

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH Nr. 12176

**Vorkommen und Charakterisierung von
dunklen, septierten Hyphomyceten (DSH)
in Gehölzwurzeln**



**Abhandlung zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften**

**vorgelegt von
Karin Ahlich Schlegel**

Zürich 1997

Zusammenfassung

Dunkle septierte Hyphomyceten (DSH) wurden aus den nicht ekto-mykorrhizierten Wurzeln folgender Gehölzarten isoliert: *Abies alba*, *Abies spectabilis*, *Picea abies*, *Pinus mugo*, *Pinus sylvestris*, *Tsuga dumosa*, *Tsuga heterophylla*, *Thuja plicata*, *Alnus rubra*, *Betula pubescens*, *Fagus sylvatica*, *Gaultheria shallon*, *Calluna vulgaris* und *Vaccinium myrtillus*. Die Wurzelproben stammten aus Europa, Nepal und Kanada. In den Wurzeln der Koniferen und Ericaceen waren DSH mit Besiedlungshäufigkeiten von meist über 70% die dominanten Pilze. In den Wurzeln von *Fagus sylvatica* war *Cryptosporiopsis radicola* am häufigsten. Die Besiedlungshäufigkeiten der DSH waren negativ mit dem Boden-pH und positiv mit der Höhe des Sammelortes über dem Meerespiegel korreliert.

In Waldböden der Schweiz wurden DSH mit Hilfe von Fichtenkeimlingen als Ködern nachgewiesen. Die Isolierungshäufigkeit war negativ mit dem Boden-pH korreliert. Ausserhalb von Wäldern wurden DSH nur aus einem der untersuchten Wiesenböden und nicht aus Ackerböden isoliert.

Die meisten DSH blieben nach dreimonatiger Inkubation auf verschiedenen Medien und unter verschiedenen Inkubationsbedingungen steril. Unter diesen Isolaten konnten 4 Morphotypen unterschieden werden, von denen nur einer über mehrere Subkulturen stabil blieb. Dieser Typ (Morphotyp 1) unterschied sich von den anderen DSH durch fehlendes oder schwach ausgebildetes Luftmycel. Nach einjähriger Inkubation bei 4°C konnte etwa ein Viertel aller DSH morphologisch als *Phialocephala fortinii* identifiziert werden. DSH vom Typ 1 sporulierten nicht.

An 192 DSH und 13 Referenzstämmen wurden Analysen der Isoenzyme MDH, LAP, G6PDH, IDH, ALD, PGM und PGI vorgenommen und es wurde die Aktivität folgender extrazellulärer Enzyme untersucht: Proteasen, Amylasen, Lipasen, Laccasen und Polyphenoloxidasen. Ausserdem wurden die Wachstumsgeschwindigkeit und die Reaktion auf verschiedene Fungizide ermittelt. Die untersuchten DSH wurden von Benomyl (ab 10 mg l⁻¹) und Thiabendazol (ab 100 mg l⁻¹) vollständig gehemmt. Gegenüber Nystatin und Cycloheximid in denselben Konzentrationen waren zumindest einige Stämme toleranter.

Die Ergebnisse der Isoenzymanalysen und der physiologischen Untersuchungen wurden getrennt voneinander und kombiniert mit Cluster- und Korrespondenzanalysen ausgewertet. Bei der Clusterbildung wurde keine strenge Abhängigkeit von der Wirtsart und vom Standort festgestellt. In jedem Cluster befanden sich DSH verschiedener Wirte und Herkünfte. Alle DSH aus Nepal waren, gemeinsam mit anderen Stämmen aus Europa und Kanada, in einem Cluster zusammengefasst.

Die Mehrzahl der Stämme vom Morphotyp 1 befanden sich stets in einem Cluster, so dass es sich bei ihnen um ein eigenes Taxon handeln könnte.

Die untersuchten DSH waren gegenüber verschiedenen Stressfaktoren weitgehend tolerant. Alle Stämme überlebten wiederholtes Gefrieren (-20°C) und Auftauen sowie eine mehrmonatige Austrocknung. Weiterhin erwiesen sie sich als sehr resistent gegenüber Nährstoffmangel. Infektionsversuche an steril angezogenen Fichtenkeimlingen ergaben keine Hinweise auf ein pathogenes Verhalten der DSH, obwohl die Keimlinge zum Teil systemisch infiziert wurden. Die Lokalisation der DSH in Fichten- und Kiefernwurzeln wurde durch Mikrotom-Dünnschnitte untersucht. DSH wurden in abgestorbenen Zellen des ehemaligen primären Cortex, des erweiterten Perizyklus, des Phellems und der Endodermis nachgewiesen.

Summary

Dark septate hyphomycetes (DSH) were isolated from non-ectomycorrhizal roots of the following hosts: *Abies alba*, *Abies spectabilis*, *Picea abies*, *Pinus mugo*, *Pinus sylvestris*, *Tsuga dumosa*, *Tsuga heterophylla*, *Thuja plicata*, *Alnus rubra*, *Betula pubescens*, *Fagus sylvatica*, *Gaultheria shallon*, *Calluna vulgaris* and *Vaccinium myrtillus*. The root samples originated from Europe, Nepal and Canada. In coniferous and ericaceous roots, DSH were the dominant fungi with a colonization frequency of over 70%. *Cryptosporiopsis radicola* occurred most frequently in the roots of *Fagus sylvatica*. The colonization frequency of DSH was negatively correlated with the soil pH, however, positively with the site's height above sea-level.

In Swiss forest soils DSH were detected using Norway-spruce seedlings as baits. The isolation frequency was correlated negatively with the soil-pH. Outside of forests, DSH were only isolated from one of the meadow soils investigated but not from agricultural soils.

Most of the DSH remained sterile after an incubation period of three months on various media and under various conditions of incubation. Among these isolates, four morphotypes could be distinguished. Only one of them remained stable for several subcultures. This type (morphotype 1) differed from other DSH by lacking or having only scarcely developed aerial mycelium. After an incubation period of one year at 4°C, about a quarter of all DSH could be identified morphologically as *Phialocephala fortinii*. DSH of type 1 do not sporulate. The isozymes MDH, LAP, G6PDH, IDH, ALD, PGM and PGI were used to analyse 192 DSH and 13 reference strains, furthermore, the activity of the following extracellular enzymes was investigated: proteases, amylases, lipases, laccases and phenoloxidases. In addition, the growth rate and the reaction towards various fungicides were determined. The investigated DSH were completely inhibited by Benomyl (above 10 mg l⁻¹) and Thiabendazole (above 100 mg l⁻¹). With regard to Nystatine and Cycloheximide (applied in same concentrations) at least some isolates showed a more tolerant reaction.

The results of the isozyme analyses and the physiological investigations were evaluated separately and combined by cluster- and correspondence analyses. With regard to the clustering, neither host- nor site-specific dependence could be made out. Each cluster showed DSH of various hosts and provenances. All the DSH originated from Nepal were combined together with other isolates originating from Europe and Canada in one cluster.

The majority of the strains of morphotype 1 were always located in one clustering, which indicates a distinct taxon.

The investigated DSH mainly tolerated various stress factors. All the isolates survived repeated freezing (-20°C) and rethawing as well as a drying out period of several months. Furthermore, they showed to be resistant towards nutrient deficiency. Infection tests on Norway spruce seedlings grown under sterile conditions did not exhibit a pathogenic behaviour of the DSH, although several seedlings were infected systemically. The localisation of the DSH in Norway spruce and pine roots was investigated by means of microtome sections. The DSH were detected in dead cells of the cortex, the expanded pericycle, the endodermis and the phellem.