diesen Flächen wurden jeweils verschiedene prädisponierende / devitalisierende bzw. schadensverstärkende und krankheitsauslösende Faktoren identifiziert. In Lüderitz wurde als schadauslösender Faktor eine Verletzung der Rinde durch Hagelschlag festgestellt. Auf anderen Untersuchungsflächen wurde Trockenstress der Kiefern beobachtet (Devitalisierung), der durch verschiedenen Faktoren ausgelöst wurde: durch Niederschlagsdefizite (Bürstadt), Grundwasserabsenkungen (Pfungstadt), standörtliche Gegebenheiten (Bodenart: Bürstadt, Exposition: Bad Freienwalde) und Mistelbefall (Bürstadt, Pfungstadt, Bad Freienwalde). Als weiterer schwächender und damit devitalisierender Faktor kam auf zahlreichen Untersuchungsflächen *H. annosum* vor. Auch wurde ein devitalisierender Fraß an den Wurzeln der Kiefer durch Larven des Maikäfers als schadverstärkender Faktor ermittelt (Pfungstadt). Es scheint also zumeist nicht ein einzelner Faktor zu sein, der das *Diplodia*-Triebsterben an Kiefern auslöst, sondern oftmals verschiedene Faktoren, die die Vitalität der Kiefer beeinträchtigen. Die zuvor genannten potentiellen schadassoziierten Faktoren werden im Folgenden nacheinander einzeln diskutiert. Am Ende des Kapitels wird kurz auf die besonderen Gegebenheiten auf der Untersuchungsfläche in Bürstadt und die Analyse der Beratungsfälle der NW-FVA eingegangen.

Standortfaktoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Stickstoffversorgung und andere Ernährungsparameter der Kiefernbestände, die als Faktoren für eine Erkrankung am *Diplodia*-Triebsterben beschrieben wurden (Kam de 1985; Dijk et al. 1992; Stanosz et al. 2004; Diminić et al. 2012), nicht untersucht.

Die Auswertung der Beratungsfälle der NW-FVA ergab, dass *Diplodia*-Triebsterben Schadensfälle oftmals auf Kuppenlagen oder an Süd-exponierten Hängen auftreten. Das gehäufte Auftreten des *Diplodia*-Triebsterbens auf solchen Standorten erklärt sich

daraus, dass Kuppenlagen und Süd-exponierte Hänge für Bäume oft mit einer angespannten Wasserversorgung einhergehen. Für Pfungstadt spielt eine Grundwasserabsenkung eine prädisponierende Rolle, hinzu kommt ein sandiger Boden, der wenig Wasserspeicherkapazität aufweist. In Bad Freienwalde ist die Kuppenlage des Kiefernbestandes ein prädisponierender Faktor.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass **Wassermangel** auf den Untersuchungsflächen Pfungstadt (PF59) und Bürstadt vorlag und als devitalisierender, aber auch als potentieller schadauslösender Faktor (Bürstadt) angesehen werden kann. Folgende Untersuchungen von Paoletti et al. (2001) und Stanosz et al. (2001) bestätigen diese Annahme. In Untersuchungen von Paoletti et al. (2001) in Italien wurden 4 - 5 jährige Aleppo-Kiefern Wasserstress ausgesetzt und vor oder nach dem Stress mit *S. sapinea* inokuliert. Es zeigte sich, dass Kiefern, die unter Wassermangel litten, wesentlich stärker durch das Pathogen geschädigt wurden als die Kontroll-Pflanzen (Paoletti et al. 2001). Stanosz et al. (2001) setzte in einem Experiment 2 Jahre alte Amerikanische Rot-Kiefern (*P. resinosa*) mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens, einem Wassermangel aus. Obwohl die Pflänzchen nicht mit *S. sapinea* inokuliert wurden, zeigten sie Symptome der Erkrankung (Stanosz et al. 2001). Dafür gab es zwei Erklärungen: 1) die Pflanzen waren schon vor dem Versuch mit *S. sapinea* endophytisch infiziert, durch den Wassermangel und die daraus resultierende verminderte Vitalität konnte *S. sapinea* von seiner endophytischen Phase in die pathogene wechseln oder 2) die Infektion erfolgte erst während des Versuchs. Ähnliche Ergebnisse wiesen Blodgett et al. (1997) experimentell nach, sie konnten nachweisen, dass *P. resinosa* unter Wasserstress anfälliger für eine Erkrankung mit *S. sapinea* ist.

Eine verminderte Vitalität des Wirtes durch Wassermangel könnte auch ein indirekter Faktor sein, der das Vorkommen von *S. sapinea* fördert. Durch Niederschlagsdefizite im Zusammenhang mit dem Klimawandel kann die Physiologie des Baumes verändert werden und Endophyten, die vorher dem Baum nicht geschadet haben, können pathogen für den Baum werden (Desprez-Loustau et al. 2006; Giordano et al. 2009; Botella et al. 2010). Trockenheit steht weltweit mit anderen abiotischen und biotischen Faktoren in Zusammenhang mit frühzeitiger Baummortalität (Allen et al. 2010), da sie die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen erhöhen kann (Niinemets 2010). Die Reaktion der Bäume auf den Trockenstress hängt dabei von der Länge und Intensität der

Trockenheit ab, den Baumreserven und anderen Stressfaktoren am Standort (Niinemets 2010). Das bedeutet, durch den Klimawandel (Temperaturerhöhung und Extremwetterereignisse) kann einerseits die Kiefer, obwohl sie eine trockenresistente Baumart ist (Oberhuber et al. 1998; Rigling et al. 2002; Allen et al. 2010) geschwächt werden, andererseits könnte *S. sapinea* von steigenden Temperaturen durch den Klimawandel profitieren und sich in nördlichen Gebieten (z. B. Baltikum) ausbreiten (Adamson et al. 2015).

Verletzungen der Rinde durch **Hagel** konnte als schadauslösender Faktor identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *Diplodia*-Schadensfall in Verbindung mit Hagel intensiv untersucht (Versuchsfläche Lüderitz). Weiterhin zeigte die Analyse der Beratungsfälle der NW-FVA, dass Verletzungen durch Hagel häufig einer Schädigung durch *Diplodia*-Triebsterben, insbesondere an älteren Kiefern, vorangehen (10 % der Fälle). Hagel wurde auch bei anderen Autoren weltweit in zahlreichen Schadensfällen des *Diplodia*-Triebsterbens als auslösender Faktor identifiziert (Zwolinski et al. 1990a). Auch in Untersuchungen von Schumacher (2012) hat sich gezeigt, dass Verletzungen, wie sie durch Hagel entstehen, das Schadgeschehen durch *S. sapinea* intensivieren können. Bei den untersuchten Schadensfällen (Beratungsfälle der NW-FVA) ist jedoch eine Dunkelziffer zu erwarten, da am eingesendeten Probematerial nicht in jedem Falle Schädigungen durch Hagel festgestellt werden konnte, obwohl der betroffene Baum bzw. der Bestand einen Hagelschlag erlitten hatte. Bei einer Ursachenanalyse hinsichtlich *Diplodia*-Triebsterben ist es deshalb erforderlich, dass die Äste auf Verletzungen durch Hagel zu untersuchen.

Das Vorkommen von Fruchtkörpern des **Wurzelschwamms** in Kiefernbeständen kann als weiterer devitalisierender Faktor angesehen werden. Wurzelschwamm-Fruchtkörper an Kiefernstubben wurden in ca. 40 % der untersuchten Bestände gefunden. Sie wurden sowohl in Beständen mit als auch ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens nachgewiesen. Bei der systematischen Beprobung entlang des Transekts (n = 91 Standorte) konnten an zahlreichen Untersuchungspunkten (33 %) Fruchtkörper des Wurzelschwamms an Kiefernstubben beobachtet werden. Dass ein Befall mit Wurzelschwamm einen verstärkenden Einfluss auf das *Diplodia*-Triebsterben hat, haben auch Bonello et al. (2008) nachgewiesen. Sie haben in

Gewächshausversuchen an 3-jährigen Pinien (*Pinus pinea* L.) den Einfluss einer Infektion mit *H. annosum* auf die Intensität des *Diplodia*-Triebsterbens feststellen können. Wenn die Setzlinge zuvor mit Wurzelschwamm an der Stammbasis inokuliert wurden, bildeten sie bei einer zusätzlichen Inokulation mit *S. sapinea* größere Läsionen aus. Eine Infektion mit Wurzelschwamm reduziert die Konzentration an Terpenen in der Pflanze. Bonello et al. (2008) nehmen daher an, dass ein höherer Terpengehalt in der Wirtspflanze einen Angriff von *S. sapinea* mindert. Sie werten *H. annosum* an *P. pinea* als prädisponierenden Faktor für eine Erkrankung mit dem *Diplodia*-Triebsterben und bestätigen somit die hier gewonnenen Annahmen.

Der Nachweis der Nebenfruchtform *Spiniger meineckellus* und damit sein latentes Vorkommen in Kiefern wurde im Rahmen dieser Arbeit an nahezu 100 % der untersuchten Stammscheiben (n = 43) erbracht. Dies deckt sich mit Untersuchungen im Rahmen des NaLaMa-nT-Projektes (Nachhaltiges Landmanagement im Norddeutschen Tiefland), dort wurden rund 380 Stammscheiben von der Waldkiefer aus dem norddeutschen Tiefland (an WZE-Punkten, vitale Bestände) auf das Vorhandensein der Nebenfruchtform des Wurzelschwamms untersucht. Dabei zeigte sich, dass auf rund 96 % aller untersuchten Stammscheiben *Spiniger meineckellus* nachgewiesen werden konnte (NaLaMa-nT Abschlussbericht, Teilprojekt F3b; Langer und Bressen (2017)). Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass davon auszugehen ist, dass *H. annosum* s. l. lange Zeit einen Großteil der Bäume besiedelt, ohne dabei sichtbare Symptome hervorzurufen. Weiterhin kann die Sensibilität gegenüber dem *Diplodia*-Triebsterben zunehmen und der Wurzelschwamm als devitalisierender Faktor der Kiefer für ein *Diplodia*-Triebsterben angesehen werden. Zudem birgt die hohe Besiedlungsrate mit *H. annosum* Risiken für zukünftige Waldbestände, auch im Hinblick auf den Waldumbau. Die Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*) und die Roteiche (*Quercus rubra*) werden in diesem Zusammenhang oft als wichtige Ersatzbaumarten im Hinblick auf den Klimawandel gesehen (Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde 2009; Spellmann et al. 2011). Insbesondere die Douglasie ist jedoch in ihrer Jugendphase anfällig gegenüber dem Wurzelschwamm (Garbelotto und Gonthier 2013; NW-FVA 2015d).

Misteln wurden im Rahmen dieser Untersuchungen ebenfalls als devitalisierender Schadfaktor identifiziert. Auf den Untersuchungsflächen Bürstadt und Pfungstadt wurde an den Kiefern, die stark mit Misteln besetzt waren, Wipfeldürre beobachtet. Als typisches Symptom eines Mistelbefalls beschrieben Janssen und Wulf (1999) bei *P. sylvestris* ebenfalls eine Wipfeldürre, die mit einer Verlichtung und Verkümmern des Kronengipfels einher geht. Anschließend kann ein Mistelbefall mitunter zum Absterben der betroffenen Bäume führen (Janssen und Wulf 1999).

Die Beteiligung der Mistel an frühzeitigen Absterbeprozessen der Kiefer in Europa wurde intensiv diskutiert (Dobbertin und Rigling 2006). So wird dem Befall mit der Mistel ein großer Anteil am schlechten Vitalitätszustand der Kiefer zugerechnet (Sangüesa-Barreda et al. 2012). Durch ihren großen Wasserbedarf verstärkt sie Absterbeprozesse der Kiefer bei Trockenheit (Glatzel und Geils 2009) und verursacht höhere Mortalitätsraten (Reid et al. 1994; Tsopelas et al. 2004).

Es ist schon länger bekannt, dass ein Mistelbefall, mit Vitalitätseinschränkungen der betroffenen Kiefern verbunden ist (Hilker et al. 2005). Vitalitätseinbußen durch Trockenstress, Befall mit Insekten und Schadstoffimmissionen begünstigen den Befall mit Misteln und könnten so auch das Auftreten anderer sekundärer Schadorganismen fördern (Hilker et al. 2005), wie etwa das Auftreten des *Diplodia*-Triebsterbens. Hartmann (1997) sieht als Voraussetzung für eine Infektion der Kiefer mit Misteln eine Schwächung des Wirtes, da ein Eindringen des Senkers in der vitalen Kiefer durch Überwachsen verhindert werden würde. Eine Regeneration der betroffenen Bäume vom Mistelbefall ist nur selten zu beobachten, da die Kiefer im Alter schlecht ihre Krone ausbauen kann (Hartmann 1990). Kiefern sind unter Wasserstress anfälliger für eine Erkrankung mit *S. sapinea* (Blodgett et al. 1997), deshalb kann ein Befall der Kiefer mit Mistel auch als ein devitalisierender Faktor gegenüber dem *Diplodia*-Triebsterben gewertet werden. Die Vitalität der Kiefer wird herabgesetzt und eine pathogene Wirkung von *S. sapinea* erleichtert.

Fraß durch Insekten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Kiefernbestände untersucht, in denen nadelfressende Insekten in Massenvermehrung auftraten: In Brandenburg die Probefläche Schlaubetal mit einer Nadelschädigung durch die Nadelscheidengallmücke und in Niedersachsen die Probefläche Prezelle mit Nadelfraß durch den Kiefernspinner. In beiden Beständen konnten im Untersuchungszeitraum (2014-2017) keine Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens festgestellt werden. Dagegen wurde nach einem Nadelfraß der Kiefernbuschhornblattwespe (*Diprion pini*) auf rund 1600 ha im Jahr 2009 an *P. sylvestris* in der Letzlinger-Heide (Sachsen-Anhalt) ein *Diplodia*-Triebsterben festgestellt (Langer et al. 2011). Damals gab es Nadelverluste durch Fraß an den Kiefern zwischen 10 - 100 %. Anschließend kam es im Folgejahr teilweise zum Absterben der Bestände (>200 ha Fläche). Die NW-FVA führte daraufhin Untersuchungen im April, Juli und September 2010 an verbraunten bis abgestorbenen und grünen Zweigen auf das Vorhandensein von *S. sapinea* durch. Es zeigte sich, dass *S. sapinea* an braunem Material sowie endophytisch in vitalen, befallenen Kieferntrieben nachgewiesen werden konnte (Langer et al. 2011). In dem Untersuchungsgebiet Letzlinger Heide (12 Probeflächen) wurden neben Nadelverlusten durch Insektenfraß auch Vorschädigungen durch Hagel (67 % der Probeflächen) und Käferbefall (42 % der Probeflächen) festgestellt (Langer et al. 2011). Bei dem Käferbefall spielten insbesondere der Befall mit Bockkäfern, Borkenkäfern (Großer Waldgärtner (*Tomicus piniperda*), *Pityophthorus lichtensteinii*, *Pityogenes bidentatus*, *Dryocoetes autographus*, *Pityogenes chalcographus*, *Xyloterus lineatus*), Prachtkäfern (Blauer Kiefernprachtkäfer (*Phaenops cyanea*), Vierpunkt-Kiefernprachtkäfer (*Anthaxia quadripunctata*)), Rüsselkäfern (*Pissodes spec.*) und Kiefernstangenrüßlern (*P. piniphilus*) eine Rolle (unveröffentlichte Untersuchungen der Abteilung Waldschutz der NW-FVA 2011).

In diesem beschriebenen Fall in der Letzlinger Heide war mit großer Wahrscheinlichkeit neben dem Fraß der Kiefernbuschhornblattwespe, der prädisponierend bzw. devitalisierend auf die Kiefern wirkte, der Hagel schadauslösender Faktor für ein *Diplodia*-Triebsterben. Hingegen gab es auf den Untersuchungsflächen Schlaubetal und Prezelle keine zusätzliche Schwächung durch Hagel. In solchen komplexen Absterbeprozessen ist es schwierig, den entscheidenden

Faktor, der letztlich zum Absterben führt, zu identifizieren (Amoroso et al. 2012). Das zeigte sich auch an dem Schadensfall Letzlinger Heide.

Inwieweit ein Absterben durch den Nadelverlust aufgrund von Insektenfraß und / oder durch einen Befall mit *S. sapinea* zu Stande kommt, lässt sich nur schwer entwirren. Wie Untersuchungen im Zusammenhang von Nadelfraß durch Insekten und Baummortalität gezeigt haben, kann sich die Kiefer bei einer Restbenadelungen von unter 10 % auch ohne eine weitere Schwächung durch *S. sapinea* nicht regenerieren und stirbt folglich ab (Landesforstanstalt Eberswalde 2007; NW-FVA 2008). Inwieweit *S. sapinea* das Schadgeschehen durch nadelfressende Insekten intensivieren kann, sollte zukünftig durch Gewächshausversuche geklärt werden.

Nachstehend zu dem obig beschriebenen Schadensfall in der Letzlinger Heide mit Beteiligung von Insektenfraß an Nadeln, werden im Folgenden die in der Literatur beschriebenen *Diplodia*-Triebsterbensfälle mit Beteiligung von Insekten beschrieben:

- Haddow und Newman (1942, in Feci et al. 2003) wiesen Schäden durch *S. sapinea* in Verbindung mit *Aphrophora parallela* (*Aphrophoridae* / Familie der Schaumzikaden) an *P. sylvestris* nach. Ort nicht angegeben.
- Wingfield und Knox-Davies (1980) beobachteten in Süd-Afrika Erkrankungen durch *S. sapinea* an verschiedenen Arten der Gattung *Pinus* (*P. patula* SCHLTDL. & CHAM., *P. ellioti* ENGELM., *P. taeda* L., *P. pinaster* AIT., *P. radiata*) im Zusammenhang mit folgenden Insekten: *Cinara cronartii* (*Aphididae* / Familie der Röhrenblattläuse), *Hylastes* sp. (*Scolytinae* / Unterfamilie der Borkenkäfer), *Orthotomicus erosus* (*Scolytinae*), *Pissodes* sp. (*Curculionidae* / Familie der Rüsselkäfer).
- Peterson (1981) beschrieb lediglich Wunden durch Insekten als auslösenden Faktor für ein *Diplodia*-Triebsterben in den USA und konkretisiert den Verursacher nicht weiter.
- Aus Deutschland berichtete Schwerdtfeger (1981) von einem Nachweis von *S. sapinea* auf absterbenden Zweigen und Ästen von Kiefer 1978 bei Celle nach einem Blattwespenfraß und Trockenheit.
- Swart et al. (1987b) isolierten *S. sapinea* von Wunden an Trieben von absterbenden *P. radiata* in Südafrika, die durch die Eiablage von *Pissodes nemorensis* Germ. verursacht wurden.

- Nicholls und Ostry (1990) beobachteten in den USA an *Pinus banksiana* LAMB. und *Pinus resinosa* Wunden, die durch *Ips* spp. (*Scolytinae* / Unterfamilie der Borkenkäfer) verursacht wurden. Nachfolgend trat die Erkrankung mit *S. sapinea* auf.
- Zwolinski et al. (1995) stellten in Süd-Afrika nach einem Hagelsturm an *P. radiata* die kambioptagen Insekten *Pissodes nemorensis* gefolgt von *Orthotomicus erosus* in Verbindung mit einer Erkrankung von *S. sapinea* fest. Die beiden Insektenarten befallen nur zuvor geschwächte Kiefern.
- Aus Deutschland berichtete die Niedersächsische Forstliche Versuchsanstalt 1996 von Schäden an *P. sylvestris* bei Celle und Gartow (Niedersachsen) durch *S. sapinea* und *C. ferruginosum* mit gleichzeitigem Nonnen- und Blattwespenfraß. Die Schädigung begann jedoch schon 1994 infolge witterungsbedingter günstiger Infektionsbedingungen für *S. sapinea*. Als Voraussetzung für einen Befall mit *S. sapinea* sahen die Autoren Niederschlagsdefizite, die bereits seit 1989 festgestellt wurden, mangelnde Pflege der Bestände und hohe Stickstoffkonzentrationen der Nadeln erkrankter Kiefern (Niedersächsische Forstliche Versuchsanstalt 1996).
- Feci et al. (2003) beobachteten ein *Diplodia*-Triebsterben an *P. resinosa* nach Zweig- und Zapfenverletzungen durch *Dioryctria* sp. (*Pyralidae* / Familie der Zünsler) in den USA.

Die oben aufgelisteten Untersuchungsergebnisse von Schadensfällen des *Diplodia*-Triebsterbens weltweit in Verbindung mit Insekten zeigen, dass insbesondere den Trieb verletzende Insekten, wie z. B. Zikaden oder Borkenkäfer, eine Rolle als auslösende Faktoren für das *Diplodia*-Triebsterben spielen (Haddow und Newman 1942, Wingfield und Knox-Davies 1980, Swart et al. 1987b, Nicholls und Ostry 1990, Feci et al. 2003), indem sie Wunden am Kiefertrieb verursachen und so Eintrittspforten für Pathogene schaffen und / oder die Kiefer devitalisieren und sie somit anfälliger für eine Erkrankung mit dem *Diplodia*-Triebsterben machen. In den Schadensfällen Letzlinger Heide und Prezelle hingegen schädigten die Insekten durch ihren Fraß die Nadeln und nicht die Triebe der Kiefer. Gegenüber den in der Literatur beschriebenen Schadensfällen lagen in Letzlingen eine Reihe von weiteren prädisponierenden Faktoren vor, wie Wurzelschwamm-Befall, nährstoffarme trockene Standorte, Hagel und Besiedlung mit Borkenkäfern (Langer et al. 2011). Zudem traten die in der Literatur beschriebenen Fälle meist an anderen Kiefernarten als *P. sylvestris*

auf, die gegenüber dem *Diplodia*-Triebsterben als anfälliger gelten (Swart et al. 1988) und in wärmeren Regionen der Welt. *S. sapinea* könnte bereits endophytisch in den betroffenen Kiefern vorhanden gewesen sein, wie auch die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten lassen. Aufgrund der Devitalisierung durch den Fraß könnte *S. sapinea* dann von der endophytischen in die parasitische Phase übergegangen sein.

Die ca. 100 analysierten **Beratungsfälle der NW-FVA** aus den Bundesländern Hessen, Niedersachsen und Sachsen-Anhalt aus den Jahren 2006-2014 zeigten, dass insbesondere junge Kiefern- und Douglasienpflanzen (bis 5 Jahre) häufig am *Diplodia*-Triebsterben erkrankten. Bei den meisten untersuchten Beratungsfällen war kein Schadensausmaß dokumentiert. Auch konnte nicht bei allen Fällen schadauslösende Faktoren ermittelt werden und teilweise war der genaue Standort der erkrankten Bäume nicht dokumentiert. Deshalb bieten die Daten in der vorliegenden Qualität keine weitere Möglichkeit, schadauslösende Faktoren präzisieren zu können. Fabre et al. (2011) haben ebenfalls Daten realer Erkrankungsfälle mit *Diplodia*-Triebsterben in Frankreich ausgewertet. Sie untersuchten 1064 Fälle einer Erkrankung mit *Diplodia*-Triebsterben die von 1989 bis 2006 aufgetreten sind. Weiterhin analysierten sie das Vorkommen von *S. sapinea* auf Kiefernzapfen und interpolierten die Fälle für Frankreich. Dabei fanden sie drei Faktoren heraus, die das Vorkommen von *S. sapinea* auf Kiefernzapfen maßgeblich bestimmen: die Kiefernart: die Zapfen von *P. sylvestris* und von *P. nigra* wurden etwa gleich häufig kolonisiert, *P. pinaster*-Zapfen hingegen selten. Weiterhin begünstigten milde Wintertemperaturen und hohe Niederschlagsmengen im Sommer das Vorkommen von *S. sapinea*. Die zuletzt genannten sind laut Fabre et al. (2011) entscheidende meteorologische Faktoren für ein Auftreten von *S. sapinea*.

Untersuchungsfläche Bürstadt

Die untersuchten Kiefern in Bürstadt wiesen neben den Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens noch ein weiteres Schadbild auf: verkürzte Triebe und Nadeln. Die Analyse der Klimadaten für den Bestand Bürstadt (Abbildung 28 bis Abbildung 31) zeigte, dass ein Niederschlagsdefizit für das Jahr 2015 vorlag. Zusätzlich waren erhöhte Monatsmitteltemperaturen im Juli und August zu verzeichnen. Das zeigte sich im Bestand durch Welken der Blätter an anderen Baumarten wie Birke und Eiche. In

der Literatur wird das Kiefernsterben, wie es auf der Untersuchungsfläche Bürstadt auftrat, als ein erstmalig vor knapp 60 Jahren auftretendes Phänomen erwähnt. Hellrigl und Minerbi (2006) zufolge beschrieben Butin und Reuss (1959) erstmals ein Kiefernsterben bedingt durch Temperaturschwankungen und Dürre, in Folge dessen es zu einem Hallimasch-Befall kam. Jenes Kiefernsterben wurde durch einen Ursachenkomplex ausgelöst, bei dem verschiedene Faktoren zusammen wirkten: primär kam es zu einer Schädigung durch Klimaextreme und Wasserdefizite und danach zu einem Folgebefall durch Insekten und Pilze. Einen anderen Fall von Kiefernsterben beschrieben Ebert et al. (1978) in dem „Bestimmungsbuch der wichtigsten Kieferschädlinge und -krankheiten“. Sie beobachteten Absterbeerscheinungen in Kiefernbeständen nach anhaltend milder Winterwitterung für den ostdeutschen Raum, die ab 1956 in älteren Kiefernbeständen auftraten. Als Symptome wurden eine schütterere Benadelung und das Absterben von Kiefern beschrieben. Genauer führten die Autoren aus, dass sich im Frühjahr die Nadeln vor der Maitriebbildung vorzeitig bräunlich verfärbten und dann abfielen. Der Austrieb war verzögert, die ausgebildeten Nadeln stark verkürzt und graugrün bis gelblichgrün gefärbt.

Diese Symptome wurden auf der Untersuchungsfläche Bürstadt ebenfalls beobachtet. Die Witterungsverhältnisse könnten die Kiefern für einen Befall mit dem *Diplodia*-Triebsterben prädisponiert haben und im Bestand Bürstadt eine Rolle gespielt haben: Die Monatsmittel-Temperatur im Dezember 2015 war im Vergleich zum langjährigen Mittel deutlich erhöht (Abbildung 27). In diesem Zusammenhang wird von Ebert et al. (1978) darauf verwiesen, dass den Wärmephasen im Hochwinter nachfolgende sehr tiefe Temperaturen den bereits frostentwöhnten Kiefern auch Frostschäden an Wurzeln und Nadeln zufügen können. Die Krankheitserscheinungen treten nach Ebert et al. (1978) „verstärkt nach anhaltenden Wärmephasen im Hochwinter“ auf. Nach Ebert et al. (1978) kommt es durch eine negative CO₂-Bilanz beim Gasstoffwechsel im Winter zu Stoffverlusten, die zu einer nachhaltigen physiologischen Schwächung führen.

Truncatella conorum-piceae (OTU11) und *Biscogniauxia mediterranea* (OTU52) könnten auf der Untersuchungsfläche Bürstadt in Südhessen eine Rolle als Schwächepathogene gespielt haben. *B. mediterranea* ist als opportunistischer Parasit an verschiedenen *Quercus*-Arten im Mittelmeerraum bekannt und tritt insbesondere im Zusammenhang mit Wasserstress auf (Desprez-Loustau et al. 2006). Insbesondere

dort, wo sich neben dem *Diplodia*-Triebsterben noch ein weiteres Schadbild zeigte (Trieb- und Nadelverkürzung), traten *T. conorum-piceae* und *B. mediterranea* verstärkt auf. In Brandenburg wurden in den Jahren 2014 und 2015 ähnliche Symptome in einigen Kiefern-Beständen wie in Bürstadt beobachtet (Landesforstanstalt Eberswalde 2015; Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde 2016). Dort wurde an Nadel- und Zweigmaterial der geschädigten Kiefern *Truncatella conorum-piceae* (TUBEUF) STEYAERT (1949) nachgewiesen. Der Pilz wird als Folgebesiedler geschwächter Bäume eingeschätzt und nicht als primärer Verursacher der Schadsymptome (Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde 2016). In Untersuchungen der LFE wurde ebenfalls wie auf der Untersuchungsfläche Bürstadt keine biotische Vorschädigung der betroffenen Bestände ermittelt. Dort wurden meterogene Faktoren als Auslöser des schlechten Vitalitätszustands der Kiefernbestände angenommen (Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde 2016). Auch in Italien im Vintschgau wurde unter vielen verschiedenen Pathogenen *Truncatella conorum-piceae* an absterbenden Kiefern nachgewiesen (Minerbi 2007).

Es lässt sich aus den hier untersuchten Schadensfällen des *Diplodia*-Triebsterbens schließen, dass es eine Reihe prädisponierender, devitalisierender, schadauslösender und schadensverstärkender Faktoren für eine Erkrankung gibt. Die Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass ein Faktor (z. B. Mistel, Wasserstress) zumeist nicht ausreichte, die Erkrankung auszulösen. Oft waren es eine Reihe von schwächenden Faktoren, welche die Kiefer devitalisierten und eine Erkrankung ermöglichten. So haben die systematischen Untersuchungen entlang des Transekts gezeigt, dass es zahlreiche Kiefernbestände mit Mistelbefall und / oder Wurzelschwamm-Vorkommen und / oder auf schlecht wasserversorgten Standorten gibt, in denen aber zur Zeit (noch) keine Erkrankung auftritt. In den betroffenen Beständen akkumulieren sich die devitalisierenden Faktoren. Zu welchem Zeitpunkt (auslösender Moment) eine Erkrankung auftritt, kann mit den vorliegenden Daten momentan nicht abgeschätzt werden.

4.2. Einfluss der Methode auf die Isolation von Endophyten

Oberflächensterilisierung

Wie die Ergebnisse der Experimente zur Überprüfung der Methode der Oberflächensterilisierung gezeigt haben, wurde eine geeignete Methode (V15) gewählt, um Epiphyten von den Kiefernzweigen zu entfernen. Die Effektivität der gewählten Methode (V15) wurde durch verschiedene Zusatzversuche, wie der Abklatsch, überprüft und bestätigt. Das hier angewandte Vorgehen, erst das Netzmittel Ethanol zu benutzen, dann eine Sterilisation durch eine Natriumhypochlorid-Lösung vorzunehmen und dann ein Waschen in Ethanol durchzuführen, ist von vielen anderen AutorInnen anerkannt (Sieber 1988; Stanosz et al. 1997; Arnold et al. 2000; Guo et al. 2000; Gamboa et al. 2003; Schulz und Boyle 2005; Promputtha et al. 2007; Rungjindamai et al. 2008; Zamora et al. 2008; Botella et al. 2010; Peršoh et al. 2010; Kim et al. 2013; Rajala et al. 2013). Grundsätzlich sind die Kieferntriebe, die mit der Methode V15 behandelt wurden, nicht absolut steril, wie der Abklatsch-Versuch und der Versuch mit einer *Diaporthe*-Kultur (Kapitel 3.2.1 Einfluss der Isolationsmethode auf die Diversität der Endophyten, Seite 85) gezeigt haben. Der Abklatsch-Versuch zeigte, dass es trotz Anwendung der Methode V15 bei einem geringen Prozentsatz zu Auswuchs von 5 verschiedenen Pilzarten kam: *Sydowia polyspora*, *Fusarium* sp., *Desmazierella acicola*, *Biscogniauxia nummularia* und *Nemania serpens*, die im Zuge der Oberflächensterilisierung nicht hinreichend eliminiert worden waren. Der Versuch zur Lokalisierung der Endophyten (Kapitel 3.2.1, Seite 90) zeigte hingegen, dass *S. polyspora*, *B. nummularia* und *N. serpens* auch im Inneren des Zweiges (im Holz) vorkommen und somit typische Endophyten sind. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Abgrenzung von Endo- und Epiphyten nicht einfach ist. Ein Grund für das Auswachsen der Pilze nach dem Abklatsch könnte sein, dass sich teilweise kleine Partikel von der Rinde der Zweige lösten und auf der MYP-Platte verblieben. Aus diesen Partikeln konnten dann Pilzkolonien auswachsen.

Bei unzureichender Oberflächensterilisation wurde *S. fimicola* (OTU9) häufiger aus den Kiefertriebsegmenten isoliert, im Gegensatz zu der stringenteren Methode V15. *S. fimicola* wird als generalistischer ubiquitärer Pilz eingestuft (Lundqvist 1972). Kowalski (1993) isolierte *S. fimicola* ebenfalls und stuft den Pilz als krophophil ein. Es ist davon auszugehen, dass dieser sehr schnell wachsende Pilz andere langsam wachsende Endophyten überwachsen kann. Letzteres wurde auch von Kehr (1998)

beschrieben. Kehr (1998) sieht das Problem, dass bei der Isolation von Endophyten epiphytisch wachsende Pilzarten auswachsen können und endophytisch vorkommende Arten überwachsen, was durch eine unzureichende Oberflächensterilisation noch verstärkt wird. Hingegen stufte Kowalski (1993) *S. polyspora* als einen Epiphyten ein, der häufig auftritt, wenn eine schwache Oberflächensterilisierung angewendet wird. Diese Beobachtung kann für diese Arbeit nicht bestätigt werden, da *S. polyspora* auch bei der stringenteren Oberflächensterilisierung V15 häufig auftrat.

Einfluss der Lagerung des Probenmaterials

In den Experimenten zu unterschiedlichen Lagerungszeiten wurde kein negativer Einfluss auf die Zusammensetzung der Endophyten bei einer Lagerung im Kühlschrank bei 8 °C innerhalb von 14 Tagen festgestellt. Ab einer Lagerungszeit von mehr als 14 Tagen gab es qualitative und quantitative Unterschiede in der Pilzzusammensetzung. Das bedeutet, dass bei einer Aufarbeitungszeit von 7 Tagen, wie sie für diese Arbeit eingehalten wurde, keine Minderung der isolierten Pilzarten in Quali- und Quantität zu erwarten war. In anderen Studien zu Endophyten, waren nicht immer Angaben zur Lagerung vorhanden. Oftmals waren Lagerungszeiten von 1-2 Tagen bei einer Temperatur von 4 °C angegeben, aber auch Lagerungen von bis zu 14 Tagen kamen vor (Petrini und Fisher 1988; Kowalski und Kehr 1992; Flowers et al. 2001; Arnold 2007; Bihon et al. 2011a; Sanz-Ros et al. 2015). Slippers und Wingfield (2007) gaben zu bedenken, dass bei längeren Lagerungszeiten des Pflanzenmaterials, sich kleinflächige endophytische Infektionen ausbreiten können, d. h. während der Lagerungszeit mehr Gewebe kolonisieren können. Das kann einerseits ein Vorteil sein, da so endophytische Infektionen besser detektiert werden können. Andererseits könnten während der Lagerungszeit auch Epiphyten in das Pflanzengewebe einwachsen und dann fälschlicherweise als Endophyten aufgefasst werden (Slippers und Wingfield 2007).

Länge der Triebsegmente

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die Länge bzw. Größe der Holzstücke aus denen Endophyten isoliert werden sollen, einen Einfluss auf das Isolationsergebnis haben (Gamboa et al. 2003). Im ersten Versuch (LA1-4) konnten bei kleineren Triebsegmenten und der damit einhergehenden größeren Anzahl an Wiederholungen

die doppelte Anzahl von OTUs festgestellt werden. Bei dem zweiten Versuch wurde eine gleiche Anzahl von Wiederholungen mit unterschiedlichen Segmentlängen durchgeführt, um diesen Faktor „auszuschalten“. Hier überlagerte vermutlich der Faktor „Gesamtlänge des Probematerials“, der sich erheblich unterscheidet (160 cm zu 8 cm) das Ergebnis. Es wurden bei kleineren Triebsegmenten nicht mehr OTUs detektiert, da hier der Probenumfang viel geringer war. Insgesamt zeigte sich, dass auch bei größeren Triebsegmenten langsam wachsende OTUs wie z. B. OTU99 (*Nemania serpens*) und die Pilze der Gattung *Pezizula* (OTU110, 124, 125) auswachsen können. Das Ergebnis verdeutlicht ebenfalls, dass eine Segmentlänge von 5 mm, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, gut geeignet ist, um zahlreiche und langsam wachsende Endophyten nachweisen zu können. Die ForscherInnengruppe um Gamboa et al. (2003) hat einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Größe des Pflanzenmaterials und der Anzahl der isolierten Arten pro Probe beobachtet. Sie haben dafür zwei Erklärungen: 1) Je kleiner die Gewebestücke, desto geringer ist auch die Konkurrenz unter den auswachsenden Pilzen. So sind pro Gewebestück weniger Pilzkulturen vorhanden und langsam wachsende Arten könnten auswachsen, ohne von schneller wachsenden überdeckt zu werden. 2) Die Oberfläche, an der Pilze auswachsen können, wird mit vielen kleineren Stücken größer. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei der dort beschriebenen Versuchsanordnung bei kleineren Gewebstücken eine größere Anzahl und somit mehr Wiederholungen durchgeführt wurden. Dieser Einfluss zeigte sich auch in dem Ergebnis der Endophytenisolation (Tabelle 28). Collado et al. (2007) untersuchten die „Dilution to extinction“ / „Extinction culturing“-Technik, also die Verdünnung des Probenmaterials, um Pilze aus der Streu zu isolieren. Sie zeigten, dass durch diese Methode eine größere Diversität an Pilzen, im Vergleich zu herkömmlichen Kultivierung nachgewiesen werden konnte. Durch diese Methode können auch endophytische Pilze, die oft als lokale Infektionen im Pflanzengewebe vorkommen, nachgewiesen werden (Lodge et al. 1996; Johnston et al. 2006; Flowers et al. 2006).

Lokalisierung der Endophyten

Im Rahmen dieses Teil-Versuchs wurden insgesamt 32 Pilzarten aus Holz, Kambialbereich und Rinde eines Kiefernzweiges isoliert. Die Mehrheit der Pilze wurde in der Rinde der Kieferntriebe nachgewiesen (26 Arten, ca. 80 % der im Rahmen

dieses Versuches isolierten Arten). Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen von Kowalski und Kehr (1992), sie fanden in ihren Studien ebenfalls heraus, dass die meisten Endophytenarten in dem lebenden Teil der Rinde zu finden sind. Das Vorhandensein der Endophyten in der Rinde lässt sich mit dem Übertragungsweg der meisten Endophyten erklären, die oft horizontal durch Sporen verbreitet werden und dann über die Rinde in den Zweig gelangen (Bayman et al. 1998). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei Bissegger und Sieber (1994), sie fanden bei Untersuchungen an der Esskastanie (*Castanea sativa* MILL.) Endophyten nur im Rindenbereich (Phellem = Kork), nicht im Mark (innersten Teil des Kernholzes) und im Xylem (Holz). Im Gegensatz dazu konnten im Rahmen der vorliegenden Studie aus Holz neun verschiedene Pilzarten isoliert werden (*Sydowia polyspora*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Xylaria longipes*, *Nemania diffusa*, *Biscogniauxia nummularia*, *Nemania serpens*, *Pezicula eucrita*, *Umbelopsis isabellina*, *Phacidium lacerum*). Dieses Ergebnis wurde durch andere Endophytenstudien bestätigt (Kowalski und Kehr 1992; Wilson und Carroll 1994; Barklund und Kowalski 1996).

S. sapinea wurde im Rahmen dieser Untersuchungen in Rinde und Kambialbereich im Kiefertrieb festgestellt, konnte jedoch im Rahmen anderer Untersuchungen dieser Arbeit (Ergebnisse nicht dargestellt) mehrmals aus gesundem Kiefernholz isoliert werden. Legesse (2011) hat *S. sapinea* als Erster aus gesundem Holz isoliert. Flowers et al. (2001) fanden in ihren Untersuchungen *S. sapinea* selten in Xylem / Mark von *P. sylvestris* und *P. nigra*, häufiger trat der Pilz in Rinde und Phloem auf.

Im Rahmen des Versuchs zur Lokalisierung wurde auch *Umbelopsis isabellina* (OTU111) im Inneren eines Zweiges im Kiefernholz nachgewiesen und kann somit eindeutig als Endophyt gewertet werden. Dieser Zygomycet kommt typischerweise in Waldböden vor (Domsch et al. 1993) und wurde auch in Kiefernadelstreu (Hayes 1965) nachgewiesen. Gattungen wie *Aureobasidium*, *Alternaria* und *Epicoccum*, die eigentlich als typische Epiphyten gelten (Domsch et al. 1993; Samson et al. 2010), wurden schon aus dem Inneren einer Pflanze isoliert und haben somit neben ihrer epiphytischen Lebensweise auch einen endophytischen Lebensabschnitt (Kehr 1998). Auch in dieser Arbeit wurden als typische Epiphyten bzw. Verunreinigungen geltende Pilze isoliert, wie z. B. Arten der Gattung *Chaetomium*, *Epicoccum* und *Aspergillus*. Petrini (1991) hingegen meint, dass beschriebene Endophytengemeinschaften sich oft tatsächlich aus typischen Epiphyten wie *Alternaria alternata*, *Cladosporium*

cladosporioides, *Epicoccum pupurascens* zusammensetzen. Er ist der Meinung, dass es bei diesen Pilzen um subcuticulare Infektion handelt, also nicht wirklich um endophytisch vorkommende Pilze, sondern um solche, die bei der Oberflächensterilisierung nicht eliminiert wurden, die also auf methodische Probleme hinweisen. Um eine Abgrenzung zwischen Epi- und Endophyten vornehmen zu können, wären in Zukunft Studien hilfreich, bei denen beide ökologischen Gruppen auf dem gleichen Wirt und zur gleichen Zeit untersucht werden würden (Arnold 2007).

Selektivmedien für Basidiomyceten

Bei den durchgeführten Pilzisolierungen aus Kiefernzweigen wurde nur ein geringer Prozentsatz an Basidiomyceten (2 % der isolierten Arten) festgestellt. In anderen vergleichbaren kulturbasierten Studien zu Endophyten in Zweigen der Kiefer wurden hingegen gar keine Basidiomyceten nachgewiesen (Petrini und Fisher 1988; Kowalski und Kehr 1992; Peršoh et al. 2010; Martínez-Álvarez et al. 2012; Sanz-Ros et al. 2015). So beschrieben Peršoh et al. (2010) in einer ersten Studie zu Endophyten aus Kiefern und Misteln, die eine kulturbasierte Isolierungsmethode anwandte, nur eine basidiomycetische Pilzart in der Mistel. In einer zweiten Studie (Peršoh 2013), die hingegen mit molekulargenetischen Methoden zur Pilzisolierung arbeitete, wurden Basidiomyceten fast genauso häufig wie Ascomyceten isoliert.

Dass Basidiomyceten in Untersuchungen zu Endophyten oft unterrepräsentiert sind, könnte daran liegen, dass (1) wirklich wenige Basidiomyceten in dieser ökologischen Nische leben, (2) die Isolierungsmethode bzw. (3) die verwendeten Nährmedien nicht zur Isolation von Basidiomyceten geeignet sind oder (4) eine unzureichende Oberflächensterilisation verwendet wurde, die nicht alle Hyphen epiphytischer Organismen abtötet. Dadurch könnten schnellwüchsige Epiphyten aus dem Kiefernmaterial auswachsen und langsam wachsende Basidiomyceten überwachsen werden.

Weder das Auslegen von Kiefertriebsegmenten auf OPP-Agar noch auf MYP-Agar mit Benomyl-Zusatz erbrachte mehr Arten aus der Abteilung der Basidiomyceten. Teilweise wurden in Arbeiten zur Isolation von Endophyten anderer Arbeitsgruppen dem Nährmedium Antibiotika hinzugefügt, um bakterielles Wachstum zu unterdrücken (Kowalski und Kehr 1992; Giordano et al. 2009). Die Isolationsergebnisse aus Kiefernzweigen im Rahmen der vorliegenden Studie zeigten jedoch, dass eine Zugabe von Antibiotikum nicht notwendig war, da viele Pilzarten isoliert wurden, die schon aus

anderen Studien bekannt waren (siehe Tabelle 35, Seite 106) und wenig Verunreinigungen durch Bakterien oder Hefen festgestellt wurden.

Ein Überwachsen der vorhandenen Basidiomyceten durch schnell wachsende Ascomyceten ist wahrscheinlich. Nach ca. zweiwöchiger Inkubation der Triebsegmente auf dem Nährmedium bei Raumtemperatur waren die Petrischalen meistens vollständig mit Myzelium bedeckt und eine Isolation von langsam auswachsenden Pilzen nicht mehr möglich. Das Überwachsen-Werden von langsam wachsenden Basidiomyceten beschreiben auch andere Autoren (Lindahl und Boberg 2008; Thorn et al. 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein MYP-Nährmedium verwendet, in anderen Endophytenstudien wurde das Pflanzenmaterial nach der Sterilisation zerschnitten und auf 2%-igen MEA oder PDA-Nährboden ausgelegt (Kowalski und Kehr 1992; Zamora et al. 2008; Giordano et al. 2009; Botella und Diez 2011; Sanz-Ros et al. 2015). So konnten z. B. Bills und Polishook (1991) nachweisen, dass der Einsatz verschiedener Nährmedien eine größere Artenvielfalt bei der Isolation von Endophyten aus Pflanzenmaterial erbringt.

Giordano et al. (2009) stellten fest, dass von 143 isolierten Endophytenarten aus dem Splintholz von *P. sylvestris* 17 Arten (12% der Arten, z. B. *Bjerkandera adusta*, *Heterobasidion annosum*, *Peniophora* sp., *Schizophyllum commune*, *Sistotrema coroniferum*, *Rhizoctonia solani* (Synonym *Thanatephorus cucumeris*), *Trametes versicolor*) den Basidiomyceten angehörten. Die Untersuchungen wurden teilweise an absterbenden Kiefern durchgeführt, daher sind zahlreiche der nachgewiesenen Pilze auch als Schwächeparasiten, Parasiten oder Saprobionten bekannt, wie z. B. *Bjerkandera adusta*, *Heterobasidion annosum*, *Rhizoctonia solani*, *Trametes versicolor* (Schlechte 1986; Woodward et al. 1998; Butin 2011). In der Studie von Giordano et al. (2009) wurde im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit Splintholz untersucht, das eine ganz andere ökologische Nische darstellt. Unterschiedliche Ergebnisse könnten auch durch den unterschiedlichen geographischen Ursprung (Spanien) der Kiefern entstanden sein. Giordano et al. (2009) benutzten für die oben genannten Untersuchungen neben 2%-MEA auch ein Selektiv-Medium mit Benomyl und Streptomycin. Die unterschiedlich verwendeten Nährmedien hingegen können nicht die Ursache für die Untersuchungsergebnisse sein, da Untersuchungen der NW-FVA zeigten, lassen sich die oben von Giordano et al. (2009) isolierten und

beschriebenen Basidiomyceten gut auf einem MYP-Medium isolieren und kultivieren (persönliche Mitteilung Gitta Langer).

Es gibt Hinweise darauf, dass ein Teil der in der Pflanze lebenden Endophyten nicht auf Nährmedium kultivierbar ist (Allen et al. 2003; Arnold 2007; Unterseher et al. 2007). Das heißt, die vorliegende Studie hat keinen Anspruch darauf, alle in der Kiefer lebenden endophytischen Pilze vollständig abzubilden. Wenn insbesondere Basidiomyceten nicht auf Nährmedium nachweisbar sind, wie es zahlreiche Studien aufgezeigt haben (Kowalski und Kehr 1992; Hoff et al. 2004; Lygis et al. 2005; Menkis et al. 2006; Zamora et al. 2008; Botella und Diez 2011; Sanz-Ros et al. 2015), könnte der Nachweis von Endophyten mit Hilfe von DNA-Untersuchungen hilfreich sein. So würden auch Ascomyceten, die nicht kultivierbar sind, nachgewiesen werden können, wie folgende Studien (Rajala et al. 2013, Arnold et al. 2007, Sanz-Ros et al. 2015) zeigen. Die Gesamt-DNA könnte untersucht werden, um die Endophytengemeinschaften besser charakterisieren zu können (Rajala et al. 2013). Dabei ergibt sich das Problem, dass Epiphyten auch mit untersucht werden, da bei der Oberflächensterilisation die DNA der Epiphyten nicht zerstört wird (Schulz und Boyle 2005). Einen direkten Vergleich zwischen kulturbasierten und molekulargenetischen Methoden haben Arnold et al. (2007) mit Nadeln von *P. taeda* durchgeführt. Dazu wurden die Proben auf MEA-Nährmedium kultiviert und mit ITS und LSUrDNA auf ihre Endophytenzusammensetzung hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Basidiomyceten bei der Isolation auf Nährmedium, im Gegensatz zum genetischen Nachweis, unterrepräsentiert sind und Sordariomyceten mit molekulargenetischen Methoden nicht hinreichend detektiert wurden (Arnold et al. 2007). Sordariomyceten sind häufige endophytische Pilze in Pflanzengewebe, so machten sie in der vorliegenden Arbeit 31 % aller Isolationen aus (absolute Häufigkeit).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Untersuchungen von Sanz-Ros et al. (2015), bei denen sich 32 % aller Isolationen aus Kiefernzweigen den Sordariomyceten zurechnen ließen. Oono et al. (2015) untersuchten ebenfalls Nadeln von Sämlingen und adulten Kiefern von *P. taeda* und verglichen die Ergebnisse der Endophytenisolation aus kulturbasierten (MEA-Medium) und molekulargenetischen (ITS und LSU-Region) Untersuchungen. Dabei zeigte sich, dass auf Grund von rein genetischen Analysen weniger OTUs identifiziert werden konnten. Bei den Sämlingen zeigten sich durch die kulturbasierte Analyse 67 OTUs, bei den molekulargenetischen Analysen hingegen nur 34 OTUs. Dabei ließen sich in den Nadeln der Sämlinge 26 Arten mit

molekulargenetischen Methoden nachweisen, die mit einer Verwendung eines Nährmediums nicht isoliert werden konnten. Von diesen 26 Arten waren 19 sogenannte Singeltons, also nur einmal auftretende Pilze. Aus den Nadeln adulter Kiefern ließen sich durch Kultivierung auf einem künstlichen Nährmedium 37 OTUs nachweisen, bei der Analyse DNA hingegen nur 6 OTUs. Bei den Nadeln adulter Kiefern fanden sich durch molekulargenetische Untersuchungen nur 2 OTUs, die sich durch eine kulturbasierte Analyse nicht nachweisen ließen (Oono et al. 2015). Einerseits waren unter den Arten, die ausschließlich mit molekulargenetischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnten, auch Basidiomyceten wie z. B. *Stereum* sp. und *Malassezia* spp. (Oono et al. 2015). Andererseits fanden sich aber auch Arten, die in anderen kulturbasierten Studien häufig isoliert werden konnten, wie z. B. *Penicillium* sp. (*ibid.*; Zamora et al. 2008; Giordano et al. 2009; Botella und Diez 2011; Sanz-Ros et al. 2015). Diese Pilze könnten infolge einer ineffektiven Oberflächensterilisierung isoliert worden sein, da sie auch als Epiphyten bekannt sind.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Hypothese (1) mit der Annahme, dass wirklich wenige Basidiomyceten in dieser ökologischen Nische leben, nicht zutreffend zu sein scheint, da andere Autoren mit molekulargenetischen Methoden zahlreiche Basidiomyceten aus der gleichen ökologischen Nische (lebende Kiefernzweige) isolieren konnten (Peršoh 2013). Hypothese 2 (die Isolierungsmethode bzw. die verwendeten Nährmedien sind nicht zur Isolation von Basidiomyceten geeignet) scheint zutreffend zu sein, da auch andere Autoren mit ähnlichen Methoden wenige Basidiomyceten isolieren konnten. Hypothese 3 (es wurde eine unzureichende Oberflächensterilisation verwendet, die nicht alle Hyphen epiphytischer Organismen abtötet; dadurch könnten schnellwüchsige Epiphyten aus dem Kiefernmaterial auswachsen und Basidiomyceten überwachsen werden) trifft insofern nicht zu, da die Ergebnisse der Versuche zur Oberflächensterilisierung gezeigt haben, dass die angewendete Methode eine hinreichende Oberflächensterilität gewährleistet. Die Hypothese trifft aber insoweit zu, als dass auch aus oberflächensterilen Kieferntriebsegmenten zahlreiche schnellwüchsige Ascomyceten auswachsen und nachgewiesen werden konnten, die ein Auswachsen von langsam wachsenden Basidiomyceten verhindern könnten.

4.3 Isolierte Endophyten

Bestimmung der isolierten Endophyten

Von den 90 isolierten Endophyten konnten 42 Morphotypen bis zur Art, 39 bis zur Gattung, 2 bis zur Familie, 1 bis zur Ordnung und jeweils 3 bis zur Klasse und Abteilung bestimmt werden. Obwohl vollständige, monographische Arbeiten über viele Ascomyceten- und Deuteromycetengattungen vorliegen, ist die Bestimmung einer bestimmten Art oft schwierig: die Variationsbreite innerhalb einer Art, die sich in Kultur zeigt, wird in den gängigen Bestimmungswerken oft nicht berücksichtigt. Dies zeigte sich z. B. auch bei OTU2, der mindestens vier verschiedene Morphotypen bilden kann. Ein weiteres Beispiel sind die Pilze der Gattung *Pezizula*: in dem Werk von Verkley (1999) sind zahlreiche Pilze dieser Gattung ausführlich dokumentiert, es gibt Angaben zur Wachstumsgeschwindigkeit, zu den Sporen, Fotos der Kulturen usw., trotzdem war keine Bestimmung aller hier isolierten *Pezizula*-Stämme möglich (siehe OTU120 und 125).

Viele Ascomyceten bilden *in vitro* kein Teleomorph (sexuelle Fruktifikation) und zur Bestimmung blieben nur die Anamorphe / die Konidienform der Pilze. Einige der isolierten Pilze sporulierten direkt nach ihrer Isolierung, verloren jedoch im Verlauf der Zeit, nach mehrmaligem Abimpfen, ihre Vitalität. Dieses Phänomen äußerte sich in einem schwächeren Wuchsverhalten und teilweise in dem Verblässen der Kulturfarbe. Um die Pilze wieder zu revitalisieren, wurden sie auf Kiefernadelagar (PNA), Kiefernringenagar (PBA) und Kiefernholzagar (PWA) inokuliert. Insbesondere das PNA-Medium regte einige Pilzkulturen zur Sporulation an (z. B. Arten der Gattung *Pestalotiopsis* / *Pestalotia* / *Truncatella*). Viele endophytisch isolierte Pilzarten bleiben unter Laborbedingungen, in künstlicher Kultur, steril und werden dann nur in Morphotypen eingeteilt, diese Ergebnisse sind wiederum nicht vergleichbar mit anderen Arbeiten. Von 90 im Rahmen dieser Arbeit isolierten Pilzarten blieben 17 (\cong 19 %) *mycelia sterilia*. Diese Endophyten konnten auch nicht unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zur Sporulation angeregt werden. In anderen Untersuchungen zu Endophyten wurden zwischen 4,5 bis 54 % sterile Morphotypen beschrieben (Petrini et al. 1982; Espinosa-Garcia und Langenheim 1990; Johnson und Whitney 1992; Fisher et al. 1993, 1994, 1995; Taylor et al. 1999; Guo et al. 2000; Photita et al. 2001; Cannon und Simmons 2002; Kumaresan und Suryanarayanan 2002).

Arnold (2007) gibt zu bedenken, dass bei Basidiomyceten die Bestimmungsschlüssel aus anderen geografischen Regionen nur bedingt zur Bestimmung geeignet sind (Cantrell und Lodge 2001). Auch Gazis et al. (2011) sehen als herausforderndste Arbeit mit Endophyten die taxonomische Beschreibung, die es für viele Gattungen nicht gibt. Busby et al. (2015) diskutieren in diesem Zusammenhang, dass die Mehrheit der endophytischen Pilze nie beschrieben wurde oder unter Revision stehen. Als Problem hierbei sehen Gazis et al. (2011), dass viele Endophytenstudien nur mit einem DNA-Lokus arbeiten. Hier wird zumeist die ITS-Sequenz verwendet, wie auch in der vorliegenden Arbeit. Gründe, die für die ITS-Region sprechen, sind, dass sie einfach zu amplifizieren ist und durch ihre häufige Verwendung viele Vergleichssequenzen zur Verfügung stehen. Probleme bereitet die Verwendung von ITS-Sequenzen, da sie teilweise hohe intraspezifische Variation aufweisen (Lacap et al. 2003). Als Näherungsweise an die Art werden üblicherweise Ähnlichkeitsprozente herangezogen. In sehr diversen Gattungen oder Spezies-Komplexen ist die Verwendung der ITS-Sequenz nicht ausreichend (Hoffman und Arnold 2008; Lacap et al. 2003). Die Grenzen der Verwendung der ITS-Region haben sich auch in dieser Arbeit gezeigt, z. B. an den Arten der Gattung *Pestalotiopsis* (Maharachchikumbura et al. 2011, 2014) oder der Gattung *Diaporthe* (Gomes et al. 2013). Ein weiteres Problem, das sich aus der Verwendung von ITS-Sequenzen ergibt, ist die mangelnde Qualitätskontrolle der eingestellten Sequenzen in den Datenbanken (Bridge et al. 2003; Nilsson et al. 2006; Arnold et al. 2007). Für zahlreichere und aktuelle Vergleichssequenzen wurden Initiativen zum Barcoding von Pilzen ins Leben gerufen (z. B. www.fungalbarcoding.org). Nichtsdestotrotz beinhalten diese Datenbanken bis heute weniger als 1 % der erwarteten Diversität der Pilze (Hawksworth 2012).

Artabgrenzung und Erkennung sind auch für das Management und die Kontrolle von Pathogenen sehr wichtig (Short et al. 2015; Ghelardini et al. 2016). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus Bestimmung nach morphologischen und molekulargenetischen Merkmalen vorgenommen, dies schlagen auch Lacap et al. (2003) vor. Viele der aus Kiefernzweigen isolierten Pilze konnten nicht allein aufgrund der ITS-Sequenz einer Art zugeordnet werden. Als Beispiel werden hier *S. polyspora* (OTU1) und *M. olivacea* (OTU2) diskutiert. Bei OTU1 kamen nach dem Blast in der NCBI Datenbank zwei nahverwandte Arten in Frage: *Rhizosphaera kalkhoffii* oder *S. polyspora*. Die Kultur von OTU1 hat ebenfalls Ähnlichkeiten mit der von

Aureobasidium pullulans. Erst durch Kulturversuche (Tabelle 12) und Mikroskopie der Kulturen konnte die Zuordnung zur Art *S. polyspora* bestätigt werden. Auch bei OTU2 standen mehrere nahverwandte Arten zur Auswahl: *Phoma herbarum* und *M. olivacea / proteae*. Hier wurden ebenfalls Kulturen von CBS *Microsphaeropsis olivacea* (BONORD.) HÖHN. (CBS336.78) und DSMZ *Phoma herbarum* WESTEND (DSMZ Nr. 63184) als Vergleich für Merkmale der Kultur herangezogen. Weiterhin wurden Artbeschreibungen, wie sie von Domsch et al. (1993), Kinsey (2002), Samson et al. (2010) Crous et al. (2011), Chen et al. (2015) und Liu et al. (2015) veröffentlicht wurden, nachvollzogen und überprüft, um eine Zuordnung zur Art zu ermöglichen. Bei dem Pilz OTU107 konnte die durch die ITS-Sequenz ermittelte Art *Cercophora coprophila* durch Kulturversuche nicht bestätigt werden. Weitere Beispiele, bei denen der Arname der besten übereinstimmenden ITS-Sequenz durch Laborversuche nicht bestätigt werden konnte, sind OTU30, 69, 81, 89, 93, 115. Diese Beispiele zeigen, dass die ITS-Sequenz nur ein Hinweis auf die Art bzw. Gattung des Pilzes geben kann. Der Blast der ITS-Sequenz stellt also nur ein Anhaltspunkt dar. Der isolierte Endophyt muss mit Angaben in der Literatur verglichen werden, d. h. Kulturbeschreibungen sollten recherchiert, Kulturmerkmale überprüft, Kulturversuche durchgeführt und mikroskopische Untersuchungen vorgenommen werden.

Der Pilz OTU123 aus der Gattung *Pezicula* ist ein Beispiel für eine Art, die nur auf Grund der ITS ausgewiesen wurde. *Pezicula neosporulosa* Z.L. YUAN & VERKLEY wurde 2014 neu beschrieben und ist morphologisch „nicht zuverlässig“ (Yuan und Verkley 2015) von *P. sporulosa* zu unterscheiden. In der ITS-Sequenz unterscheiden sich die beiden *Pezicula*-Arten an einem bestimmten Locus (TCA / TTA). An diesem Beispiel werden die Grenzen des Morphospecies-Konzepts sichtbar.

Ein weiteres Problem, das sich aus der Methode der Artabgrenzung ergibt, ist die Berechnung von Diversitätsindices. Diese verändern sich, je nachdem ob man z. B. Arten mit einer Ähnlichkeit von 95 % als gleiche Art ansieht oder ein höheres Level z. B. bei 99 % ansetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Artebene eine Ähnlichkeit der ITS-Sequenz von mindestens 98 % vorausgesetzt.

Diversität der isolierten Endophyten

Einige der hier identifizierten endophytischen Pilzarten wurden sogar erstmalig für *Pinus* spp., *P. sylvestris* oder an Zweigen von *P. sylvestris* beschrieben. Die isolierten Arten unterscheiden sich zum Teil erheblich von den Arten, die in anderen Studien

detektiert wurden (siehe Tabelle 34 bis 36, Seite 105ff), Gründe dafür werden im Verlauf eingehend erörtert. Die Zusammensetzung der Pilzarten im Gewebe der Kiefer kann erheblich variieren. Sie wird beeinflusst durch das Mikroklima und die Nährstoffversorgung der Nadeln oder auch durch das Konkurrenzverhalten der Pilze untereinander (Gremmen 1957 in Kowalski 1988). Diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Im Folgenden werden die Faktoren Probenanzahl, Gewebealter, Gewebetyp, Jahreszeit und der Einfluss der Umgebungsvegetation des Standorts auf die isolierte Endophytenzusammensetzung diskutiert. Das Vorkommen von *S. sapinea* und einzelner häufiger vorkommender Endophyten wird ebenfalls vorgestellt und diskutiert.

Von den isolierten Pilzen traten nur wenige Arten häufig, d. h. mit einer relativen Häufigkeit > 10 % (*Sydowia polyspora*, *Microsphaeropsis olivacea*, *S. sapinea*, *Truncatella conorum-piceae*) und viele Arten selten auf (Tabelle 20 und Abbildung 45). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei anderen Studien zu Endophyten, wie z. B. bei Kowalski und Kehr (1992) und Sanz-Ros et al. (2015). Es ist bekannt, dass die Anzahl der nachgewiesenen Endophyten-Arten maßgeblich vom Isolierungsaufwand abhängt (Hyde und Soyong 2008). Dabei besteht die Frage, ob die isolierte relative Häufigkeit die natürliche Abundanz in der Pflanze widerspiegelt. Studien von z. B. Unterseher et al. (2013) weisen darauf hin, dass die Diversität der Pilze durch die *in vitro*-Kultivierung nicht gut abgebildet wird. Als Maß für die Abundanz von Arten wird meist ihre Biomasse herangezogen. Diese Biomasse, die ein Pilz im Pflanzengewebe aufweist, kann durch die Isolation auf Nährmedium jedoch nicht ermittelt werden.

Den Einfluss der **Probenanzahl** bildet auch die Artenakkumulationskurve ab, da mit zunehmender Probenanzahl mehr Arten isoliert wurden. Das legt auch das Modell zur Schätzung der zu findenden Arten nach der Methode nach Chao nahe, das 118 Arten annimmt. Das bedeutet, würden weitere Triebsegmente untersucht werden, könnten nach dem Modell von Chao noch rund weitere 20 Endophyten-Arten zusätzlich nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss des **Gewebealters** auf die Diversität der Endophyten nachgewiesen werden. So war die Anzahl der isolierten Taxa im jüngsten Gewebe des Kiefernzweiges am geringsten, wie auch die Besiedlungsrate und die Evenness. Auch wurde bei der Untersuchung des jeweils aktuellen Jahrgangs bei deutlich mehr Triebsegmenten kein Auswuchs festgestellt (Tabelle 32). Ebenso konnte

S. polyspora häufiger aus den jüngsten Trieben als aus den drei älteren Nadeljahrgängen isoliert werden. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da *S. polyspora* ein typischer Saprophyt, aber auch Pathogen (Smerlis 1970; Sutton und Waterston 1970) der Kiefer ist und somit angenommen werden könnte, dass die Abundanz des Pilzes mit der Seneszenz des Kieferngewebes zunimmt.

Die geringere Diversität in jungen Trieben der Kiefer könnte auch mit der Expositionsdauer des Gewebes gegenüber potentiellen Endophyten, die meist horizontal via Sporen übertragen werden, in Zusammenhang stehen. Zum Einfluss des Gewebealters auf die Endophytenzusammensetzung gibt es in der Literatur verschiedene Angaben. Meist wird ein Anstieg der Artenzahl mit zunehmendem Alter des Pflanzengewebes nachgewiesen (Fröhlich et al. 2000; Kumaresan und Suryanarayanan 2002; Arnold und Herre 2003). Oono et al. (2015) weisen darauf hin, dass eine Variation der Endophytenzusammensetzung auch mit den Inhaltsstoffen des Gewebes zusammenhängen könnte, die sich mit dem Alter verändern. Zudem nimmt mit dem Alter des Pflanzengewebes die Fähigkeit zur Abwehr ab (Zeier 2005), was eine Besiedelung mit Pilzen erleichtern könnte. Dieses Ergebnis bestätigen auch Peršoh et al. (2010), die in älteren Blättern von Kiefern und Misteln mehr Pilzarten nachweisen konnten, die nicht wirts-spezifisch vorkommen. Sie nehmen an, dass eine Abnahme der Abwehr des Pflanzengewebes der Grund dafür ist.

Neben einem altersspezifischen Einfluss wurde auch ein **saisonalen Einfluss** auf die Diversität der Endophyten festgestellt. Die monatliche Untersuchung einer Kiefer zeigte, dass die Besiedlungsrate und die Evenness im Winter abnehmen. Das könnte darauf hinweisen, dass einige Endophyten im Winter inaktiv sind und deshalb nicht detektiert werden konnten. Wobei sich nicht klären ließ, ob die Endophyten wohlmöglich durch die Inkubation bei Raumtemperatur wieder vitalisiert werden könnten. Einen saisonalen Einfluss auf die Endophytenzusammensetzung konnte an Sämlingen der Gattung *Quercus* und *Pinus* in Baumschulen nachgewiesen werden (Martin-Pinto et al. 2004). Wie auch in dieser Arbeit, fanden die Autoren, dass die Diversität der isolierten Pilzarten im Frühling in den untersuchten Pflanzengeweben höher war, als in den anderen Jahreszeiten. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Untersuchungen von Collado et al. (1999). Im Gegensatz dazu wiesen Zamora et al. (2008) an verschiedenen *Pinus*-Gewächsen im Frühling weniger Pilzarten nach, als im Herbst. Martin-Pinto et al. (2004) identifizierten Pilzarten die vermehrt im Frühling oder im Herbst detektiert wurden, so kam z. B. der *Alternaria alternata*-complex eher im

Herbst vor, *Ulocladium* sp. dagegen verstärkt im Frühling. Einen jahreszeitlichen Einfluss auf die Endophytenzusammensetzung konnte ebenfalls durch Osono (2008) festgestellt werden.

Die untersuchten Kiefern mit **Mistelbesatz** wiesen auf den Flächen Viernheim und Wildpark jeweils eine höhere Artenanzahl an Endophyten in den Kiefernzweigen auf (Abbildung 32 und Abbildung 33). In Viernheim lässt sich dieses Ergebnis durch die wesentlich höhere Probenanzahl erklären. Mit Mistel wurden 6 und ohne nur 2 Kiefern untersucht. In Wildpark hingegen wurden etwa gleich viele Triebsegmente von Kiefern mit und ohne Mistelbesatz untersucht. Die Endophyten, die auf der Untersuchungsfläche Wildpark ausschließlich in Kiefernzweigen mit Mistel festgestellt wurden (8 OTUs) kamen allerdings mit einer geringen RH vor (< 5 %, Abbildung 33). Drei dieser Endophyten konnten jeweils nur von diesen Untersuchungsflächen isoliert werden (OTU 86, 89 und 98). Sonst ließen sich alle Endophyten aus Kiefern mit und ohne Mistelbesatz isolieren. Auffallend war, dass zahlreiche Endophyten der Gattung *Xylaria* in Kiefernzweigen mit Mistel vorkamen (OTU 12, 41, 68, 89), woran das lag, konnte nicht geklärt werden.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Endophyten isoliert wurden, die mit einem Mistelbesatz der Kiefer in Zusammenhang stehen. Diese Beobachtung wird durch Untersuchungen von Peršoh (2013) bestätigt. Untersuchungen zu Endophyten aus Misteln und Zweigen und Nadeln von Kiefer mit und ohne Misteln haben bis jetzt nur Peršoh et al. (2010) und Peršoh (2013) durchgeführt. Es zeigte sich, dass ein Besatz mit Kiefernmistel keinen nachweisbaren Einfluss auf die Zusammensetzung der Endophyten in der Kiefer hatte (Peršoh 2013). Giordano et al. (2009) hingegen identifizierten drei Pilze im Holz der Kiefer, die mit einem Mistelbesatz assoziiert waren (*Thanatephorus cocumeris* (Synonym: *Rhizoctonia solani*), *Phoma herbarum* und *Mucor plumbeus*). Diese Arten wurden in der vorliegenden Studie nicht isoliert. Auch zeigten z. B. nahverwandte Arten der Gattung *Phoma* kein gehäuftes Auftreten in Mistel-infizierten Kiefern an den untersuchten Standorten.

Das Vorkommen von *Biscogniauxia mediterranea* und die Baumartenzusammensetzung

Die durchgeführten Ordinationen (Abbildung 47 - 45) zeigten für die isolierten Arten in der Regel keine eindeutige Variation der Endophytenzusammensetzung entlang des Transekts von Nord nach Süd. Eine Ausnahme bildet *B. mediterranea*, das Vorkommen (endophytische Isolation / relative Häufigkeit) des Pilzes variiert von Nord nach Süd entlang des Transekts. Bei *B. nummularia* hingegen zeigte sich dieses Verteilungsmuster nicht. *B. mediterranea* fruktifiziert unter anderem auf Buche oder Eiche und gilt als wärmeliebender Pilz, der auch als Schwächepathogen an Arten der Gattung *Quercus* in mediterranen Gebieten in Erscheinung tritt (Henriques et al. 2015). Auf den Untersuchungsflächen in Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Thüringen und Bayern wurde *B. mediterranea* nur selten nachgewiesen (Abbildung 46). In Hessen und Baden-Württemberg hingegen trat *B. mediterranea* verstärkt auf.

Das Vorkommen könnte einerseits von dem wärmeren Klima im Süden des Untersuchungsgebietes abhängen, da *B. mediterranea* eine wärmeliebende Art ist (Vannini und Valentini 1994; Vannini et al. 2009). Andererseits könnte das Vorkommen von *B. mediterranea* aber auch von der Umgebungsvegetation beeinflusst worden sein, da bisher nicht bekannt ist, dass *B. mediterranea* auf der Kiefer sporuliert, sondern nur auf Buche, Eiche und anderen Hartlaubhölzern (Ju et al. 1998). So fanden sich im Norden des Untersuchungsgebietes vermehrt große Kiefernreinbestände, im Süden des Transekts waren häufiger Laubbäume innerhalb oder in der Umgebung der Probebestände zu finden.

Dass die Baumartenzusammensetzung einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Endophyten in Kiefer und Mistel hatten, konnte Peršoh (2013) ebenfalls nachweisen. Er untersuchte Gewebe von Kiefern und Misteln zum einen aus einem Kiefernreinbestand und zum anderen aus einem Bestand mit u. a. Buche, Fichte, Birke, und konnte unterschiedliche Endophytenzusammensetzungen feststellen.

Abweichend von der Nord-Süd-Tendenz tritt *B. mediterranea* an dem Untersuchungspunkt ST03 im Nord-Osten Sachsens-Anhalts verstärkt auf. Eine Erklärung könnte die Bestandeszusammensetzung sein, da dort Eiche mit Kiefer im Oberstand zu finden waren.

In Untersuchungen von Sanz-Ros et al. (2015) in Nordspanien an Zweigen von *P. sylvestris* war *B. mediterranea* der am vierthäufigsten isolierte Pilz und wurde von den Autoren als potentiell schädlich eingestuft. In den Arbeiten von Sanz-Ros et al.

(2015) stand das Vorkommen von *B. mediterranea* mit einem geringen Dickenwachstum der untersuchten Kiefern im Zusammenhang. Die Zusammensetzung der Endophyten in der Studie von Sanz-Ros et al. (2015) könnte auch mit der Umgebungsvegetation zusammenhängen, zu der jedoch keine Angaben vorliegen.

Ebenso fanden Rollinger und Langenheim (1993) keine Variation der Endophyten-gemeinschaften entlang eines Nord-Süd Gradienten entlang der Westküste der USA an Blättern des Küstenmammutbaums (*Sequoia sempervirens* (D.DON) ENDL.). Bei ihren Untersuchungen auf 6 Standorten von jeweils 10 Bäumen stellten sie eine ähnliche Endophytenzusammensetzung fest. Dieses Ergebnis überprüften sie ebenfalls mit einer Ordination (PCA-Methode) und einer Clusteranalyse.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in anderen Forschungsarbeiten zu Endophyten eine geographische Variation in der Endophytenzusammensetzung nachgewiesen: Arnold und Lutzoni (2007) haben die Endophytengemeinschaft von 28 Pflanzenarten von der kanadischen Arktis bis nach Panama untersucht und einen Breitengrad-Gradienten in der Endophytenzusammensetzung festgestellt. Die Ergebnisse sind jedoch nicht vergleichbar, da das Untersuchungsgebiet in der oben genannten Studie viel größer war, als der hier untersuchte Transekt. Unterschiede zeigen sich wahrscheinlich noch nicht auf dem knapp 700 km langen Transekt durch Deutschland, der im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht wurde. Zudem wurden in der oben genannten Studie von Arnold und Lutzoni (2007) verschiedene Wirtspflanzen untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit gehörten die meisten isolierten Pilze zu den Ascomyceten und zur Klasse der Dothideomycetes, gefolgt von Sordariomycetes, Pezizomycetes und Leotiomycetes. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit Aussagen von Arnold (2007) und Sieber (2007), die Leotiomycetes als dominante Klasse der Endophyten in Kieferngewächsen beschrieben. Peršoh et al. (2010) hingegen haben fast keine Endophyten der Klasse der Leotiomycetes gefunden. Die verschiedenen endophytisch isolierten Mykozöosen aus dem gleichen Wirt (*P. sylvestris*) lassen den Schluss zu, dass insbesondere der **Standort** eine Rolle spielt. Das legen auch Studien von Kowalski und Kehr (1992) nahe, die Endophyten von 11 Baumarten untersuchten und

eine Standortabhängigkeit der Zusammensetzung feststellen konnten. Dies konnten auch Peršoh et al. (2010) nachweisen.

Es stellt sich aber weiterhin die Frage, nach den Gründen, weshalb in verschiedenen Studien so unterschiedliche endophytische Pilzarten isoliert werden, die teilweise vom gleichen Wirt und Gewebe stammen. Zum einem ist es schwierig, verschiedene Studien und die darin gefundenen endophytisch vorkommenden Pilzarten und Abundanzen zu vergleichen, da fast immer andere Methoden zur Isolation und zur Determination verwendet wurden. Bei der Zusammenschau verschiedener Ergebnisse (Tabelle 33, Seite 104) wird deutlich, dass sich Probenart, Sterilisationsbedingungen, Nährmedium und Inkubationsdauer der Proben auf dem Nährmedium erheblich unterscheiden. In diesem Zusammenhang ist wenig darüber bekannt, welche Auswirkungen die angewendete Methode auf das Ergebnis der Endophytenzusammensetzung hat (Arnold 2007). Das Nährmedium, auf dem die Gewebestücke inkubiert werden, die Auswahl des Gewebestückes, die Zeit die zwischen Ernte und Verarbeitung des Probematerials vergeht und die Bedingungen der Kultivierung (Nährmedium, Inkubationstemperatur, Lichtregime, Dauer) haben einen Einfluss auf die Diversität der Endophyten (Arnold 2007).

Zum anderen ist der Einfluss der Herkunft der Proben und deren Standort wichtig für die endophytische Besiedelung: zahlreiche isolierte Endophyten sporulieren nicht auf *P. sylvestris* und werden via Sporen und Wind übertragen, wie z. B. *Hypoxylon* sp., die auf *Fagales* spp. wachsen, aber auch als Endophyten aus der Kiefer isoliert werden. Ein weiteres Problem, Ergebnisse aus verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen, ergibt sich daraus, dass die angewandten Methoden in einigen aktuellen Studien keine Identifikation der Endophyten bis zur Art zulassen. Dort werden lediglich genetische Sequenzen in phylogenetische Bäume mit Vergleichssequenzen eingeordnet, wie dies z. B. in Studien von Ganley et al. (2004), Arnold et al. (2007) oder Prihatini et al. (2016) der Fall ist. Probleme bei der Analyse bzw. dem Vergleich der Endophytenstudien ergeben sich weiterhin, wenn in den Ergebnissen Endophytenarten nicht nach Wirtsbäumen getrennt aufgeführt werden. Dies ist z. B. in Untersuchungen von Martin-Pinto et al. (2004) der Fall, dort werden die Endophyten verschiedener *Pinus* und *Quercus*-Arten zusammen vorgestellt. Ein zusätzliches Problem ergibt sich aus den zahlreichen Synonymen, die es für viele Pilzarten gibt.

Probenumfang

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deutlich mehr Proben untersucht, als in vergleichbaren Studien über Endophyten aus Zweigen von *P. sylvestris* (Petrini und Fisher 1988, Kowalski und Kehr 1992, Peršoh et al. 2010, Martínez-Álvarez et al. 2012, Sanz-Ros et al. 2015). Hier wurden ca. 20 000 Triebsegmente inkubiert und die pilzlichen Auswüchse bestimmt (rund 1,4 Isolate pro Segment), wohingegen in den oben genannten Studien zwischen 200 und 1000 Isolate untersucht wurden. Durch die kleinere Menge an inkubierten Gewebestücken ergibt sich damit auch eine geringere Anzahl an Pilzarten, die detektiert wurden: zwischen 10 - 44 Arten wurden in den 5 Studien aus Zweigen der Kiefer isoliert und bestimmt (Petrini und Fisher 1988, Kowalski und Kehr 1992, Peršoh et al. 2010, Martínez-Álvarez et al. 2012, Sanz-Ros et al. 2015).

Häufig isolierte Pilzarten

***S. polyspora* (OTU1)** ist der Pilz mit der höchsten Abundanz in der vorliegenden Arbeit, 31 % aller untersuchten Triebsegmente waren mit dem Pilz besiedelt. Der Pilz wurde auf 104 der 106 Standorte nachgewiesen. Auch in den Untersuchungen von Kowalski und Kehr (1992) wurde *S. polyspora* häufig isoliert und in Untersuchungen von Sanz-Ros et al. (2015) war *S. polyspora* der zweit häufigste Endophyt in Kieferngewebe. *S. polyspora* lebt vorwiegend saprotroph auf abgestorbenem Pflanzenmaterial und kann an vorgeschädigten Nadeln und Triebspitzen als Schwächeparasit auftreten (Heydeck 1991). Weiterhin tritt der Pilz als Wundpathogen und Bläue-Pilz in Erscheinung (Sutton und Waterston 1970). Heydeck und Dahms (2012) beschrieben *S. polyspora* als Verursacher von Nadel- und Triebspitzenerkrankungen verschiedener Koniferenarten. Der Pilz tritt auf abiotisch beeinträchtigten Bäumen sowie nach Insektenschäden oder in Verbindung mit anderen Pilzinfektionen als Pathogen in Erscheinung. *S. polyspora* trat im nordostdeutschen Tiefland besonders in den 1980er und 1990er Jahren an *P. sylvestris* als Schaderreger auf (Heydeck und Dahms 2012). Auch Talgø et al. (2010) beschrieben *S. polyspora* als Nadelpathogen an Tanne. Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen konnte kein pathogenes Auftreten von *S. polyspora* beobachtet werden. Die Art ist ein potentielles Pathogen an Kiefer, aber auch ein typischer Endophyt in vitalen Kiefernzweigen (Tabelle 37).

***Microspphaeropsis olivacea* (OTU2)** wurde auf nahezu allen Untersuchungspunkten (96 %) nachgewiesen, er war der dritt häufigste Pilz mit einer relativen Häufigkeit von knapp 25 %. Aus *Pinus*-Gewächsen ist *M. olivacea* erst in drei Publikationen beschrieben worden (Petrini und Fisher 1988; Kowalski und Kehr 1992; Kowalski 1993). Petrini und Fisher (1988) beschrieben *M. olivacea* auch als einen typischen endophytischen Besiedler von Koniferen. Kowalski und Kehr (1992) isolierten den Pilz hingegen nur von ein oder zwei untersuchten Ästen der Kiefer als Endophyt.

***Sordaria fimicola* (OTU9)** kam mit einer relativen Häufigkeit von knapp 8 % an 24 Standorten vor. Insbesondere nach der Umstellung der Methode der Oberflächensterilisation wurde der Pilz nur noch selten nachgewiesen. Lundqvist (1972) beschrieb *S. fimicola* als „zweit oder dritt häufigsten crophophilen Pyrenomyceten“ (S. 311). Als Cellulose-Verwerter kommt er häufig auf Pferdemist vor (Lundqvist 1972).

Die Pilze der Gattung ***Diaporthe*** (Nebenfruchtform *Phomopsis*, OTU12, 16, 41, 121) kamen mit einer relativen Häufigkeit zwischen 0,4 und 3 % an 76 Standorten vor. Pilze der Gattung *Diaporthe* wurden ebenfalls von Kowalski und Kehr 1992 und Petrini und Fisher 1988 aus Zweigen der Kiefer endophytisch isoliert. Zahlreiche ökologische Rollen dieser Pilze sind bekannt: Pathogene von Menschen, Pflanzen und Tieren, Endophyten und Saprophyten (Gomes et al. 2013). Hier traten sie nur als Endophyt in Erscheinung, ein pathogenes Vorkommen wurde im Rahmen der Arbeit nicht festgestellt.

***Peniophora pini* (OTU102)** wurde nur ein einziges Mal von der Untersuchungsfläche Prezelle (Niedersachsen) isoliert. Das ist verwunderlich, da der Pilz als ein typischer saprophytischer Besiedler von Kiefernzweigen gilt. Die Ergebnisse decken sich mit Beschreibungen aus der Literatur, denn dort wurde *P. pini* zuvor noch nicht in Zweigen der Kiefer endophytisch nachgewiesen (Petrini und Fisher 1988; Kowalski und Kehr 1992; Peršoh et al. 2010; Martínez-Álvarez et al. 2012; Sanz-Ros et al. 2015). Dieses Ergebnis könnte mit dem langsamen Wuchsverhalten von *P. pini* auf künstlichem Nährmedium zusammenhängen. Jedoch wurde *P. pini* schon aus Nadeln von der Kiefer isoliert (Millberg et al. 2015)

***Truncatella conorum-piceae* (OTU11)** war der viert häufigste Pilz bei den hier durchgeführten Endophytenisolationen und auf nahezu allen untersuchten Standorten (97 %, n = 103) nachzuweisen. Auf einigen Untersuchungsflächen (Viernheim, Pfungstadt 59, Lüderitz, Bürstadt und einzelne Probepunkte entlang des Transekts)

wurde ein erhöhtes Vorkommen von *T. conorum-piceae* festgestellt. *T. conorum-piceae* könnte auf der Untersuchungsfläche Bürstadt in Südhessen eine Rolle als Schwächepathogen spielen (siehe dazu 4.1. Auslösende Faktoren für ein *Diplodia*-Triebsterben, Seite 125).

Aus Zweigen der Kiefer wurden Pilze der Gattung *Truncatella* in anderen Studien nie nachgewiesen (Petrini und Fisher 1988; Kowalski und Kehr 1992; Peršoh et al. 2010; Martínez-Álvarez et al. 2012; Sanz-Ros et al. 2015).

In anderen Studien über Endophyten in verschiedenen Geweben der Kiefer wurden nur selten Pilze der Gattung *Truncatella* isoliert und bestimmt (Menkis et al. 2006; Menkis und Vasaitis 2010; Terhonen et al. 2011). In den drei zuvor genannten Studien wurde stets *Truncatella angustata* bzw. *Truncatella* sp. (Terhonen et al. 2011) im Gewebe der Kiefer nachgewiesen. Der Blast der ITS-Sequenz von OTU118 ergab eindeutig den Artnamen *Truncatella angustata*. Die ITS von OTU118 ist ebenfalls identisch mit der von Menkis et al. (2006; Akzessionsnummer NCBI DQ093715), Menkis und Vasaitis (2010; Akzessionsnummer NCBI HM036617) und Terhonen et al. (2011; Akzessionsnummer NCBI AF377300). Jedoch stimmten die Angaben zur Größe der Konidien von OTU118 nicht mit denen von Guba (1961) beschriebenen für *Pestalotia truncata* LÉV. (1846) überein (Anmerkung: *Pestalotia truncata* Lév. entspricht *Pestalotia angustata* (PERS.) Arx (1981), diese Art ist wiederum ein Synonym von *Truncatella angustata* (PERS.) S. HUGHES (1958) (Arx 1981; Hughes 1958; Index Fungorum 2018)). Ob es sich bei OTU118 um *Truncatella angustata* (PERS.) S. HUGHES (1958) handelt, konnte abschließend nicht sicher geklärt werden. Für die Bestimmung sind weitere mikromorphologische Untersuchungen der Kultur von OTU118 nötig.

Desmazierella acicola (OTU34, Kiefernadel-Haarbecherchen) wurde auf 43 % der untersuchten Standorte (n = 46) mit einer relativen Häufigkeit von 2,8 % nachgewiesen. *D. acicola* wurde als typischer Saprophyt und Endophyt an Kiefern eingestuft (Kowalski und Kehr 1992; Martinović et al. 2016; O. Petrini und Fisher 1988; Przybył et al. 2008). Kowalski und Kehr (1992) isolierten den Pilz endophytisch aus *P. sylvestris* und *Picea abies* (L.) H.KARST. und von weiteren fünf Laubbaumarten. Auch Halmschlager et al. (1993) fanden *D. acicola* in Blättern der Traubeneiche bei Wien. Daneben wurde *D. acicola* von Petrini und Fisher (1988) endophytisch aus Buche und Kiefer isoliert. Sie wiesen *D. acicola* in nahezu allen Zweigproben der Kiefer nach. Durch das signifikant höhere Auftreten in der Kiefer, nehmen sie eine

Wirtsspezifität für *P. sylvestris* an. Die Funde in Kiefer und Buche zeigen jedoch auch, dass wirtsspezifische Pilze auch andere Baumarten auf dem gleichen Standort besiedeln können.

Phoma eupyrena (OTU57) wurde nur auf 6 von 106 Standorten mit einer relativen Häufigkeit von < 1 % isoliert. Er ist ein bodenbürtiger Pilz, der häufig als Schwächepathogen an zahlreichen Pflanzen auftritt, darunter auch an Arten der Gattung *Abies* und an Douglasie (Hampel 1970; Kliejunas 1985). Auf den untersuchten Flächen trat er nicht als Pathogen in Erscheinung. Giordano et al. (2009) isolierten den Pilz ebenfalls aus Splintholz von *P. sylvestris* und wiesen einen Zusammenhang mit absterbenden Kiefern nach.

Hypoxylon fragiforme (Rötliche Kohlenbeere, OTU59) wurde an 28 % der untersuchten Standorte mit einer Häufigkeit von rund 1 % isoliert. *H. fragiforme* fruktifiziert als Saprobiont auf Buche und ist einer der am weitesten verbreiteten Ascomyceten an Buche in der Nordhemisphäre (Stadler et al. 2006). Sanz-Ros et al. (2015) und Kowalski und Kehr (1992) isolierten *H. fragiforme* ebenfalls aus Kiefernzweigen, jedoch ist eine Fruktifikation an Kiefer bisher nicht bekannt (Breitenbach und Kränzlin 1984; Schlechte 1986). In Untersuchungen von Peršoh et al. (2010) war der Pilz sogar der häufigste Sordariomycet, der aus Kiefer und Mistel isoliert werden konnte. ***Hypoxylon rubiginosum*** (OTU101, Ziegelrote Kohlenkruste) gehört zu den Endophyten, die mit einer geringen relativen Häufigkeit isoliert wurden. Diese Art fand sich nur in zwei Triebsegmenten, die bei einem Sterilisationsversuch mit Kiefernzweigen aus Dransfeld untersucht wurden. Gewöhnlich kommt *H. rubiginosum* an verschiedenen Laubholzarten zumeist an Totholz vor (Breitenbach und Kränzlin 1984), aber auch „ausnahmsweise an Nadelgehölzen“ (Schlechte 1986, S. 24). Bei Untersuchungen von Peršoh et al. (2010) war ein Vorkommen von *H. rubiginosum* auf die Kiefernmistel beschränkt.

Pezicula eucrita (OTU110) wurde von 28 Standorten mit einer RH von rund 1 % nachgewiesen. *P. livida*, welcher als conspezifisch mit *P. eucrita* angesehen wird (Verkley 1999, S. 28), wurde von Kowalski und Kehr (1992) häufig endophytisch aus dem Periderm, Subperiderm und Holz der Kiefer isoliert. Sanz-Ros et al. (2015) isolierten *P. eucrita* ebenfalls, mit einer relativen Häufigkeit von 12 %. ***Pezicula cinnamomea*** (OTU124) wurde nur an einem Standort (Dransfeld, Süd-Niedersachsen) bei der monatlichen Probennahme isoliert und die relative Häufigkeit betrug 0,5 %. Kowalski und Kehr (1992) fanden *P. cinnamomea* im Periderm der Kiefer

mit einer Häufigkeit von 3,4 %. Pilze aus der Gattung *Pezizula* sind als Primärbesiedler und als Endophyten bekannt, einige treten als Schwächepathogene, wenn der Baum unter Stress steht, in Erscheinung (Verkley 1999).

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine **Quarantäne-Schaderreger** isoliert. *Cenangium ferruginosum* wurde ebenfalls nicht nachgewiesen, was verwunderlich ist, da der Pilz ein typischer Besiedler von Kiefernästen und ein Schwächepathogen ist (Butin 2011). *C. ferruginosum* fruktifizierte auch an Ästen gefälltter Kiefern in Pfungstadt (PF59), wurde jedoch auch dort nicht endophytisch nachgewiesen. Dieses Ergebnis lässt sich nicht durch die Kultivierbarkeit von *C. ferruginosum* erklären, da Kowalski und Kehr (1992) den Pilz aus Kiefernästen auf einem Nährmedium isolieren konnten. Der Pilz wurde darüber hinaus aus zahlreichen anderen Geweben von *Pinus* spp. endophytisch isoliert: Kowalski (1993); Hata und Futai (1996); Jurc et al. (1996); Jurc et al. (1999); Sieber et al. (1999); Kowalski und Zych (2002); Alsonso et al. (2011); Lee et al. (2011).

Das Vorkommen von *Sphaeropsis sapinea*

Nach der Definition von Carroll (1986) über Endophyten dürfte *S. sapinea* nicht als Endophyt aufgefasst werden, weil nur nicht-pathogene Pilze den Endophyten zugerechnet werden. Hier wird der Begriff jedoch nach der Definition von Petrini (1991) aufgefasst, der hingegen zu den Endophyten alle Pilze, die zu einem Zeitpunkt ihres Lebenszyklus symptomlos im Gewebe leben, zählt. Delaye et al. (2013) wenden ein, dass der Begriff kontextgebunden verwendet wird, also nur einen bestimmten Pilz, in einem bestimmten Wirt und unter bestimmten Umweltbedingungen meint. Die Pathogenität von endophytisch lebenden *S. sapinea*-Stämmen wurde bereits im Experiment bestätigt (Stanosz et al. 1997; Flowers et al. 2001). Auch zahlreiche andere Endophyten sind als latente Pathogene beschrieben (Carroll 1988; Begoude et al. 2011; Andrew et al. 2012).

Endophyten, Pathogene und Saprophyten scheinen in der Pflanze eine Gemeinschaft zu bilden und sich in ihrem ökologischen Verhalten zu überlappen. Wie die drei ökologischen Gruppen zusammen wirken ist bisher unklar. Viele Pilze haben verschiedene ökologische Rollen. Arnold et al. (2009) verdeutlicht das am Beispiel von *Chaetomium globosum*, der Pilz wurde in verschiedenen Studien als Pathogen,

Saprophyt oder als Endophyt isoliert. *S. sapinea* ist ein ebenso gutes Beispiel: endophytisch konnte der Pilz in den quer durch Deutschland untersuchten Kiefernzweigen nahezu in jeder Kiefer isoliert werden. Vermutlich hängt ein Isolierungserfolg maßgeblich von der Anzahl der untersuchten Proben ab. An den meisten Kiefern mit endophytischer Besiedlung durch *S. sapinea* tritt der Pilz jedoch als Pathogen nicht in Erscheinung. Eine dritte Rolle des Pilzes findet sich als Saprophyt. So können Fruchtkörper von *S. sapinea* an abgestorbenen Kiefernzweigen und Zapfen auch in Wäldern ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens nachgewiesen werden. Dass so viele saprophytische Pilze unter den Endophyten gefunden worden sind, untermauert die These, dass eine ökologische Rolle der Endophyten die Zersetzung der Pflanze nach ihrem Absterben ist (Osono 2006; Promputtha et al. 2007; Zamora et al. 2008; Peršoh 2013).

Bei dem untersuchten Kiefernmaterial wurden neben *S. sapinea* keine Arten ermittelt, die speziell oder gehäuft in erkrankten Kiefern vorkamen. Im Gegensatz dazu konnten Botella et al. (2010) zahlreiche weitere endophytische Pilze in Zweigen erkrankter Aleppo-Kiefern identifizieren (z. B. *Brunchorstia pinea*, *Cytospora* sp., *Naemacyclus niveus*, *Pestalotiopsis stevensonii* und *Sclerophoma pithyophila* (Synonym *Sydowia polyspora*)), die mit einem Absterben von *P. halepensis* in Verbindung standen. Außer *S. polyspora* und *S. sapinea* wurde keine der von Botella et al. (2010) genannten Pilzarten hier nachgewiesen. *S. polyspora* wurde im Rahmen der Probennahme von fast allen Standorten (98 %) isoliert und wird als typischer Endophyt von Kiefernzweigen eingestuft. Ein pathogenes Auftreten wurde im Rahmen der Untersuchungen nicht beobachtet.

Bei erkrankten Kiefern mit dem *Diplodia*-Triebsterben war auffällig, dass einerseits eine sehr hohe Besiedlungsrate mit *S. sapinea* festzustellen war (RH Ø 50 %). Andererseits wurden ähnlich hohe Isolierungsraten auch an einzelnen symptomlosen, vitalen Kiefern nachgewiesen (*S. sapinea* RH 68 % am Probepunkt HE12), wobei die durchschnittliche Besiedlungsrate von *S. sapinea* in symptomlosen Kiefern deutlich geringer war (RH Ø 13 %).

Grundsätzlich war die Artenanzahl in erkrankten Bäumen geringer (n = 45) als bei symptomlosen Kiefern (n = 90). Letzteres könnte sich zum einem dadurch erklären, dass durch das schnelle Auswachsen von *S. sapinea* (Slippers und Wingfield 2007; Decourcelle et al. 2015) andere, insbesondere langsam wachsende Pilzarten nicht mehr auswachsen können. Andererseits war die Probenanzahl der beiden Kategorien

(Kiefernzweige von Bäumen mit und ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens) sehr unterschiedlich: 2800 gegenüber 18000 untersuchten Triebsegmenten. Dies hatte sehr wahrscheinlich maßgeblichen Einfluss auf die Anzahl der nachgewiesenen Arten. Denn vergleicht man hingegen paarweise die Ergebnisse der Untersuchungsflächen mit und ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens (Pfungstadt 122 und 59 / Lüderitz / und Bad Freienwalde 650 und 312) ergab sich ein anderes Bild. So wurden auf den Untersuchungsflächen Pfungstadt und Bad Freienwalde jeweils etwa gleich viele Pilzarten endophytisch aus den Kiefernzweigen von Bäumen mit und ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens isoliert (Pfungstadt 34 bzw. 33 Arten, Bad Freienwalde jeweils 23 Pilzarten). In Lüderitz konnten aus den Kiefern ohne Symptome 32 aus den Zweigen von erkrankten Kiefern hingegen nur 18 OTUs isoliert werden. Im Gegensatz dazu wiesen Giordano et al. (2009) eine signifikant geringere Kolonisierungsrate des Holzes in gesund aussehenden Kiefern als in vitalitätsgeschwächten Kiefern nach.

Bei der systematischen Untersuchung von 91 Probepunkten entlang des Transekts von Nordost-Brandenburg durch Sachsen-Anhalt, Thüringen, Bayern, Hessen und Baden-Württemberg wurden keine offensichtlichen Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens an Kiefern im Beobachtungszeitraum (im Jahr 2015) beobachtet. Jedoch wurde an 87 % der Untersuchungs-Punkte ein endophytisches Vorkommen von *S. sapinea* festgestellt. Auffällig war, dass in Thüringen Waldkiefern untersucht wurden, die direkt neben Schwarzkiefern mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens standen, jedoch keine Krankheitssymptome aufwiesen. *P. nigra* ist besonders anfällig für eine Erkrankung mit dem *Diplodia*-Triebsterben (Vujanovic et al. 2000). Es ist davon auszugehen, dass an den untersuchten Standorten mit Schwarzkiefern-Vorkommen der Infektionsdruck hoch gewesen sein muss, aber die Waldkiefer im vitalen Zustand nicht gefährdet ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *S. sapinea* mit einer relativen Häufigkeit von 19 % aus grünen Kiefernzweigen isoliert (Mittelwert aus allen untersuchten Triebsegmenten, Tabelle 19). Auf 87 % der 106 untersuchten Standorte konnte mindestens jeweils ein *S. sapinea*-Stamm isoliert werden. Vergleicht man das endophytische Vorkommen mit anderen Arbeiten zum endophytischen Vorkommen von *S. sapinea* (Flowers et al. (2001), Flowers et al. (2003), Maresi et al. (2007), Bihon et al. (2011a), Tabelle 30), liegt eine hohe Besiedlungsrate in den hier untersuchten Kieferntrieben vor.

Dabei wurde in Waldbeständen ohne Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens *S. sapinea* mit einer relativen Häufigkeit zwischen 0 und 68 % nachgewiesen. Die höchste Isolierungsrate von *S. sapinea* (RH 91 %) fand sich im Trieb einer an *Diplodia*-Triebsterben erkrankten Kiefer auf der Versuchsfläche Lüderitz (LU-123). Bihon et al. (2011a) nimmt an, dass aus symptomlosem Kieferngewebe weniger *S. sapinea* auf Grund der spezifischen Position im Gewebe isoliert werden kann. Die Besiedlung mit *S. sapinea* im Kieferngewebe scheint nicht durchgängig zu sein, wie Versuche von Flowers et al. (2003) an Knospen und Rinde von Schwarzkiefer zeigten. Sie haben in einem Experiment Kiefernknospen und Rinde halbiert und konnten nicht immer aus beiden Hälften *S. sapinea* isolieren. Maresi et al. (2007) detektierten mit der PCR-Methode mehr endophytisch vorkommende *S. sapinea*-Stämme, im Vergleich zur Isolation auf Nährmedium aus Zweigen der Schwarzkiefer.

Es gibt *S. sapinea* selektive Medien wie das Swarts Medium (Swart et al. 1987a) oder das Blodgetts Medium (Blodgett et al. 2003). Rigling et al. (1989) beschreiben die höchste Isolierungsrate auf dem Bavendamms-Medium. Der Einsatz eines Spezialmediums ist jedoch nicht notwendig, da *S. sapinea* auf dem hier verwendeten MYP-Medium sehr gut und schnell auswächst.

Im Rahmen des Versuchs zur Lokalisierung der Endophyten wurde *S. sapinea* lediglich in der Rinde und im Kambialbereich isoliert. Jedoch wurde *S. sapinea* in weiteren Versuchen auch aus symptomfreien Holz isoliert. Flowers et al. (2006) untersuchten die Besiedlung durch *S. sapinea* in Zweigen von *P. nigra* histologisch. Sie wollten durch eine Kombination von PCR und Mikroskopie den Unterschied zwischen latenter und aggressiver Infektion herausfinden. Dazu mikroskopierten sie Gewebe der Schwarzkiefer 1) ohne eine Besiedlung von *S. sapinea*, 2) mit latentem Vorkommen von *S. sapinea* und 3) mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens. In den Gewebetypen 2) und 3) fanden Flowers et al. (2006) inter- und intrazelluläre Besiedlung mit Hyphen von *S. sapinea* im Gewebe der Schwarzkiefern. Sie konnten bestätigen, dass einer Nekrotisierung ein Hyphenwachstum von *S. sapinea* vorangeht und vermuten somit, dass Phytotoxine maßgeblich an der Pathogenität von *S. sapinea* beteiligt sind. Flowers et al. (2006) fanden in ihren histologischen Untersuchungen auch Unterschiede in der Besiedlung von latent besiedeltem Gewebe und erkranktem Gewebe: im latent kolonisiertem Gewebe kam *S. sapinea* im Gegensatz zum erkrankten Gewebe nie im Mark vor, sondern in der äußeren Rinde und in der Nähe der Knospenschuppen.

Die verbreitete latente / endophytische Besiedlung der Kiefer mit *S. sapinea* könnte eine Gefahr für vitalitätsgeschwächte Kiefernbeständen darstellen. Da angenommen werden kann, dass bei Schwächung des Wirtes *S. sapinea* als Pathogen schneller in die parasitische Phase eintreten könnte, weil der Pilz bereits im Trieb vorkommt. Stanosz et al. (1997) und Flowers et al. (2001) haben in Gewächshausversuchen nachgewiesen, dass *S. sapinea*-Stämme, die aus gesundem Gewebe der Kiefer isoliert wurden, ein ebenso hohes pathogenes Potential aufweisen wie *S. sapinea*-Stämme aus erkranktem Gewebe.

Andererseits sind Fruchtkörper von *S. sapinea* in den Waldbeständen zahlreich vorhanden (als Saprobiont an Kiefernzweigen), sodass auch Konidien ein Infektionspotential über die Luft darstellen. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine latente Besiedlung der Kiefern mit *S. sapinea* unter den damaligen gegebenen Umweltbedingungen keine konkrete Gefahr darstellte. Auf 92 von 106 untersuchten Standorten (die meisten Untersuchungsstandorte wiesen keine Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens auf) quer durch Deutschland konnte *S. sapinea* in grünen Zweigen nachgewiesen werden, Erkrankungen der Kiefer mit dem *Diplodia*-Triebsterben traten im Untersuchungsgebiet und im Untersuchungszeitraum jedoch selten auf.

Im Rahmen der systematischen Erhebung des endophytischen Vorkommens entlang eines Transekts konnten keine Parameter gefunden werden, die ein Vorkommen von *S. sapinea* maßgeblich beeinflussen, wie z. B. Längengrad oder Höhe des Standorts. Jedoch zeigte sich bei der systematischen Untersuchung entlang des Transekts die Tendenz, dass an den höher gelegenen Standorten (11 Probepunkte über 400 m über NN) *S. sapinea* mit einer geringeren relativen Häufigkeit festgestellt werden konnte. Fabre et al. (2011) stellten ebenfalls eine abnehmende Häufigkeit von *S. sapinea* (Kolonisierung von Kiefernzapfen) mit zunehmender Höhe fest. Als Grund sehen die Forscher mildere Wintertemperaturen in tiefer gelegenen Regionen. Jedoch unterscheiden sich die untersuchten Höhen der Standorte: in der vorliegenden Studie wurden Standorte zwischen ~20-600 m über NN untersucht, die Forschergruppe Fabre et al. (2007) untersuchte hingegen Standorte bis ~1500 m über NN.

Maresi et al. (2007) hingegen haben eine Erklärung für das unterschiedliche endophytische Vorkommen von *S. sapinea* in ihren Untersuchungen aufgezeigt: sie haben den Zusammenhang zwischen Sonneneinstrahlung, ausgedrückt durch den NII (Normalized Insolation index) und dem endophytischen Vorkommen von *S. sapinea*

erörtert. Dazu untersuchten sie an 9 Standorten (8 davon mit Symptomen des *Diplodia*-Triebsterbens) Zweigteile ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens von 27 Schwarzkiefern (*P. nigra*). Insgesamt wurden 1080 Kiefertriebsegmente untersucht, in 166 (15 %) Triebsegmenten konnte *S. sapinea* im Labor endophytisch isoliert werden. Wie stark die untersuchten Bestände mit dem *Diplodia*-Triebsterben belastet waren, geht aus ihrer Veröffentlichung nicht hervor. Ihre Untersuchungen zeigten, dass der NLI positiv mit der Häufigkeit des endophytischen Auftretens von *S. sapinea* an Schwarzkiefer korreliert war (Maresi et al. 2007). Der Normalized Insolation index gibt die Menge an Hitze an, die einen Standort im Jahr belastet und zeigt damit stressige Umweltbedingungen (Wasserstress) für die Kiefern an. Wäre diese Annahme zutreffend, wäre zu erwarten gewesen, dass in Hessen und Baden-Württemberg *S. sapinea* mit einer höheren relativen Häufigkeit auftreten würde. Jedoch zeigte sich, dass *S. sapinea* in Sachsen-Anhalt mit der höchsten relativen Häufigkeit (32 %) isoliert werden konnte und *S. sapinea* in Baden-Württemberg hingegen nur mit 18 % relativer Häufigkeit auftrat.

4.4 Untersuchungen zu ausgewählten Endophyten

4.4.1 Temperaturversuche

Für die vier untersuchten *S. sapinea*-Kulturen ergab sich ein Wuchsoptimum auf MYP-Nährmedium bei ca. 26 °C. Dabei war kein Unterschied zwischen den Stämmen aus dem erkrankten (NW-FVA 2740) und dem gesunden (NW-FVA 2703 und 2715) Kieferntrieben hinsichtlich des Temperaturoptimums zu erkennen (Abbildung 54). Auch unterschieden sich die Isolate nicht hinsichtlich des Temperaturoptimums nach ihrer geographischen Herkunft: Thüringen, Hessen oder Baden-Württemberg. Bei ca. 0 °C war kein Wachstum der Pilzstämmen mehr zu erkennen, bei 35 °C hingegen zeigte *S. sapinea* noch physiologische Aktivität auf dem MYP-Medium. Versuche anderer Forschergruppen zum Temperaturoptimum von *S. sapinea* zeigten *in vitro* ähnliche Ergebnisse: für Nordamerika 24 - 30 °C und für Europa 25 - 30 °C (Brookhouser 1971: USA, 24-28 °C; Keen und Smits 1989: diverse Herkünfte, 27-30 °C; Palmer et al. 1987: USA, 25 °C; Milijašević 2006: Serbien, 25-28 °C; Schumacher 2012: Deutschland, 25-30 °C).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Wachstumsgeschwindigkeiten von 23 mm / Tag bei einer Temperatur von 26 °C und bei 30 °C von 17 mm pro Tag ermittelt. Bei 30 °C Inkubation zeigten die *S. sapinea*-Isolate in der Forschungsarbeit von Schumacher (2012) durchschnittlich 25 mm pro Tag Wachstum, das ist eine etwas höhere Wachstumsgeschwindigkeit als bei den hier getesteten Pilzstämmen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *S. sapinea*-Kulturen zeigten bei 35 °C nur einen dünnen Flaum aus Myzel am Inokulum, bei Schumacher (2012) hingegen erzielten die *S. sapinea*-Isolate bei 35 °C noch 16 mm Wachstum pro Tag. Schumacher (2012) untersuchte im Rahmen seiner Arbeit sechs verschiedene *S. sapinea*-Stämme von an *Diplodia*-Triebsterben erkrankten *P. sylvestris* und *P. nigra*, die ebenfalls aus Deutschland stammten (Sachsen-Anhalt). *S. sapinea* zeigte dort ein Wuchsoptimum auf 2 %-MEA-Medium zwischen 25-30 °C.

Man kann annehmen, dass das Nährmedium einen Einfluss auf die Wuchsgeschwindigkeit von *S. sapinea*-Isolaten hat und sogar auf die Grenzen der physiologischen Aktivität. Diese Annahme bestätigt sich auch durch Untersuchungen von Milijašević (2006). Er untersuchte 11 verschiedene *S. sapinea*-Isolate aus Serbien und Montenegro von 6 *Pinus*-Arten auf ihr Temperaturoptimum auf einem PDA und MEA-Nährmedium. Die Pilzstämmen zeigten auf PDA-Medium zwischen 4 und 40 °C physiologische Aktivität. Auf MEA-Medium hingegen nur zwischen 10 und 35 °C. Das Temperaturoptimum beschreibt Milijašević (2006) bei 28 °C, wobei die untersuchten Stämme ein sehr ähnliches Koloniewachstum auch bei 25 °C aufwiesen. Keen und Smits (1989) haben 27 verschiedene *S. sapinea*-Isolate aus den Niederlanden und sechs anderen Ländern (nicht angegeben) untersucht, die Isolate wurden auf PDA-Medium bei Temperaturen zwischen -2 bis 45 °C getestet. Sie ermittelten T_{min} bei 4 °C und T_{max} bei 40 °C. Das Temperaturoptimum (T_{opt}) ermittelten sie zwischen 26,9 bis 30,4 °C. Palmer et al. (1987) untersuchten verschiedene *S. sapinea*-Stämme aus dem Norden der USA, die aus erkrankten *Pinus*-Arten isoliert wurden, auf ihr Temperaturoptimum hin. Auf PDA-Medium wurden Temperaturen zwischen 5 und 30 °C getestet. Bei 5 und 10 °C zeigten die Isolate kein Wachstum, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit getesteten *S. sapinea*-Stämmen. Das Wuchsoptimum lag bei 25 °C. Brookhouser (1971) hat das Wachstum des Keimschlauchs und die Keimungsraten von Konidien von *S. sapinea*, die aus Nebraska stammten, untersucht. Die Temperaturen lagen zwischen 12 und 36 °C. Die Keimungsrate war am höchsten bei 24 °C, das Wachstum des Keimschlauches am größten bei 28 °C.

Insgesamt bestätigen die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit und die zahlreichen Versuche zum Temperaturoptimum von *S. sapinea in vitro* anderer AutorInnen aus verschiedenen Regionen der Welt, dass *S. sapinea* ein wärmeliebender Pilz ist. Die ermittelten Optimaltemperaturen für das Kulturwachstum *in vitro* herrschen in Deutschland jedoch nur an wenigen Tagen. Als thermophil kann *S. sapinea* nach der Definition von Cooney und Emerson (1964) jedoch nicht eingestuft werden, da diese Autoren für thermophile Pilze eine Minimal-Temperatur für ein Wachstum bei / über 20 °C annehmen und eine Maximal-Temperatur bei / über 50 °C definieren.

Bei den anderen drei, hinsichtlich des Wachstumsfaktors Temperatur untersuchten Pilzarten (*S. polyspora* (OTU1), *M. olivacea* (OTU2), *Truncatella conorum-piceae* (OTU11)), die endophytisch aus Kieferntrieben gewonnen wurden, zeigte sich, dass *S. polyspora* und *T. conorum-piceae* ein optimales Myzel-Wachstum *in vitro* bei ca. 20 °C aufwiesen. *M. olivacea* hingegen wuchs zwischen 8 und 12 °C am schnellsten. Dieses Wuchsverhalten zeigte sich auch *in vivo* bei der Untersuchung der Endophyten im Jahresverlauf: *M. olivacea* kam in den kalten Monaten häufiger vor, wobei das Auftreten von *S. polyspora* gegenläufig war. Bei *T. conorum-piceae* war im Jahresverlauf kein Muster zu erkennen, die relative Häufigkeit des Pilzes schwankte bei diesem Versuch zwischen 0 und 2 %. Bei ca. 0 °C zeigten *M. olivacea* und *T. conorum-piceae* noch physiologische Aktivität, *S. polyspora* hingegen nicht. Bei 35 °C zeigte im Gegensatz zu den *S. sapinea*-Isolaten keiner der drei Pilze physiologische Aktivität. Publierte Arbeiten anderer Forschergruppen zum Wuchsoptimum *in vitro* von *S. polyspora*, *M. olivacea* und *T. conorum-piceae* als Vergleich für die in dieser Arbeit gewonnen Daten sind derzeit nicht bekannt und sind somit hier erstmalig publiziert.

4.4.2 VC-Test

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte VC-Test mit *S. sapinea*-Stämmen, die aus einer erkrankten Kiefer von zwei verschiedenen Ästen isoliert wurden, ergab eine hohe genetische Diversität, die durch eine große Anzahl verschiedener VC-Gruppen angezeigt wird. Aus Ast 1 konnten 29 *S. sapinea*-Isolate gewonnen werden, die 24 VC-Gruppen zugeordnet wurden. Aus Ast 2 wurden 16 *S. sapinea*-Isolate gewonnen wurden, die in 14 VC-Gruppen eingeordnet werden konnten. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Bihon et al. (2011a). Sie haben in ihren Untersuchungen

herausgefunden, dass die genotypische Diversität von *S. sapinea*-Stämmen zwischen verschiedenen Bäumen und innerhalb eines Baumes groß ist. Weiterhin stellten sie fest, dass eine VC-Gruppe mehrere Mikrosatelliten Haplotypen aufweisen konnte, aber auch der umgekehrte Fall kam vor. Insgesamt erhielten sie von 5 Bäumen 44 *S. sapinea*-Isolate, die in 39 Mikrosatelliten-Haplotypen und 32 VC-Gruppen eingeteilt werden konnten (Bihon et al. 2011a). Smith (2001) wies 14 verschiedene VC-Gruppen für *Neofusicoccum* spp. an Eukalyptusblättern nach. Die vielen VC-Gruppen von *S. sapinea* lassen vermuten, dass die endophytische Kolonisierung der Kiefer nicht einmalig oder mehrfach durch den gleichen Stamm erfolgt, sondern mehrfach durch genetisch verschiedene Stämme. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben eine hohe Persistenz und Diversität von *S. sapinea* in Kiefernzweigen, dies lässt auch auf ein hohes Potential für pathogene Eigenschaften schließen (Stanosz et al. 1997; H. Smith et al. 2002; Bihon et al. 2011b). Diese hohe Pathogenität bestätigte sich auch in den untersuchten Beständen mit einer *Diplodia*-Triebsterben-Erkrankung und den zahlreichen Beratungsfällen der NW-FVA.

4.4.3 Potentielle Antagonisten

Es wurden 18 Arten unter den 89 Endophyten als potentielle Antagonisten ermittelt, das sind 20 % der hier isolierten Endophyten. Viele der hier untersuchten Endophyten (80 %) zeigten *in vitro* keine antagonistische Wirkung gegenüber *S. sapinea*, trotzdem wuchsen sie niemals mit *S. sapinea* aus dem gleichen Triebsegment aus. Das kann zum einen daran liegen, dass sie das Wachstum von *S. sapinea* nur im Zweig hemmen oder zum anderen, dass sie so selten vorkamen, dass ein gemeinsames Auswachsen vom gleichen Triebsegment unwahrscheinlich war.

Im Verlauf des Versuchs zur Hypheninteraktion von *S. sapinea* und potentiellen Antagonisten konnten bei der Kreuzung von *S. sapinea* mit *Chaetomium* sp. 2, *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., bzw. *Pezicula eucrita* die Veränderungen an den Hyphen von *S. sapinea*, die durch Tong-Kwee und Keng (1990) festgestellt wurden, nicht nachvollzogen werden (Hyphenspiralen, Bildung vergrößerter Hyphenspitzen und kurze Hakenhyphen, Vakuolisierung, Granulation und Koagulation des Zytoplasmas). Nicht beobachtet wurde ebenfalls ein Umklammern oder Eindringen des antagonistischen Pilzes in *S. sapinea*-Hyphen. Warum die Interaktionen, die Tong-

Kwee und Keng (1990) beschrieben haben, sich nicht beobachten ließen, konnte abschließend nicht geklärt werden.

Lediglich *Trichoderma* sp. (OTU71) und die Pilze der Gattung *Pezizula* (OTU110, 120, 123, 125; mit Ausnahme von *Pezizula cinnamomea* (OTU124)) zeigten bei den Versuchen in Dualkultur und im Zellophanversuch antagonistische Wirkung und wurden niemals aus dem gleichen Triebsegment mit *S. sapinea* isoliert.

Trichoderma sp. (OTU71) zeigte in der Dualkultur starke antagonistische Wirkung auf *S. sapinea*, indem er *S. sapinea* stark im Wachstum hemmte. Die Untersuchungsergebnisse des Zellophan-Versuchs lassen darauf schließen, dass *Trichoderma* sp. (OTU71) Stoffe, die durch das Zellophan hindurch in den Agar diffundieren, abgibt, die *S. sapinea* im Wachstum hemmen.

Ein vermindertes Wachstum auf Grund der vorangegangenen Inkubation und dem Nährstoffentzug des potentiellen Antagonisten ist unwahrscheinlich, da der potentielle Antagonist nur kurz inkubiert wurde und das verwendete MYP-Medium ein reiches Nährmedium ist. Das langsamere Wachstum von *S. sapinea* bei vorangegangener Inkubation mit Zellophan konnte auch nicht auf eine Devitalisierung oder Alterung des *S. Sapinea*-Stamms zurückgeführt werden, da alle Varianten (Inkubation von *S. sapinea* mit und ohne Zellophan bzw. mit antagonistischem Endophyt) zeitgleich durchgeführt wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde *Trichoderma* sp. mit einer geringen relativen Häufigkeit (< 0,1 %) nachgewiesen. Zudem trat der Pilz nur an 7 verschiedenen Standorten auf und wurde immer nur aus Kiefern ohne Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens isoliert (Lüderitz Schlaubetal, Brandenburg 02/07, Thüringen06, Dransfeld, Pfungstadt). Um welche Art der Gattung *Trichoderma* (*atroviride* oder *viride*) es sich bei OTU71 handelt, konnte nicht abschließend geklärt werden, da die DNA-Extraktion nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Auch in Untersuchungen von Botella und Diez (2011) wurde *T. viride* (dort als *viridae* bezeichnet) mit einer geringen Häufigkeit nur an 2 von 55 Standorten aus Zweigen bzw. Nadeln der Aleppo-Kiefer nachgewiesen. Im Gegensatz zu den geringen Isolierungsraten von *Trichoderma* sp. in der vorliegenden Arbeit, wurde in Untersuchungen von Zamora et al. (2008) *T. viride* häufig (relative Abundanz 27 % bzw. 53 %, Frühling bzw. Herbst) aus Zweigen von *P. sylvestris* isoliert. In Untersuchungen von Sanz-Ros et al. (2015) wurde *T. atroviride* mit einer relativen Abundanz von 16 % und *T. viride* mit einer relativen Abundanz von 3 % an Zweigen

der gemeinen Kiefer nachgewiesen. *T. harzianum* war zudem in dieser Studie mit einem langsamen Wachstum von *P. sylvestris* assoziiert (Sanz-Ros et al. 2015). Eine Art der Gattung *Trichoderma* (*T. atroviride*) wurde, wie auch in der vorliegenden Studie, schon als Antagonist gegenüber *S. sapinea* beschrieben (Santamaría et al. 2012, Regliński et al. 2012). Santamaría et al. (2012) führten Untersuchungen zum antagonistischen Verhalten von vier endophytischen Pilzen gegenüber *Diplodia scrobiculata* und *S. sapinea* durch. Dazu untersuchten sie den Einfluss der Endophyten auf die Sporenkeimung der beiden Pathogene und ihren Einfluss bei der Inokulierung von *S. sapinea* auf *P. banksiana*. Dabei zeigte sich *T. atroviride* als Antagonist gegenüber *S. sapinea*. Santamaría et al. (2012) stuften *T. atroviride* als Hyperparasit ein, der verhindert, dass *S. sapinea* Läsionen ausbilden kann. Die Forscher vermuten jedoch, dass eine Antibiose vorliegt, da *T. atroviride* auch die Sporenkeimung vermindert (Santamaría et al. 2012). Einen Einfluss von *Trichoderma* auf *S. sapinea* konnten ebenfalls Regliński et al. (2012) nachweisen. Es zeigte sich, dass *P. radiata*-Sämlinge nach der Inokulierung mit *T. atroviride* um 20 % weniger Symptome des *Diplodia*-Triebsterbens im Vergleich zu unbehandelten Kiefernensämlingen aufwiesen. Zudem zeigte sich an diesen Pflanzen eine erhöhte Biomasseproduktion der Wurzeln und zusätzlich wiesen sie einen erhöhten Stamm-Umfang auf (Regliński et al. 2012). Ferner wurden verschiedene Arten aus der Gattung *Trichoderma* schon von zahlreichen Autoren als Antagonisten gegenüber anderen Pilzen beschrieben (Carisse et al. 2000; Martínez-Medina et al. 2014; Romeralo et al. 2015a; Busby et al. 2016; Larran et al. 2016).

Die Arten der Gattung ***Pezicula*** hemmten *S. sapinea* in Dualkultur kontaktlos. Bei der Hypheninteraktion *in vitro* zeigten sich in der Dualkultur nur bei der paarweisen Anordnung von *S. sapinea* und *P. neosporulosa* (OTU123) veränderte Hyphen von *S. sapinea*. Auch reduzierten die *Pezicula*-Arten (OTU110 und 123) im Zellophanversuch das Wachstum von *S. sapinea* stark. Es ist bekannt, dass Pilze aus der Gattung *Pezicula* eine Reihe von Antibiotika produzieren können (Verkley 1999).

Chaetomium sp. 2 (OTU46) wurde von fünf Standorten (Pfungstadt, Lüderitz, Schlaubetal, BY04, Prezelle) mit einer relativen Häufigkeit < 0,1 % aus den untersuchten Kiefernzweigen isoliert. Antagonistisches Verhalten gegenüber Pilzen ist von Arten der Gattung *Chaetomium* aus verschiedenen Studien bekannt (Perelló et al. 2002; Busby et al. 2016; Larran et al. 2016). *Chaetomium* sp. 2 zeigte in den

durchgeführten Dualkulturentests (Kapitel 3.3.3) antagonistisches Verhalten gegenüber *S. sapinea*, wohingegen andere isolierte Endophyten der Gattung *Chaetomium* (OTU6 und 37) dieses nicht erkennen ließen. Der Zellophan-Versuch (Kapitel 3.3.5) zeigte deutlich, dass *Chaetomium* sp. 2 vermutlich hemmende Stoffe in den Agar abgibt, die das Wachstum von *S. sapinea* auf dem MYP-Medium hemmen.

Fusarium sp. (OTU29) wurde mit einer relativen Häufigkeit von 0,5 % in den untersuchten Triebsegmenten auf 25 verschiedenen Standorten nachgewiesen. OTU29 beeinflusste in den durchgeführten Antagonistentest (paarweise Anordnung in Dualkulturen) das Wachstum von *S. sapinea* in geringem Maße negativ. Dabei ist der Antagonismus von Arten der Gattung *Fusarium* gegenüber pilzlichen Pathogenen aus verschiedenen Studien bekannt (Arnold et al. 2003; Lee et al. 2009; Larran et al. 2016). Antagonistisches Verhalten gegenüber Pilzen ist von Arten der Gattung ***Penicillium*** ebenfalls in der Literatur beschrieben (Busby et al. 2016; Larran et al. 2016). *Penicillium* sp. (OTU116) zeigte in den Antagonistentests *in vitro* jedoch kein hemmendes Verhalten gegenüber *S. sapinea*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antagonisten gesucht, die *in vitro* eine direkte Wirkung auf das Wachstum von *S. sapinea* hatten. Diese Methode ist üblich, um die Effektivität eines Endophyten gegenüber einem Pathogen zu überprüfen (Santamaría et al. 2012). Gao et al. (2010) teilt die Wirkungsweise von Endophyten gegenüber Pathogenen in drei Gruppen ein: 1) direkte (Endophyt wirkt auf Pathogen ein), 2) indirekte (Endophyt stärkt Pflanzenabwehr) und 3) ökologische Effekte (Endophyt nimmt ökologische Nische des Pathogens ein). Adams (1990) beschreibt die drei Wirkmechanismen bei Mykoparasiten als Konkurrenz, Antibiose und Hyperparasitismus.

Auch andere Forschungsarbeiten haben Endophyten schon als potentielle Antagonisten beschrieben. So zeigten Romeralo et al. (2015a), dass vier endophytisch vorkommende Pilze (*Trichoderma viride*, *Aureobasidium pullulans*, *Aureobasidium* sp. und ein unbestimmter Endophyt 20.1) im Gewächshausversuch die Nekrosenlänge, die durch *Gremmeniella abietina* bei *P. halepensis*-Sämlingen verursacht wurden, reduzieren konnten.

Obwohl sich in Dualkulturen von *S. sapinea* mit *Chaetomium* sp. 2 bzw. *Alternaria* sp. eine kontaktlose Hemmung von *S. sapinea* zeigte und sich ebenfalls im Zellophan-Versuch kein Wachstum von *S. sapinea* feststellen ließ, wurden *Chaetomium* sp. 2

bzw. *Alternaria* sp. (OTU46 / 81) trotzdem aus demselben Triebsegment isoliert. Dieses Vorkommen verdeutlicht, dass antagonistisches Verhalten von Endophyten, das sich *in vitro* zeigt, sich in der Pflanze anders darstellen kann. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in Versuchen zum Ulmensterben von Martín et al. (2015). Die Forscher isolierten 7 Endophyten (*Aureobasidium pullulans*, *Alternaria tenuissima*, *Fusarium* sp., *Monographella nivalis*, *Neofusicoccum luteum*, *Penicillium crustosum*, *Sordaria* sp.) aus *Ulmus minor* MILL., von denen sechs antagonistisches Verhalten in Dualkulturen gegenüber *Ophiostoma novo-ulmi* BRASIER aufwiesen. Dann wurden vier dieser Pilze *in vivo* einem Antagonistentest unterzogen. Es zeigte sich jedoch, dass sich in der Pflanze die antagonistische Wirkung nicht über den gesamten Zeitraum nachweisen ließ (Martín et al. 2015). Deshalb unterstreichen Busby et al. (2015) die Wichtigkeit, antagonistisches Verhalten, das *in vitro* festgestellt wurde, auch in Pflanzen zu überprüfen. Die Durchführung dieses Schrittes war im Rahmen der Arbeit nicht geplant.

Weiterhin kann es zu Unterschieden bei den Ergebnissen zwischen *in vitro*, *in vivo* unter kontrollierten Bedingungen und unter Feldbedingungen kommen. Deshalb wäre es in der Zukunft sinnvoll, zuerst Gewächshausversuche und später eventuell Versuche im Freiland mit *S. sapinea* infizierten Kiefern und den potentiellen Antagonisten durchzuführen. Diese Einschätzung wird auch durch Versuche von Stadler und Tiedemann (2014) bestätigt. Sie untersuchten das antagonistische Potential des Mykoparasiten *Microsphaeropsis ochracea* gegenüber *Verticillium longisporum*. Der bodenbürtige Pilz *V. longisporum* verursacht insbesondere Schäden an Raps (*Brassica napus* L.) -Kulturen. *M. ochracea* zeigte sich *in vitro* als Antagonist gegenüber *V. longisporum*, indem er eine hohe Mortalität der Mikrosklerotien von *V. longisporum* verursachte (Stadler und Tiedemann 2014). Unter kontrollierten Laborbedingungen (sterilem Sand) zeigte sich dieses Verhalten auch bei Rapspflanzen *in vivo*. Jedoch wurde die Wirkung von *M. ochracea* auf *V. longisporum* bei unsterilem Boden unter Laborbedingungen nicht mehr beobachtet. In einem zwei Jahre dauernden Freilandversuch konnte die antagonistische Wirkung von *M. ochracea* durch die fungistatische Wirkung des Bodens ebenfalls nicht beobachtet werden (Stadler und Tiedemann 2014).

4.5 Ausblick

Grundsätzlich gilt das latente Vorkommen von Pathogenen als Erklärung für schnelles oder plötzliches Absterben von Bäumen (Stanosz et al. 2001). Dies wurde von zahlreichen AutorInnen bei anderen pilzlichen Erkrankungen bestätigt (Sinclair 1991; Williamson 1994; Stanosz et al. 2001; Delaye et al. 2013). Um Absterbeprozesse, an denen *S. sapinea* beteiligt ist, besser verstehen zu können, bräuchte es ein klares und experimentell gestütztes Modell der Wirt-Pathogen Interaktion, das Erkenntnisse über Latenzzeit und die auslösenden Faktoren für einen Übergang von der endophytischen in die parasitische Phase von *S. sapinea* enthält. Auslösende Faktoren, die es *S. sapinea* ermöglichen, von einer latenten Lebensweise in eine pathogene überzugehen, sollten weitergehend untersucht und im Experiment überprüft werden. Dabei wird von Ghelardini et al. (2016) darauf hingewiesen, dass es „besonders problematisch“ sein wird, Faktoren, die eine Veränderung der Pathogenität des Endophyten bewirken, herauszufinden.

Aus den vorgestellten Untersuchungsergebnissen lässt sich jedoch schließen, dass im Zuge des Klimawandels mit einem erhöhten Schadvorkommen von *S. sapinea* zu rechnen ist, da Extremwetterereignisse wie z. B. Hagel zunehmen können (Jentsch et al. 2007). Die Vitalität der Kiefer kann durch die prognostizierten trockeneren Sommer herabgesetzt werden und sie so anfälliger für einen Befall mit *S. sapinea* machen. Die Forschergruppe um Fabre et al. (2011) fand durch ihre Untersuchungen in Frankreich heraus, dass *S. sapinea* von der vergangenen Klimaänderung (seit 15 Jahren) profitiert hat. Sie gehen aber davon aus, dass der kommende angenommene Klimawandel (IPCC2001 B2 Szenario) in den nächsten 40 Jahren das Vorkommen von *S. sapinea* nicht weiter fördern wird. Hingegen könnte *S. sapinea* von der zunehmenden Trockenheit profitieren, die ihre Wirte schwächt. Deshalb ist es, laut Fabre et al. (2011) für eine Prognose zum Ausbruch der Erkrankung wichtig, insbesondere indirekte Faktoren wie die Wasserversorgung und die Vitalität des Wirtes in der Pilz-Wirt Interaktion zu berücksichtigen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Auftreten des *Diplodia*-Triebsterbens der Kiefer (Erreger: *Sphaeropsis sapinea*) entlang eines Transekts von Nordost- nach Südwestdeutschland durch klimasensible Räume untersucht. Dazu wurden systematische Beprobungen entlang eines Transekts vorgenommen und weitere 12 Kiefernbestände intensiv untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass dem Auftreten des *Diplodia*-Triebsterbens in der Regel eine Devitalisierung der Kiefer voraus geht. Auslösende Faktoren können nach derzeitiger Einschätzung sein: Wasserdefizite durch Trockenheit / Hitze oder Verletzungen der Triebe z. B. durch Hagelschlag. Ein prädisponierender Faktor kann Mistelbefall sein, der Wasserstress auslöst. Wasserstress kann auch auf flachgründigen, süd-exponierten Standorten oder Kuppenlagen entstehen. Zahlreiche Schadensfälle stehen mit Wurzelfäulen, insbesondere durch den Wurzelschwamm, in Verbindung, der ebenfalls als prädisponierender Faktor in Erscheinung tritt.

Bei der durchgeführten Isolation von Endophyten aus Zweigen von *Pinus sylvestris* wurden 90 verschiedene Pilzarten isoliert, morphologisch charakterisiert und DNS-gestützt bestimmt. 88 der isolierten Arten waren Ascomyceten, nur zwei Arten ließen sich den Basidiomyceten zuordnen. Vier Arten wurden mit einer relativen Häufigkeit von > 10 % isoliert (*S. sapinea*, *Sydowia polyspora*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Truncatella conorum-piceae*) und fünf Arten mit einer relativen Häufigkeit von > 5 % (zusätzlich zu den genannten vier Arten: *Sordaria fimicola*). Alle anderen Arten kamen seltener vor. Aus den Kiefernzweigen vitaler Kiefern konnten deutlich mehr Endophyten nachgewiesen werden. Ob, die auf künstlichem Medium durchgeführte Isolation von Pilzen in Gänze die natürliche endophytische Besiedlung der Kieferntriebe widerspiegelt ist fraglich. Woran die geringe Isolierungsquote von Basidiomyceten im Rahmen der vorliegenden Arbeit liegt, ließ sich nicht eindeutig feststellen.

Es wurden 26 Arten isoliert, die erstmals aus Zweigen der Kiefer isoliert wurden. Die verwendete Isolationsmethode wurde hinsichtlich der Einflussfaktoren wie z. B. Oberflächensterilisierung und Größe der untersuchten Triebsegmente optimiert. Bei dem Versuch zur Lokalisierung der Endophyten im Kiefernast zeigte sich, dass zwar im Kambialbereich und im Holz Endophyten nachgewiesen, jedoch die meisten Pilzarten in der Rinde isoliert wurden. Zwei Arten, *Sydowia polyspora* und *Microsphaeropsis olivacea*, zeigten klare jahreszeitliche Unterschiede ihrer Abundanz.

In vitro wurden die Endophyten auf ihr antagonistisches Potential gegenüber *S. sapinea* getestet. Es zeigte sich, dass sechs der getesteten Endophyten *S. sapinea* kontaktlos hemmen konnten. Unter den Endophyten fanden sich viele saprophytisch lebende Arten wie z. B. *Peniophora pini* und typische Laubholzbesiedler der Gattung *Hypoxylon*, *Daldinia* und *Biscogniauxia*. Potentielle Pathogene für holzige Pflanzen wurden ebenfalls isoliert wie z. B. *Sphaeropsis sapinea*, *Sydowia polyspora*, *Truncatella conorum-piceae*. Bei den vorgenommenen Isolationen entlang des Transekts aus grünen Zweigen der Kiefer wurden keine Quarantäne-Schaderreger nachgewiesen.

6. Literatur

- Adams, P. B. (1990). The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 28, 59–72.
- Adamson, K., Klavina, D., Drenkhan, R., Gaitnieks, T., & Hanso, M. (2015). *Diplodia sapinea* is colonizing the native Scots pine (*Pinus sylvestris*) in the northern Baltics. *European Journal of Plant Pathology*, 143(2), 343–350.
- Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D., Hogg, E. H., Gonzales, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J-H., Allard, G., Running, S. W., Semerci, A. & Cobb, N. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, 259(4), 660–684.
- Allen, T. R., Millar, T., Berch, S. M., & Berbee, M. L. (2003). Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist*, 160(1), 255–272.
- Alonso, R., Tiscornia, S., & Bettucci, L. (2011). Fungal endophytes of needles and twigs from *Pinus taeda* and *Pinus elliotti* in Uruguay. *Sydowia*, 63(2), 141–153.
- Amoroso, M. M., Daniels, L. D., & Larson, B. C. (2012). Temporal patterns of radial growth in declining *Austrocedrus chilensis* forests in Northern Patagonia: The use of tree-rings as an indicator of forest decline. *Forest Ecology and Management*, 265, 62–70.
- Anagnostakis, S. L. (1988). *Cryphonectria Parasitica*, Cause of Chestnut Blight. In G. S. Sidhu (Hrsg.), *Advances in Plant Pathology* (Bd. 6, S. 123–136). Academic Press.
- Andrew, M., Barua, R., Short, S. M., & Kohn, L. M. (2012). Evidence for a Common Toolbox Based on Necrotrophy in a Fungal Lineage Spanning Necrotrophs, Biotrophs, Endophytes, Host Generalists and Specialists. *PLoS ONE*, 7(1), e29943.
- Arenal, F., Platas, G., & Pelaez, F. (2007). A new endophytic species of *Preussia* (*Sporormiaceae*) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis. *Fungal Diversity*, 25, 1–17.
- Arevalo, J., Hidalgo-Díaz, L., Martins, I., Souza, J. F., Castro, J. M. C., Carneiro, R. M. D., & Tigano, M. S. (2009). Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 158–163.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 51–66.
- Arnold, A. E., Henk, D. A., Eells, R. L., Lutzoni, F., & Vilgalys, R. (2007). Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99(2), 185–206.
- Arnold, A. E., & Herre, E. A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (*Malvaceae*). *Mycologia*, 95(3), 388–398.
- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and Host Range of Foliar Fungal Endophytes: Are Tropical Leaves Biodiversity Hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology letters*, 3(4), 267–274.

- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649–15654.
- Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Higgins, K. L., Sarvate, S. D., Gugger, P., Way, A., Hofstetter, V., Kauff, F., Lutzoni, F. (2009). A Phylogenetic Estimation of Trophic Transition Networks for Ascomycetous Fungi: Are Lichens Cradles of Symbiotrophic Fungal Diversification? *Systematic Biology*, 58(3), 283–297.
- Arx, J. A. von. (1975). On *Thielavia* and some similar genera of ascomycetes. *Studies in Mycology*, 8, 1–31.
- Arx, J. A. von. (1981). *The genera of fungi sporulating in pure culture*. (3. Aufl.). 424 Seiten. Vaduz: J. Cramer.
- Aveskamp, M. M., Gruyter de, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1–60.
- Bachi, P. R., & Peterson, J. L. (1985). Enhancement of *Sphaeropsis sapinea* stem invasion of pines by water deficits. *Plant Disease*, 69(9), 798–799.
- Balasuriya, A., & Adikaram, N. K. B. (2009). Some spatial, temporal and spatio-temporal considerations of wood decay of tea (*Camellia sinensis*), caused by *Nemania diffusa* (Syn. *Hypoxylon vestitum*). *Crop Protection*, 28(3), 273–279.
- Barklund, P., & Kowalski, T. (1996). Endophytic fungi in branches of Norway spruce with particular reference to *Tryblidiopsis pinastri*. *Canadian Journal of Botany*, 74(5), 673–678.
- Barnard, E. L., Blakeslee, G. M., English, J. T., Oak, S. W., & Anderson, R. L. (1985). Pathogenic fungi associated with sand pine root disease in Florida. *Plant Disease*, 69(3), 196–199.
- Bary, A. de. (1866). *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. 316 Seiten. Leipzig: W. Engelmann.
- Bayman, P., Angulo-Sandoval, P., Báez-Ocrtiz, Z., & Lodge, D. J. (1998). Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycological Research*, 102(8), 944–948.
- Beermann, C. (2011). GIS-gestützte Darstellung von *Heterobasidion annosum* s. l. im Forstamt Südostheide (Bezirksförsterei Isetal, Wittingen). *Examensarbeit (Fachgebiet Ökologie der Universität Kassel)*, 1–82.
- Begoude, B. A. D., Slippers, B., Wingfield, M. J., & Roux, J. (2011). The pathogenic potential of endophytic *Botryosphaeriaceae* fungi on *Terminalia* species in Cameroon. *Forest Pathology*, 41(4), 281–292.
- Bell, A., & Mahoney, D. P. (1997). Coprophilous Fungi in New Zealand. II. *Podospora* Species with Coriaceous Perithecia. *Mycologia*, 89(6), 908–915.
- Bernicchia, A., & Gorjón, S. P. (2010). *Fungi Europaei - Corticiaceae s.l.* Band 12. 1008 Seiten. Alassio : Candusso
- BfN. (2016). Verbreitungskarten der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. <http://www.floraweb.de/webkarten/karte.html?taxnr=6411>. Zugegriffen: 10. März 2016
- Bigler, C., Bräker, O. U., Bugmann, H., Dobbertin, M., & Rigling, A. (2006). Drought as an Inciting Mortality Factor in Scots Pine Stands of the Valais, Switzerland. *Ecosystems*, 9(3), 330–343.
- Bihon, W., Burgess, T. I., Slippers, B., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2011a). Distribution of *Diplodia pinea* and its genotypic diversity within asymptomatic *Pinus patula* trees. *Australasian Plant Pathology*, 40(5), 540–548.

- Bihon, W., Burgess, T. I., Slippers, B., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2011b). High levels of genetic diversity and cryptic recombination is widespread in introduced *Diplodia pinea* populations. *Australasian Plant Pathology*, 41(1), 41–46.
- Bihon, W., Slippers, B., Burgess, T. I., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2012). Diverse sources of infection and cryptic recombination revealed in South African *Diplodia pinea* populations. *Fungal Biology*, 116(1), 112–120.
- Bihon, W., Wingfield, M. J., Slippers, B., Duong, T. A., & Wingfield, B. D. (2014). MAT gene idiomorphs suggest a heterothallic sexual cycle in a predominantly asexual and important pine pathogen. *Fungal Genetics and Biology*, 62, 55–61.
- Bills, G. F., & Polishook, J. D. (1991). Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany*, 69(7), 1477–1482.
- Bissegger, M., & Sieber, T. (1994). Assemblage of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*, *Mycologia* 86: 648-655.
- Blodgett, J. T., Bonello, P., & Stanosz, G. R. (2003). An effective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea* from asymptomatic pines. *Forest Pathology*, 33(6), 395–404.
- Blodgett, J. T., Kruger, E. L., & Stanosz, G. R. (1997). Effects of moderate water stress on disease development by *Sphaeropsis sapinea* on red pine. *Phytopathology*, 87(4), 422–428.
- Boerema, G. H., & Dorenbosch, M. M. J. (1973). The *Phoma* and *Ascochyta* species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit-rotting. *Studies in Mycology*, 3, 1–50.
- Bonello, P., Capretti, P., Luchi, N., Martini, V., & Michelozzi, M. (2008). Systemic effects of *Heterobasidion annosum* s.s. infection on severity of *Diplodia pinea* tip blight and terpenoid metabolism in Italian stone pine (*Pinus pinea*). *Tree physiology*, 28(11), 1653–1660.
- Botella, L., & Diez, J. J. (2011). Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*, 47(1), 9–18.
- Botella, L., Santamaría, O., & Diez, J. J. (2010). Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Diversity*, 40(1), 1–11.
- Brady, B. L. K. (1979). *Beauveria bassiana*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(602).
- Brancato, F. P., & Golding, N. S. (1953). The Diameter of the Mold Colony as a Reliable Measure of Growth. *Mycologia*, 45(6), 848–864.
- Bräsicke, N., & Hommes, M. (2013). Die Waldschutzsituation 2012 in der Bundesrepublik Deutschland. *Journal für Kulturpflanzen*, 65(4), 129–140.
- Breitenbach, J., & Kränzlin, F. (1984). *Pilze Der Schweiz. Band 1: Ascomyceten*. 313 Seiten. Luzern: Verlag Mykologia.
- Brener, W. D., Setliff, E. C., & Norgren, R. L. (1974). *Sclerophoma phythiophila* associated with a tip dieback of ju niper in Wisconsin. *Plant disease reporter*, 58, 653–657.
- Bridge, P. D., Roberts, P. J., Spooner, B. M., & Panchal, G. (2003). On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist*, 160(1), 43–48.
- Brookhouser, L. W., & Peterson, G. (1971). Infection of Austrian, Scots, and Ponderosa Pines by *Diplodia pinea*. *Phytopathology*, 61(4), 409.
- Brown, K. R. (1999). Mineral nutrition and fertilization of deciduous broadleaved tree species in British Columbia. *Working Paper Ministry of Forests Research Program, British Columbia*, 42, 8–52.

- Burgess, T. I., Bihon, W., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2009). A simple and rapid method to determine vegetative compatibility groups in fungi. *Inoculum: Newsletter of the Mycological Society of America*, 60(6), 1–2.
- Burgess, T. I., Gordon, T. R., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2004a). Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. *Mycological Research*, 108(12), 1399–1406.
- Burgess, T. I., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2004b). Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers. *Australasian Plant Pathology*, 33(4), 513–519.
- Busby, P. E., Peay, K. G., & Newcombe, G. (2016). Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify *Melampsora* rust disease severity. *The New Phytologist*, 209(4), 1681–1692.
- Busby, P. E., Ridout, M., & Newcombe, G. (2015). Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 645–655.
- Butin, H. (2011). *Krankheiten der Wald- und Parkbäume: Diagnose, Biologie, Bekämpfung* (4. Aufl.). 319 Seiten. Stuttgart (Hohenheim): Verlag Eugen Ulmer.
- Butin, H., & Reuss, H. (1959). Eine auffallende Erkrankung von Kiefernalthölzern, *AFZ-Der Wald*(14), 665–668.
- CABI. (2014). *Sphaeropsis sapinea* (*Sphaeropsis* blight). *Invasive Species Compendium*. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/19160>. Zugegriffen: 11. Juni 2015
- CABI. (2016). *Bursaphelenchus xylophilus* (pine wilt nematode). *Invasive Species Compendium Datasheets, maps, images, abstracts and full text on invasive species of the world*. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/10448>. Zugegriffen: 2. November 2016
- Cannon, P. F., & Simmons, C. M. (2002). Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*, 94(2), 210–220.
- Cantrell, S. A., & Lodge, D. J. (2001). *Hygrophoraceae* (*Agaricales*) of the Greater Antilles: *Hygrocybe* subgenus *Pseudohygrocybe* section *Firmae*. *Mycological Research*, 105(2), 215–224.
- Carisse, O., Pillion, V., Rolland, D., & Bernier, J. (2000). Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 90(1), 31–37.
- Carroll, F. E., Muller, E., & Sutton, B. C. (1977). Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia*, 29, 87–103.
- Carroll, G. C. (1986). Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In N. J. Fokkema & J. Heuvel van den (Hrsg.), *Microbiology of the phyllosphere* (S. 205–222). Cambridge: Cambridge University Press.
- Carroll, G. C. (1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, 69(1), 2–9.
- Carroll, G. C. (1995). Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1316–1324.
- Carroll, G. C., & Carroll, F. E. (1978). Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany*, 56(24), 3034–3043.
- Cech, T., & Perny, B. (2000). Kiefersterben in Tirol. *Forstschutz Aktuell*, 22, 12–15.
- Chang, J.-H., & Wang, Y.-Z. (2005). The genus *Cercophora* (*Lasiosphaeriaceae*) in Taiwan. *Fungal Science*, 20(1&2), 19–25.

- Chang, T. H., Chang, S. W., & Jung, G. H. (2011). Response of Bentgrass Cultivars to *Microdochium nivale* Isolates Collected from Golf Courses. *The Plant Pathology Journal*, 27(3), 232–241.
- Chao, A. (1987). Estimating the Population Size for Capture-Recapture Data with Unequal Catchability. *Biometrics*, 43(4), 783–791.
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., & Shen, T.-J. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*, 8(2), 148–159.
- Chapela, I. H., & Boddy, L. (1988). Fungal colonization of attached beech branches. *New Phytologist*, 110(1), 47–57.
- Chen, C., Verkley, G. J. M., Sun, G., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezizula*, and related genera. *Fungal Biology*, 120(1), 1291–1322.
- Chesters, C. G. C., & Greenhalgh, G. N. (1964). *Geniculosporium serpens* gen. et sp.nov., the imperfect state of *Hypoxyylon serpens*. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(3), 393–401.
- Chiu, C.-H., Wang, Y.-T., Walther, B. A., & Chao, A. (2014). An improved nonparametric lower bound of species richness via a modified good-turing frequency formula. *Biometrics*, 70(3), 671–682.
- Chou, C. K. S. (1976). A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*. 1. Symptoms, disease development, and isolation of pathogen. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 6(1), 72–79.
- Chou, C. K. S. (1978). Penetration of young stems of *Pinus radiata* by *Diplodia pinea*. *Physiological Plant Pathology*, 13(2), 189–192.
- Chou, C. K. S. (1987). Crown wilt of *Pinus radiata* associated with *Diplodia pinea* infection of woody stems. *European Journal of Forest Pathology*, 17(7), 398–411.
- Cohen, W. B., Yang, Z., Stehman, S. V., Schroeder, T. A., Bell, D. M., Masek, J. G., Huang, C. & Meigs, G. W. (2016). Forest disturbance across the conterminous United States from 1985–2012: The emerging dominance of forest decline. *Forest Ecology and Management*, 360, 242–252.
- Collado, J., Platas, G., González, I., & Peláez, F. (1999). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist*, 144(3), 525–532.
- Collado, Javier, Platas, G., Paulus, B., & Bills, G. F. (2007). High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS microbiology ecology*, 60(3), 521–533.
- Collado, Javier, Platas, G., & Peláez, F. (2001). Identification of an Endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in Central Spain as the Anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA Sequence Analysis and Effect of Different Ecological Factors on Distribution of the Fungus. *Mycologia*, 93(5), 875–886.
- Colwell, R. K., & Coddington, J. A. (1994). Estimating Terrestrial Biodiversity through Extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 345(1311), 101–118.
- Cooney, D. G., & Emerson, R. (1964). *Thermophilic fungi. An account of their biology, activities, and classification*. 188 Seiten. San Francisco & London: W. H. Freeman & Co.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881–10890.
- Crous, P. W., & Groenewald, J. Z. (2013). A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. *IMA Fungus*, 4(1), 133–154.

- Crous, P. W., Quaedvlieg, W., Hansen, K., Hawksworth, D. L., & Groenewald, J. Z. (2014). *Phacidium* and *Ceuthospora* (*Phacidiaceae*) are congeneric: taxonomic and nomenclatural implications. *IMA Fungus*, 5(2), 173–193.
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Swart, L., Denman, S., Taylor, J. E., Bezuidenhout, C. M., Palm, M. E., Marincowitz, S. & Groenewald, J. Z. (2011). Fungal pathogens of *Proteaceae*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27, 20–45.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., & Swart, W. J. (1990). Shoot and Needle Diseases of *Pinus* spp. in South Africa. *South African Forestry Journal*, 154(1), 60–66.
- Damm, U., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2010). *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 24, 60–80.
- Davis, E. C., Franklin, J. B., Shaw, A. J., & Vilgalys, R. (2003). Endophytic *Xylaria* (*Xylariaceae*) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany*, 90(11), 1661–1667.
- Decourcelle, T., Piou, D., & Desprez-Loustau, M.-L. (2015). Detection of *Diplodia sapinea* in Corsican pine seeds. *Plant Pathology*, 64(2), 442–449.
- Delaye, L., García-Guzmán, G., & Heil, M. (2013). Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens - are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Diversity*, 60(1), 125–135.
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25–39.
- Desprez-Loustau, M.-L. (2009). Alien Fungi of Europe. In *Handbook of Alien Species in Europe* (S. 15–28). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Desprez-Loustau, M.-L., Courtecuisse, R., Robin, C., Husson, C., Moreau, P.-A., Blancard, D., Selosse, M.-A., Lung-Escarmant, B., Piou, D., & Sache I. (2009). Species diversity and drivers of spread of alien fungi (sensu lato) in Europe with a particular focus on France. *Biological Invasions*, 12(1), 157–172.
- Desprez-Loustau, M.-L., Marçais, B., Nageleisen, L.-M., Piou, D., & Vannini, A. (2006). Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*, 63(6), 597–612.
- Diederich, P., Kocourková, J., Etayo, J., & Zhurbenko, M. (2007). The lichenicolous *Phoma* (coelomycetes) *Cladonia*. *The Lichenologist*, 39(2), 153–163.
- Dijk, H. F. G. V., Gaag, M. V. der, Perik, P. J. M., & Roelofs, J. G. M. (1992). Nutrient availability in Corsican pine stands in The Netherlands and the occurrence of *Sphaeropsis sapinea*: a field study. *Canadian Journal of Botany*, 70(4), 870–875.
- Diminić, D., Potočić, N., & Seletković, I. (2012). The Role of Site in Predisposition of Austrian Pine (*Pinus nigra* Arnold) to Pathogenic Fungus *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton in Istria (Croatia). *Šumarski list*, 136(1–2), 19–35.
- Dobbertin, M., Hilker, N., Rebetez, M., Zimmermann, N. E., Wohlgemuth, T., & Rigling, A. (2005a). The upward shift in altitude of pine mistletoe (*Viscum album* ssp. *austriacum*) in Switzerland—the result of climate warming? *International Journal of Biometeorology*, 50(1), 40–47.
- Dobbertin, M., Mayer, P., Wohlgemuth, T., Feldmeyer-Christe, E., Graf, U., Zimmermann, N. E., & Rigling, A. (2005b). The Decline of *Pinus sylvestris* L. Forests in the Swiss Rhone Valley - a Result of Drought Stress? *Phyton*, 45(4), 153–156.

- Dobbertin, M., & Rigling, A. (2006). Pine mistletoe (*Viscum album* ssp. *austriacum*) contributes to Scots pine (*Pinus sylvestris*) mortality in the Rhone valley of Switzerland. *Forest Pathology*, 36(5), 309–322.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1993). *Compendium of Soil Fungi*. Auflage: Reprint der Ausgabe von 1980. 860 Seiten. Eching: Atlantic Books.
- Duong, L. M., McKenzie, E. H. C., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2008). Fungal succession on senescent leaves of *Castanopsis diversifolia* in Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. *Fungal diversity*, 30, 23–36.
- Ebert, W., Häußler, D., & Kulicke, H. (1978). *Bestimmungsbuch der wichtigsten KiefernSchädlinge und -krankheiten*. O. Jarisch, Hrsg. 1. Aufl. 128 Seiten. Berlin: Deutscher Landwirtschaftsverlag.
- Eilmann, B., Weber, P., Rigling, A., & Eckstein, D. (2006). Growth reactions of *Pinus sylvestris* L. and *Quercus pubescens* Willd. to drought years at a xeric site in Valais, Switzerland. *Dendrochronologia*, 23(3), 121–132.
- Ellenberg, H., & Leuschner, C. (2010). *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen in ökologischer, dynamischer und historischer Sicht*. 6. Auflage. 1333 Seiten. Stuttgart: Ulmer.
- EPPO Global Database. (2016). *Fusarium circinatum* (GIBBCI), World distribution. <https://gd.eppo.int/taxon/GIBBCI/distribution>. Zugegriffen: 2. November 2016
- Escher, P., Eiblmeier, M., Hetzger, I., & Rennenberg, H. (2004a). Seasonal and spatial variation of carbohydrates in mistletoes (*Viscum album*) and the xylem sap of its hosts (*Populus x euamericana* and *Abies alba*). *Physiologia Plantarum*, 120(2), 212–219.
- Escher, P., Eiblmeier, M., Hetzger, I., & Rennenberg, H. (2004b). Spatial and seasonal variation in amino compounds in the xylem sap of a mistletoe (*Viscum album*) and its hosts (*Populus* spp. and *Abies alba*). *Tree Physiology*, 24(6), 639–650.
- Espinosa-Garcia, F. J., & Langenheim, J. H. (1990). The Endophytic Fungal Community in Leaves of a Coastal Redwood Population - Diversity and Spatial Patterns. *The New Phytologist*, 116(1), 89–97.
- EUFORGEN. (2008). European forest genetic resources programme: Distribution maps of *Pinus sylvestris*. <http://www.euforgen.org/distribution-maps/>. Zugegriffen: 3. November 2015
- Fabre, B., Piou, D., Desprez-Loustau, M.-L., & Marçais, B. (2011). Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? *Global Change Biology*, 17(10), 3218–3227.
- Fávaro, L. C. de L., Melo de, F. L., Aguilar-Vildoso, C. I., & Araújo, W. L. (2011). Polyphasic Analysis of Intraspecific Diversity in *Epicoccum nigrum* Warrants Reclassification into Separate Species. *PLoS ONE*, 6(8), e14828.
- Feci, E., Smith, D., & Stanosz, G. R. (2003). Association of *Sphaeropsis sapinea* with insect-damaged red pine shoots and cones. *Forest Pathology*, 33(1), 7–13.
- Fisher, P. J., Petrini, L. E., Sutton, B. C., & Petrini, O. (1995). A study of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Gynoxis oleifolia* Muchler (*Compositae*) from Ecuador. *Nova Hedwigia*, 60(3), 589–594.
- Fisher, P. J., Petrini, O., & Petrini, L. E. (1991). Endophytic ascomycetes and deuteromycetes in roots of *Pinus sylvestris*. *Nova Hedwigia*, 52, 11–15.
- Fisher, P. J., Petrini, O., Petrini, L. E., & Sutton, B. C. (1994). Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist*, 127(1), 133–137.
- Fisher, P. J., Petrini, O., & Sutton, B. C. (1993). A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of Eucalyptus in Australia and England. *Sydowia*, 45(2), 338–345.

- Flowers, J., Hartman, J. R., & Vaillancourt, L. J. (2006). Histology of *Diplodia pinea* in diseased and latently infected *Pinus nigra* shoots. *Forest Pathology*, 36(6), 447–459.
- Flowers, J., Hartman, J., & Vaillancourt, L. J. (2003). Detection of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in Austrian pine tissues using nested-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 93(12), 1471–1477.
- Flowers, J., Nuckles, E., Hartman, J., & Vaillancourt, L. J. (2001). Latent infection of Austrian and Scots pine tissues by *Sphaeropsis sapinea*. *Plant Disease*, 85(10), 1107–1112.
- Fournier, J. (2014). Update on European species of *Xylaria*. <http://www.ascofrance.com/>. Zugegriffen: 26. Februar 2017
- Fournier, J., & Magni, J.-F. (2004c). *Rosellinia corticium*. *Pyrenomyces from southwestern France*. http://pyrenomyces.free.fr/rosellinia/html/Rosellinia_corticium.htm. Zugegriffen: 8. November 2016
- Fournier, J., & Magni, J.-F. (2004a). *Nemania serpens*. *Pyrenomyces from southwestern France*. http://pyrenomyces.free.fr/nemania/html/N_serpens.htm. Zugegriffen: 8. November 2016
- Fournier, J., & Magni, J.-F. (2004b). *Nemania diffusa*. *Pyrenomyces from southwestern France*. http://pyrenomyces.free.fr/nemania/html/N_diffusa.htm. Zugegriffen: 8. November 2016
- Fournier, J., & Magni, J.-F. (2004d). *Biscogniauxia nummularia*. *Pyrenomyces from southwestern France*. http://pyrenomyces.free.fr/biscogniauxia/html/Biscogniauxia_nummularia.htm. Zugegriffen: 8. November 2016
- Fries, E. M. (1821). *Systema mycologicum: sistens fungorum ordines, genera et species, huc usque cognitae, quas ad normam methodi naturalis determinavit / disposuit atque descripsit Elias Fries*. (Bd. 1). 520 Seiten. Lundae: Ex Officina Berlingiana.
- Fröhlich, J., Hyde, K. D., & Petrini, O. (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*, 104(10), 1202–1212.
- Gamboa, M., Laureano, S., & Bayman, P. (2003). Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia*, 156(1), 41–45.
- Ganley, R. J., Brunfeld, S. J., & Newcombe, G. (2004). A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 10107–10112.
- Ganley, R. J., Hargreaves, C. L., & Donaldson, L. A. (2015). Detection of asymptomatic fungal microorganisms in *Pinus radiata* tissue culture material. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 45(11), 1–9.
- Ganley, R. J., & Newcombe, G. (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*, 110(3), 318–327.
- Ganley, R. J., Snieszko, R. A., & Newcombe, G. (2008). Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management*, 255(7), 2751–2760.
- Gao, F., Dai, C., & Liu, X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346–1351.

- Garbelotto, M., & Gonthier, P. (2013). Biology, Epidemiology, and Control of *Heterobasidion* Species Worldwide. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 39–59.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118.
- Garrett, K. A., Dendy, S. P., Frank, E. E., Rouse, M. N., & Travers, S. E. (2006). Climate Change Effects on Plant Disease: Genomes to Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 489–509.
- Gazis, R., Rehner, S., & Chaverri, P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology*, 20(14), 3001–3013.
- Ghelardini, L., Pepori, A. L., Luchi, N., Capretti, P., & Santini, A. (2016). Drivers of emerging fungal diseases of forest trees. *Forest Ecology and Management*, 381, 235–246.
- Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G. C., Miserere, L., & Nicolotti, G. (2009). Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity*, 38, 69–83.
- Glatzel, G., & Geils, B. W. ; (2009). Mistletoe ecophysiology: Host-parasite interactions. *Botany*, 87, 10–15.
- Gminder, A. (2010). *Die Großpilze Baden-Württembergs. Band 5: Ständerpilze: Blätterpilze III.* (G. J. Krieglsteiner & A. Gminder, Hrsg.). 671 Seiten. Stuttgart: Eugen Ulmer.
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). *Diaporthe* a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31(1), 1–41.
- Gonthier, P., & Nicolotti, G. (Hrsg.). (2013). *Infectious Forest Diseases*. 672 Seiten. Wallingford [u. a.]: CABI.
- Greenacre, M., Nenadic, O., & Friendly, M. (2016). *ca: Simple, Multiple and Joint Correspondence Analysis.* <https://cran.r-project.org/web/packages/ca/index.html>. Zugegriffen: 13. Februar 2017
- Greenhalgh, G. N., & Chesters, C. G. C. (1968). Conidiophore morphology in some British members of the *Xylariaceae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 51, 57–82.
- Gremmen, J. (1957). Microfungi decomposing organic remains of pines. *Fungus*, 27, 34–42.
- Griffith, G. S., & Boddy, L. (1988). Fungal communities in attached ash (*Fraxinus excelsior*) twigs. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(4), 599–606.
- Guba, E. F. (1961). *Monograph of Monochaetia and Pestalotia*. 342 Seiten. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
- Guo, L.-D., Huang, G. R., Wang, Y., He, W. H., Zheng, W. H., & Hyde, K. D. (2003). Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycological Research*, 107(6), 680–688.
- Guo, L.-D., Huang, G.-R., & Wang, Y. (2008). Seasonal and Tissue Age Influences on Endophytic Fungi of *Pinus tabulaeformis* (*Pinaceae*) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 997–1003.
- Guo, L.-D., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New phytologist*, 147(3), 617–630.

- Guo, L.-D., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2001). Detection and Taxonomic Placement of Endophytic Fungi within Frond Tissues of *Livistona chinensis* Based on rDNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(1), 1–13.
- Habermann, M., Bressemer, U., Hurling, R., & Plasil, P. (2015). Waldschutzsituation 2014 in Nordwestdeutschland. *AFZ- Der Wald*, (7), 37–41.
- Haddow, W. R., & Newman, F. S. (1942). A Disease of the Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) caused by the Fungus *Diplodia pinea* Kickx, associated with the Pine Spittlebug (*Aphrophora parallela* Say.). I. Symptoms and Etiology. *Trans. R. Canad. Inst, Toronto*, 24(1), 1–18.
- Halmschlager, E. von, Butin, H., & Donaubaue, E. (1993). Endophytische Pilze in Blättern und Zweigen von *Quercus petraea*. *European Journal of Forest Pathology*, 23(1), 51–63.
- Hampel, M. (1970). *Phoma eupyrena* Sacc. ss. *W. und Plectosphaerella cucumeris* Kleb., zwei wenig bekannte Keimlingspathogene. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 77(4/5), 225–227.
- Hansen, K., Perry, B. A., Dranginis, A. W., & Pfister, D. H. (2013). A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67, 311–335.
- Harrington, T. C., & Wingfield, M. J. (1998). Diseases and the ecology of indigenous and exotic pines. In *Ecology and biogeography of Pinus* (S. 381–404). Cambridge [u.a.]: Cambridge Univ. Press.
- Hartmann, T. (1990). Kiefernmitel im Raum Schwabach / Mittelfranken, *AFZ-Der Wald*(36), 914–916.
- Hartmann, T. (1997). Kiefernmitel contra ökologischen Waldbau?, *AFZ-Der Wald*(52), 52–53.
- Hata, K., & Futai, K. (1995). Endophytic fungi associated with healthy pine needles and needles infested by the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. *Canadian Journal of Botany*, 73(3), 384–390.
- Hata, K., & Futai, K. (1996). Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Canadian Journal of Botany*, 74(1), 103–114.
- Hawksworth, D. L. (1972). *Hypoxyton rubiginosum*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(357).
- Hawksworth, D. L. (2012). Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodiversity and Conservation*, 21(9), 2425–2433.
- Hayes, A. J. (1965). Some microfungi from Scots pine litter. *Transactions of the British Mycological Society*, 48(2), 179–185.
- Helander, M. L., Neuvonen, S., Sieber, T., & Petrini, O. (1993). Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations. *Microbial Ecology*, 26(3), 227–234.
- Hellrigl, K., & Minerbi, S. (2006). Klimaextreme und Schädlinge als Faktoren des Kiefernsterbens, *forest observer*(2/3), 145–156.
- Hennebert, G. L. (1973). *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia*, 7(2), 183–204.
- Henriques, J., Nóbrega, F., Sousa, E., & Lima, A. (2014). Diversity of *Biscogniauxia mediterranea* within Single Stromata on Cork Oak. *Journal of Mycology*, 2014, 1–5.
- Henriques, J., Nóbrega, F., Sousa, E., & Lima, A. (2015). Morphological and genetic diversity of *Biscogniauxia mediterranea* associated to *Quercus suber* in the Mediterranean Basin. *Revista de Ciências Agrárias*, 38(2), 166–175.

- Heydeck, P. (1991). Nadelschädigung und Triebsterben in Verbindung mit *Sclerophoma pithyophila* (Corda) Höhn. *Der Wald*, 41(4), 142.
- Heydeck, P., & Dahms, C. (2012). Trieberkrankungen an Waldbäumen im Brennpunkt der forstlichen Phytopathologie. *Eberswalder Forstliche Schriftenreihe*, 49, 47–55.
- Heydeck, P., Dahms, C., Götz, B., Hänisch, A., & Schumacher, J. (2016). Erstes Auftreten der *Dothistroma*-Nadelbräune (*Dothistroma septosporum*) im Nordostdeutschen Tiefland. *Journal für Kulturpflanzen*, 69(1), 10–15.
- Hilber, R., & Hilber, O. (1979). Einige Anmerkungen zu der Gattung *Cercophora* Fuckel (*Lasiosphaeriaceae*). *Zeitschrift für Mykologie*, 45(2), 209–233.
- Hilker, N., Rigling, A., & Dobbertin, M. (2005). Mehr Misteln wegen der Klimaerwärmung? *Wald und Holz* 3, 86(3), 39–42.
- Hoff, J. A., Klopfenstein, N. B., McDonald, G. I., Tonn, J. R., Kim, M.-S., Zambino, P. J., Hessburg, P. F., Rogers, J. D., Peever, T. L. & Carris, L. M. (2004). Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology*, 34(4), 255–271.
- Hoffman, M. T., & Arnold, A. E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*, 112(3), 331–344.
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2013). iNEXT Online. <https://chao.shinyapps.io/iNEXT/>. Zugegriffen: 9. März 2016
- Hughes, S. J. (1958). Revisiones Hyphomycetum Aliquot Cum Appendice De Nominibus Rejiciendis. *Canadian Journal of Botany*, 36(6), 727–836.
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2007). Understanding microfungal diversity: a critique. *Cryptogamie. Mycologie*, 28(4), 281–289.
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163–173.
- Index Fungorum. (o. J.). Index Fungorum Home Page. <http://www.indexfungorum.org/>. Zugegriffen: 16. Januar 2018
- Ivanová, H., Pristaš, P., & Ondrušková, E. (2016). Comparison of two *Coniochaeta* species (*C. ligniaria* and *C. malacotricha*) with a new pathogen of black pine needles – *Sordaria macrospora*. *Plant Protection Science*, 52(1), 18–25.
- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Tanaka, C., Gafur, A., Ohata, A., Kawai, M., Yamanaka, T., Neda, H. & Ota, Y. (2012). Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience*, 53(5), 396–401.
- Janssen, T., & Wulf, A. (1999). *Zur Bedeutung von Misteln im Forstschutz: ein Vergleich nordamerikanischer und europäischer Arten: Schaden, Kontrolle, Gefahrenpotential und Quarantäneaspekte unter besonderer Berücksichtigung der Zwergmistelgattung Arceuthobium*. 142 Seiten. Berlin: Parey.
- Jeewon, R., Liew, E. C. Y., & Hyde, K. D. (2002). Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25(3), 378–392.
- Jentsch, A., Kreyling, J., & Beierkuhnlein, C. (2007). A new generation of climate-change experiments: events, not trends. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(7), 365–374.
- Johnson, D. W., Peterson, G. W., & Dorset, R. D. (1985). *Diplodia* tip blight of ponderosa pine in the Black Hills of South Dakota. *Plant disease*, 69(2), 136–137.

- Johnson, J. A., & Whitney, N. J. (1992). Isolation of fungal endophytes from black spruce (*Picea mariana*) dormant buds and needles from New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Botany*, 70(9), 1754–1757.
- Johnston, P. R., Sutherland, P. W., & Joshee, S. (2006). Visualising endophytic fungi within leaves by detection of (1→3)-β-d-glucans in fungal cell walls. *Mycologist*, 20(4), 159–162.
- Jong, S. C., & Rogers, J. D. (1972). Illustrations and descriptions of conidial states of some *Hypoxyylon* species. *Bulletin of the Washington Agricultural Experiment Station*, 71, 1–51.
- Ju, Y., & Rogers, J. D. (1996). *A revision of the genus Hypoxyylon* (Bd. 20). 365 Seiten. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Ju, Y.-M., Rogers, J. D., San Martin, F., & Granmo, A. (1998). The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon*, 66, 1–98.
- Juniper, B. E. (1991). The Leaf from the Inside and the Outside: A Microbe's Perspective. In J. H. Andrews & S. S. Hirano (Hrsg.), *Microbial Ecology of Leaves* (S. 21–42). New York: Springer.
- Jurc, D., Bojovic, S., & Jurc, M. (1999). Influence of endogenous terpenes on growth of three endophytic fungi from the needles of *Pinus nigra* Arnold. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 39(3), 225–229.
- Jurc, M., Jurc, D., Gogala, N., & Simoncic, P. (1996). Air pollution and fungal endophytes in needles of Austrian pine. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 36(3), 111–114.
- Kam de, M. (1985). *Sphaeropsis* (= *Diplodia*) shoot-dying: an incident or a permanent problem? *Nederlands Bosbouw tijdschrift*, 57, 118–122.
- Kam de, M., Versteegen, C. M., Burg, J., & Werf, D. C. (1991). Effects of fertilization with ammonium sulphate and potassium sulphate on the development of *Sphaeropsis sapinea* in Corsican pine. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 97(5), 265–274.
- Keen, A., & Smits, T. F. C. (1989). Application of a mathematical function for a temperature optimum curve to establish differences in growth between isolates of a fungus. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(1), 37–49.
- Kehr, R. (1998). Zur Bedeutung pilzlicher Endophyten bei Waldbäumen. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig, Institut für Pflanzenschutz im Forst, 100 Jahre Pflanzenschutzforschung Aktuelle Forschungsschwerpunkte im Forst- und Rebschutz* (Heft 349), 8–30.
- Kim, C.-K., Eo, J.-K., & Eom, A.-H. (2013). Diversity and Seasonal Variation of Endophytic Fungi Isolated from Three Conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology*, 41(2), 82–85.
- Kinsey, G. C. (2002). *Phoma herbarum*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1501).
- Kirk, P. M. (1991). *Nigrospora sphaerica*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1056).
- Kirk, P. M. (1994). *Trichocladium asperum*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1201).
- Kliejunas, J. T. (1985). *Phoma* Blight of Fir and Douglas-Fir Seedlings in a California Nursery. *Plant Disease*, 69(9), 773.
- Kokaew, J., Manoch, L., Worapong, J., Chamswarng, C., Singburadom, N., Visarathanonth, N., Piasai, O. & Strobel, G. (2011). *Coniochaeta ligniaria* an endophytic fungus from *Baekkea frutescens* and its antagonistic effects against plant pathogenic fungi. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44(2), 123–131.

- Kowalski, T. (1988). Zur Pilzflora toter Kiefernadeln. *Zeitschrift für Mykologie*, 54, 159–174.
- Kowalski, T. (1993). Fungi in Living Symptomless Needles of *Pinus sylvestris* with Respect to Some Observed Disease Processes. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 139(2), 129–145.
- Kowalski, T., & Kehr, R. (1992). Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia*, 44(2), 137–168.
- Kowalski, T., & Zych, P. (2002). Fungi isolated from living symptomless shoots of *Pinus nigra* growing in different site conditions. *Österr. Z. Pilzk.*, 11, 107–116.
- Krause, S. C., & Raffa, K. F. (1996). Differential growth and recovery rates following defoliation in related deciduous and evergreen trees. *Trees*, 10(5), 308–316.
- Kreber, B., Kimberley, M., Eden, D., Chittenden, C., Waals Van der, J., Wakeling, R., & Dorset, I. (2001). Arrest of fungal pre-infections in raw logs and freshly sawn lumber of radiata pine using Sentry®. *Forest Products Journal*, 51(10), 66–72.
- Krieglsteiner, G. J., & Kaiser, A. (2000). *Die Großpilze Baden-Württembergs, Band 1: Allgemeiner Teil. Gallert-, Rinden-, Stachel- und Porenpilze.* (G. J. Krieglsteiner, Hrsg.). 629 Seiten. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.
- Kruys, Å., Eriksson, O. E., & Wedin, M. (2006). Phylogenetic relationships of coprophilous *Pleosporales* (*Dothideomycetes*, *Ascomycota*), and the classification of some bitunicate taxa of unknown position. *Mycological Research*, 110(5), 527–536.
- Kumaresan, V., & Suryanarayanan, T. (2002). Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*, 9, 81–91.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7), 792–798.
- Kwaśna, H. (2008). *Fungi inhabiting roots of trees and their stumps and their effect on growth of Armillaria.* (M. Garbelotto & P. Gonthier, Hrsg.) (Bd. Root and butt rots of forest trees: 12th International Conference on Root and Butt Rots: IUFRO Working Party 7.02.01, Conference proceedings). University of California, Berkeley.
- Lacap, D. C., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2003). An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12, 53–66.
- Landesforstanstalt Eberswalde (Hrsg.). (2007). *Die Kiefer im nordostdeutschen Tiefland* (Bd. XXXII). Eberswalder Forstliche Schriftenreihe.
- Landesforstanstalt Eberswalde (Hrsg.). (2015). Diagnose Report 2014, Diagnostische Arbeiten unter besonderer Berücksichtigung pilzlicher Organismen.
- Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde (Hrsg.). (2009). *Die Douglasie im nordostdeutschen Tiefland - Chancen und Risiken im Klimawandel* (Bd. 43). Eberswalder Forstliche Schriftenreihe.
- Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde (Hrsg.). (2016). Diagnose Report 2015, Diagnostische Arbeiten unter besonderer Berücksichtigung pilzlicher Organismen.
- Langer, G. (1994). Die Gattung *Botryobasidium* Donk (Corticaceae, Basidiomycetes). *Bibliotheca Mycologica*, 158, 459 Seiten. Berlin [u.a.]: Cramer.
- Langer, G., & Bressemer, U. (2017). *Phlebiopsis gigantea* als Antagonist des Wurzelschwamms, *AFZ-Der Wald*(3), 39–42.
- Langer, G., Bressemer, U., & Habermann, M. (2011). *Diplodia*-Triebsterben der Kiefer und endophytischer Nachweis des Erregers *Sphaeropsis sapinea.*, *AFZ-Der Wald*(11), 28–31.

- Larkin, B. G., Hunt, L. S., & Ramsey, P. W. (2012). Foliar nutrients shape fungal endophyte communities in Western white pine (*Pinus monticola*) with implications for white-tailed deer herbivory. *Fungal Ecology*, 5(2), 252–260.
- Larran, S., Simón, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. P. S., & Perelló, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*, 92, 17–23.
- Lawrey, J. D., Diederich, P., Nelsen, M. P., Freebury, C., Broeck Van den, D., Sikaroodi, M., & Ertz, D. (2012). Phylogenetic placement of lichenicolous *Phoma* species in the Phaeosphaeriaceae (Pleosporales, Dothideomycetes). *Fungal Diversity*, 55(1), 195–213.
- Lee, K., Pan, J. J., & May, G. (2009). Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize. *FEMS microbiology letters*, 299(1), 31–37.
- Lee, S. K., Lee, S. K., Bae, H., Seo, S.-T., & Lee, J. K. (2014). Effects of Water Stress on the Endophytic Fungal Communities of *Pinus koraiensis* Needles Infected by *Cenangium ferruginosum*. *Mycobiology*, 42(4), 331–338.
- Legesse, W. B. (2010). *Understanding the global population genetics of Diplodia pinea and its life cycle in plantation pines* (Disseration). University of Pretoria.
- Levine, M. (1914). The Origin and Development of the Lamellae in *Coprinus micaceus*. *American Journal of Botany*, 1(7), 343–356.
- Lewis, F. J. (1924). An Endotropic Fungus in the Coniferæ. *Nature*, 114(2876), 860–860.
- Linaldeddu, B. T., Scanu, B., & Franceschini, A. (2010). First report of *Diplodia scrobiculata* causing canker and branch dieback on strawberry tree (*Arbutus unedo*) in Italy. *Plant Disease*, 94(7), 919.
- Lindahl, B., & Boberg, J. (2008). Chapter 10 Distribution and function of litter basidiomycetes in coniferous forests. In L. Boddy, J. C. Frankland, & P. van West (Hrsg.), *British Mycological Society Symposia Series* (Bd. 28, S. 183–196). Academic Press.
- Lindau, G. (1922). *Die mikroskopischen Pilze: Myxomyceten, Phycomyceten und Ascomyceten* (Bd. 2). 222 Seiten. Berlin: Julius Springer Verlag.
- Liu, J. K., Hyde, K. D., Jones, E. B. G., Ariyawansa, H. A., Bhat, D. J., Boonmee, S., et al. (2015). Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. *Fungal Diversity*, 72(1), 1–197.
- Lodge, D. J., Fisher, P. J., & Sutton, B. C. (1996). Endophytic Fungi of *Manilkara bidentata* Leaves in Puerto Rico. *Mycologia*, 88(5), 733–738.
- Luchi, N., Capretti, P., & Bonello, P. (2007). Production of *Diplodia scrobiculata* and *Diplodia pinea* pycnidia on ground Austrian pine needle agar medium. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(2), 230–235.
- Luchi, N., Capretti, P., Vettraino, A. M., Vannini, A., Pinzani, P., & Pazzagli, M. (2006). Early detection of *Biscogniauxia nummularia* in symptomless European beech (*Fagus sylvatica* L.) by TaqMan™ quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 43(1), 33–38.
- Luchi, N., Oliveira Longa, C. M., Danti, R., Capretti, P., & Maresi, G. (2014). *Diplodia sapinea*: the main fungal species involved in the colonization of pine shoots in Italy. *Forest Pathology*, 44(5), 372–381.
- Lundqvist, N. (1972). *Nordic Sordariaceae s. lat* (Bde. 1-20, Bd. 1). 374 Seiten. Uppsala: Almqvist & Wiksells.
- Lygis, V., Vasiliauskaite, I., Matelis, A., Pliūra, A., & Vasaitis, R. (2014). Fungi in living and dead stems and stumps of *Pinus mugo* on coastal dunes of the Baltic Sea. *Plant Protection Science*, 50(4), 221–226.

- Lygis, V., Vasiliauskaite, I., Stenlid, J., & Vasaitis, R. (2010). Impact of forest fire on occurrence of *Heterobasidion annosum* s.s. root rot and other wood-inhabiting fungi in roots of *Pinus mugo*. *Forestry*, 83(1), 83–92.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Larsson, K.-H., & Stenlid, J. (2005). Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 20(4), 337–346.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Stenlid, J., & Vasiliauskas, A. (2004). Silvicultural and pathological evaluation of Scots pine afforestations mixed with deciduous trees to reduce the infections by *Heterobasidion annosum* s.s. *Forest Ecology and Management*, 201(2–3), 275–285.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L.-D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50(1), 167–187.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121–186.
- Manion, P. D. (1991). *Tree disease concepts* (2. Aufl.). 399 Seiten. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall.
- Maresi, G., Luchi, N., Pinzani, P., Pazzagli, M., & Capretti, P. (2007). Detection of *Diplodia pinea* in asymptomatic pine shoots and its relation to the Normalized Insolation index. *Forest Pathology*, 37(4), 272–280.
- Marincowitz, S., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Wingfield, M. J. (2008). *Microfungi occurring on Proteaceae in the fynbos*. 166 Seiten. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Martín, J. A., Macaya-Sanz, D., Witzell, J., Blumenstein, K., & Gil, L. (2015). Strong in vitro antagonism by elm xylem endophytes is not accompanied by temporally stable in planta protection against a vascular pathogen under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 142(1), 185–196.
- Martínez-Álvarez, P., Rodríguez-Ceinós, S., Martín-García, J., & Diez, J. J. (2012). Monitoring endophyte populations in pine plantations and native oak forests in Northern Spain. *Forest Systems*, 21(3), 373.
- Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A., & Van Wees, S. C. M. (2014). Phytohormone Profiles Induced by *Trichoderma* Isolates Correspond with Their Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activity on Melon Plants. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 804–815.
- Martinović, T., Koukol, O., & Hirose, D. (2016). Distinct phylogeographic structure recognized within *Desmazierella acicola*. *Mycologia*, 108(1), 20–30.
- Martin-Pinto, P., Pajares, J. A., Nanos, N., & Diez, J. J. (2004). Site and seasonal influences on the fungal community on leaves and stems of *Pinus* and *Quercus* seedlings in forest nurseries. *Sydowia*, 56(2), 243–257.
- Mason, W. L., & Alía, R. (2000). Current and future status of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forest in Europe. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 9(1), 317–336.
- Mattson, W. J., & Haack, R. A. (1987). The Role of Drought in Outbreaks of Plant-eating Insects. *BioScience*, 37(2), 110–118.
- Menkis, A., & Vasaitis, R. (2010). Fungi in Roots of Nursery Grown *Pinus sylvestris*: Ectomycorrhizal Colonisation, Genetic Diversity and Spatial Distribution. *Microbial Ecology*, 61(1), 52–63.
- Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A. F. S., Stenström, E., Stenlid, J., & Finlay, R. (2006). Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries,

- afforested clear-cuts and abandoned farmland. *Plant Pathology*, 55(1), 117–129.
- Metzler, B., Langer, G., Heydeck, P., Peters, F., Scham, J., & Langer, E. (2013). Survey on *Heterobasidion* species and perspectives of butt rot control in Germany. *XIII Conference „Root and Butt Rot of Forest Trees“ IUFRO*, (Firenze University Press), 206–208.
- Meyer, W., & Gams, W. (2003). Delimitation of *Umbelopsis* (*Mucorales*, *Umbelopsidaceae* fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data*. *Mycological Research*, 107(3), 339–350.
- Michailides, T. J. (1991). Pathogenicity, Distribution, Sources of Inoculum, and Infection Courts of *Botryosphaeria dothidea* on Pistachio. *Phytopathology*, 81, 566–573.
- Milgroom, M. G., & Cortesi, P. (1999). Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10518–10523.
- Milijašević, T. (2006). Effect of temperature on the mycelial growth of the fungus *Sphaeropsis sapinea*. *Glasnik Šumarskog fakulteta*, (94), 211–222.
- Millberg, H., Boberg, J., & Stenlid, J. (2015). Changes in fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles along a latitudinal gradient in Sweden. *Fungal Ecology*, 17, 126–139.
- Miller, J. D., Sumarah, M. W., & Adams, G. W. (2008). Effect of a Rugulosin-producing Endophyte in *Picea glauca* on *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Chemical Ecology*, 34(3), 362–368.
- Min, Y. J., Park, M. S., Fong, J. J., Quan, Y., Jung, S., & Lim, Y. W. (2014). Diversity and Saline Resistance of Endophytic Fungi Associated with *Pinus thunbergii* in Coastal Shelterbelts of Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 324–333.
- Minerbi, S. (2007). *Phytosanitäre und waldbauliche Sanierungsmaßnahmen in sterbenden Kieferschutzwäldern des Vinschgau*. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ywdAsBKAbHsJ:www.provinz.bz.it/forst/download/KIEFERNSTERBEN_VINSCHGAU_01.pdf+&cd=21&hl=de&ct=clnk&gl=de&client=firefox-b. Zugegriffen: 30. Januar 2017
- Minter, D. W. (2006a). *Chaetomium elatum*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1683).
- Minter, D. W. (2006c). *Chaetomium bostrychodes*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1681).
- Minter, D. W. (2006b). *Chaetomium globosum*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1685).
- Minter, D. W. (2006d). *Daldinia concentrica*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1694).
- Mirza, J. H., & Cain, R. F. (1969). Revision of the genus *Podospora*. *Canadian Journal of Botany*, 47(12), 1999–2048.
- Monod, M. (1983). Monographie taxonomique des Gnomoniaceae (Ascomycètes de l'ordre des Diaporthales) I, 9, 1–314.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(16), 1757–1764.
- Navarro-Meléndez, A. L., & Heil, M. (2014). Symptomless endophytic fungi suppress endogenous levels of salicylic acid and interact with the jasmonate-dependent indirect defense traits of their host, lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 816–825.

- Nawrot-Chorabik, K. (2013). The Use of Interactions in Dual Cultures in vitro to Evaluate the Pathogenicity of Fungi and Susceptibility of Host Plant Genotypes. In M. Petre (Hrsg.), *Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications*. InTech Open Access Publisher.
- Nawrot-Chorabik, K., Grad, B., & Kowalski, T. (2016). Interactions between callus cultures of *Pinus sylvestris* and pine fungi with different trophic properties. *Forest Pathology*, 46(3), 179–186.
- Nicholls, T., & Ostry, M. (1990). *Sphaeropsis sapinea* Cankers on Stressed Red and Jack Pines in Minnesota and Wisconsin. *Plant Disease*, 74(1), 54–56.
- Niedersächsische Forstliche Versuchsanstalt (Hrsg.). (1996). Tätigkeitsbericht der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt, 66–67.
- Niinemets, Ü. (2010). Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management*, 260(10), 1623–1639.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.-H., & Kõljalg, U. (2006). Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE*, 1(1).
- Nirenberg, H. I. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 169, 1–117.
- NW-FVA. (2015d). *Schlussbericht, F3b, NaLaMa-nT* (Abschlussbericht). Göttingen: NW-FVA.
- NW-FVA. (2015a). Waldzustandsbericht 2015 - Hessen. www.nw-fva.de. Zugegriffen: 28. Februar 2017
- NW-FVA. (2016b). Waldzustandsbericht 2016 - Niedersachsen. www.nw-fva.de. Zugegriffen: 28. Februar 2017
- NW-FVA. (2016a). Waldzustandsbericht 2016 - Hessen. www.nw-fva.de. Zugegriffen: 28. Februar 2017
- NW-FVA. (2016c). Waldzustandsbericht 2016 - Sachsen-Anhalt. www.nw-fva.de. Zugegriffen: 28. Februar 2017
- NW-FVA. (2015b). Waldzustandsbericht 2015 - Niedersachsen. www.nw-fva.de. Zugegriffen: 28. Februar 2017
- NW-FVA. (2015c). Waldzustandsbericht 2015 - Sachsen-Anhalt. www.nw-fva.de. Zugegriffen: 28. Februar 2017
- NW-FVA (Hrsg.). (2008). *Die Waldkiefer Fachtagung zum Baum des Jahres 2007* (Bde. 1-2, Bd. Beiträge aus der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt). 99 Seiten. Göttingen: Univ.-Verl. Göttingen.
- NW-FVA (Hrsg.). (2013). *Waldentwicklungsszenarien für das Hessische Ried: Entscheidungsunterstützung vor dem Hintergrund sich beschleunigt ändernder Wasserhaushalts- und Klimabedingungen und den Anforderungen aus dem europäischen Schutzgebietssystem Natura 2000*. 398 Seiten. Göttingen: Univ.-Verl. Göttingen.
- NW-FVA. (2014). Waldzustandsbericht 2014 - Hessen. www.nw-fva.de. Zugegriffen: 28. Februar 2017
- Oberhuber, W., Stumböck, M., & Kofler, W. (1998). Climate-tree-growth relationships of Scots pine stands (*Pinus sylvestris* L.) exposed to soil dryness. *Trees*, 13(1), 19–27.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. &

- Wagner, H. (2016). *vegan: Community Ecology Package*. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>. Zugegriffen: 13. Februar 2017
- Oliva, J., Stenlid, J., Grönkvist-Wichmann, L., Wahlström, K., Jonsson, M., Drobyshev, I., & Stenström, E. (2016). Pathogen-induced defoliation of *Pinus sylvestris* leads to tree decline and death from secondary biotic factors. *Forest Ecology and Management*, 379, 273–280.
- Oono, R., Lefèvre, E., Simha, A., & Lutzoni, F. (2015). A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). *Fungal Biology*, 119(10), 917–928.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Sanfuentes, E., & Rodriguez, J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*, 33, 77–86.
- Osono, T. (2006). Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(8), 701–716.
- Osono, Takashi. (2008). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. *Mycologia*, 100(3), 387–391.
- Palmer, M. A., Stewart, E. L., & Wingfield, M. J. (1987). Variation Among Isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States. *Phytopathology*, 77(6), 944–948.
- Paoletti, E., Danti, R., & Strati, S. (2001). Pre- and post-inoculation water stress affects *Sphaeropsis sapinea* canker length in *Pinus halepensis* seedlings. *Forest Pathology*, 31(4), 209–218.
- Paul, A. R. (1971). *Pyrenophora tetrarrhenae* sp. nov., *Drechslera tetrarrhenae* sp. nov., and *D. biseptata* on *Ehrharteae* in Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 56(2), 261–266.
- Pawłowska, J., Wilk, M., Śliwińska-Wyrzychowska, A., Mętrak, M., & Wrzosek, M. (2014). The diversity of endophytic fungi in the above-ground tissue of two *Lycopodium* species in Poland. *Symbiosis*, 63(2), 87–97.
- Pehl, L. (1995). *Lecanosticta*-Nadelbräune – Eine neue Kiefernkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenbl. Deutscher Pflanzenschutzdienst*, 47, 305–309.
- Perelló, A., Simón, M. R., & Arambarri, A. M. (2002). Interactions between Foliar Pathogens and the Saprophytic Microflora of the Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phylloplane. *Journal of Phytopathology*, 150(4–5), 232–243.
- Peršoh, D. (2013). Factors shaping community structure of endophytic fungi—evidence from the *Pinus-Viscum*-system. *Fungal Diversity*, 60(1), 55–69. Zugegriffen: 14. Januar 2016
- Peršoh, D., Melcher, M., Flessa, F., & Rambold, G. (2010). First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus sylvestris*. *Fungal Biology*, 114(7), 585–596.
- Peters, S., Draeger, S., Aust, H.-J., & Schulz, B. (1998). Interactions in Dual Cultures of Endophytic Fungi with Host and Nonhost Plant Calli. *Mycologia*, 90(3), 360–367.
- Peterson, G. W. (1981). *Diplodia* Blight of Pines. <http://na.fs.fed.us/spfo/pubs/fidls/diplodia/diplodiafidl.htm>. Zugegriffen: 7. Oktober 2016
- Petrini, L. E., & Müller, E. (1986). Haupt- und Nebenfruchtformen europäischer *Hypoxylon*-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) und verwandter Pilze. *Mycologia Helvetica*, 1(7), 501–627.

- Petrini, L. E., & Petrini, O. (1985). Xylariaceous Fungi as Endophytes. *Sydowia, Annales Mycologici Ser. II., Vol. 38: 216-234.*
- Petrini, L. E., & Petrini, O. (2005). Morphological studies in *Rosellinia* (Xylariaceae): the first step towards a polyphasic taxonomy. *Mycological Research, 109*(5), 569–580.
- Petrini, L. E., & Rogers, J. D. (1986). A summary of the *Hypoxylon serpens* complex. *Mycotaxon (USA), 26*, 401–436.
- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. In J. H. Andrews & S. S. Hirano (Hrsg.), *Microbial Ecology of Leaves* (S. 179–197). New York: Springer.
- Petrini, O., & Fisher, P. (1988). A Comparative Study of Fungal Endophytes in Xylem and Whole Stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society, 91*, 233–238.
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L., & Viret, O. (1992). Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins, 1*(3), 185–196.
- Petrini, O., Stone, J., & Carroll, F. E. (1982). Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Canadian Journal of Botany, 60*(6), 789–796.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology, 76*, 51–167.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., & Hyde, K. D. (2001). Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand*. *Mycological Research, 105*(12), 1508–1513.
- pilzbestimmer.de. (2017). *Desmazierella acicola* - Kiefernadel-Haarbecherchen. <http://www.pilzbestimmer.de/Detailed/17384.html>. Zugegriffen: 29. Juni 2017
- Pinto, P. M., Alonso, J. A. P., Fernández, V. P., & Casero, J. J. D. (2006). Fungi Isolated from Diseased Nursery Seedlings in Spain. *New Forests, 31*(1), 41–56.
- Piou, D., Chandelier, P., & Morelet, M. (1991). *Sphaeropsis sapinea*, un nouveau problème sanitaire des Pins en France. *Revue forestière française, 43*(3), 203–213.
- Pirttilä, A. M., Pospiech, H., Laukkanen, H., Myllylä, R., & Hohtola, A. (2003). Two Endophytic Fungi in Different Tissues of Scots Pine Buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microbial Ecology, 45*(1), 53–62.
- Popp, M., & Richter, A. (1998). Ecophysiology of Xylem-Tapping Mistletoes. In H.-D. Behnke, K. Esser, J. W. Kadereit, U. Lüttge, & M. Runge (Hrsg.), *Progress in Botany* (Bd. 59, S. 659–674). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Powell, W. A. (1995). Vegetative Incompatibility and Mycelial Death of *Cryphonectria parasitica* Detected with a pH Indicator. *Mycologia, 87*(5), 738–741.
- Prihatini, I., Glen, M., Wardlaw, T. J., & Mohammed, C. L. (2016). Diversity and identification of fungi associated with needles of *Pinus radiata* in Tasmania. *Southern Forests: a Journal of Forest Science, 78*(1), 19–34.
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D., & Jeewon, R. (2007). A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. *Microbial Ecology, 53*(4), 579–590.
- Przybył, K., Karolewski, P., Oleksyn, J., Labeledzki, A., & Reich, P. B. (2008). Fungal diversity of Norway spruce litter: effects of site conditions and premature leaf fall caused by bark beetle outbreak. *Microbial Ecology, 56*(2), 332–340.
- Punithalingam, E. (1979). *Phomopsis viticola*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(635).
- Punithalingam, E. (1990). *Phomopsis cotoneastri*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(1018).

- Qadri, M., Rajput, R., Abdin, M. Z., Vishwakarma, R. A., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2014). Diversity, Molecular Phylogeny, and Bioactive Potential of Fungal Endophytes Associated with the Himalayan Blue Pine (*Pinus wallichiana*). *Microbial Ecology*, 67(4), 877–887.
- Ragazzi, A., Moricca, S., Capretti, P., Dellavalle, I., & Turco, E. (2003). Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. *Forest Pathology*, 33(1), 31–38.
- Rajala, T., Velmala, S. M., Tuomivirta, T., Haapanen, M., Müller, M., & Pennanen, T. (2013). Endophyte communities vary in the needles of Norway spruce clones. *Fungal Biology*, 117(3), 182–190.
- Ramsfield, T. D., Bentz, B. J., Faccoli, M., Jactel, H., & Brockerhoff, E. G. (2016). Forest health in a changing world: effects of globalization and climate change on forest insect and pathogen impacts. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 89(3), 245–252.
- Rappaz, F. (1987). Taxonomie et nomenclature de *Diatrype stigma*, *D. decorticata* et *D. undulata* (Diatrypaceae, Ascomycetes). *Mycotaxon*, 30, 209–219.
- Rees, A. A., & Webber, J. F. (1988). Pathogenicity of *Sphaeropsis sapinea* to seed, seedlings and saplings of some central American pines. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(2), 273–277.
- Regliński, T., Rodenburg, N., Taylor, J. T., Northcott, G. L., Ah Chee, A., Spiers, T. M., & Hill, R. A. (2012). *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. *Forest Pathology*, 42(1), 75–78.
- Reid, N., Yan, Z., & Fittler, J. (1994). Impact of mistletoes (*Amyema miquelii*) on host (*Eucalyptus blakelyi* and *Eucalyptus melliodora*) survival and growth in temperate Australia. *Forest Ecology and Management*, 70(1–3), 55–65.
- Richardson, D. M. (2000). *Ecology and Biogeography of Pinus*. 527 Seiten. Cambridge University Press.
- Rigling, A., Bräker, O., Schneiter, G., & Schweingruber, F. (2002). Intra-annual tree-ring parameters indicating differences in drought stress of *Pinus sylvestris* forests within the Erico-Pinion in the Valais (Switzerland). *Plant Ecology*, 163(1), 105–121.
- Rigling, A., & Cherubini, P. (1999). Wieso sterben die Waldföhren im «Telwald» bei Visp? Eine Zusammenfassung bisheriger Studien und eine dendroökologische Untersuchung. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen*, 150(4), 113–131.
- Rigling, A., Eilmann, B., Koechli, R., & Dobbertin, M. (2010). Mistletoe-induced crown degradation in Scots pine in a xeric environment. *Tree Physiology*, 30(7), 845–852.
- Rigling, D., Heiniger, U., & Hohl, H. (1989). Reduction of Laccase Activity in DsRna-Containing Hypovirulent Strains. *Phytopathology*, 79(2), 219–223.
- Rishbeth, J. (1951). Observations on the Biology of *Fomes annosus*, with Particular Reference to East Anglian Pine Plantations II. Spore Production, Stump Infection, and Saprophytic Activity in Stumps. *Annals of Botany*, 15(1), 1–22.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330.
- Rogers, J. D., Ju, Y.-M., & Adams, M. J. (2002). Home of the *Xylariaceae*. <http://mycology.sinica.edu.tw/Xylariaceae/frames.asp?qrySectionName=HypoXylon&qryIDstring=h075&qryPart=t>. Zugegriffen: 8. November 2016
- Rollinger, J. L., & Langenheim, J. H. (1993). Geographic Survey of Fungal Endophyte Community Composition in Leaves of Coastal Redwood. *Mycologia*, 85(2), 149–156.

- Romeralo, C., Diez, J. J., & Santiago, N. F. (2012). Presence of fungi in Scots pine needles found to correlate with air quality as measured by bioindicators in northern Spain. *Forest Pathology*, 42(6), 443–453.
- Romeralo, C., Santamaria, O., Pando, V., & Diez, J. J. (2015a). Fungal endophytes reduce necrosis length produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* seedlings. *Biological Control*, 80, 30–39.
- Rossmann, A. Y., Castlebury, L. A., Farr, D. F., & Stanosz, G. R. (2008). *Sirococcus conigenus*, *Sirococcus piceicola* sp. nov. and *Sirococcus tsugae* sp. nov. on conifers: anamorphic fungi in the Gnomoniaceae, Diaporthales. *Forest Pathology*, 38(1), 47–60.
- Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T., & Jones, E. B. G. (2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*. *Thailand. Fungal Divers*, 33, 139–161.
- Saikkonen, K. (2007). Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 67–74.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 319–343.
- Samson, R. A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2010). *Food and indoor fungi* (Bd. 2). 390 Seiten. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F., & McCray, E. B. (2015). *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. Zugegriffen: 13. Februar 2015
- Samuels, G. J., & Hallett, I. C. (1983). *Microdochium stoveri* and *Monographella stoveri*, new combinations for *Fusarium stoveri* and *Micronectriella stoveri*. *Transactions of the British Mycological Society*, 81(3), 473–483.
- Sánchez Márquez, S., Bills, G. F., & Zabalgoceazcoa, I. (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*, 27, 171–195.
- Sangüesa-Barreda, G., Linares, J. C., & Camarero, J. J. (2012). Mistletoe effects on Scots pine decline following drought events: insights from within-tree spatial patterns, growth and carbohydrates. *Tree Physiology*, 32(5), 585–598.
- Santamaria, O., González, M. A., Pajares, J. A., & Diez, J. J. (2007). Effect of fungicides, endophytes and fungal filtrates on in vitro growth of Spanish isolates of *Gremmeniella abietina*. *Forest Pathology*, 37(4), 251–262.
- Santamaria, O., Smith, D. R., & Stanosz, G. R. (2012). Interaction between *Diplodia pinea* or *Diplodia scrobiculata* and fungal endophytes isolated from pine shoots. *Canadian Journal of Forest Research*, 42(10), 1819–1826.
- Santini, A., Pepori, A., Ghelardini, L., & Capretti, P. (2008). Persistence of some pine pathogens in coarse woody debris and cones in a *Pinus pinea* forest. *Forest Ecology and Management*, 256(3), 502–506.
- Sanz-Ros, A. V., Müller, M. M., San Martín, R., & Diez, J. J. (2015). Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in northern Spain. *Fungal Biology*, 119(10), 870–883.
- Schlechte, G. (1986). *Holzbewohnende Pilze: 240 Arten in Farbe*. 213 Seiten + 13 Farbtafel Beil. Hamburg: Jahn u. Ernst.
- Schröder, T. (2004). Der Kiefernholz-nematode, *LWF aktuell*(45), 23–24.
- Schubert, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C. F., Zalar, P., Hoog de, G. S. & Crous, P. W. (2007). Biodiversity in the

- Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*, 58, 105–156.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661–686.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(09), 996–1004.
- Schulz, B., Guske, S., Dammann, U., & Boyle, C. (1998). Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis*, 25(1–3), 213–227.
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andree, N., & Schobert, M. (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, 109(1), 39–45.
- Schumacher, J. (2012). *Auftreten und Ausbreitung neuartiger Baumkrankheiten in Mitteleuropa unter Berücksichtigung klimatischer Aspekte*. 153 Seiten. Stuttgart: Ulmer.
- Schwerdtfeger, F. (1981). *Die Waldkrankheiten: ein Lehrbuch der Forstpathologie und des Forstschutzes* (4., neubearb. Aufl.). 486 Seiten. Hamburg [u.a.]: Parey.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana: University of Illinois Press.
- Shoemaker, R. A. (1962). *Drechslera* Ito. *Canadian Journal of Botany*, 40(6), 809–836.
- Short, D. P. G., Gurung, S., Gladieux, P., Inderbitzin, P., Atallah, Z. K., Nigro, F., Li, G., Benlioglus, S. & Subbarao, K. V. (2015). Globally invading populations of the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae* are dominated by multiple divergent lineages. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2824–2840.
- Sieber, T. (1988). Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden und geschädigten Fichten (*Picea abies* [L.] Karsten). *European Journal of Forest Pathology*, 18(6), 321–342.
- Sieber, T. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 75–89.
- Sieber, T., Rys, J., & Holdenrieder, O. (1999). Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *uncinata*. *Mycological Research*, 103(3), 306–310.
- Sinclair, J. B. (1991). Latent Infection of Soybean Plants and Seeds by Fungi. *Plant Disease*, 75(3), 220–224.
- Sinclair, W., & Lyon, H. H. (2005). *Diseases of Trees and Shrubs, Second Edition* (2. Aufl.). 660 Seiten. Ithaca: Comstock Publishing Associates.
- Sivanesan, A., & Holliday, P. (1971). *Khuskia oryzae*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(311).
- Sivanesan, A., & Holliday, P. (1972). *Xylaria polymorpha*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(335).
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 90–106.
- Smerlis, E. (1970). Notes on *Sydowia polyspora*. *Canadian Journal of Botany*, 48(9), 1613–1615.
- Smith, E. P., & van Belle, G. (1984). Nonparametric Estimation of Species Richness. *Biometrics*, 40(1), 119–129.
- Smith, H. (2001). *Biology of Botryosphaeria Dothidea and Sphaeropsis Sapinea as Endophytes of Eucalypts and Pines in South Africa* (PhD thesis). 111 Seiten. University of Pretoria.

- Smith, H., Wingfield, M. J., & Coutinho, T. A. (2002). The role of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in post-hail associated die-back of *Pinus patula*. *Forest Ecology and Management*, 164(1–3), 177–184.
- Sogonov, M. V., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Mejía, L. C., & White, J. F. (2008). Leaf-inhabiting genera of the *Gnomoniaceae*, *Diaporthales*. *Studies in Mycology*, 62, 1–77.
- Sogonov, M. V., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., & White, J. F. (2007). The type species of *Apiognomonia*, *A. veneta*, with its *Discula* anamorph is distinct from *A. errabunda*. *Mycological Research*, 111(6), 693–709.
- Spellmann, H., Albert, M., Schmidt, M., Suttmöller, J., & Overbeck, M. (2011). Waldbauliche Anpassungsstrategien für veränderte Klimaverhältnisse. *AFZ-DerWald*, 66(11), 19–23.
- Stadler, Marc, Læssøe, T., Fournier, J., Decock, C., Schmieschek, B., Tichy, H.-V., & Peršoh, D. (2014). A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (*Xylariaceae*). *Studies in Mycology*, 77(1), 1–143.
- Stadler, Marc, Quang, D. N., Tomita, A., Hashimoto, T., & Asakawa, Y. (2006). Changes in secondary metabolism during stomatal ontogeny of *Hypoxyylon fragiforme*. *Mycological Research*, 110(7), 811–820.
- Stadler, Martin, & Tiedemann von, A. (2014). Biocontrol potential of *Microsphaeropsis ochracea* on microsclerotia of *Verticillium longisporum* in environments differing in microbial complexity. *BioControl*, 59(4), 449–460.
- Stanosz, G. R., Blodgett, J. T., Smith, D. R., & Kruger, E. L. (2001). Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist*, 149(3), 531–538.
- Stanosz, G. R., Smith, D. R., & Albers, J. S. (2005). Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries. *Forest Pathology*, 35(4), 233–244.
- Stanosz, G. R., Smith, D. R., Guthmiller, M. A., & Stanosz, J. C. (1997). Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in Asymptomatic Shoots of Red and Jack Pines. *Mycologia*, 89(4), 525–530.
- Stanosz, G. R., Swart, W. J., & Smith, D. R. (1999). RAPD marker and isozyme characterization of *Sphaeropsis sapinea* from diverse coniferous hosts and locations. *Mycological Research*, 103(9), 1193–1202.
- Stanosz, G. R., Trobaugh, J., Guthmiller, M. A., & Stanosz, J. C. (2004). *Sphaeropsis* shoot blight and altered nutrition in red pine plantations treated with paper mill waste sludge. *Forest Pathology*, 34(4), 245–253.
- Steyaert, R. L. (1949). Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). *Bulletin du Jardin botanique de l'État a Bruxelles*, 19(3), 285–347.
- Stichgel, A. M., Figuera, L., Cano, J., & Guarro, J. (2002). New species of *Thielavia*, with a molecular study of representative species of the genus. *Mycological Research*, 106(8), 975–983.
- Strømeng, G. M., & Stensvand, A. (2011). *Godronia* canker (*Godronia cassandrae* f.sp. *vaccinii*) in highbush blueberry. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 35–41.
- Summerbell, R. C. (1993). The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology. *Journal of clinical microbiology*, 31(3), 572–577.
- Suryanarayanan, T. (2013). Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecology*, 6(6), 561–568.

- Suryanarayanan, T., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., & Gopalan, V. (2012). Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*, 54(1), 19–30.
- Suryanarayanan, T., Venkatesan, G., & Murali, T. (2003). Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. *Current Science*, 85(4), 489–493.
- Sutton, B. C., & Dyko, B. J. (1989). Revision of *Hendersonula*. *Mycological Research*, 93(4), 466–488.
- Sutton, B. C., & Waterston, J. M. (1970). *Sydowia polyspora*, *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*(228), 1–2.
- Swart, W. J., & Wingfield, M. J. (1991). Biology and Control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* Species in South Africa. *Plant Disease*, 75, 761–766.
- Swart, W. J., Wingfield, M. J., & Knox-Davies, P. S. (1987b). Factors associated with *Sphaeropsis sapinea* infection of pine trees in South Africa. *Phytophylactica*, 19, 505–510.
- Swart, W. J., Wingfield, M. J., & Knox-Davies, P. S. (1987a). Selective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology*, 77(10), 1387–1389.
- Swart, W. J., Wingfield, M. J., & Knox-Davies, P. S. (1988). Relative susceptibilities to *Sphaeropsis sapinea* of six *Pinus* spp. cultivated in South Africa. *Forest Pathology*, 18(3-4), 184–189.
- Talgø, V., Chastagner, G., Thomsen, I. M., Cech, T., Riley, K., Lange, K., Klemsdal, S. S., & Stensvand, A. (2010). *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.). *Fungal Biology*, 114(7), 545–554.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tao, G., Liu, Z. Y., Hyde, K. D., Lui, X. Z., & Yu, Z. N. (2008). Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (*Orchidaceae*). *Fungal Diversity*, 33, 101–122.
- Taylor, J. E., Hyde, K. D., & Jones, E. B. G. (1999). Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*, 142(2), 335–346.
- Terhonen, E., Marco, T., Sun, H., Jalkanen, R., Kasanen, R., Vuorinen, M., & Asiegbu, F. (2011). The effect of latitude, season and needle-age on the mycota of Scots Pine (*Pinus sylvestris*) in Finland. *Silva Fenn*, 45, 301–317.
- Thabeet, A., Vennetier, M., Gadbin-Henry, C., Denelle, N., Roux, M., Caraglio, Y., & Vila, B. (2009). Response of *Pinus sylvestris* L. to recent climatic events in the French Mediterranean region. *Trees*, 23(4), 843–853.
- Thorn, R. G., Reddy, C. A., Harris, D., & Paul, E. A. (1996). Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Applied and environmental microbiology*, 62(11), 4288–4292.
- Thünen-Institut. (2014). Dritte Bundeswaldinventur - Ergebnisdatenbank. [https://bwi.info/inhalt1.3.aspx?Text=1.04%20Baumartengruppe%20\(rechnerischer%20Reinbestand\)&prrolle=public&prlnv=BWI2012&prKapitel=1.04](https://bwi.info/inhalt1.3.aspx?Text=1.04%20Baumartengruppe%20(rechnerischer%20Reinbestand)&prrolle=public&prlnv=BWI2012&prKapitel=1.04). Zugriffen: 7. März 2016
- Tong-Kwee, L., & Keng, T. B. (1990). Antagonism in vitro of *Trichoderma* species against several basidiomycetous soil-borne pathogens and *Sclerotium rolfsii*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 97(1), 33–41.

- Tsopelas, P., Angelopoulos, A., Economou, A., & Soulioti, N. (2004). Mistletoe (*Viscum album*) in the fir forest of Mount Parnis, Greece. *Forest Ecology and Management*, 202(1–3), 59–65.
- Tubeuf, K. F. von. (1889). *Pestalotia conorum-piceae*. *Bot. Cent.*, 10(39), 134.
- Unterseher, M., Peršoh, D., & Schnittler, M. (2013). Leaf-inhabiting endophytic fungi of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. *Fungal Diversity*, 60(1), 43–54.
- Unterseher, M., Reiher, A., Finstermeier, K., Otto, P., & Morawetz, W. (2007). Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress*, 6(3), 201–212.
- Vacchiano, G., Garbarino, M., Mondino, E. B., & Motta, R. (2012). Evidences of drought stress as a predisposing factor to Scots pine decline in Valle d'Aosta (Italy). *European Journal of Forest Research*, 131(4), 989–1000.
- Vannini, A., Lucero, G., Anselmi, N., & Vettraino, A. M. (2009). Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. *Forest Pathology*, 39(1), 8–14.
- Vannini, A., & Valentini, R. (1994). Influence of water relations on *Quercus cerris*–*Hypoxylon mediterraneum* interaction: a model of drought-induced susceptibility to a weakness parasite. *Tree Physiology*, 14(2), 129–139.
- Verkley, G. J. M. (1999). A Monograph of the Genus *Pezicula* and Its Anamorphs. *Studies in Mycology*, 44, 1–180.
- Verkley, G. J. M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., & Stielow, J. B. (2014). Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32, 25–51.
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., & Neumann, P.-J. (2000). Susceptibility of cones and seeds to fungal infection in a pine (*Pinus* spp.) collection. *Forest Pathology*, 30(6), 305–320.
- Wang, W., Peng, C., Kneeshaw, D. D., Larocque, G. R., & Luo, Z. (2012). Drought-induced tree mortality: ecological consequences, causes, and modeling. *Environmental Reviews*, 20(2), 109–121.
- Wang, Y., & Guo, L. (2007). A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Canadian Journal of Botany*, 85(10), 911–917.
- Waterman, A. M. (1943). *Diplodia pinea* the cause of a disease of hard Pines. *Phytopathology*, 33, 1018–31.
- Watson, D. M. (2001). Mistletoe—A Keystone Resource in Forests and Woodlands Worldwide. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 219–249.
- Weber, E. (2002). The *Lecythophora-Coniochaeta* complex: I. Morphological studies on *Lecythophora* species isolated from *Picea abies*. *Nova Hedwigia*, 74(1–2), 159–185.
- Wet, J. de, Burgess, T. I., Slippers, B., Preisig, O., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2003). Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research*, 107(5), 557–566.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Hrsg.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (S. 315–322). New York: Academic Press.

- Whyte, G., Howard, K., Hardy, G. E. S. J., & Burgess, T. I. (2016). The Tree Decline Recovery Seesaw; a conceptual model of the decline and recovery of drought stressed plantation trees. *Forest Ecology and Management*, 370, 102–113.
- Williamson, B. (1994). Latency and quiescence in survival and success of fungal plant pathogens. *Ecology of plant pathogens*, 187–207.
- Wilson, D., & Carroll, G. C. (1994). Infection Studies of *Discula quercina*, an Endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia*, 86(5), 635–647.
- Wingfield, M. J., & Knox-Davies, P. S. (1980). Observations on diseases in pine and eucalyptus plantations in South Africa. *Phytophylactica*, 12(2), 57–63.
- Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., & Hüttermann, A. (Hrsg.). (1998). *Heterobasidion annosum: biology, ecology, impact and control*. 589 Seiten. Wallingford: CAB International.
- Wyk van, M., Al Adawi, A. O., Khan, I. A., Deadman, M. L., Al Jahwari, A. A., Wingfield, B. D., Ploetz, R., & Wingfield, M. J. (2007). *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. *Fungal Divers*, 27, 213–230.
- Yuan, Z., & Verkley, G. J. M. (2015). *Pezicula neosporulosa* sp. nov. (Helotiales, Ascomycota), an endophytic fungus associated with *Abies* spp. in China and Europe. *Mycoscience*, 56(2), 205–213.
- Zamora, P., Martínez-Ruiz, C., & Diez, J. J. (2008). Fungi in needles and twigs of pine plantations from northern Spain. *Fungal Diversity*, 30, 171–184.
- Zare, R., & Games, W. (2003). *Lecanicillium psalliotae*, CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria(1568).
- Zeier, J. (2005). Age-dependent variations of local and systemic defence responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(1–2), 30–39.
- Zhang, N., Castlebury, L. A., Miller, A. N., Huhndorf, S. M., Schoch, C. L., Seifert, K. A., Rossmann, A. Y., Rogers, J. D., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., & Sung, G. H. (2006). An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98(6), 1076–1087.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 7(1–2), 203–214.
- Zhao, Y.-J., Hosaka, K., & Hosoya, T. (2016). Taxonomic re-evaluation of the genus *Lambertella* (Rutstroemiaceae, Helotiales) and allied stroma-forming fungi. *Mycological Progress*, 15(12), 1215–1228.
- Zuber, D. (2004). Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(3), 181–203.
- Zwolinski, J. B., Swart, W. J., & Wingfield, M. J. (1990b). Intensity of dieback induced by *Sphaeropsis sapinea* in relation to site conditions. *European journal of forest pathology*, 20(3), 167–174.
- Zwolinski, J. B., Swart, W. J., & Wingfield, M. J. (1990a). Economic impact of a post-hail outbreak of dieback induced by *Sphaeropsis sapinea*. *European Journal of Forest Pathology*, 20(6–7), 405–411.
- Zwolinski, J. B., Swart, W. J., & Wingfield, M. J. (1995). Association of *Sphaeropsis sapinea* with insect infestation following hail damage of *Pinus radiata*. *Forest Ecology and Management*, 72(2–3), 293–298.

7. Anhang

Index fungorum

<i>Acremonium</i> sp.....	76, 83, 108
<i>Alternaria alternata</i>	19, 20, 76, 81, 106, 140
<i>Alternaria infectoria</i>	76
<i>Alternaria</i> sp.	56, 57, 76, 82, 107, 121, 166
<i>Apiognomonia</i> sp.1	76, 84, 108
<i>Apiognomonia</i> sp.2.....	77, 84, 109
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	76, 83, 93, 108
<i>Ascomycet</i> 1	77, 82
<i>Ascomycet</i> 2.....	76, 83
<i>Ascomycet</i> 3.....	76, 83
<i>Aspergillus</i>	52, 73
<i>Aspergillus niger</i>	19
<i>Aureobasidium pullulans</i>	19, 147, 169, 170
<i>Beauveria bassiana</i>	76, 82, 107
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	68, 76, 82, 97, 98, 107
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	77, 82, 107
<i>Botrytis cinerea</i>	77, 82, 107
<i>Camarosporium brabeji</i>	45, 77, 82, 107
<i>Cenangium ferruginosum</i>	16, 64, 74
<i>Chaetomium</i>	19, 45, 76, 81, 82, 106, 107, 121, 158, 168
<i>Chaetomium</i> sp.2	56, 57, 76, 82, 107, 166
<i>Chromelosporium carneum</i>	76, 82, 107
<i>Cladosporium</i>	19, 20, 76, 82, 83, 104, 107, 140
<i>Coniochaeta ligniaria</i>	77, 82, 107
<i>Coprinellus</i> sp.....	77, 84, 109
<i>Daldinia childiae</i>	77, 82, 107
<i>Daldinia concentrica</i>	77, 82, 107, 121
<i>Desmazierella acicola</i>	76, 81, 106
<i>Diaporthe</i> sp.1	76, 81, 106
<i>Diaporthe</i> sp.2	76, 81, 106
<i>Diaporthe</i> sp.3	76, 82, 107
<i>Diaporthe</i> sp.4	76, 84, 108
<i>Dothistroma septosporum</i>	16
<i>Drechslera</i> sp.	76, 81, 106
<i>Epicoccum nigrum</i>	20, 55, 76, 81, 106
<i>Fusarium</i> sp.	76, 81, 106
<i>Gibberella circinata</i>	16
<i>Gnomoniaceae</i> sp.	76, 83, 108
<i>Gremmeniella abietina</i>	16, 169
<i>H. annosum</i>	14, 126, 129
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	76, 82, 107
<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	76, 83, 108
<i>Jugulospora rotula</i>	76, 83, 108
<i>Lambertella</i> sp.	76, 83, 108
<i>Lecanicillium psalliotae</i>	76, 81, 106
<i>Lecanosticta acicola</i>	16
<i>Lecythophora</i> sp. 1	76, 82, 107

<i>Lecythophora</i> sp.2	76, 82, 107
<i>Leotiomyces</i> sp.....	77, 84, 109
<i>M. olivacea</i>	100, 101, 102, 116, 118, 119
<i>Microdochium nivale</i>	76, 83, 108
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	76
<i>Nemania diffusa</i>	76, 81, 106
<i>Nemania serpens</i>	76, 83, 108
<i>Nigrospora oryzae</i>	76, 81, 106
<i>Nigrospora</i> sp.	77, 82, 107
<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	76, 83, 108
<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	45, 76, 83, 108
<i>Penicillium</i>	19, 20, 52, 73, 76, 83, 108, 144, 169
<i>Peniophora pini</i>	76, 83, 108
<i>Periconia</i> sp.....	77, 84, 109
<i>Pestalotiopsis</i> sp.1	76, 84, 108
<i>Pestalotiopsis</i> sp.2.....	77, 84, 109
<i>Pezicula cinnamomea</i>	76, 84, 109
<i>Pezicula eucrita</i>	56, 57, 76, 83, 108, 157, 166
<i>Pezicula neosporulosa</i>	56, 57, 76, 84, 109
<i>Pezicula</i> sp.1	76, 84, 108
<i>Pezicula</i> sp.3	77, 84
<i>Peziza varia</i>	77, 84, 109
<i>Pezizomyces</i> sp.1	76, 81, 106, 109
<i>Pezizomyces</i> sp.2.....	77, 84
<i>Phacidium lacerum</i>	76, 83, 108
<i>Phoma eupyrena</i>	76, 82, 107
<i>Phoma</i> sp.1	76, 83, 108
<i>Phoma</i> sp.2	76, 83, 108
<i>Phoma</i> sp.3	77, 84, 109
<i>Pleosporaceae</i> sp.	77, 84, 109
<i>Podospora curvicolla</i>	76, 83, 108
<i>Preussia</i> sp.1	76, 77, 83, 84, 108
<i>Pyronema domesticum</i>	77, 82, 107, 121
<i>Rosellinia</i> sp.1	76, 81, 106
<i>Rosellinia</i> sp.2	76, 82, 107
<i>S. polyspora</i>	100, 101, 102, 116, 119
<i>S. sapinea</i> ... 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 23, 40, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 63, 64, 72, 75, 90, 91, 96, 102, 116, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 129, 131, 132, 134, 140, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166	
<i>Sordaria fimicola</i>	56, 76, 81, 106, 121
<i>Sordaria</i> sp.	76, 81, 106, 121
<i>Sordariales</i> sp.....	76, 81
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	1, 2, 76, 81, 106
<i>Sydowia polyspora</i>	76, 81, 106, 165
<i>Trichocladium</i> sp.	76, 82, 107
<i>Trichoderma</i>	19, 20, 56, 57, 77, 80, 82, 107, 121, 123, 166, 167, 168
<i>Truncatella conorum-piceae</i>	46, 52, 59, 63, 64, 68, 74, 76, 77, 78, 79, 81, 88, 106, 111, 116, 117, 119, 135, 136, 148, 156, 165, 172
<i>Truncatella</i> sp.2	76, 83, 108
<i>Umbelopsis isabellina</i>	76, 83, 108
<i>Xylaria longipes</i>	76, 81, 106

<i>Xylaria polymorpha</i>	76, 81, 106
<i>Xylaria</i> sp.1.....	77, 82, 107
<i>Xylaria</i> sp.2.....	76, 82
<i>Xylaria</i> sp.3.....	76, 83

Abkürzungsverzeichnis

BHD	Brusthöhendurchmesser	NCBI	National Center for Biotechnology Information
BMELV	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft	NN	Normal Null
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit	NW-FVA	Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt
BZE	Bodenzustandserhebung	MYP	Malt yeast Peptone
ca.	circa	OA	Oatmealagar
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures	OTU	Operational taxonomic unit
cf.	Conferre	PBA	Pinebarkagar
CHA	Cherryagar	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
cm	Zentimeter	PDA	Potato dextrose agar
d	Tag	PNA	Pineneedleagar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PWA	Pinewoodagar
		RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat	rmp	Umdrehungen pro Minute
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	sec	Sekunden
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SNA	Spezieller Nährstoffarmer Agar
g	Gramm	TBE	TRIS-Borat-EDTA
h	Stunde	TE	TRIS-EDTA
ha	Hektar	VC	Vegetative Kompatibilität (Compatibility)
ITS	Internal transcribed spacer	WZE	Waldzustandserhebung
KA	Kein Auswuchs	µl	Mikroliter
KU	Keine Untersuchungen	°C	Grad Celsius
km	Kilometer	WAHYKLAS	Waldhygienische Anpassungsstrategien für das steigende Potential von Schadorganismen in vulnerablen Regionen unter Berücksichtigung von Klimawandel und zunehmenden Restriktionen

LSU	large subunit
m	Meter
MEA	Malzextraktagar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Miligramm
min	Minuten
Mio.	Millionen
MT	Morphotyp

Digitaler Anhang

Im Anhang befinden sich folgende Dateien:

- Fotos der OTUs auf MYP-Medium nach 7 und 28 Tagen Inkubation
- ITS bzw. LSU-Sequenzen der OTUs
- Wissenschaftliche Namen der OTUs
- Übersicht über die Untersuchungsflächen