

Aus dem Institut für Phytomedizin  
der Universität Hohenheim  
Fachgebiet Phytopathologie  
Prof. Dr. Ralf T. Vögele

# Feuerbrand: Charakterisierung und Bekämpfungsmaßnahmen

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Agrarwissenschaften

vorgelegt

der Fakultät Agrarwissenschaften

von

Georg Bantleon  
aus Geislingen an der Steige

2012

Die vorliegende Arbeit wurde am 14.12.2012 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2012

1. Prodekan: Prof. Dr. Markus Rodehutscord

Berichterstatter 1. Prüfer: Prof. Dr. Ralf T. Vögele

Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. Jens N. Wünsche

3. Prüfer: Prof. Dr. Wilhelm Claupein

Leiter des Prüfungskolloquiums: Prof. Dr. Gerd Weber

Ein gewisser Ekphantos aus Syrakus erklärte, es sei unmöglich, eine wahrheitsgemäße Erkenntnis von der Seinswelt zu gewinnen, wohl aber für die Art der gewonnenen Ansichten Abgrenzungen herzustellen.

Hippolytus von Rom in „Refutatio omnium haeresium“

## Inhaltverzeichnis

1	Zusammenfassung und Summary .....	1
1.1	Zusammenfassung.....	1
1.2	Summary.....	2
2	Einleitung .....	3
2.1	Die Bedeutung des Feuerbrands für den Obstbau.....	3
2.2	Der Feuerbranderreger <i>Erwinia amylovora</i> .....	4
2.3	Die Wirtspflanzen des Feuerbrands .....	5
2.4	Pathogenese, Symptome und Krankheitszyklus des Feuerbrands .....	5
2.5	Bekämpfungsmaßnahmen und Feuerbrandmanagement.....	7
2.6	Fragestellungen dieser Arbeit .....	10
3	Material und Methoden .....	12
3.1	Verwendete Computerprogramme .....	12
3.2	Verwendete Laborgeräte.....	12
3.3	Verwendete Prüfsubstanzen und Chemikalien .....	12
3.4	Pflanzenmaterial .....	14
3.5	Erregermaterial, -aufzucht und -suspension .....	15
3.6	Versuchstandorte .....	15
3.6.1	Freilandversuche.....	15
3.6.2	Klimakammer .....	16
3.7	Versuche.....	16
3.7.1	Hagel-Wirkstoff-Versuche in der Klimakammer.....	16
3.7.2	Hagel-Wirkstoff-Versuch im Freiland.....	18
3.7.3	Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung .....	18
3.7.4	Blüten-Sortentest im Freiland.....	19
3.7.5	Blüten-Sortentest in der Klimakammer.....	20
3.7.6	Hagel-Sorten-Versuch in der Klimakammer .....	20
3.7.7	Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion .....	21
3.7.8	Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm.....	21
3.8	Probenaufbereitung.....	22
3.8.1	Blütenproben.....	22
3.8.2	Triebproben.....	22

3.8.3	Stammproben.....	23
3.9	Erregernachweis per Real-Time PCR.....	23
3.10	Auswertung und Statistik.....	25
3.10.1	Allgemeines Vorgehen.....	25
3.10.2	Hagelversuche.....	25
3.10.3	Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung.....	26
3.10.4	Trieb- und Stammproben.....	26
3.10.5	Blütenproben.....	26
3.10.6	Rohdatenplot und Verteilungsplot.....	26
3.10.7	Erstellung von Regressionen und Korrelationen.....	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Wirkstofftests zur Feuerbrandregulierung.....	28
4.1.1	Hagelversuche.....	28
4.1.2	Freilandblütenversuche.....	34
4.2	Apfelsortentests zur Feuerbrandanfälligkeit.....	43
4.2.1	Blüteninokulationsversuche im Freiland und in der Klimakammer.....	43
4.2.2	Hagelversuch zur Sortentestung.....	46
4.2.3	Zusammenfassung der Sortenanfälligkeit.....	49
4.3	Pathogeneseversuche zum Feuerbrand.....	50
4.3.1	Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion.....	50
4.3.2	Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm.....	53
5	Diskussion.....	57
5.1	Wirkstofftests zur Feuerbrandregulierung.....	57
5.1.1	Hagelversuche.....	57
5.1.2	Schlussfolgerungen und Ausblick Hagelversuche.....	63
5.1.3	Freilandblütenversuche.....	64
5.1.4	Schlussfolgerungen und Ausblick Freilandblütenversuche.....	70
5.2	Apfelsortentests zur Feuerbrandanfälligkeit.....	71
5.2.1	Blüteninokulationen und Hagelversuch.....	71
5.2.2	Schlussfolgerungen und Ausblick Sorten.....	74
5.3	Pathogeneseversuche zum Feuerbrand.....	74
5.3.1	Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion.....	74

5.3.2	Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm.....	76
5.3.3	Schlussfolgerungen und Ausblick Pathogenese .....	79
6	Literaturverzeichnis .....	81
7	Anhang.....	91
7.1	Versuchspläne, Witterungsverläufe und Versuchsprotokoll der Freilandblütenversuche und Lagepläne der Klimakammerversuche.....	91
7.2	Detaillierte statistische Ergebnisse sämtlicher Versuche .....	98
7.3	Standardeichgerade für Real-Time PCR.....	104
7.4	Anhang zur Statistik .....	105
7.5	Boniturskala für Blüteninfektionen.....	106

## Abbildungsverzeichnis

Alle Abbildungen und Fotos sind vom Autor, wenn nicht anders angegeben.

Abbildung 2.1	Feuerbrandsymptome bei ‚Gala‘ Apfel an Blüte (A) und Trieb (B) und bei ‚Conference‘ Birne am gesamten Baum (C).....	3
Abbildung 2.2	Länder mit dokumentiertem Feuerbrandvorkommen auf nationaler (Kreis) oder subnationaler (Kreuz) Ebene (EPPO, 2012). .....	4
Abbildung 2.3	Krankheitszyklus des Feuerbrandes im Jahresverlauf. Modifiziert nach Olbrecht (2008) und Thomson (2000).....	7
Abbildung 2.4	Verletzungen durch Hagel. ....	8
Abbildung 3.1	Freilandversuch zur Sortentestung. ....	20
Abbildung 3.2	Stamminjektion beim Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm.....	22
Abbildung 4.1	Versuche zur Hagelsimulation. ....	28
Abbildung 4.2	Ergebnis des 1. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation. ....	29
Abbildung 4.3	Ergebnis des 2. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation. ....	30
Abbildung 4.4	Ergebnis des 3. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation. ....	31
Abbildung 4.5	Ergebnis des 4. Hagelversuches 28 Tage nach Inokulation. ....	33
Abbildung 4.6	Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2009 an zwei Standorten. ....	35
Abbildung 4.7	Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2010 an zwei Standorten. ....	36
Abbildung 4.8	Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2011 an zwei Standorten. ....	38
Abbildung 4.9	Zusammenhang zwischen Blütenbefall und Distanz zum Infektionsbaum (A) und zwischen befallenen Blüten und befallenen Trieben (B) der Freilandblütenversuche 2011. ....	39
Abbildung 4.10	Vorkommen von <i>Erwinia amylovora</i> in den Blüten der unbehandelten Parzellen am Standort Vogt während des Wirkstoffversuchs 2011.....	40
Abbildung 4.11	Vorkommen von <i>Erwinia amylovora</i> in den Blüten ausgewählter Parzellen am Standort Mühlingen während des Wirkstoffversuchs 2011.....	40
Abbildung 4.12	Befallsentwicklung verschiedener Sorten beim Blütenversuch in der Klimakammer mit Regressionskurven.....	44
Abbildung 4.13	Rohdatenplot des Blütenbefalls verschiedener Sorten. ....	46
Abbildung 4.14	Befallsentwicklung verschiedener Sorten beim Hagelversuch in der Klimakammer.....	47
Abbildung 4.15	Feuerbrandanfälligkeit verschiedener Sorten nach Hagelverletzung, bonitiert 14 Tage nach der Inokulation.....	47

Abbildung 4.16	Befallsentwicklung der Varianten mit verschiedener Konzentration der Inokulationssuspension (KbE/ml) beim Versuch in der Klimakammer.....	51
Abbildung 4.17	Blütenbefall in Abhängigkeit der unterschiedlichen Konzentrationen der Inokulationssuspensionen 14 Tage nach der Inokulation. ....	52
Abbildung 4.18	Fotos zum Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm. ....	54
Abbildung 7.1	Lageplan der Freilandblütenversuche.....	91
Abbildung 7.2	Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Vogt 2009.....	92
Abbildung 7.3	Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Mühlingen 2009.....	93
Abbildung 7.4	Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Vogt 2010.....	94
Abbildung 7.5	Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Mühlingen 2010.....	94
Abbildung 7.6	Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Vogt 2011.....	95
Abbildung 7.7	Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Mühlingen 2011.....	96
Abbildung 7.8	Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Hagelversuches in Vogt 2011.....	96
Abbildung 7.9	Lagepläne der Hagelversuche.....	97
Abbildung 7.10	Lageplan des Sortentests in der Klimakammer. ....	97
Abbildung 7.11	Lageplan des Versuchs zur unterschiedlichen Inokulationskonzentration in der Klimakammer. ....	98
Abbildung 7.12	Standardeichkurve aus 108 Standardproben von 17 analysierten Platten (Regressionsmodell $p < 0,0001$ ).....	104
Abbildung 7.13	Beschreibung der Box-Whisker-Plots bzw. Kastengrafiken. ....	105
Abbildung 7.14	Blüten der Boniturstufe 1. ....	106
Abbildung 7.15	Blüten der Boniturstufe 2. ....	106
Abbildung 7.16	Blüten der Boniturstufe 3. ....	107
Abbildung 7.17	Blüten der Boniturstufe 4. ....	107
Abbildung 7.18	Blüten der Boniturstufe 5. ....	107
Abbildung 7.19	Blüten der Boniturstufe 6. ....	108
Abbildung 7.20	Blüten der Boniturstufe 7. ....	108
Abbildung 7.21	Blüten der Boniturstufe 8. ....	108



## Tabellenverzeichnis

Alle Tabellen sind vom Autor, wenn nicht anders angegeben.

Tabelle 2.1	Wirtspflanzen von <i>Erwinia amylovora</i> der Rosengewächse (Rosaceae) mit Unterfamilien (EPPO, 2012; Momol, 2000).....	5
Tabelle 3.1	Verwendete Computerprogramme.....	12
Tabelle 3.2	Verwendete Laborgeräte. ....	12
Tabelle 3.3	Verwendete Prüfsubstanzen und Chemikalien. ....	13
Tabelle 3.4	Verwendete <i>Erwinia amylovora</i> Stämme mit Herkunft.....	15
Tabelle 3.5	Versuchsglieder Hagel-Wirkstoff-Versuche in der Klimakammer.....	17
Tabelle 3.6	Temperaturverlauf und physiologischer Zustand der Versuchspflanzen bei den Hagel-Wirkstoff-Versuchen in der Klimakammer.....	17
Tabelle 3.7	Versuchsglieder Hagel-Wirkstoff-Versuch im Freiland.....	18
Tabelle 3.8	9-Punkte Boniturskala für Feuerbrand-Blütenbefall nach Silvestri und Egger (2011). ....	20
Tabelle 3.9	Verwendetes Real-Time PCR Programm. ....	24
Tabelle 3.10	Nachweisgrenzen für <i>Erwinia amylovora</i> für die per Real-Time PCR analysierten Proben. ....	24
Tabelle 4.1	Quantifizierung und Ausbreitung von <i>Erwinia amylovora</i> in Trieben nach Hagelinokulation und Prüfmittelbehandlung.....	32
Tabelle 4.2	Tabellarische Darstellung des Blütenbefalls verschiedener Sorten 21 Tage nach der Inokulation im Freiland und in der Klimakammer.....	45
Tabelle 4.3	Quantifizierung und Ausbreitung von <i>Erwinia amylovora</i> in Trieben verschiedener Sorten nach Hagelinokulation. ....	48
Tabelle 4.4	Einstufung der sortenspezifischen Feuerbrandanfälligkeit relativ zu Gala (100 %). ....	49
Tabelle 4.5	Sortentypische Feuerbrandanfälligkeit relativ zu Gala (100 %). ....	50
Tabelle 4.6	Zellzahl pro Blüte 8 Tage nach Inokulation bei unterschiedlicher Konzentration der Inokulationssuspension. ....	51
Tabelle 4.7	Quantifizierung und Ausbreitung von <i>Erwinia amylovora</i> im Stamm nach Injektion oberhalb (A) oder unterhalb (B) der Veredelungsstelle 3, 5, 7 und 14 Tage nach Inokulation. ....	55
Tabelle 5.1	Risikoklassifizierung für Feuerbrandneueinfektionen nach einem Hagelereignis.....	59
Tabelle 7.1	Versuchsglieder der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2009. ....	92
Tabelle 7.2	Versuchsglieder der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2010. ....	93

Tabelle 7.3	Versuchsglieder der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2011. ....	95
Tabelle 7.4	Detailliertes statistisches Ergebnis des 1. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation. ....	98
Tabelle 7.5	Detailliertes statistisches Ergebnis des 2. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation. ....	99
Tabelle 7.6	Detailliertes statistisches Ergebnis des 3. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation. ....	99
Tabelle 7.7	Detailliertes statistisches Ergebnis des 4. Hagelversuches 28 Tage nach Inokulation. ....	100
Tabelle 7.8	Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2009. ....	100
Tabelle 7.9	Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2010. ....	101
Tabelle 7.10	Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2011. ....	101
Tabelle 7.11	Vorkommen von <i>Erwinia amylovora</i> in den Blüten der unbehandelten Parzellen am Standort Vogt während des Wirkstoffversuchs 2011. ....	102
Tabelle 7.12	Vorkommen von <i>Erwinia amylovora</i> in den Blüten ausgewählter Parzellen am Standort Mühlingen während des Wirkstoffversuchs 2011. ....	102
Tabelle 7.13	Logarithmische Regressionskurven für die Blütenbefallsentwicklung in der Klimakammer mit Bestimmtheitsmaß beim Sortenversuch. ....	102
Tabelle 7.14	Feuerbandanfälligkeit verschiedener Sorten bei Hagelverletzung 14 Tage nach der Inokulation. ....	103
Tabelle 7.15	Logarithmische Regressionskurven für die Befallsentwicklung bei unterschiedlicher Inokulationskonzentration beim Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion. ....	103
Tabelle 7.16	Logarithmische Regressionskurven für die Blütenbefallsentwicklung bei unterschiedlicher Inokulationskonzentration beim Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion. ....	103
Tabelle 7.17	Mittelwert und Standardfehler des Blütenbefalls in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Konzentrationen der Inokulationssuspensionen und Inokulationsmethode sowie Werte aus den Regressionsgeraden nach 14 Tage nach der Inokulation. ....	104
Tabelle 7.18	Verwendete Modelle statistisch ausgewerteter Versuche (Darstellung nach Piepho (2003)). ....	105

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
Add.	Additiv
AVG Temp	tägliche Durchschnittstemperatur
BBS	Blossom Blight Symptoms (Blütenbefallsymptome)
Bloss. Prot.	Blossom Protect
C	Cytosin
Ct	Thresold Cycle (Grenzyklus)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E. tas.	<i>Erwinia tasmaniensis</i>
EIP	Epiphytic Infection Potential (Infektionspotential)
EPPO	European Plant Protection Organisation (Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum)
g	mittleren Erdschwerebeschleunigung
G	Guanin
Gree	Greenstar
ha u. m KH	Hektar und Meter Kronenhöhe
JKI	Julius-Kühn-Institut
Juglon h. bzw. d	Juglon hell bzw. dunkel
Kanz	Kanzi
KbE	koloniebildende Einheiten
lg	Logarithmus zur Basis 10
ln	natürlicher Logarithmus zur Basis e
L TZ	Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg
m ü. NN	Höhenmeter über Normalnull
Mair	Mairac
n	Anzahl
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
p	p-Wert (Signifikanzwert eines Modells oder Parameters)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pino	Pinova
PR-Proteine	pathogenesis related proteins
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
Rewe	Rewena
RFE	relative Fluoreszenzeinheiten
ROS	Reaktive Oxygen Spezies (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
Sel. Dis.	Selecta Disperss
Serenade M. bzw A.	Serenade Max bzw. ASO
T	Thymin
TBS	Traum Blight Symptoms (Hagelbefallsymptome)
Vit+Cur	Vittafos+Curamin
Well	Wellant
10 <sup>x</sup> bzw. 1,0E+0X	10 <sup>x</sup>



# 1 Zusammenfassung und Summary

## 1.1 Zusammenfassung

*In dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse gewonnen zur Effektivität von Wirkstoffen zur Verhinderung von Feuerbrand nach Hagel und während der Blüte, zur Feuerbrandanfälligkeit moderner Apfelsorten und zur Feuerbrandpathogenese bei der Blüteninfektion und der Ausbreitung von Feuerbrandbakterien im Stamm. Hierfür wurden Labor-, Gewächshaus- und Feldversuche durchgeführt.*

Eine Möglichkeit für Neuinfektionen sind Verletzungen an Blättern nach Hagelereignissen. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die das Testen von Wirkstoffen nach simuliertem Hagel unter kontrollierten Bedingungen ermöglicht. Bisher gab es hierfür keine Methode. Pflanzen wurden verletzt und mit einer *Erwinia amylovora* Suspension besprüht. Nach 4 Stunden erfolgte die Applikation der Prüfmittel. Bonitiert wurde der optische Befall. Neben der hohen Wirksamkeit von Streptomycin zeigten drei der 13 Prüfmittel eine für die Praxis ausreichend hohe Wirkung (Juglon, LMA und Myco-Sin).

Eine weitere Möglichkeit für Neuinfektionen ist das Eindringen der Bakterien über die Blüten. Zur Testung von Wirkstoffen zur Verhinderung von Blüteninfektionen wurden Freilandversuche nach dem EPPO Versuchsstandard PP 1/166(3) durchgeführt. Ziel der Versuche war das Finden von Alternativen zum Antibiotikum Streptomycin, dessen Anwendung im Obstbau in Zukunft nicht mehr möglich sein wird. Von den 20 getesteten Prüfmitteln erreichte Streptomycin stets hohe Wirkungsgrade, ebenso Spritzfolgen mit Streptomycin. Drei Prüfmittel konnten ohne gravierende Verluste bei der Wirksamkeit Streptomycin substituieren (Antinfek, Juglon und LMA).

In den Tests zur Feuerbrandanfälligkeit verschiedener Apfelsorten wurden acht moderne Sorten in Blütentests in der Klimakammer und im Freiland untersucht. Rewena zeigte sich schwach, Mairac und Pinova mittel, Diwa, Gala, Greenstar und Kanzi hoch und Wellant sehr hoch anfällig. Die Ergebnisse aus der Klimakammer und dem Freiland decken sich.

Beim Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Anfangskonzentration der Inokulationssuspension und der Symptomausprägung in Blüten und Trieben. Bei allen Konzentrationen kam es zur Entwicklung von Symptomen, wobei mit steigender Konzentration die Schwere der Symptome zunahm. Beim Pathogeneseversuch zur Ausbreitung der Bakterien im Stamm wurden Feuerbrandbakterien mit einer Spritze in den Stamm von Apfelbäumen injiziert. Anschließend wurden Stammstücke per Real-Time PCR auf die

Erregerlast untersucht. Es konnten nur unterhalb der Injektionsstelle Bakterien nachgewiesen werden, was auf eine Ausbreitung der Bakterien im Phloem hinweist.

### 1.2 Summary

*This work provides new scientific findings on control agents for fire blight after hail and during bloom, on fire blight susceptibility of modern apple cultivars and on fire blight pathogenesis of blossom infection and of internal stem movement. Experiments were conducted in the laboratory, greenhouse and field.*

Leaf damages after hail are points of entry for new infections. Until now, there has been no method established for testing control agents after hail injury. In the method developed, plants were damaged and sprayed with a suspension of *Erwinia amylovora*. Control agents were applied 4 h after inoculation. The visual symptoms were scored. Streptomycin showed high effectivity. Of 13 agents tested, 3 showed an effectivity sufficient for practical use (Juglon, LMA und Myco-Sin).

Flowers are the main point of entry for *Erwinia amylovora*. Control agents for fire blight were tested according to EPPO standard PP 1/166(3). The goal was to identify alternatives to the antibiotic streptomycin which won't be available in fruit-growing in the future. Out of 20 agents tested, streptomycin always showed high effectivity as well as spray strategies involving streptomycin. Three agents were found to be potential substitutes for streptomycin (Antinfek, Juglon und LMA).

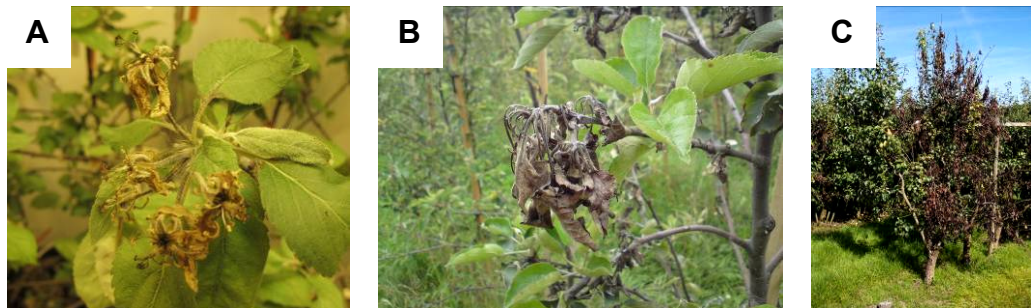
Eight modern apple cultivars were tested for their fire blight susceptibility in flower tests in the climate chamber and in the field. Rewena showed low, Mairac and Pinova medium, Diwa, Gala Greenstar and Kanzi high and Wellant very high susceptibility. The results of the climate chamber and results from field trials correspond.

A clear relation between the density of the inoculation suspension and symptom development in flower and shoot was found in pathogenesis experiments. All concentrations led to infections. Higher concentrations led to more severe symptoms. In another pathogenesis experiment bacteria were injected into the stems of apple trees. Stem tissue was analyzed for *Erwinia amylovora* using real-time PCR. Bacteria could only be found below the point of injection what favors the idea of phloem migration.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Bedeutung des Feuerbrands für den Obstbau

Der Feuerbrand ist eine Pflanzenkrankheit an Rosengewächsen, die durch das Bakterium *Erwinia amylovora* ausgelöst wird (Vanneste, 2000). Die Krankheit hat große Bedeutung, da zu ihren Wirtspflanzen die Obstarten Apfel, Birne und Quitte gehören. Bei einem Befall gleichen die optischen Symptome verbrannten Trieben, was zum Namen geführt hat (Abbildung 2.1). Wenn Bakterien in eine Pflanze gelangen, können sie dort zum Absterben einzelner Triebe oder der ganzen Pflanze führen. Es können alle oberirdischen Teile der Pflanze befallen werden (Thomson, 2000). Hierdurch entstehen große Kosten durch Ernteaufschläge sowie durch die Sanierung oder Rodung von Bäumen oder ganzen Anlagen (Bonn und van der Zwet, 2000).



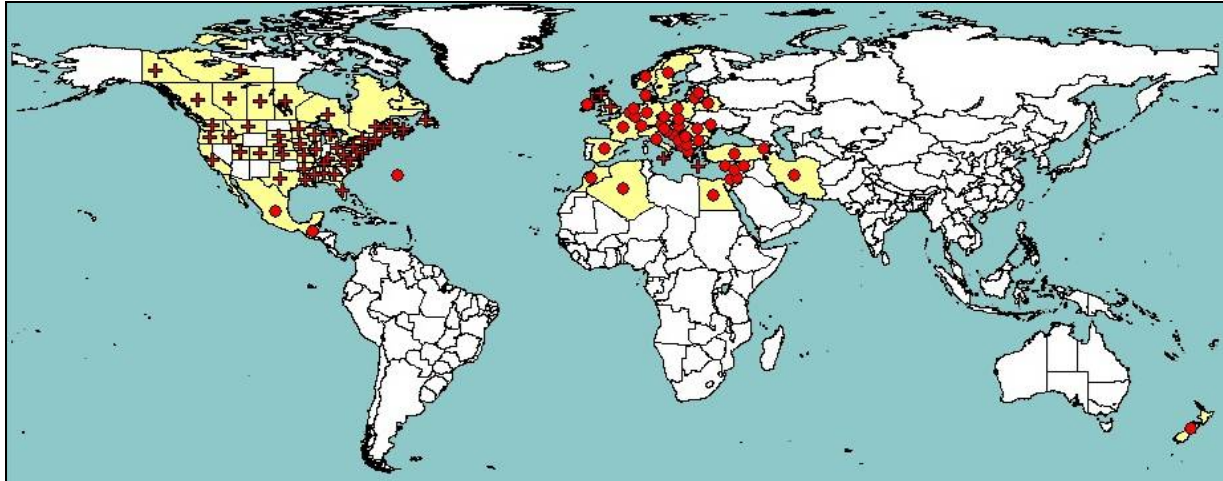
**Abbildung 2.1** Feuerbrandsymptome bei ‚Gala‘ Apfel an Blüte (A) und Trieb (B) und bei ‚Conference‘ Birne am gesamten Baum (C).

Das erste Auftreten der Krankheit wurde im 18. Jahrhundert in Nordamerika beschrieben. Von dort aus hat sich die Krankheit in allen Obstbauregionen in Nordamerika, Europa, im Mittelmeerraum und in Vorderasien, sowie in der südlichen Hemisphäre in Neuseeland ausgebreitet (Bonn und van der Zwet, 2000). Abbildung 2.2 zeigt auf einer Weltkarte Länder mit dokumentiertem Feuerbrandvorkommen. Die Ausbreitung erfolgte einerseits sukzessiv durch natürliche Vektoren und andererseits durch menschliche Aktivitäten, hauptsächlich über Handel mit Pflanzenmaterial (Bonn und van der Zwet, 2000).

Seit den 70er Jahren sind Feuerbrandfälle in Deutschland bekannt, wobei die Ausbreitung von Norden nach Süden erfolgte. Das wärmere und feuchtere Klima in Süddeutschland begünstigte die Etablierung der Krankheit (Bonn und van der Zwet, 2000). Nach ersten vereinzelten Befällen in den 80er Jahren kann man inzwischen von einem endemischen Auftreten der Krankheit im gesamten Bodenseegebiet ausgehen (Moltmann, 2005). Stärkere Befälle erfolgten in den Jahren 1993 – 1995, 1999 – 2000, 2007 und 2012 (LTZ Augustenberg, 2012; Moltmann, 2007). Die Kosten durch den Befall 2007 in Baden-Württemberg wurden auf ca. 3 Mio. € geschätzt (BMELV, 2008).

## Einleitung

Aufgrund der hohen Praxisrelevanz wurde im EU-Interreg IV Projektes „Gemeinsam gegen Feuerbrand“ von 2007 bis 2011 mit 13 Projektpartnern aus Wissenschaft und Praxis länderübergreifend im Bodenseegebiet zum Feuerbrand geforscht ("Gemeinsam gegen Feuerbrand", 2011). Das Projekt gliederte sich in die Schwerpunkte Wirkstoffe, Sorten und Kulturmaßnahmen. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen dieses Projektes angefertigt.



**Abbildung 2.2** Länder mit dokumentiertem Feuerbrandvorkommen auf nationaler (Kreis) oder subnationaler (Kreuz) Ebene (EPPO, 2012).

## 2.2 Der Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*

*Erwinia amylovora* (Burrill) (Winslow et al., 1920) ist ein gram-negatives, teilweise begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium von 0,3 µm x 1-3 µm Größe mit einem Mantel aus extrazellulären Polysacchariden. Es gehört innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae zum Genus *Erwinia* (EPPO, 2012; Paulin, 2000). Es war das erste Bakterium, das als Ursache für eine Pflanzenkrankheit bekannt wurde. Im Rahmen seiner Erforschung erfolgte die Etablierung der Bakteriologie als Teilgebiet der Phytomedizin (Griffith et al., 2003). Es bestehen mehrere serologische und molekulare Nachweisverfahren, die eine eindeutige Bestimmung der Spezies in symptomatischem und nicht symptomatischem Gewebe zulassen (EPPO, 2004).

Das Pathogen wird als Quarantäneschaderreger gelistet (EPPO, 2004). Die Vermehrung ist stark von der Temperatur abhängig. Temperaturen zwischen 18 und 33 °C begünstigen die Vermehrung, mit einem Optimum bei 28 °C (Billing, 1974; Shrestha et al., 2011). Der Stoffwechsel ist fakultativ anaerob (Paulin, 2000). Die unterschiedlichen Stämme von *Erwinia amylovora* unterscheiden sich bezüglich Virulenz, Morphologie der Kolonien, Serologie, Phagentypisierung und Antibiotikaempfindlichkeit (Momol, 2000).



## 2.3 Die Wirtspflanzen des Feuerbrands

Sämtliche Wirtspflanzen von *Erwinia amylovora* gehören zur Familie der Rosengewächse. Hier werden ca. 200 verschiedene Spezies in 40 Unterfamilien befallen (Momol, 2000). Dies liegt möglicherweise daran, dass die Rosengewächse zur Gruppe der Blütenpflanzen mit feuchter Narbe zählen, was die Besiedelung des Stigmas begünstigen kann (Thomson und Gouk, 2003). Wirtschaftliche Bedeutung hat vor allem der Befall bei Apfel, Birne und Quitte. In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten Wirtspflanzen aufgeteilt nach Obstbäumen und Zierpflanzen dargestellt.

**Tabelle 2.1** Wirtspflanzen von *Erwinia amylovora* der Rosengewächse (Rosaceae) mit Unterfamilien (EPPO, 2012; Momol, 2000).

Unterfamilie	Obstbäume	Zierpflanzen
Maloideae (Pomoideae)	<i>Cydonia oblonga</i> (Quitte) <i>Eriobotrya japonica</i> (Loquat) <i>Malus domestica</i> (Apfel) <i>Mespilus germanica</i> (Mispel) <i>Pyrus communis</i> (Birne) <i>Pyrus pyrifolia</i> (Nashi-Birne)	<i>Amelanchier</i> spp. (Felsenbirne) <i>Chaenomeles</i> spp. (Zierquitten) <i>Crataegus</i> spp. (Weißdorn) <i>Cotoneaster</i> spp. (Zwergmispeln) <i>Photinia</i> spp. (Glanzmispeln) <i>Pyracantha</i> spp. (Feuerdorn) <i>Sorbus</i> spp. (Mehlbeeren)
Rosoideae	<i>Rubus</i> spp. (Brombeere, Himbeere)	<i>Cowania</i> sp. <i>Dryas</i> sp. Geum sp. <i>Potentilla</i> sp. <i>Rosa</i> sp.
Amygdaloideae (Prunoideae)	<i>Prunus salicina</i> (Chinesische Pflaume)	
Spiraeoideae		<i>Aruncus</i> sp. (Geißbart) <i>Holodiscus</i> sp. (Schaumspiere) <i>Physocarpus</i> sp. <i>Spiraea vanhouttei</i> (Belgischer Spierstrauch)

## 2.4 Pathogenese, Symptome und Krankheitszyklus des Feuerbrands

*Erwinia amylovora* kann nur passiv über vorhandene Öffnungen in die Pflanze gelangen. Diese befinden sich natürlicherweise in den Blüten (hauptsächlich die Nektarthoden) oder entstehen durch Verletzungen an Blättern und Trieben durch bspw. Wind, Starkregen, Hagel oder Schädlinge (Thomson, 2000). Es wird vermutet, dass sich in der Blüte erste Populationen auf dem Stigma etablieren und dann durch Feuchtigkeit in das Hypanthium geschwemmt werden, von wo aus sie über die Nektarthoden in das Pflanzengewebe gelangen können (Thomson, 2000).

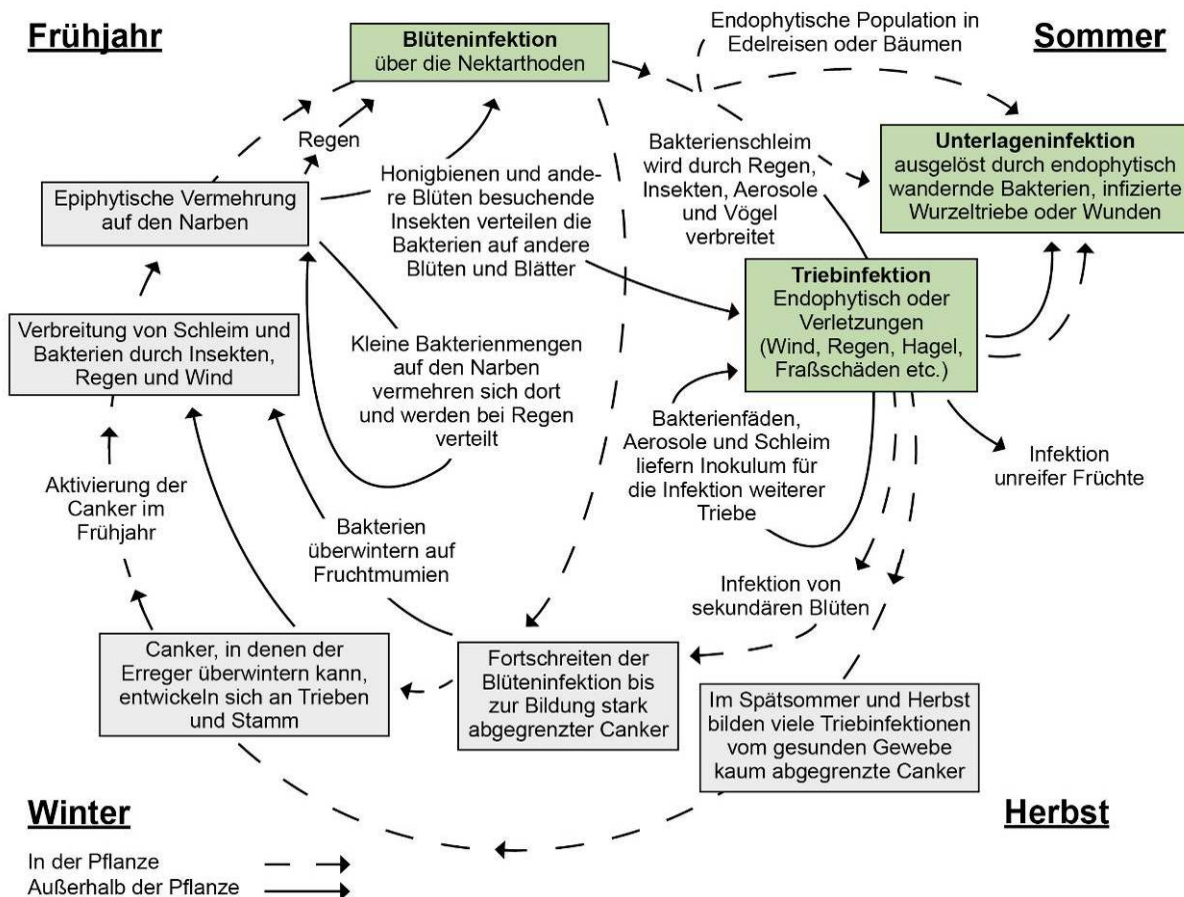
Über die Ausbreitung in der Pflanze gibt es unterschiedliche Ansichten. Die Ausbreitung im kortikalen Parenchym wird als gesichert angesehen, es bestehen jedoch auch Hinweise auf eine Migration im Xylem und Phloem (Billing, 2011; Bogs et al., 1998; Thomson, 2000). Durch die Vermehrung der Bakterien und das Aufquellen von extrazellulären Polysacchariden entsteht ein physikalischer Druck,

## Einleitung

der eine Fortbewegung im Interzellularraum ermöglicht (Eden-Green, 1972; Schouten, 1989). Latenter Befall, bei dem hohe Mengen an Bakterien in symptomlosem Gewebe vorliegen, scheinen häufig vorzukommen (Vögele et al., 2010).

Die für den Feuerbrand charakteristischen Symptome sind eine Braunfärbung und ein Vertrocknen des Gewebes, häufig mit dem oberflächlichen Austreten eines zähflüssigen Schleimes aus Bakterien und Polysacchariden. Außerdem ist das bogenförmige Einknicken der Triebspitzen ein typisches Merkmal, auch als „Hirtenstabsymptom“ bezeichnet (Vanneste und Eden-Green, 2000). Es wird angenommen, dass die Symptome durch die Wirkung von extrazellulären Polysacchariden und der hypersensitiven Reaktion der Pflanze entstehen, die zur Dekompartimentierung des Gewebes führen. Als Ursache für die hypersensitive Reaktion, die über den programmierten Zelltod zum Absterben der Pflanzelle führt, wird die Sekretion von Elicitoren über das Typ-III-Sekretionssystem angenommen, die über das hrp-Gencluster gesteuert wird (Eastgate, 2000).

Es werden verschiedene Mechanismen der Pflanzen angegeben, die bei einer Feuerbrandinfektion beteiligt sind und die sorten- und artspezifische Anfälligkeit begründen. Dazu gehören die Attraktivität des Wirtes für die Bakterien, die Eisen- und Wasserverfügbarkeit, gebildete antimikrobielle Inhaltsstoffe und die Fähigkeit zur Immobilisierung von Bakterien (Brisset und Paulin, 2006). Als durch eine Infektion induzierte Mechanismen werden die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Synthese von PR-Proteinen und die Stimulation des Phenylpropanoid-Stoffwechsels angegeben. Insgesamt wird von einem sehr komplexen Krankheitszyklus ausgegangen (Olbrecht, 2008; Thomson, 2000). In Abbildung 2.3 wird der Krankheitszyklus im Jahresverlauf schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.3** Krankheitszyklus des Feuerbrandes im Jahresverlauf. Modifiziert nach Olbrecht (2008) und Thomson (2000).

Als Primärinokulum dienen Bakterien von einem im Vorjahr befallenen Baum, bspw. aus im Vorjahr gebildeten Cankern (Beer und Norelli, 1977) oder Fruchtmumien (Weißhaupt, 2008). Durch biotische und abiotische Vektoren können nun Bakterien und Schleim im Umfeld des Baumes verbreitet werden. So können kleine Mengen an Bakterien auf Blüten gelangen, wo sie sich vermehren. Diese können eine neue Blüteninfektion auslösen, sowie durch blütenbesuchende Insekten und andere Vektoren weiter verteilt werden (Thomson, 1986). Dies führt zur Etablierung eines Erregerdruckes in der Anlage. Durch die endophytische Ausbreitung der Bakterien von der Blüte ausgehend, können nun Triebe, der Stamm und die Unterlage besiedelt und befallen werden. Über Verletzungen an Blättern, Trieben oder Stämmen können epiphytische Bakterien zu Neuinfektionen führen. Ebenso ist eine Verbreitung durch Fraßinsekten oder Schnittwerkzeuge möglich.

## 2.5 Bekämpfungsmaßnahmen und Feuerbrandmanagement

Für eine erfolgreiche Regulierung von Feuerbrand wird die Kombination einer Vielzahl von Maßnahmen empfohlen (Steiner, 2000; van der Zwet und Beer, 1995). Neben der termingerechten Applikation von Pflanzenschutzmitteln zur Verhinderung von Neuinfektionen an Blüten und Trieben soll durch die Auswahl toleranter Sorten und Unterlagen die Anfälligkeit der Pflanzen generell reduziert werden. Durch

## Einleitung

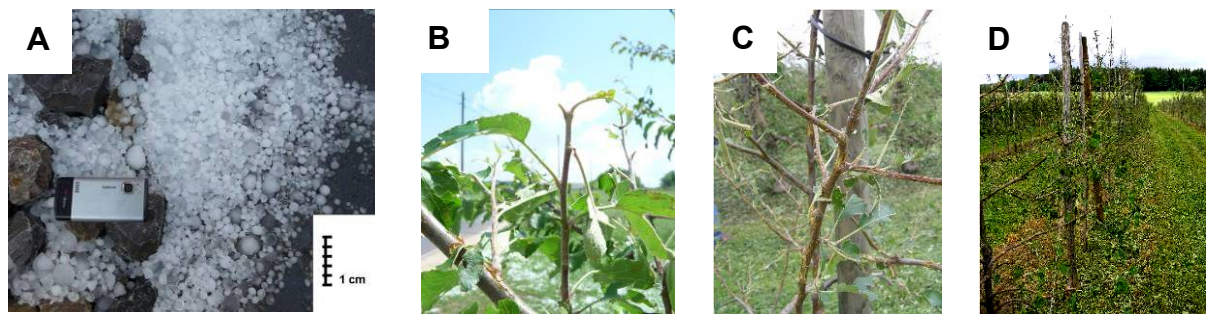
Kulturmaßnahmen wie dem Schnitt befallener Triebe und Canker und der Rodung sollen Pflanzen saniert werden und eine weitere Ausbreitung in der Anlage verhindert werden.

### Wirkstoffe zur Feuerbandregulierung

Der Verhinderung von Neuinfektionen über die Blüten wird in der Praxis die höchste Priorität zugemessen. Dies soll durch die Applikation von Pflanzenschutzmitteln erreicht werden (Psallidas, 2000). Durch die Verwendung von Prognosemodellen, die an den jeweiligen Standort angepasst sind, soll durch die optimale Terminierung der Applikation eine maximale Wirkung erreicht werden (Billing, 2000).

Für die Verhinderung oder Reduzierung von Neuinfektionen an Blüten gibt es Wirkstoffe mit unterschiedlichem Wirkmechanismus. Es gibt Wirkstoffe mit direkter bakterizider oder bakteriostatischer Wirkung, wie Antibiotika oder Desinfektionsmittel. Außerdem gibt es Resistenzinduktoren, die über verschiedene, oftmals nicht eindeutig geklärte Mechanismen, die pflanzliche Abwehrfähigkeit erhöhen. Hinzu kommen Pflanzenschutzmittel mit antagonistischen Mikroorganismen, die über unterschiedliche Mechanismen die Infektion verhindern bzw. reduzieren. Die Applikation von Kupfer vor dem Knospenaustrieb dient dazu, vorhandenes Primärinokulum in Überwinterungsorganen zu reduzieren und so die Möglichkeit einer Erstinfektion zu vermindern (Psallidas, 2000).

Während die Bedeutung der Blüten für Neuinfektionen allgemein anerkannt ist und versucht wird, entsprechende Maßnahmen dagegen zu unternehmen, ist der Einfluss von Hagelverletzungen auf Neuinfektionen zwar als Möglichkeit erwähnt, es wurden jedoch keine speziellen Maßnahmen daraus abgeleitet (van der Zwet und Beer, 1995). Bisher wurde noch nicht detailliert untersucht, welche Wirkstoffe einen ausreichenden Schutz bieten. Dies ist umso verwunderlicher, da in den letzten Jahren vermehrt Hagelschlag auftrat, speziell in der Bodenseeregion (Kunz et al., 2009). Die Verletzungen durch Hagel bieten Eintrittspforten für Bakterien, die im Anschluss die Pflanze befallen können (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4** Verletzungen durch Hagel.

Hagelereignis auf der Schwäbischen Alb am 5.6.2011 mit Hagelkörnern zwischen 0,5 und 1 cm (A) und Verletzungen (B) an einem Apfelbaum (Rubinola 10 Jahre); Hagelverletzungen an Jungbäumen in der Bodenseeregion (C, D).

Streptomycin ist ein Antibiotikum mit hohen Wirkungsgraden bei der Verhinderung von Feuerbrandneuinfektionen und wurde flächendeckend in Obstbaugebieten in Nordamerika und in einigen europäischen Ländern eingesetzt (McManus et al., 2002). Durch die Resistenzentwicklungen in vielen Gebieten Nordamerikas musste auf andere, weniger wirksame Antibiotika ausgewichen werden (Rezzonico et al., 2009b). Zusätzlich führten Bedenken wegen möglicher Gefahren für die Gesundheit als auch für die Umwelt durch Gentransfers zu starken Einschränkungen oder Verboten der Anwendung von Streptomycin in vielen Ländern (Stockwell und Duffy, 2012). Hierdurch entstanden weltweit Bestrebungen, Alternativen zu Streptomycin in der Feuerbrandregulierung zu finden (Bastas et al., 2010; Bazzi et al., 2006; Johnson et al., 2008; Moltmann et al., 2006; Tsiantos et al., 2003). Eine mögliche Alternative sollte auch Schutz nach einem Hagelereignis bieten.

### **Sortenwahl**

Innerhalb der Wirtspflanzen von *Erwinia amylovora* gibt es art- und sortenspezifische Unterschiede in der Anfälligkeit. Unter den Obstarten gilt Quitte als am anfälligsten, gefolgt von Birne und Apfel. Edelreis und Unterlage könne unterschiedlich stark anfällig sein, müssen jedoch als Baum zusammen betrachtet werden (Lespinasse und Aldwinckle, 2000). Möglicherweise kann durch die Wahl der Unterlage die Gesamtanfälligkeit des Baumes verringert werden (Jensen et al., 2012).

Zur Beurteilung der Sortenanfälligkeit dienen einerseits Feldbeobachtungen und andererseits Exaktversuche mit künstlicher Inokulation unter kontrollierten Bedingungen oder im Freiland (Lespinasse und Aldwinckle, 2000). Zu berücksichtigen sind die Art der Inokulation, sowie die jeweils herrschenden Umweltbedingungen während der Versuche. Ein Abgleich zwischen den Ergebnissen aus Exaktversuchen und Feldbeobachtungen ist für eine abschließende Beurteilung einer Sorte notwendig. Für die meisten für den Erwerbsobstbau interessanten Sorten und für viele Sorten für den Streuobstanbau gibt es detaillierte Informationen über die Anfälligkeit (Joos et al., 2012; Le Lezec et al., 1997; Lespinasse und Aldwinckle, 2000; Persen, 2011; Silvestri et al., 2011). Für einige neuere Sorten sind keine Aussagen zur Feuerbrandanfälligkeit bekannt.

In Versuchen mit künstlicher Inokulation hat sich gezeigt, dass unter optimalen Bedingungen alle Zuchtsorten eine Anfälligkeit aufweisen. Somit kann nicht von einer Resistenz gesprochen werden. Vielmehr sind die untersuchten Sorten unterschiedlich stark robust oder tolerant. Durch die Wahl der Sorte und Unterlage besteht das mittel- bis langfristiges Potential, die Verluste durch Feuerbrand einzudämmen (Joos et al., 2012; Silvestri et al., 2011).

### **Kulturmaßnahmen**

Kulturmaßnahmen zielen auf die Reduzierung des Inokulums durch phytosanitäre Maßnahmen in einer Obstanlage ab. Hierzu zählen das Entfernen von Cankern und befallenen Trieben im Zuge des Winterschnitts. Ebenso wird die Entfernung von befallenen Trieben als mögliche Inokulumquelle während der Saison empfohlen (van der Zwet und Beer, 1995). Hierdurch soll die Ausbreitung von Bakterien in der Anlage vermindert werden. Eine weitere Möglichkeit ist das mechanische oder chemische Entfernen von Blüten an Jungbäumen, die nicht im Ertrag stehen (Steiner, 2000). Hierdurch werden Eintrittspforten für das Bakterium entfernt. Durch die Kontrolle von saugenden und fressenden Schadinsekten kann außerdem eine weitere Verbreitung eingeschränkt werden (van der Zwet und Beer, 1995). Da eine höhere Anfälligkeit von jungem, stark wüchsigem Gewebe beobachtet wird, wird eine verhaltene Düngung empfohlen. Es sollte allgemein versucht werden, einen physiologisch ruhigen Baum durch entsprechende Dünge-, Schnitt- und Bewässerungsmaßnahmen zu erhalten (Steiner, 2000). Letztendlich müssen stark befallene Pflanzen, deren Sanierung ökonomisch nicht sinnvoll erscheint, als mögliche Inokulumquellen aus der Obstanlage entfernt werden (Johnson und Stockwell, 1998). Für die Ableitung von Empfehlungen von Kulturmaßnahmen für die Praxis ist das Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktionen wichtig.

## **2.6 Fragestellungen dieser Arbeit**

### **Wirkstoffe zur Feuerbandregulierung**

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zum Test von Prüfmitteln auf ihre Wirkung zur Verhinderung von Neuinfektionen an Apfeltrieben nach simuliertem Hagel. Hierdurch sollte die Frage beantwortet werden, welche Wirkstoffe bzw. Produkte einen ausreichenden Schutz vor Neuinfektionen nach Hagel bieten.

Zusätzlich sollte in Freilandblütenversuchen die Frage beantwortet werden, welche Wirkstoffe bzw. Produkte einen ausreichenden Schutz vor Neuinfektionen während der Blüte bieten. Die dafür existierende Methode sollte überprüft und ggf. weiterentwickelt werden.

Durch die Versuche zur Wirkstofftestung sollten Prüfmittel auf ihr Potential zur Verhinderung von Neuinfektionen nach Hagel und während der Blüte getestet werden, damit der Praxis mittelfristig Pflanzenschutzmittel zur Regulierung des Feuerbrands zur Verfügung stehen.

### **Sortentest zur Feuerbrandanfälligkeit**

Zur Testung der sortenspezifischen Feuerbrandanfälligkeit an Blüten sollte eine Methode in Freiland und Klimakammer etabliert werden und eine Boniturskala für den Blütenbefall entwickelt werden. Dadurch sollte beantwortet werden, wie hoch die Anfälligkeit der modernen Apfelsorten Diwa, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova und

Wellant für Blüten- und Hagelinfektion im Vergleich zu den bekannten Sorten Gala und Rewena ist.

Durch die Testung der modernen Apfelsorten auf Feuerbandanfälligkeit sollten der Praxis Informationen für die Sortenwahl zur Verfügung gestellt werden.

### **Pathogeneseversuche zum Feuerbrand**

Im Pathogeneseversuch mit Blüten sollte unter der Verwendung der Methode zur Testung der Blütenanfälligkeit untersucht werden ob und wie die Menge an Bakterien auf der Blüte die Entwicklung von Blütensymptomen an Apfelbäumen beeinflusst.

Der Versuch zur Konzentration der Inokulationssuspension sollte grundlegende Informationen zum Infektionsverlauf in der Blüte liefern. Konkrete Fragestellung war, ob es einen unteren Grenzwert für eine Infektion gibt und bei welchen Konzentrationen es zu einem Abstoppen der Infektion oder zu einer Triebinfektion kommt.

Im Pathogeneseversuch am Stamm sollte eine Methode entwickelt werden bei der über eine Stamminjektion Apfelbäume mit *Erwinia amylovora* inokuliert werden und anschließend per Real-Time PCR beprobt werden. Dies diene zur Beantwortung der Frage, wie sich *Erwinia amylovora* räumlich und zeitlich im Stamm mehrjähriger Apfelbäume ausbreitet.

Der Versuch zur Stamminjektion sollte grundlegende Informationen zur Ausbreitung der Bakterien im Stamm liefern. Konkrete Fragestellung war, wie sich die Bakterien räumlich und zeitlich im Stamm ausbreiten und wie die Symptomentwicklung erfolgt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Computerprogramme

In Tabelle 3.1 sind die für diese Arbeit verwendeten Computerprogramme aufgelistet.

**Tabelle 3.1** Verwendete Computerprogramme.

<b>Programm</b>	<b>Firma</b>	<b>Verwendung</b>
Adobe InDesign CS3	Adobe Systems GmbH, München	Abbildungen
Bio-Rad CFX Manager 2.1 CFX96	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA	Auswertung Real-Time PCR
EPPO PQR 5.0	EPPO/OEPP, Paris, Frankreich	Datenbank über Schädlinge
Maryblyt 7.0	The University of Maryland, USA	Modell zur Blüteninfektionsprognose
Microsoft Office 2007 (Excel, Word)	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim	Datenverarbeitung, Kalkulationen, Textverarbeitung, Abbildungen
RefWorks 2.0	ProQuest LLC, Cambridge, UK	Literaturverwaltung
SAS 9.3	SAS Institute Inc., Cary, USA	Statistische Auswertung, Abbildungen

#### 3.2 Verwendete Laborgeräte

In Tabelle 3.2 sind Laborgeräte aufgeführt, die für diese Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 3.2** Verwendete Laborgeräte.

<b>Beschreibung</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage	ALJ 220-5 DNM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Laborbrutschrank	Friocell 111	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, München
Mikroliterpipetten	Pipetman	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5418	Eppendorf AG, Hamburg
Plattformschüttler	Vibramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Probenschütteln, Homogenisieren	LTF-Intelli-Mixer RM-2S	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg
Probenschütteln, Homogenisieren	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Real-Time PCR Cycler	CFX96	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
UV/Vis-Spektrophotometer	U 2001	Hitachi, Tokio, Japan

#### 3.3 Verwendete Prüfsubstanzen und Chemikalien

In Tabelle 3.3 werden die verwendeten Prüfsubstanzen und Chemikalien aufgeführt. Dort nicht aufgeführte Chemikalien wurden mit analytischem Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Sigma-Aldrich



Chemie GmbH, Taufkirchen. Bei den meisten untersuchten Prüfsubstanzen handelt es sich nicht um zugelassene Pflanzenschutzmittel.

**Tabelle 3.3** Verwendete Prüfsubstanzen und Chemikalien.

<b>Substanz/Produkt</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
3DS	3-Deoxy-Flavonoide, Proteine	Technische Universität Wien, Inst. für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Wien
ABI 09 fl.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42, Antagonist	ABiTEP GmbH, Berlin
AFB 1.0	N-Düngemittel, PHMB als Konservierungsmittel	proagro GmbH, Abenberg
ALD 1901	Hefeextrakt, Resistenzinduktor	Agro-Levures et Dérivés SAS, Lille, Frankreich
Akasoil	kationisches Polymer auf Guanidinbasis	AKA Technology GmbH, Wien, Österreich
Antinfek FB	Polyhexamethylenbiguanid (PHMB), Desinfektions- und Konservierungsmittel	H+S Vita AG, Rickenbach, Schweiz
Bloomtime FD	<i>Pantoea agglomerans</i> Stamm E325, Antagonist	Northwest Agri Products, Pasco, USA
Blossom Protect	<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 14940 und DSM 14940, Antagonist	bio-ferm, Biotechnologische Entwicklung und Produktion GmbH, Tulln, Österreich
ChitoPlant	Chitosan, Pflanzenstärkungsmittel	ChiPro GmbH, Bremen
DM 31	Kupfer-Düngemittel	Omex Agriculture Ltd., Lincoln, Vereinigtes Königreich
DM 32	Kupfer -Düngemittel	Omex Agriculture Ltd., Lincoln, Vereinigtes Königreich
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	Antagonist	Julius Kühn-Institut, Inst. für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Dossenheim
Feusil	Bakterieller Inhibitor, Desinfektionsmittel	Cropsafe, Sint-Truiden, Belgien
FolanxCa 29 LX 4630/4622 EA	Kalziumformiat	LANXESS Distribution GmbH, Langenfeld
Juglon	5-Hydroxy-1,4-naphthalindion	Technische Universität Wien, Inst. für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Wien
LMA 01	Aluminium(III)-Ionen	chevita Tierarzneimittel GmbH, Pfaffenhofen
MNQ	Menadion (Vitamin K3)	Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl "Biochemie und Physiologie der Pflanzen", München
Myco-Sin	Aluminiumsulfat (Schwefelsaure Tonerde).	Biofa AG, Münsingen
NPA	Organische Säure	Julius Kühn-Institut, Inst. für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Dossenheim

## Material und Methoden

Fortsetzung **Tabelle 3.3** Verwendete Prüfsubstanzen und Chemikalien.

Substanz/Produkt	Beschreibung	Hersteller/Herkunft
p29TF / P29TR	Primer für PCR	Apara-Bioscience GmbH, Denzlingen
Planta 4+	Reinigungsmittel	multiBIND biotec GmbH, Köln
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	RCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Selecta Disperss	kupferhaltiges Fungizid	CEREXAGRI ITALIA S.r.l., Carlo di Cesena (FC), Italien
Serenade ASO/Max	<i>Bacillus subtilis</i> Stamm QST 713, verschiedene Formulierungen	AgraQuest, Inc., Davis, USA
Sergomil FB	kupferhaltiges Fungizid	proagro GmbH, Abenberg
Strepto	Streptomycinsulfat, Bakterizid	Globachem nv, Sint-Truiden, Belgien
Vittafos + Curamin	Phosphat-, Kupferdünger	CAMPAG GmbH & Co. KG, Münster
Vacciplant	Laminarin, Resistenzinduktor	Belchim Crop Protection, Burgdorf
Xedaphos	P, K-Blattdünger	XEDA, St. Andiol, Frankreich

### 3.4 Pflanzenmaterial

Für die Freilandwirkstoffversuche wurden im Frühjahr zweijährige Galabäume (Mutante Galaxy) auf M9 als Knipbaum von einer Baumschule bezogen (POB Leicht&Wetzler GmbH, Meckenbeuren), mit einem homogenen Tonsubstrat (ökohum GmbH, Herbertingen) in 20 l Container (TEKU, Pöppelmann GmbH & Co. KG, Lohne) getopft und zur ausreichenden Blütenknospenbildung ein Jahr auf dem Gelände des Kompetenzzentrums Obstbau Bodensee vorkultiviert. Hierbei wurden notwendige Pflanzenschutzmaßnahmen (Calypso 0,02 %, Flint 0,02 %, Runner 0,04 %), Düngung (pro Saison 3 x ca. 20 g Kalkammonsalpeter pro Baum) und regelmäßige Bewässerung durchgeführt.

Zur Einwinterung wurden die Töpfe mit Stroh eingepackt, damit bei wechselnder Witterung der Wurzelballen nicht mehrfach gefriert und auftaut und so geschädigt wird. Im Frühjahr vor Versuchsbeginn wurden die Topfbäume auf die Versuchsflächen transportiert. Zusätzlich wurden aus derselben Baumschule für die Sortentests an Blüten Topfbäume der Sorten Diwa (Junami / Milwa), Greenstar (Nicogreen), Kanzi (Nicoter), Mairac (La Flamboyante), Pinova und Wellant auf Unterlage M9, sowie Rewena auf M7 kultiviert. Von diesen Bäumen wurden Edelreiser zur Herstellung von Handveredelungen auf M9 (Lodder Unterlagen GmbH, Dülmen) verwendet. Die Handveredelungen wurden in 2 l Containern mit Tonsubstrat getopft, im Glashaus bei notwendigem Pflanzenschutz (Calypso 0,02 %, Envidor 0,04 %, Flint 0,02 %, Netzschwefel 0,1 %), Düngung (mehrmalige Blattdüngung mit 1% Harnstoff) und regelmäßiger Bewässerung kultiviert und zu Versuchen in der Klimakammer verwendet.

### 3.5 Erregermaterial, -aufzucht und -suspension

Sämtliche *Erwinia amylovora* Stämme wurden vom Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg bezogen. Als Kulturmedium wurde King`s B Medium (King et al., 1954) verwendet. Die Inokulationssuspensionen wurden aus Übernachtskulturen (12 h bei 27 °C geschüttelt) mit destilliertem H<sub>2</sub>O hergestellt. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) photometrisch bestimmt und über die Formel Gesamtzellzahl/ml = OD<sub>600</sub> x 3,3 x 10<sup>9</sup> berechnet (Olbrecht, 2008). Die einzelnen verwendeten Stämme sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tabelle 3.4** Verwendete *Erwinia amylovora* Stämme mit Herkunft.

Stamm Nr. JKI Quedlinburg <sup>1</sup> / LTZ Augustenberg <sup>2</sup>	Verwendung
385	Inokulationsversuche in der Klimakammer; Freilandversuche (Sorten, Hagel)
763 = 4/06 ( <i>Pyrus</i> ), 839 = 258/08 ( <i>Pyrus</i> ), 840 = 266/08 ( <i>Cydonia</i> )	Freilandversuche zur Wirkstofftestung 2009
797 = 17/07 ( <i>Malus</i> ), 839 = 258/08 ( <i>Pyrus</i> ), 851 = 06/09 ( <i>Pyrus</i> )	Freilandversuche zur Wirkstofftestung 2010
797 = 17/07 ( <i>Malus</i> ), 839 = 258/08 ( <i>Pyrus</i> ), 894 = 24/10 ( <i>Cotoneaster</i> )	Freilandversuche zur Wirkstofftestung 2011

1: Nummerierung des Julius Kühn-Instituts (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg

2: Nummerierung des Landwirtschaftlichen Technologiezentrums Augustenberg (LTZ)

Für die Inokulationsversuche in der Klimakammer und im Freiland (Hagelversuche, Sortentests) wurde ein in der Bodenseeregion endemischer Stamm (385) verwendet. Für die Freilandversuche zur Wirkstofftestung wurde ein Gemisch aus drei Stämmen verwendet, die in Baden-Württemberg von verschiedenen Wirtspflanzen isoliert wurden und auf ihre hohe Virulenz getestet wurden. Diese Inokulationssuspension wurde vom LTZ Augustenberg Außenstelle Stuttgart zur Verfügung gestellt.

### 3.6 Versuchstandorte

#### 3.6.1 Freilandversuche

##### 3.6.1.1 Mühlingen

Im Landkreis Konstanz wurden 2009 – 2011 auf der Gemarkung Mühlingen auf einer Waldlichtung mit angrenzender Ackerfläche Versuche zur Wirkstofftestung durchgeführt (N: 47°53'49"; O: 8°58'42). Der Standort liegt im Nordosten des Hegaus am Übergang zur Schwäbischen Alb auf 640 m ü. NN, ist 4 % in ost-westlicher Richtung geneigt und hat einen Jahresniederschlag von 750 – 800 mm. Bodenkennzahlen sind nicht relevant, da mit Containerpflanzen gearbeitet wurde.

### 3.6.1.2 Vogt

Auf der Gemarkung Vogt im Landkreis Ravensburg wurden 2009 – 2011 auf einer Waldlichtung (N: 47°47'57"; O: 9°45'30) Versuche zur Wirkstofftestung an Blüten und nach simuliertem Hagel, sowie Sortentests durchgeführt. Der Standort liegt am Südostrand des Altdorfer Waldes nordöstlich von Ravensburg auf 720 m ü. NN und hat einen Jahresniederschlag von ca. 1000 mm. Bodenkennzahlen sind auch hier nicht relevant, da mit Containerpflanzen gearbeitet wurde.

### 3.6.2 Klimakammer

Die Versuche unter kontrollierten Bedingungen wurden in Klimakammern am Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee, 88213 Ravensburg, durchgeführt. Die Temperatur und die Belichtungsdauer konnte automatisch reguliert werden. Die Beleuchtung erfolgte mit Quecksilberdampflampen. Die Luftfeuchtigkeit konnte manuell reguliert werden. Die Größe der Kammern betrug ca. 2,50 x 4,50 x 2,50 m.

## 3.7 Versuche

### 3.7.1 Hagel-Wirkstoff-Versuche in der Klimakammer

Zur Prüfung von Wirkstoffen gegen Triebbefall an Apfel nach simuliertem Hagel wurden an 10 Handveredelungen (Gala/M9) pro Variante Verletzungen mit einem Faden-Handausdünngerät (Electro'flor, INFACO, Cahuzac sur Vère, F) erzeugt, die den Blattschädigungen nach einem starken Hagelereignis gleichen (Abbildung 4.1). Anschließend wurden die Pflanzen mit einer *Erwinia amylovora* Bakteriensuspension von ca.  $10^6$  KbE/ml tropfnass behandelt. Nach 4 h erfolgte die Behandlung mit den Prüfsubstanzen. Die Pflanzen wurden vollständig randomisiert in einer Klimakammer aufgestellt (Abbildung 7.9) und bei 24 °C tags und 18 °C nachts bei 12 h Beleuchtung kultiviert. Die Luftfeuchtigkeit betrug min. 80 %.

Die Versuchspflanzen wurden vor Versuchsbeginn in Größenklassen eingeteilt und dann aus jeder Klasse eine Pflanze einer Versuchsvariante zugeteilt; somit war die Trieblänge und Wüchsigkeit zu Beginn des Versuchs annähernd gleichmäßig über die verschiedenen Varianten verteilt. Nach 1, 2, 3 und 4 Wochen erfolgte die Bonitur der Einzelpflanzen nach Befall, sichtbaren nekrotischen Läsionen, Gesamtrieblänge, Anzahl verletzter/neuer Blätter und Triebabschluss. Die statistische Auswertung berücksichtigt sämtliche erhobene Parameter im Modell. Der Befall (0/1) wurde mit einem binomialen Modell verrechnet und anschließend nach (Abbott, 1925) in einen Wirkungsgrad umgerechnet. Die Befalldynamik, abgebildet durch die Länge der nekrotischen Läsion der befallenen Triebe, wurde mit einer Varianzanalyse untersucht und Signifikanzklassen bestimmt (Buchstabendarstellung).

Insgesamt wurden im Jahr 2011 vier Versuche durchgeführt (Beginn 20.05., 22.06., 19.07., 10.10.). In Tabelle 3.5 sind die einzelnen Versuchsglieder dargestellt. Im 4. Versuch wurden die Prüfsubstanzen Strepto und LMA 01 zusätzlich noch einmal

nach 8, 12 und 24 h appliziert. Zusätzlich erfolgte beim dritten Versuchsdurchgang eine Bestimmung der Erregerlast im Edelreis an drei ausgewählten repräsentativen Pflanzen pro Variante mittels Real-Time PCR (vgl. 3.9).

**Tabelle 3.5** Versuchsglieder Hagel-Wirkstoff-Versuche in der Klimakammer.

Versuch				Behandlung	Mittelmenge (kg bzw. l)/ha u. m KH (Konzentration)
1	2	3	4		
X	X	X	X	Unbehandelt	-
X	X	X	X	Strepto	0,3 kg (0,06 %)
		X		3DS	50 l (10 %)
X	X			AFB 1.0	10 kg (2 %)
X	X			Chitoplant	0,5 kg (0,1 %)
		X	X	Juglon	0,4 kg (0,087 %)
		X		Juglon abgedeckt	0,4 kg (0,087 %)
	X	X	X	LMA 01	15 kg (3 %)
			X	MNQ	0,8 kg (0,17 %)
	X	X		Myco-Sin	5 kg (1 %)
		X		Selecta Disperss	0,75 kg (0,15 %)
X	X			Sergomil	0,75 kg (0,15 %)
X	X			Vittafos Curamin	Je 1 kg (0,2 %)
	X	X		Xedaphos	5 kg (1 %)

Die verschiedenen Versuchsdurchgänge unterschieden sich im Temperaturverlauf während und kurz nach der Verletzung und Inokulation und in den folgenden Tagen, sowie in der Wüchsigkeit der Pflanzen bzw. im erfolgten Triebabschluss (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6** Temperaturverlauf und physiologischer Zustand der Versuchspflanzen bei den Hagel-Wirkstoff-Versuchen in der Klimakammer.

Versuch/ Inokulationstermin	Temperatur				Physiologie der Versuchspflanzen	
	Phase 1	Phase 2	Tag	Nacht		
1 „Heiß“ 20.05.11	12 °C	27 °C	27 °C	24 °C	Wüchsig	
2 „Warm“ 24.06.11	17 °C	24 °C	24 °C	18 °C	Wüchsig	
3 „Warm“ 19.07.11	17 °C	24 °C	24 °C	18 °C	Wüchsig	
4 „Kühl“ 10.10.11	12 °C	20 °C	24 °C	18 °C	Gering wüchsig, Triebabschluss	

Phase 1: Zeitraum zwischen Verletzung / Inokulation und Behandlung (4 h)

Phase 2: Zeitraum zwischen Behandlung und Nacht (4 h)

### 3.7.2 Hagel-Wirkstoff-Versuch im Freiland

An fünfjährigen getopften Galabäumen (Unterlage M9) wurden am Standort Vogt Versuche mit Hagelsimulation im Freiland durchgeführt. Am 11.08.11 wurden an 10 bis 20 cm langen, wüchsigen Trieben mit einem Handausdünngerät (Electro'flor, INFACO, Cahuzac sur Vère, F) Verletzungen an jungen Blättern erzeugt. Direkt nach der Verletzung wurden die Pflanzen mit einer Feuerbrandbakteriensuspension ( $10^6$  KbE/ml) tropfnass gesprüht. Nach 4 h erfolgte die Applikation der Prüfsubstanzen mit einer handgeführten Rückenspritze (SHR 170SI, ECHO Motorgeräte, Metzingen; Flachstrahldüse 04E80; 4,0 bar). Die Bonitur des Feuerbrandbefalls an den Blättern erfolgte 7, 14 und 21 Tage nach der Inokulation. Pro Versuchsglied wurden 5 Pflanzen pro Parzelle mit 4 Wiederholungen verwendet. Die verschiedenen Versuchsglieder sind in Tabelle 3.7 beschrieben. Die Versuchsdokumentation und der Witterungsverlauf befinden sich im Anhang (7.1).

**Tabelle 3.7** Versuchsglieder Hagel-Wirkstoff-Versuch im Freiland.

Versuchsglied	Behandlung	Mittelmenge (kg bzw. l)/ha u. m KH (Konzentration)
1	Unbehandelt	-
2	Strepto	0,3 kg (0,06 %)
3	Juglon	0,4 kg (0,087 %)
4	Myco-Sin	5 kg (1 %)
5	LMA 01	15 kg (3 %)

### 3.7.3 Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung

Die Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum (EPPO) hat für Wirksamkeitstest von Bakteriziden gegen *Erwinia amylovora* den Versuchsstandard PP 1/166(3) beschrieben (EPPO, 2002). Nach dieser Norm wurden die Freilandblütenversuche durchgeführt.

Die Freilandversuche mit künstlicher Inokulation wurden während der Blüte an dreijährigen Topfbäumen der Sorte Gala auf M9 durchgeführt. Die Versuchsglieder waren vierfach wiederholt und randomisiert (Abbildung 7.1). Eine Parzelle bestand aus 10 Pflanzen. Der Abstand zwischen den Baumreihen betrug 2 m. Es erfolgte die Inokulation eines weiteren getopften Baumes je Parzelle durch Applikation einer *Erwinia amylovora* Bakteriensuspension hoher Virulenz und definierter Dichte (ca.  $1,2 \times 10^8$  KbE/ml; Tabelle 3.4). Der Inokulationsbaum stand in der Mitte der Parzelle mit 1,2 m Abstand zum nächsten Baum. Der Baumabstand in der Reihe betrug 0,7 m, der Abstand zwischen den Parzellen 1,5 m. Auf jeder Seite des Inokulationsbaumes standen 5 Versuchsbäume. Über die inokulierten Bäume erfolgte dann eine natürliche Ausbreitung der Krankheit innerhalb der Versuchsanlage durch Insekten. In der Versuchsanlage wurden blühende Äste oder Pflanzen von Befruchterbäumen aufgestellt, um eine ausreichende Bestäubung der

Versuchspflanzen zu ermöglichen. Als mögliche Vektoren wurden in den Anlagen Honigbienen (*Apis*), Hummeln (*Bombus*), und Wildbienen (*Osmia cornuta*, *Osmia rufa*) ausgebracht, um eine Ausbreitung der Bakterien in der Anlage zu fördern.

Die Prüfmittel wurden nach Herstellerangaben, Phänologie bzw. Warndienstaufruf mit einer handgeführten Rückenspritze (SHR 170SI, ECHO Motorgeräte, Metzingen; Flachstrahldüse 04E80; 4,0 bar) bzw. in Mühlingen 2011 mit einem Parzellensprühgerät (Parzellensprühgerät SZA 32 mit Gebläse, Wanner, Wangen; Teejetdüsen TP 80-015 vk; 9,0 bar; 4 km/h) und einer Wassermenge von 500 l pro ha und Meter Kronenhöhe ausgebracht. Die Einzelbaumbonitur erfolgt an den auf natürliche Weise infizierten Bäumen. Hierbei wurden alle Blüten- und Fruchtbüschel bewertet. Es wurde nach 'befallen' und 'nicht befallen' unterschieden. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte des Befalls auf Parzellenebene bzw. 2011 der Befall auf Einzelbaumbasis verrechnet. Zusätzlich wurden im Jahr 2011 Blütenproben zur Bestimmung der Erregerzahlen während des Versuchsverlaufes genommen und per Real-Time PCR analysiert (3.9). Die Versuchspläne mit den geprüften Varianten, die Witterungsverläufe und Versuchsprotokolle der einzelnen Versuche sind im Anhang dargestellt (7.1).

### **3.7.4 Blüten-Sortentest im Freiland**

Am Versuchsstandort Vogt wurden im Mai/Juni 2011 Versuche zur Blüteninfektion an jeweils 10 vierjährigen Topfbäumen der Sorten Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova, Rewena und Wellant auf Unterlage M9, bzw. bei Rewena auf M7, durchgeführt. Die Versuchsbäume wurden in einem Kühllager bei ca. 4°C gelagert, um die Blüte zu verspäten und zusätzlich bei den verschiedenen Sorten zu synchronisieren. Die Blütenentwicklung am Versuchsstandort erfolgt relativ gleichmäßig bei den unterschiedlichen Sorten. Am 27.05.2011 wurden endständige Blütenbüschel mit frischen, vollständig geöffneten Blüten mit einer Bakteriensuspension (ca.  $1,3 \times 10^8$  KbE/ml) tropfnass gesprüht und anschließend zum Erzeugen eines feucht-warmen Mikroklimas in Plastiktüten (Whirl-Pak 720 ml, Nasco, Fort Atkinson, USA) verpackt, die nach drei Tagen wieder entfernt wurden (Abbildung 3.1). Die restlichen Blütenbüschel wurden entfernt. Pro Baum wurden durchschnittlich 5 Blütenbüschel inokuliert. Nach 7, 11, 14 und 21 Tagen wurde nach einer neunstufigen Boniturskala der Befall an den Blütenbüscheln bestimmt. Die Boniturskala (Tabelle 3.8) wurde in Zusammenarbeit mit Gabriella Silvestri, ACW, entwickelt und bildet den fortschreitenden Befall ab (Silvestri und Egger, 2011). Im Anhang sind die einzelnen Boniturstufen mit Fotos beschrieben (7.5). Der Witterungsverlauf ist im Anhang aufgeführt (Abbildung 7.4).



**Abbildung 3.1** Freilandversuch zur Sortentestung.

Nach der Inokulation wurden die endständigen Blütenbüschel zum Erzeugen eines feucht-warmen Mikroklimas mit Plastiktüten verpackt (A, B), die nach 3 Tagen wieder entfernt wurden; anschließend erfolgte die Bonitur der Blütenbüschel (C).

**Tabelle 3.8** 9-Punkte Boniturskala für Feuerbrand-Blütenbefall nach Silvestri und Egger (2011).

9-Punkte Skala	Beschreibung
1	Keine Infektion
2	unklare Symptome
3	Blüteninfektion (eine Blüte pro Büschel)
4	Blüteninfektion (mehrere Blüten pro Büschel)
5	Blütenbüschel + Blütenstandstiel nekrotisch
6	Blütenbüschel + Blütenstandstiel + Neutrieb nekrotisch
7	Nekrose im Holz < 5 cm
8	Nekrose im Holz < 10 cm
9	Nekrose im Holz > 10 cm

### 3.7.5 Blüten-Sortentest in der Klimakammer

An je 4 Bäumen wurden die Sorten Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova, Rewena und Wellant auf Unterlage M9, außer bei Rewena M7, auf Anfälligkeit für Blütenbefall getestet. Die Bäume wurden vollständig randomisiert in 7 Reihen und 5 Spalten in der Klimakammer aufgestellt (Abbildung 7.10). Am 27.05.2011 wurden endständige Blütenbüschel mit frischen, vollständig geöffneten Blüten mit einer Bakteriensuspension (Stamm Ea385, ca.  $1,1 \times 10^8$  KbE/ml) tropfnass gesprüht; die Luftfeuchtigkeit wurde auf mindestens 80 % eingestellt. Die Temperatur betrug 24°C tags und 18°C nachts bei einer Beleuchtungsdauer von 12 h. Die Bonitur erfolgte nach der 9-Punkte-Skala (Tabelle 3.8) 5, 7, 11, 14 und 21 Tage nach der Inokulation.

### 3.7.6 Hagel-Sorten-Versuch in der Klimakammer

Entsprechend der beschriebenen Methode zur Hagelsimulation mit anschließender Inokulation (3.7.1) wurden verschiedene Apfelsorten auf ihre Triebanfälligkeit getestet. Verwendet wurden Handveredelungen der Sorten Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova, Rewena und Wellant auf Unterlage M9. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der Erregerlast im Edelreis an drei ausgewählten Pflanzen pro Variante mittels Real-Time PCR (vgl. 3.9). Der Versuch erfolgte zeitgleich mit dem dritten Durchgang des Hagel-Wirkstoff-Versuches.



### 3.7.7 Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion

Dreijährige dormante Galabäume aus einem Kühlraum (4 °C) wurden bis zur Blüte im Freiland kultiviert. Vor dem Öffnen der ersten Blüten wurden sie vollständig randomisiert in einer Klimakammer aufgestellt (Abbildung 7.11) und bei 22 °C tags und 15 °C nachts mit 12 h Beleuchtung kultiviert. In frisch geöffnete Blüten wurden 10 µl einer *E. a.*-Suspension (Stamm Ea 385) mit  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  und  $10^9$  KbE/ml mit einer Mikroliter-Pipette vorsichtig in das Hypanthium abgelegt. Jede Bakterienkonzentration wurde an jeweils vier Bäumen angewandt, wobei an jedem Baum einige Blütenbüschel als Kontrolle nicht inokuliert wurden, an mindestens fünf Blütenbüscheln alle Blüten und an mindestens 5 Blütenbüscheln nur die Königsblüte (mittlere Blüte) inokuliert wurde. Anschließend wurde die Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer durchgehend auf über 80 % eingestellt. Die Bonitur des Feuerbrandbefalls der Blüten erfolgte 5, 8, 13 und 21 Tage nach der Inokulation nach der 9-Punkte-Skala (Tabelle 3.8). Zusätzlich wurden an Tag 8, 13 und 21 pro Inokulationskonzentration 10 Blüten gesammelt und für die PCR-Analyse aufbereitet.

### 3.7.8 Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm

Injektionsversuche wurden am Stamm von 40 vierjährigen Topfbäumen (Gala/M9) durchgeführt. Hierbei wurden am 12.08.2011 ca. 25 µl einer Bakteriensuspension vom Stamm Ea385 (ca.  $3,6 \times 10^9$  KbE/ml) mit einer Insulinspritze (0,45 x 12 mm, Omnifix 40 Duo, B. Braun Petzold GmbH, Melsungen) injiziert. Dies entspricht etwa  $9 \times 10^7$  KbE pro Injektion. Die Spritze wurde rechtwinklig zum Stamm bis zum Erreichen eines Widerstandes eingeführt, dann zum Erzeugen eines Hohlraumes etwas zurückgezogen, anschließend wurde die Feuerbrandbakteriensuspension vorsichtig injiziert. Bei der Injektion wurde die Spritze langsam zurück gezogen. Bei je 20 Bäumen lag die Einstichstelle ca. 2,5 cm ober- bzw. unterhalb der Veredelungsstelle. An 5 Terminen (3, 5, 7, 14 Tage nach der Inokulation) wurden an 5 Bäumen Stammstücke mit einem durchschnittlichen Gewicht von 5 – 25 mg und 0,5-1,5 mm Dicke mit einem Korkstecher (Ø 5 mm) und einem Skalpell entnommen. Das Volumen der gestochenen Zylinder betrug zwischen 10 und 30 mm<sup>3</sup> bzw. µl. Die Proben enthielten Rinde, Bast, Kambium und unterschiedlich große Teile des Splintholzes.

Pro Stamm wurden im Abstand von 5 cm Proben genommen, je 3 Proben ober- sowie unterhalb der Veredelungsstelle, eine Probe davon direkt an der Einstichstelle (Abbildung 3.2). Um eine Verschleppung der Bakterien zwischen den Proben zu vermeiden, wurden der Korkstecher und das Skalpell zwischen den einzelnen Proben abgeflammt und jeweils neue Handschuhe verwendet. Die Stammproben wurden gemäß 3.8.3 aufbereitet und nach 3.9 analysiert. Bestimmt wurde die Gesamtzellzahl pro mg Stammgewebe per Real-Time PCR.



**Abbildung 3.2** Stamminjektion beim Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm. *Erwinia amylovora* Bakterien werden in den Stamm (Gala/M9) injiziert (A) und nach 3, 5, 7 bzw. 14 Tagen wurden Stammstücke an 6 Stellen entnommen (B, C).

### 3.8 Probenaufbereitung

#### 3.8.1 Blütenproben

Bei verschiedenen Versuchen mit Blüteninfektionen wurden Blütenproben genommen (Freilandversuche zur Wirkstofftestung, Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion). Je 10 Blüten wurden in Flüssigprobenbeutel (Whirl-Pak, 720 ml, Nasco, Fort Atkinson, USA) mit sterilen Handschuhen gesammelt. Anschließend wurden sie mit 20 ml sterilem Wasser versetzt und 15 min inkubiert, wobei sie insgesamt viermal alle 5 min für 10 s geschüttelt wurden. Abschließend wurde 1 ml des Waschwassers in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 15800 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. Je 10 µl dieser Proben wurden per Real-Time PCR analysiert. Die Angabe erfolgt in Zellen pro Blüte. Die Aufbereitung dieser und der folgenden Proben erfolgten nach der Methode von Olbrecht (2008) und Weißhaupt (2008).

#### 3.8.2 Triebproben

Im Rahmen der Hagel-Versuche in der Klimakammer wurden Triebproben verschiedener Sorten und Behandlungen genommen (3.7.1, 3.7.6). Bei der Aufbereitung der Triebproben wurden schmale, ca. 0,5 mm dicke Scheiben mit einer sterilen Rasierklinge geschnitten und in Sarstedt-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) eingewogen, das Gewicht (ca. 100 – 200 mg) notiert, mit 3 ml sterilem H<sub>2</sub>O pro 100 mg Gewebe versetzt und 15 min geschüttelt (Intelli-Mixer, LTF Labortechnik, Wasserburg; Programm F4, 25 rpm, abwechselndes Drehen und Schütteln). 1 ml des Waschwassers wurde anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 15800 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. 10 µl dieser Proben wurden per Real-Time PCR analysiert. Die ermittelte Zellzahl wurde entsprechend dem jeweiligen Probengewicht berechnet. Die Angabe erfolgt in Zellen pro mg Gewebe.

### 3.8.3 Stammproben

Im Rahmen des Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm (3.7.8) wurden Stammproben genommen. Die Stammstückchen wurden in Sarstedt-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) eingewogen, das Gewicht (ca. 10 – 25 mg) notiert, mit 1 ml sterilem Wasser versetzt und 15 min geschüttelt (Intelli-Mixer, LTF Labortechnik, Wasserburg; Programm F4, 25 rpm, abwechselndes Drehen und Schütteln). Das Waschwasser wurde anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 15800 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in sterilem Wasser resuspendiert (3 ml H<sub>2</sub>O pro 100 mg Gewebe) und bei -20 °C eingefroren. 10 µl dieser Proben wurden per Real-Time PCR analysiert. Die ermittelte Zellzahl wurde dann auf das Probengewicht hochgerechnet. Die Angabe erfolgt in Zellen pro mg Gewebe.

### 3.9 Erregernachweis per Real-Time PCR

Ausgehend von einem bereits etablierten Real-Time PCR Nachweisverfahren (Salm und Geider, 2004) wurde ein Protokoll zum spezifischen qualitativen und quantitativen Nachweis von *Erwinia amylovora* auf die aufbereiteten Proben angewendet (Olbrecht, 2008; Vögele et al., 2010; Weißhaupt, 2008). Verwendet wurde der Cycler CFX96 der Firma BioRad, München, mit zugehöriger Software (Bio-Rad CFX Manager 2.1) und 96-well Platten (FrameStar PCR Plates, 4titude, Berlin). Verwendet wurden die Primer p29TF (CAC TGA TGG TGC CGT TG) und p29TR (CGC CAG GAT AGT CGC ATA), die an das spezifische Plasmid pEA29 binden (Salm und Geider, 2004). Die HPLC-gereinigten Oligonukleotide wurden von der Firma Apar Bioscience GmbH (Denzlingen) synthetisiert. Für den Ansatz der einzelnen Reaktionen (25 µl) wurden zum Template (10 µl) je 12,5 µl QuantiFast SYBR Green (2x) Qiagen, 1,25 µl Primer p29TF bzw. Primer p29TR zugegeben. Bei der Negativkontrolle wurden 10 µl steriles H<sub>2</sub>O, bei der Positivkontrolle 10 µl steriles H<sub>2</sub>O und 1 µl einer definierten Bakteriensuspension (10<sup>8</sup> KbE/ml) statt dem Template zugegeben.

Auf jeder Platte wurden als Standards Bakteriensuspensionen mit 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> und 10<sup>5</sup> Zellen in drei Wiederholungen zugegeben, die über die optische Dichte quantitativ bestimmt wurden (3.5). Über die Gesamtheit dieser Standards wurde eine für alle Analysen verwendete Standardgerade erstellt (Abbildung 7.12). Jede Probe wurde doppelt analysiert und anschließend der Mittelwert verwendet. Jede fünfte Probe wurde gespiked (Zugabe einer definierten Bakterienmenge), um falsch negative Proben auszuschließen. Das verwendete Real-Time PCR Programm ist in Tabelle 3.9 dargestellt.

## Material und Methoden

**Tabelle 3.9** Verwendetes Real-Time PCR Programm.

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1 Initiale Denaturierung und DNA-Polymerase Aktivierung	95,0	5:00
2 Denaturierung und DNA-Polymerase Aktivierung	95,0	0:10
3 DNA Amplifikation, Lesen der Platte	60,0	0:30
4 Zurückgehen zu 2, 39 mal		
5 Denaturierung und DNA-Polymerase Aktivierung	95,0	0:10
6 Schmelzkurvenanalyse + Lesen der Platte	70,0 bis 90,0 in 0,2 Schritten	0:03
Ende		

Als einheitlicher Schwellenwert für die Fluoreszenz wurden 250 relative Fluoreszenzeinheiten (RFE) verwendet. Als Grenzyklus (Ct-Wert) wurde der Zyklus definiert, an dem erstmalig dieser Schwellenwert überschritten wird. Um die Spezifität des amplifizierten Fragmentes zu überprüfen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Der spezifische Schmelzpunkt lag zwischen 83 °C und 84 °C. Wenn sowohl ein Ct-Wert, als auch ein spezifischer Schmelzpunkt vorlag, wurde die Probe als positiv gewertet. Durch diese Methode kann nur tatsächlich amplifizierte DNA nachgewiesen und quantifiziert werden. Es ist möglich, dass in der Probe vorhandene DNA nicht amplifiziert wurde und deshalb die Probe nicht als positiv gewertet wird. Nur Proben mit Ct-Werten größer als der Ct-Wert der Negativproben (H<sub>2</sub>O) wurden verwendet. Über die Menge an Template und die eingewogene Probenmenge bzw. -anzahl wurde dann über die Standardgerade eine Zellzahl pro Probe berechnet und für die Auswertung verwendet.

Nur Proben, die eindeutig positiv und quantifizierbar waren, wurden für die Auswertung verwendet. Somit waren falsch negative Proben möglich. Dies sind Proben, die nicht eindeutig positiv und quantifizierbar waren, aber dennoch Bakterien DNA enthalten haben. Stoffe aus nekrotischem Gewebe können die PCR inhibieren und so zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die Nachweisgrenzen für die jeweiligen Versuche wurden aus dem rechnerischen Minimalgehalt von einer Zelle pro PCR-Ansatz (10 µl) berechnet und sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

**Tabelle 3.10** Nachweisgrenzen für *Erwinia amylovora* für die per Real-Time PCR analysierten Proben.

Versuch	Probe	Nachweisgrenze
Freilandblütenversuch Mühlingen	10 Blüten/Probe	200 Zellen/Blüte
Freilandblütenversuch Vogt	25 Blüten/Probe	200 Zellen/Blüte
Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion	10 Blüten/Probe	200 Zellen/Blüte
Hagel-Wirkstoff/Sorten-Versuch	Triebproben	3000 Zellen/g Gewebe
Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm	Stammproben	3000 Zellen/g Gewebe

## **3.10 Auswertung und Statistik**

### **3.10.1 Allgemeines Vorgehen**

Die erhobenen Werte wurden handschriftlich erfasst, digitalisiert und anschließend mit einer Statistiksoftware (SAS 9.3, SAS Institute Inc., Cary, USA) ausgewertet. Für die statistischen Modelle wurden als Faktoren die erhobenen Parameter, Co-Variablen und Designelemente verwendet. Zur Modelanpassung wurden die Daten ggf. transformiert und nicht signifikante Faktoren entfernt. Im Folgenden ist für die einzelnen Versuche das Vorgehen bei der Auswertung aufgeführt. Die Darstellung der Modelle folgt Piepho et al. (2003). Die Erzeugung der Diagramme erfolgte mit der Statistiksoftware oder Excel. Neben den Diagrammen und Tabellen im Ergebnisteil (4. Ergebnisse) sind im Anhang (7.2) die statistischen Auswertungen mit den einzelnen Modellen detaillierter dargestellt. Für jedes statistische Modell sind die p-Werte (Signifikanzwerte) der einzelnen getesteten Effekte angegeben.

### **3.10.2 Hagelversuche**

Die Auswertung der Hagelversuche (Wirkstoff- und Sortentestung) erfolgte zweistufig. Im ersten Schritt wurde für die Varianten der Befall der Triebe (ja/nein) mit einem generalisierten linearen gemischten Modell (generalized linear mixed model; GLMM) mit fixen und zufälligen Effekten geschätzt. Hierbei wurde mit der Prozedur Proc GLIMMIX die binomiale Verteilung des Parameters berücksichtigt. Die vom Modell angegebenen Konfidenzintervalle für jeden Schätzwert, die zu einer statistischen Separierung der einzelnen Varianten dienen, sind aufgrund des geringen Stichprobenumfangs pro Variante und Versuchsdurchgang (n=10) bei dieser Modellierung sehr groß. Die tatsächlichen Werte befinden sich mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit innerhalb der Grenzen dieses für jeden Einzelwert spezifischen Intervalls. Durch die Verwendung des Modells unter Einbeziehung diverser Co-Variabler und Designelemente konnten jedoch die Einzelwerte besser geschätzt werden als durch eine rein deskriptive statistische Auswertung.

Die im Modell verwendeten Variablen sind Befall, sichtbare nekrotische Läsion, Gesamtrieblänge, Anzahl verletzter/neuer Blätter und Triebabschluss. Als Designelemente wurde die Lage in der Klimakammer (Zeile, Spalte) sowie der Wiederholungsblock verwendet, um etwaige Unterschiede in der Klimakammer auszugleichen. Mit denselben Variablen wurde zusätzlich die Nekrosenlänge der befallenen Triebe geschätzt, um eine Aussage über die Befalldynamik treffen zu können. Hierfür wurde ein gemischtes lineares Modell (mixed linear model) mit fixen und zufälligen Effekten verwendet. Eine Normalverteilung der Residuen der Schätzwerte lag vor. Die verwendete Prozedur war Proc MIXED. Die angegebenen Konfidenzintervalle für die geschätzten Werte dienen zur statistischen Separierung der einzelnen Varianten. Zusätzlich wurde ein Mittelwertvergleich per t-Test mit Buchstabendarstellung nach Piepho (2004) durchgeführt. Die Darstellung der

Ergebnisse zum Befall und zur Nekrosenlänge der befallenen Triebe erfolgt im selben Diagramm durch unterschiedlich farbige Balken.

### 3.10.3 Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung

Bei den Freilandblütenversuchen zur Wirkstofftestung wurden 2009 und 2010 Mittelwerte pro Parzelle erhoben und verrechnet, während 2011 eine Einzelbaumbonitur stattfand und für die Auswertung verwendet wurde (Prozent befallene Blüten pro Parzelle bzw. Baum). Die beiden Standorte Mühlingen und Vogt wurden gemeinsam ausgewertet, da der Standorteffekt in keinem Jahr signifikant war. Das verwendete Modell war ein gemischtes lineares Modell (Proc MIXED). Zur Homogenisierung der Varianzen wurde eine Winkeltransformation der Daten durchgeführt ( $\text{Arcsinus}^{\sqrt{\text{Befall}/100}}$ ). Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten für eine bessere Interpretierbarkeit rücktransformiert. Hierbei ist zu beachten, dass aus dem Mittelwert der Median wird und die untere bzw. obere Ausdehnung des Konfidenzintervalls (tatsächlicher Wert liegt mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit in diesem Intervall) asymmetrisch wird. In das Modell wurde die Behandlung, der Standort und Designelemente aufgenommen, für das Jahr 2011 zusätzlich der Abstand des bonitierten Baumes zum inokulierten Baum. Die Berechnung des Wirkungsgrades aus den rücktransformierten Werten erfolgte nach Abbott (1925). Im Anhang sind Mittelwertvergleiche per t-Test dargestellt (7.2).

### 3.10.4 Trieb- und Stammproben

Bei den Trieb- und Stammproben-Analysen aus den Hagelversuchen (Wirkstoffe und Sorten) und des Stamminjektionsversuches wurde aus den sicher positiven und quantifizierbaren Einzelwerten pro Doppelprobe ein Mittelwert errechnet. Aus den Messungen an verschiedenen Pflanzen als Wiederholung wurde wiederum ein arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler berechnet. Die Darstellung erfolgte in Tabellenform entsprechend der Lage der Probenahmestelle am Trieb bzw. Stamm mit einer farblichen Legende zur Zellzahl pro mg Gewebe.

### 3.10.5 Blütenproben

Die Blütenproben aus den Freilandversuchen 2011 und dem Versuch zur Konzentration der Inokulationssuspension wurden entsprechend den Trieb- und Stammproben zu einem Mittelwert mit Standardfehler verrechnet ( $\text{Standardfehler} = \sqrt{\text{Varianz}} / \sqrt{\text{Stichprobenumfang}}$ ).

### 3.10.6 Rohdatenplot und Verteilungsplot

Bei der Beschreibung der Daten zur Distanz in den Freilandblütenversuchen, der Sortenanfälligkeit in der Klimakammer und im Freiland wurden Box-Whisker-Plots (Kastengrafiken) verwendet (Abbildung 7.13). Hier werden wichtige beschreibende Lagemaße dargestellt. Neben dem Mittelwert, dem Median, dem unteren und oberen Quartil (25er bzw. 75er Perzentil) in der Box werden durch die „Whisker“ oder

„Antennen“ der Minimum- bzw. Maximumwert dargestellt. Als Ausreißer (Kreise) werden Werte abgebildet, die über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand (Abstand zwischen den Quartilen) unter- bzw. oberhalb der Quartile liegen.

### **3.10.7 Erstellung von Regressionen und Korrelationen**

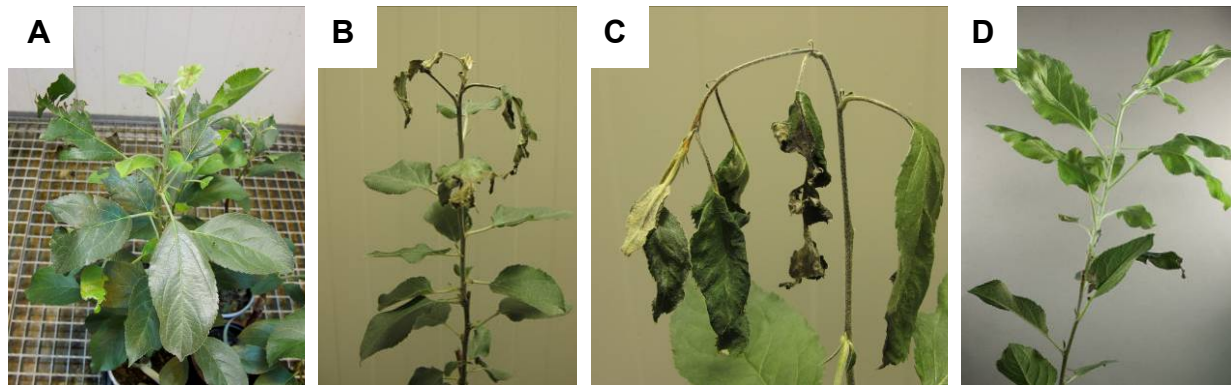
Zur Beschreibung von Zusammenhängen zwischen einzelnen erhobenen Parametern wurden im Freilandblütenversuch 2011, im Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion, bei den Sortentestungen und bei der Standarddeichkurve für die PCR-Analysen Regressionsanalysen mit der Statistiksoftware durchgeführt (Proc REG). Hierbei wurden für die einzelnen Untersuchungen Regressionsmodelle aufgestellt und die Regressionsgleichungen und Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) ermittelt. Angegeben wird außerdem die Anzahl der Beobachtungen (n) und der Signifikanzwert des Korrelationsmodells (p-Wert). Die grafischen Darstellungen beinhalten das Streudiagramm der Einzelwerte und die Regressionskurve.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wirkstofftests zur Feuerbrandregulierung

#### 4.1.1 Hagelversuche

Ziel der Hagelversuche war die Etablierung einer Methode zum Test von Prüfmitteln auf ihre Wirkung zur Verhinderung von Neuinfektionen an Apfeltrieben nach simuliertem Hagel. Hierbei wurden mit einem Fadengerät zur manuellen Blütenausdünnung Verletzungen an Blättern erzeugt, die den Verletzungen durch Hagel gleichen. Anschließend wurde die verletzte Pflanze mit einer *Erwinia amylovora* Inokulationssuspension besprüht. Eine Behandlung mit den Prüfmitteln erfolgte 4 h nach der Inokulation. Die Befallsentwicklung wurde wöchentlich in der Klimakammer festgestellt. In Abbildung 4.1 sind die Verletzungen und die Symptomentwicklung dargestellt.



**Abbildung 4.1** Versuche zur Hagelimitation.

Verletzte Pflanze (A), Pflanze mit Symptomen 14 (B) bzw. 21 (C) Tage nach Inokulation, mit Streptomycin behandelte Pflanze ohne Symptome 21 Tage nach Inokulation (D).

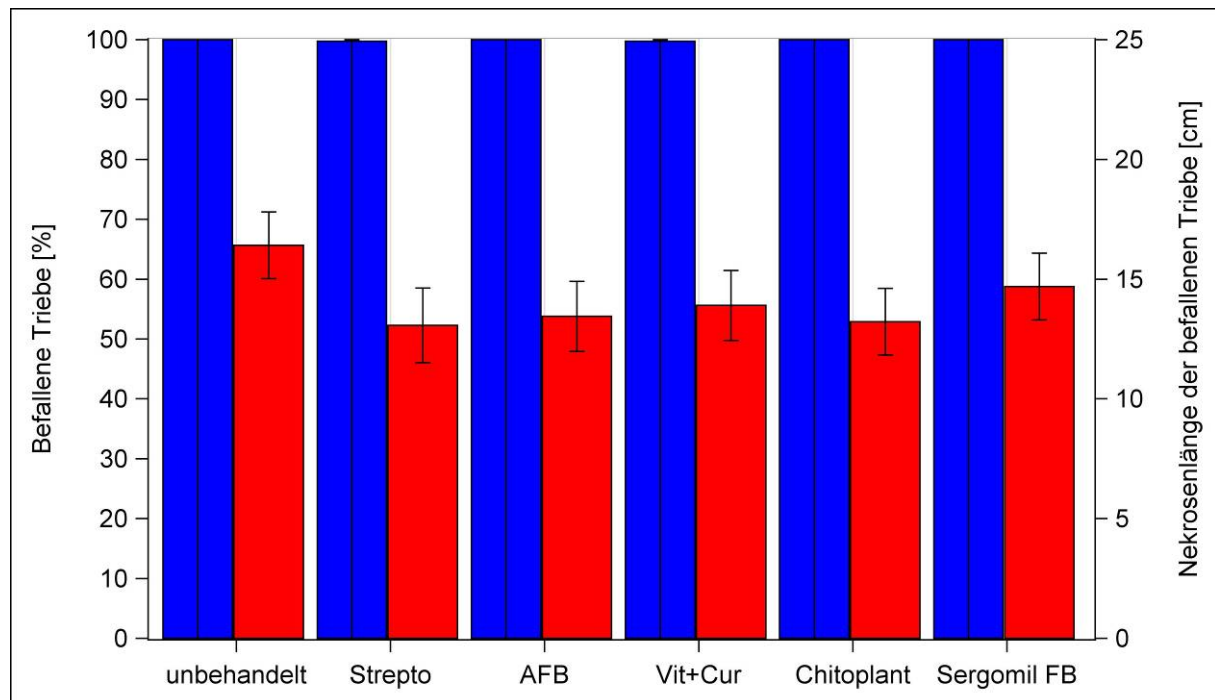
In Abbildung 4.1 A erkennt man die künstlich erzeugten Verletzungen. Sie sind unregelmäßig über die oberen wüchsigen Blätter des Triebes der Handveredelung (Gala/M9) verteilt. Die Blätter können nur leicht verletzt oder stark zerschlagen sein. Dieses Schadbild entspricht den Verletzungen, die durch starken Hagel im Freiland an jungen wüchsigen Trieben entstehen. Die Symptome entstanden zuerst an den ursprünglichen Verletzungen (B) und breiteten sich dann im Trieb aus (C). Eine Behandlung mit Streptomycinsulfat konnte die Entstehung von Symptomen verhindern, so dass der Trieb weiter wuchs (D). Die Versuchsanordnung konnte also zur Testung von Wirkstoffen zur Verhinderung von Neuinfektionen über Hagelverletzungen verwendet werden. In insgesamt vier Versuchsdurchgängen wurden verschiedene Wirkstoffe auf ihre Wirksamkeit getestet.

Die bei der Bonitur erhobenen Parameter umfassen den Befall (ja/nein) und die sichtbare nekrotische Läsion als Beschreibung der optisch sichtbaren Symptome, die Anzahl der verletzten Blätter als Maßstab für die mögliche Angriffsfläche für die Infektion und die Gesamtrieblänge, Anzahl neuer Blätter und der Triebabschluss für



den physiologischen Zustand der Pflanzen. Die Auswertung der Daten erfolgte zweistufig. Zuerst wurde über ein binomiales Modell der Befall pro Variante geschätzt, dann die durchschnittliche Nekrosenlänge der befallenen Triebe je Variante bestimmt.

In Abbildung 4.2 sind die Ergebnisse aus dem ersten Versuchsdurchgang dargestellt. Die Auswertung und Darstellung folgt dem in 3.10.2 beschriebenen Vorgehen. Im Anhang sind die detaillierten statistischen Ergebnisse dargestellt (7.2).



**Abbildung 4.2** Ergebnis des 1. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation.

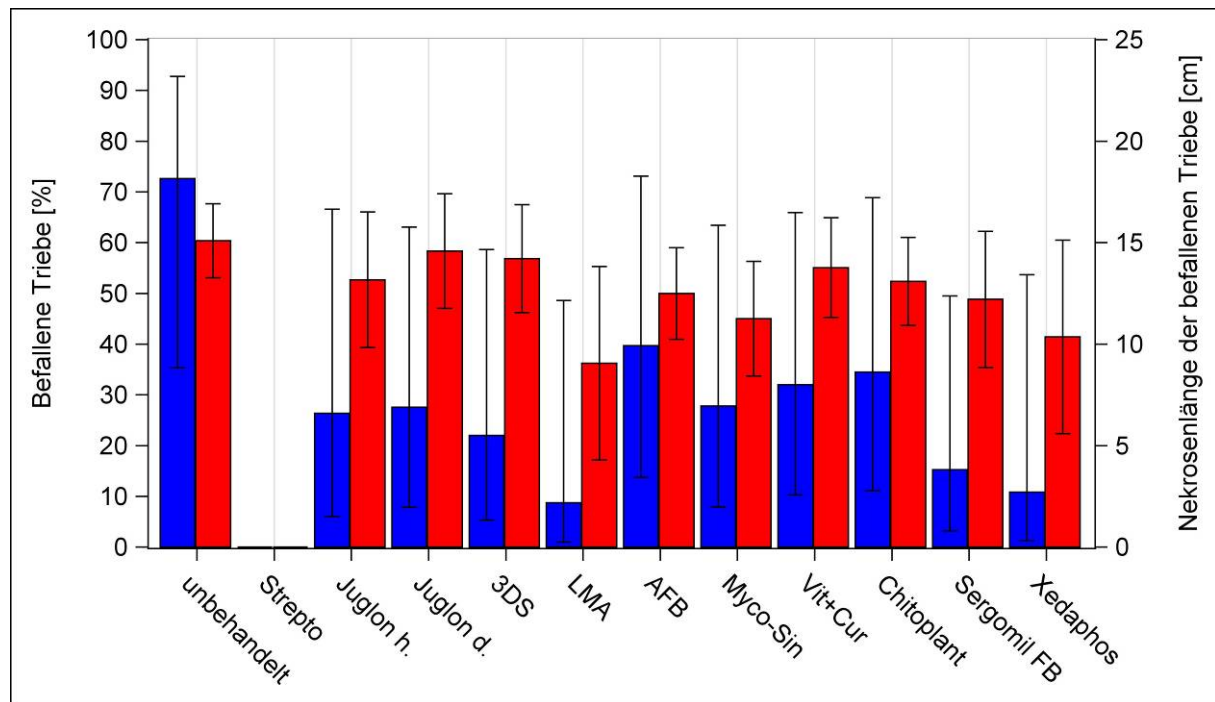
Prozentualer Anteil befallene Triebe (blau) und durchschnittliche Nekrosenlänge der befallenen Triebe (rot) jeweils mit Konfidenzintervall [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.4].

Im ersten Hagelversuch wurden vier Prüfmittel auf ihre Wirkung zur Verhinderung von Triebinfektionen nach Hagel untersucht (Abbildung 4.2). Als Referenzmittel diente Streptomycinsulfat, das keine Zulassung als Pflanzenschutzmittel hat, jedoch erfahrungsgemäß den höchsten Wirkungsgrad gegen *Erwinia amylovora* hat. Die Temperatur in der Klimakammer betrug 27 °C tags und 24 °C nachts und war damit deutlich höher als in den weiteren drei Versuchsdurchgängen (vgl. Tabelle 4.6). 21 Tage nach der Inokulation waren bei allen Trieben ein Befall feststellbar, unabhängig von der jeweiligen Behandlung.

Die durchschnittliche Nekrosenlänge der befallenen Triebe (nicht befallene Triebe wurden nicht in diese Auswertung einbezogen) betrug bei unbehandelt 16,4 cm, bei Streptomycin 13,1 cm, beim Düngemittel AFB 13,4 cm, beim kupferhaltigen Düngemittel Vittafos+Curamin 13,9 cm, beim Resistenzinduktor Chitoplant 13,2 cm und beim kupferhaltigen Düngemittel Sergomil FB 14,7 cm. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Keines der geprüften Mittel konnte bei

## Ergebnisse

diesen hohen Temperaturen somit den Befall im Vergleich zu unbehandelt verringern. Im zweiten Versuchsdurchgang wurden diese und zusätzliche Wirkstoffe bei angepasstem Temperaturverlauf getestet (Abbildung 4.3).



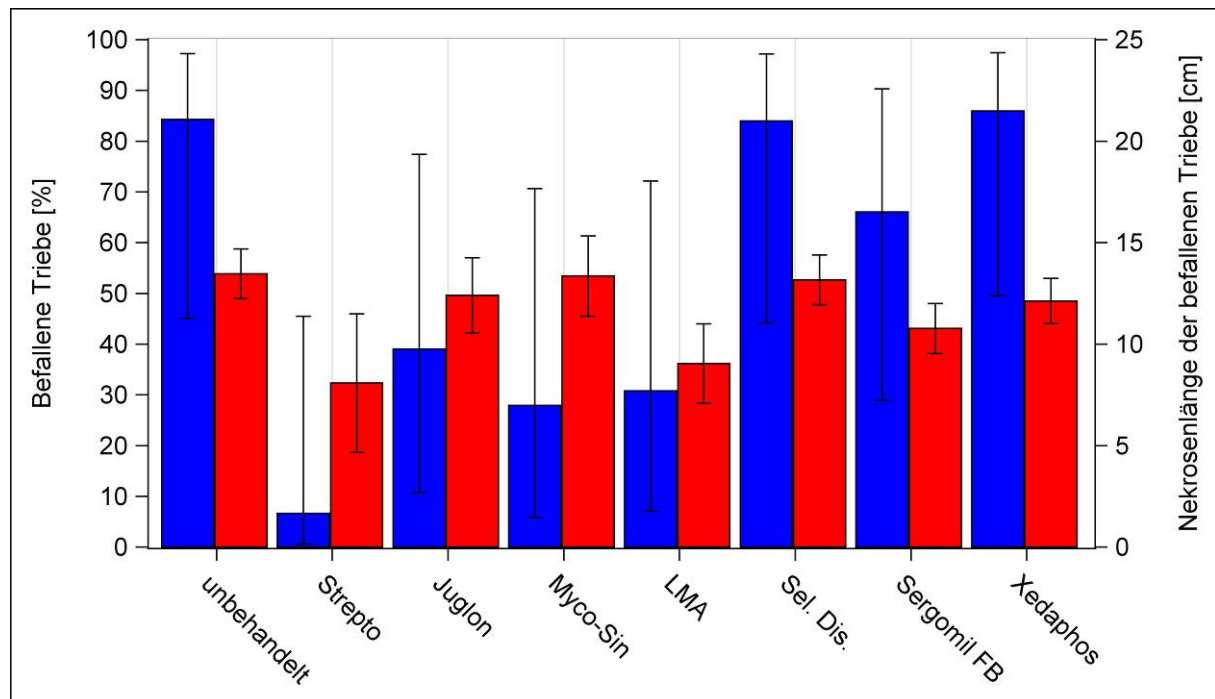
**Abbildung 4.3** Ergebnis des 2. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation.

Prozentualer Anteil befallene Triebe (blau) und durchschnittliche Nekrosenlänge der befallenen Triebe (rot) jeweils mit Konfidenzintervall [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.5]

Im zweiten Durchlauf der Hagelversuche wurden neben Streptomycin 10 Prüfmittel getestet (Abbildung 4.3). Die Temperatur in der Klimakammer betrug 24 °C tags und 18 °C nachts. Bei unbehandelt betrug der Befall 72,6 %, bei Streptomycin 0 %. Die Varianten von Juglon, einem Inhaltsstoff der Walnuss, hatten einen Befall von 26,4 % (hell) bzw. 27,6 % (dunkel). Da bei diesem Wirkstoff eine UV-Instabilität vermutet wurde, wurde eine Variante während der ersten 24 h des Versuchs gegen Licht abgedeckt („dunkel“). Ein Unterschied durch die Abdeckung im Befall war jedoch nicht erkennbar. Die Applikation des Versuchsmittels 3DS führte zu einem Befall von 22,0 %, die Prüfmittel LMA und AFB zu 8,7 bzw. 40,0 %. Das Pflanzenstärkungsmittel Myco-Sin auf der Basis von Aluminiumsulfat senkte den Befall auf 27,8 %, das kupferhaltige Düngemittel Vittafos+Curamin auf 32,0 %. Die Applikation des Resistenzinduktors Chitoplant verringerte den Befall auf 34,5 %, das kupferhaltige Düngemittel Sergomil FB auf 15,2 %, das Düngemittel Xedaphos auf 10,8 %.

Der Befall von Streptomycin unterscheidet sich von den anderen Varianten deutlich. Für die Auswertung des Triebbefalls wurde Streptomycin nicht berücksichtigt. Bei der statistischen Auswertung des Triebbefalls konnte im binomialen Modell bei diesem Stichprobenumfang (10 Triebe pro Variante) keine signifikante Wirkung der Behandlung festgestellt werden ( $p=0,4534$ ). Tendenziell hatte jedoch die Anzahl der

nach Verletzung neu gebildeten Blätter, als Indikator für die Wüchsigkeit der Pflanze, einen Einfluss auf den Befall ( $p=0,0699$ ). Die durchschnittlichen Nekrosenlängen der befallenen Triebe liegen zwischen 9,1 cm (LMA) und 15,1 cm (unbehandelt), sie unterscheiden sich jedoch nach statistischer Auswertung nicht signifikant. Auch der Behandlungseffekt zeigte sich hier nicht als signifikant ( $p=0,9625$ ). Neben Streptomycin zeigten LMA, Sergomil FB und Xedaphos einen geringeren Befall als die anderen Prüfmittel. Beim 3. Hagelversuch wurden neben Streptomycin 6 Prüfmittel getestet (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4** Ergebnis des 3. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation.

Anteil befallene Triebe (blau) und durchschnittliche Nekrosenlänge der befallenen Triebe (rot) jeweils mit Konfidenzintervall [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.6].

Beim dritten Hagelversuch (Abbildung 4.4) betrug die Temperatur 24 °C am Tag und 18 °C in der Nacht. Bei der unbehandelten Variante betrug der Befall 84,3 %, während bei Streptomycin der Befall bei 6,7 % lag. Die Behandlung mit Juglon führte zu einem Befall von 39,0 %, mit Myco-Sin 27,9 %. LMA senkte den Befall auf 30,8 %, das kupferhaltige Prüfmittel Selecta Disperss führte zu 84,0 %, Sergomil zu 66,0 % und Xedaphos zu 86,0 %. Die statistische Auswertung beschreibt den Behandlungseffekt als signifikant ( $p=0,0431$ ). Die durchschnittlichen Nekrosenlängen der befallenen Triebe lagen zwischen 8,1 cm (Streptomycin) und 13,5 cm (unbehandelt), sie unterschieden sich nicht signifikant. Im statistischen Modell der Nekrosenlängen ist der Behandlungseffekt nicht signifikant ( $p=0,3579$ ), während die Triebgröße einen signifikanten Einfluss auf die Nekrosenlänge hatte ( $p=0,0526$ ).

Insgesamt lag der Befall bei diesem Versuchsdurchgang höher als beim zweiten Durchgang. Neben Streptomycin konnten Juglon, Myco-Sin und LMA den Befall

## Ergebnisse

deutlich verringern, während die anderen Prüfmittel den Befall nicht wesentlich reduzierten. Zusätzlich zur optischen Bonitur wurden an drei repräsentativen Trieben je Variante Triebproben per Real-Time PCR auf ihre Erregerlast untersucht (Tabelle 4.1). Hierdurch sollte der Zusammenhang zwischen Bakterienkonzentration im Gewebe und der Symptomentwicklung beschrieben werden.

**Tabelle 4.1** Quantifizierung und Ausbreitung von *Erwinia amylovora* in Trieben nach Hagelinokulation und Prüfmittelbehandlung.

		unbehandelt			Strepto			Juglon			Myco-Sin		
		positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø
Entfernung von Nekrosengrenze [cm]	+7,5 cm	0/3	0		0/1	0		1/3	2,93E+04	2,93E+04	1/2	7,75E+03	7,75E+03
	+2,5 cm	0/3	0		1/1	5,86E+05		2/3	3,40E+03	3,10E+03	1/3	8,87E+03	8,87E+03
	Nekrosengrenze												
	-2,5 cm	3/3	5,61E+05	2,35E+05	0/3	0		0/2	0		2/3	1,76E+03	1,73E+03
	-7,5 cm	1/1	2,37E+05		0/2	0		0/1	0		1/2	5,40E+02	5,40E+02
Entfernung von Nekrosengrenze [cm]	+7,5 cm	1/2	2,50E+03	2,50E+03	0/2	0		0/3	0		3/3	9,69E+03	8,45E+03
	+2,5 cm	2/3	1,23E+04	6,86E+03	1/2	1,46E+02		3/3	9,69E+03	8,45E+03			
	Nekrosengrenze												
	-2,5 cm	1/3	5,90E+03	5,90E+03	2/3	7,88E+03	5,16E+03	2/2	3,37E+02	1,29E+02			
	-7,5 cm	0/2	0		3/3	5,42E+03	5,34E+03	0/0	0				

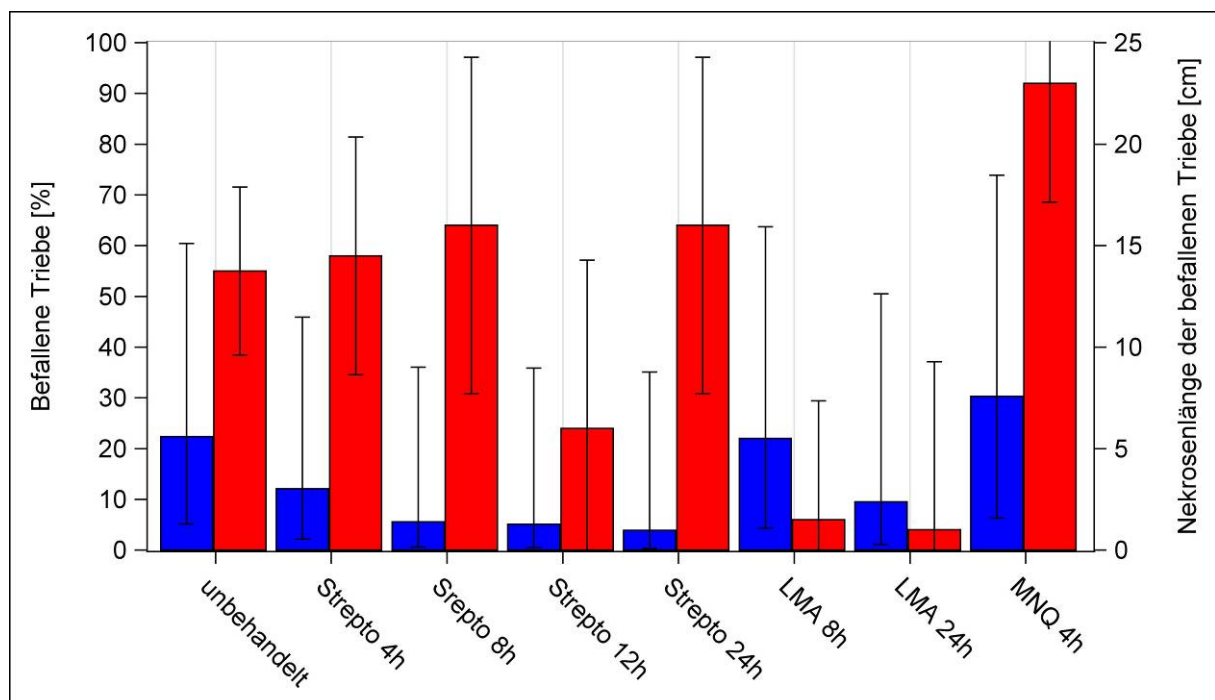
  

Farblegende lg (Zellzahl/ mg Gewebe)					
<1	2	3	4	5	6

Bei der Untersuchung auf die Erregerlast im Gewebe wurde 2,5 cm ober- bzw. unterhalb der Nekrosengrenze eine Triebprobe genommen (Tabelle 4.1). Bei ausreichender Trieblänge wurden außerdem noch Proben 7,5 cm ober- bzw. unterhalb der Nekrosengrenze genommen. Bei der unbehandelten Variante konnten oberhalb der Nekrosengrenze keine Bakterien nachgewiesen werden. Unterhalb wurden in allen getesteten Trieben hohe Zellzahlen festgestellt ( $>10^5$  Zellen/mg). Bei der Variante mit Streptomycin konnte nur in einem Trieb oberhalb der Grenze eine hohe Zellzahl festgestellt werden. Bei den mit Juglon behandelten Trieben wurden ausschließlich oberhalb mittlere Zellzahlen ( $10^3$ - $10^4$  Zellen/mg) an einem bzw. zwei Trieben festgestellt. Bei den Trieben mit Myco-Sin Behandlung hatten einer bzw. zwei Triebe oberhalb und unterhalb mittlere bis niedere Zellzahlen ( $10^2$ - $10^3$  Zellen/mg). Bei den Trieben mit LMA Behandlung wurden an einem bis zwei Trieben mittlere Zellzahlen bestimmt, hauptsächlich oberhalb der Nekrosengrenze. Bei der Variante Selecta Disperss wurden vor allem unterhalb der Grenze mittlere Zellzahlen ( $10^3$  Zellen/mg) an zwei bzw. drei Trieben bestimmt. Bei der Variante Sergomil FB wurden an den Probestellen direkt an der Nekrosengrenze an allen Trieben mittlere bis niedrige Zellzahlen bestimmt ( $10^2$ - $10^3$  Zellen/mg).

Über die Farblegende können die Stufen der Zellzahlen den Proben zugeordnet werden (grün: kein positiver Nachweis, gelb: niedrige Zellzahl, orange: mittlere

Zellzahl, rot: hohe Zellzahl). Bei den unbehandelten Trieben wurden hohe Zellzahlen nachgewiesen, während bei Streptomycin kaum Zellen nachweisbar waren. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Befall und der Erregerlast ist bei den anderen Varianten nicht deutlich erkennbar. Der geringere Befall bei Juglon, Myco-Sin und LMA im Gegensatz zum Befall bei Selecta Disperss und Sergomil FB wird nicht von einer geringeren Zellzahl im Gewebe begleitet. Jedoch sind weniger getestete Triebe positiv. Die Beziehung zwischen dem symptomatischen Befall und der Erregerlast im Gewebe ist bei den unterschiedlichen Varianten nicht klar zu bestimmen. In einem weiteren Versuchsdurchgang wurden verschiedene Applikationszeitpunkte untersucht (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5** Ergebnis des 4. Hagelversuches 28 Tage nach Inokulation.

Anteil befallene Triebe (blau) und durchschnittliche Nekrosenlänge der befallenen Triebe (rot) jeweils mit Konfidenzintervall [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.7]

Die Temperaturführung war im 4. Hagelversuch im Vergleich zu den anderen Durchgängen zu Beginn des Versuchs während der Inokulation und direkt im Anschluss daran eher kühl (12 °C/20 °C), anschließend jedoch 24 °C am Tag und 18 °C in der Nacht. Insgesamt waren die Pflanzen nicht mehr sehr triebig und teilweise schon im Triebabschluss. Bei unbehandelt lag der Befall nur bei 22,3 %, bei Streptomycin nach 4 h appliziert bei 12,1 %, bei Streptomycin nach 8 h 5,1 % und nach 24 h 3,9 % (Abbildung 4.5). Die Behandlung mit LMA führte nach 8 h zu 22,0 %, nach 12 h zu 0 % und nach 24 h zu 9,5 % Befall. Das Prüfmittel MNQ nach 4 h appliziert führte zu einem Befall von 30,3 %. Während der Behandlungseffekt nicht signifikant war ( $p=0,6514$ ), hatte die Trieblänge einen signifikanten Einfluss im statistischen Modell zum Befall ( $p=0,0179$ ). Eine klare Unterscheidung zwischen den einzelnen Versuchsvarianten ist bei dem allgemein sehr geringen Befall nicht

## Ergebnisse

möglich. Die durchschnittlichen Nekrosenlängen der befallenen Triebe (1,0 – 23,0 cm) unterscheiden sich zwar signifikant, der geringe Befall lässt jedoch hier keine eindeutige Aussage zu.

Zusätzlich zu den Exaktversuchen in der Klimakammer wurde ein Freilandversuch zur Wirkstofftestung im August bei warmer und feuchter Witterung durchgeführt (Temperaturmittel 18-21 °C, ca. 45 mm Niederschlag). Trotz der Vorhersage durch das Modell Maryblyt (Abbildung 7.8) konnten weder 11 noch 21 Tag nach der Inokulation Symptome an den verletzten Blättern festgestellt werden. Bis zum Versuchsabbau Anfang Oktober wurden keine Symptome beobachtet. Da es bei keiner Variante zu einer Infektion gekommen ist, kann keine Aussage über die Wirksamkeit der geprüften Wirkstoffe getroffen werden.

Mit den Hagelversuchen können Wirkstoffe auf ihre Wirkung zur Verhinderung von Neuinfektionen nach Hagelverletzungen getestet werden. Neben der hohen Wirksamkeit von Streptomycin wurden die Potenz von Juglon, Myco-Sin und LMA und die geringere Wirkung von kupferhaltigen Prüfmitteln deutlich. Die Bedeutung des Temperaturverlaufes und der Wüchsigkeit der Pflanzen auf den Befall wurde offensichtlich. Kühle Temperaturen und geringe Wüchsigkeit schränken die Symptomausprägung deutlich ein. Entsprechend dem tatsächlichen Infektionsrisiko können Wirkstoffe entsprechend ihrer Wirksamkeit zur Anwendung empfohlen werden.

### **Fazit**

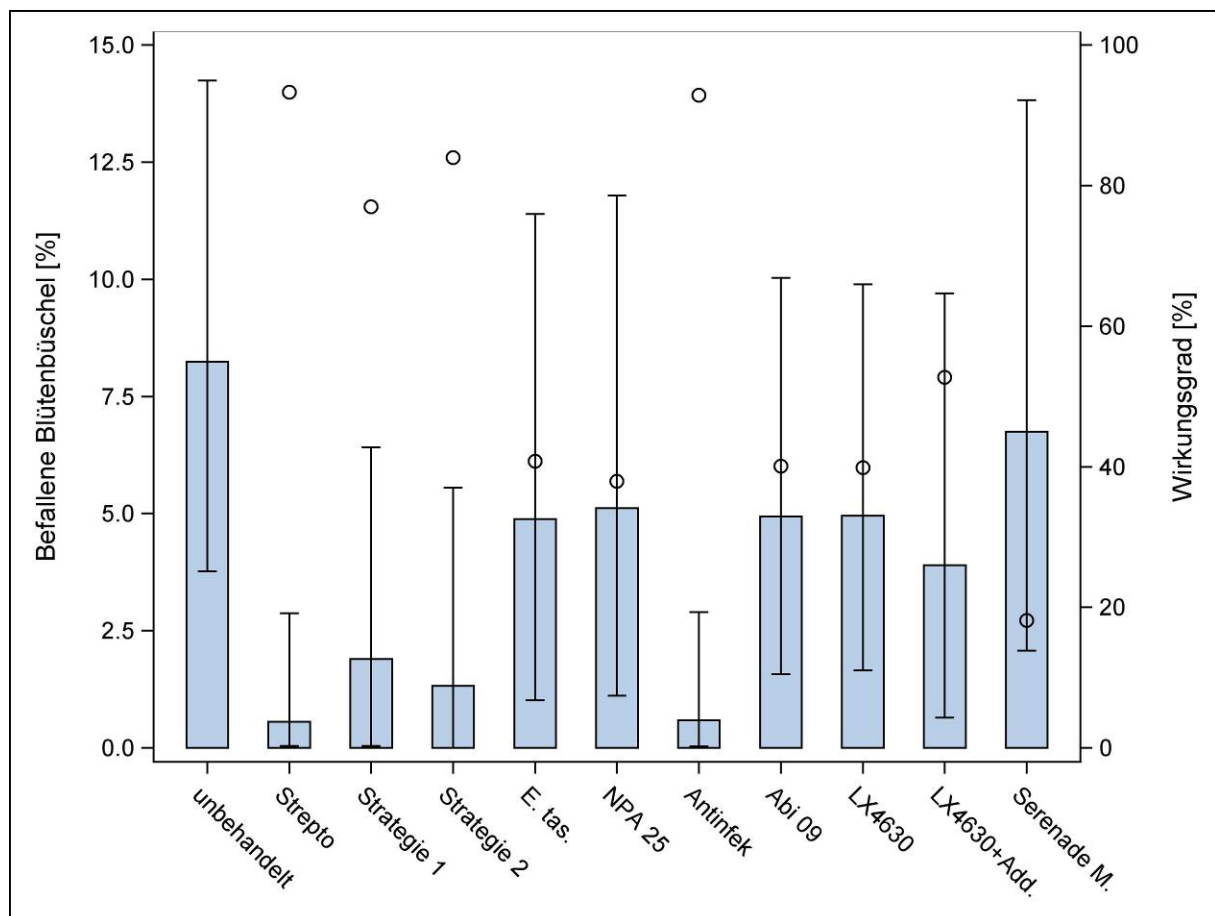
Die entwickelte Methode eignet sich zur Wirkstofftestung. Zum Erreichen statistisch belastbarer Aussagen müssen jedoch die Versuche wiederholt und die Stichprobenumfänge vergrößert werden. Die bisherigen Versuche lassen jedoch schon eine deutliche Tendenz erkennen, die für die Praxis ableitbare Empfehlungen ermöglicht. Dies wird auch bestätigt durch die hohe Wirksamkeit der getesteten Produkte in den Freilandblütenversuchen.

#### **4.1.2 Freilandblütenversuche**

In den Freilandblütenversuchen soll die Frage beantwortet werden, welche Wirkstoffe bzw. Produkte im Vergleich zum Antibiotikum Streptomycin einen ausreichenden Schutz vor Neuinfektionen während der Blüte bieten. Zusätzlich soll die dafür existierende Methode überprüft und ggf. weiterentwickelt werden. Die Testung von Wirkstoffen zur Verhinderung von Feuerbrandblüteninfektionen im Freiland erfolgte in den Jahren 2009-2011 an zwei Standorten. Detaillierte statistische Ergebnisse und die Versuchsprotokolle und Witterungsverläufe sind im Anhang aufgeführt (7.1, 7.2).

Im Jahr 2009 herrschten an beiden Standorten Infektionsbedingungen während der Blüte vor. In Vogt erfolgten drei, in Mühlungen aufgrund etwas längerer Infektionsbedingungen vier Applikationen der Versuchsmittel. Bei den beiden ersten

Applikationen wurden die Infektionsbäume inokuliert. Bonitiert wurde jeweils 24 Tage nach der ersten Inokulation. In Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt.



**Abbildung 4.6** Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2009 an zwei Standorten. Blütenbefall der Versuchsvarianten mit Konfidenzintervall (Balken) und Wirkungsgrade (Kreise) [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.8]; 3 bzw. 4 Behandlungen je Prüfmittel und Standort.

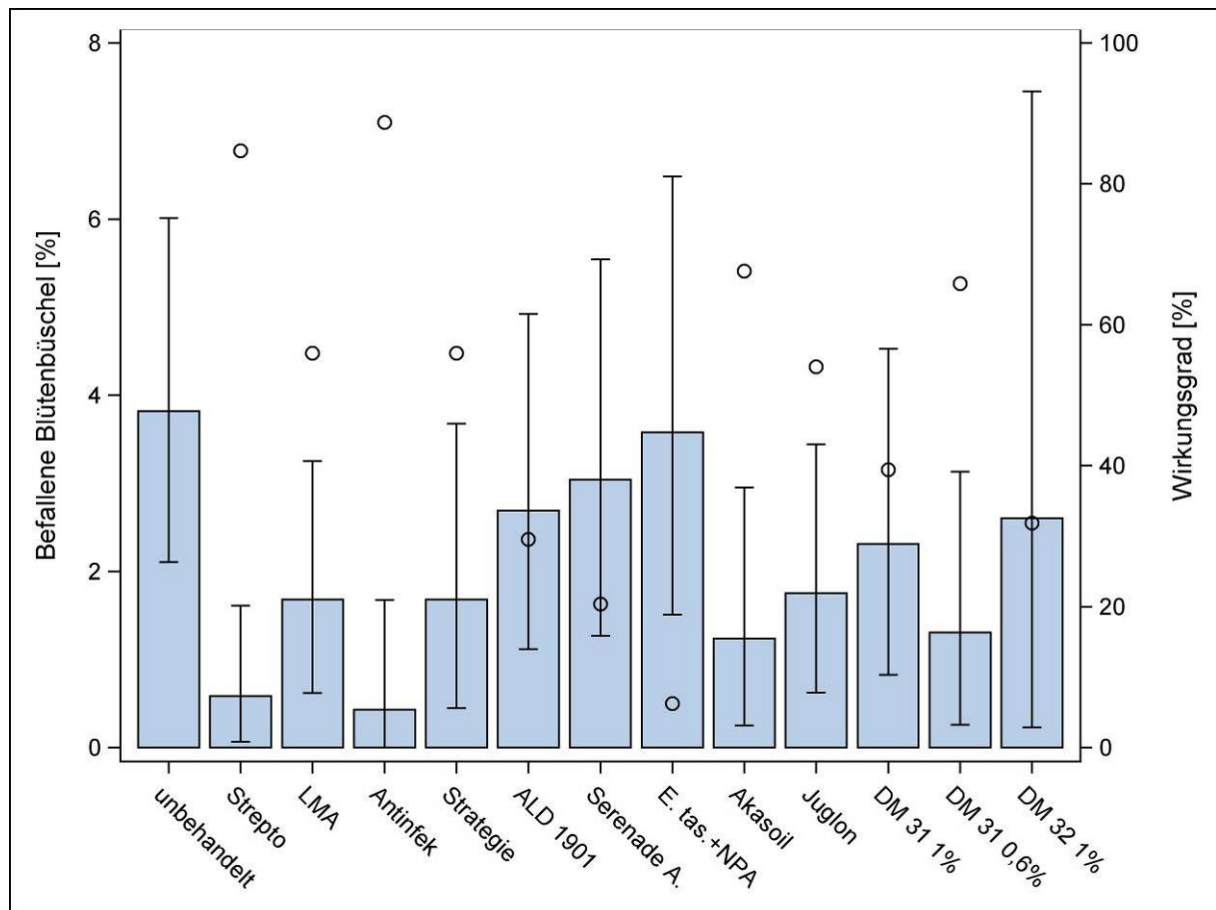
Der Standort hatte im statistischen Modell keine Signifikanz ( $p=0,3083$ ), während die Behandlung einen signifikanten Effekt hatte ( $p<0,0001$ ). Der Befall in den unbehandelten Parzellen betrug 8,2 % (Abbildung 4.6). Die Behandlungen mit Streptomycin und mit den streptomycinhaltigen Strategien führten zu einem Befall von 0,6 %, bzw. 1,9 % (1 x Serenade Max, 1 x Strepto, 2 x LX4622) und 1,3 % (1 x Blossom Protect, 1 x Strepto, 2 x LX4622). Die Variante mit dem Antagonist *Erwinia tasmaniensis* führte zu einem Befall von 4,9 %, die organische Säure NPA 25 erreichte 5,1 %. Die Variante mit dem Desinfektionsmittel Antinfek zeigte einen Befall von 0,6 %, der Antagonist Abi 09 (*Bacillus amyloliquefaciens*) von 4,9 %. Die beiden Varianten mit LX4630 hatten 5,0 % bzw. 3,9 % Befall. Die Variante mit dem Antagonist *Bacillus subtilis* (Serenade Max) hatte einen Befall von 6,7 %.

Über die paarweisen Vergleiche des t-Tests und der Buchstabendarstellung können Behandlungen zu Gruppen mit vergleichbarem Wirkungsgrad zusammengefasst

## Ergebnisse

werden. Zur Gruppe mit einem hohen Wirkungsgrad gehören Streptomycin (93,3 %), die Strategien (77,0 %, 83,9 %) und Antinfek (92,8 %). Zur Gruppe mit mittlerem bzw. niedrigem Wirkungsgrad gehören *Erwinia tasmaniensis* (37,9 %), NPA 25 (40,1 %), Abi 09 (40,1 %), LX4630 (39,9 %), LX4630+Additiv (52,7 %) und Serenade Max (18,1 %). Die Versuche 2009 waren vom Befall her auswertbar und zeigten ausreichende Wirkungsgrade bei der Applikation von Streptomycin und den streptomycinhaltigen Strategien sowie beim Prüfmittel Antinfek.

2010 dominierte vor und während der Blüte eine kühle Witterung, die nur kurzzeitig Infektionsbedingungen gegen Schluss der Blüte ermöglichte. Die Versuchsmittel wurden an beiden Standorten dreimal appliziert, in Vogt wurde einmal, in Mühlingen zweimal künstlich inokuliert. Die Bonitur erfolgte 25 Tage nach der ersten Inokulation. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 4.7 dargestellt.



**Abbildung 4.7** Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2010 an zwei Standorten. Blütenbefall der Versuchsvarianten mit Konfidenzintervall (Balken) und Wirkungsgrade (Kreise) [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.9]; 3 Behandlungen je Prüfmittel und Standort.

Bei der unbehandelten Versuchsvariante lag der Befall bei 3,8 % (Abbildung 4.7) und somit unter den vom EPPO Versuchsstandard geforderten 5 %. Im Jahr 2010 gab es auch keinen nennenswerten Befall in den Praxisanlagen im Bodenseegebiet. Trotz dem relativ geringen Befall in der unbehandelten Variante war der Behandlungseffekt

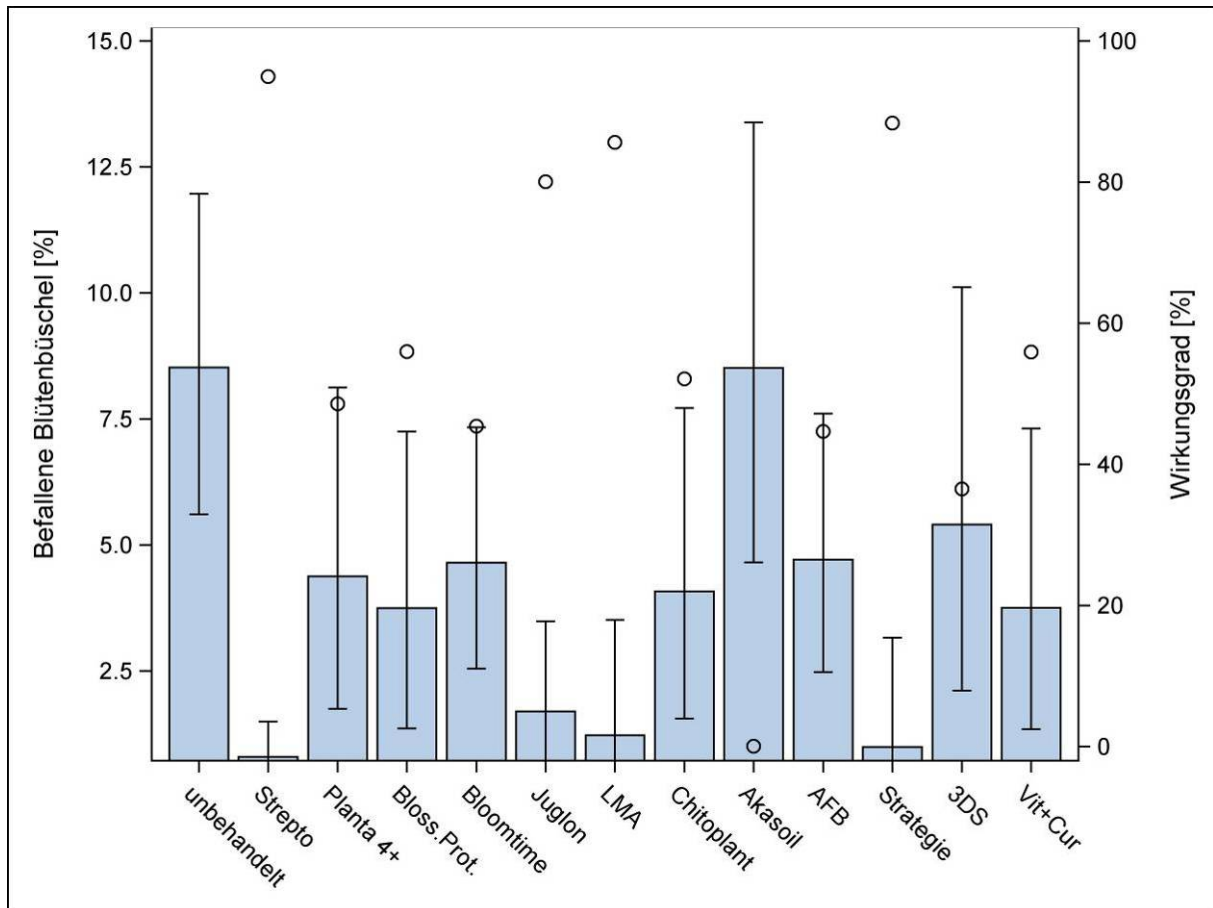


im statistischen Modell signifikant ( $p=0,0002$ ), wobei der Standorteffekt keinen signifikanten Einfluss hatte ( $p=0,9588$ ).

Die Variante mit Streptomycin hatte 0,6 % Befall, die mit dem Versuchsmittel LMA 1,7 % und die mit Antinfek 0,4 %. Bei der Strategie (2 x Vacciplant, 2 x Strepto) betrug der Befall 1,7 %, beim Resistenzinduktor ALD 1901 2,7 % und bei den Varianten Serenade ASO und *Erwinia tasmaniensis* + NPA 3,0 bzw. 3,6 %. Die Variante mit dem Desinfektionsmittel Akasoil hatte einen Befall von 1,2 %. Die Variante mit Juglon, einem Inhaltstoff der Walnuss, hatte 1,8 % Befall. Die kupferhaltigen Versuchsmittel DM 31 (Wirkstoffkonzentration 1 % und 0,6 %) und DM 32 führten zu einem Befall von 2,3 %, 1,3 % bzw. 2,6 %. Zur Gruppe mit einem hohen Wirkungsgrad zählen Streptomycin (84,7 %) und Antinfek (88,7 %). Einen mittleren Wirkungsgrad hatten LMA (56,0 %), die Strategie (56,0 %), Akasoil (67,6 %), Juglon (54,0 %) und DM 31 0,6 % (65,8 %). Einen niedrigen Wirkungsgrad hatten ALD 1901 (29,5 %), Serenade ASO (20,3 %), *Erwinia tasmaniensis* + NPA (6,3 %), sowie DM 31 1 % (39,4 %) und DM 32 (31,9 %). Das Prüfmittel Feusil erzeugte starke Verbrennungen an den Blättern und Blüten, so dass die Parzellen nicht ausgewertet werden konnten. Eine Verwendung als Pflanzenschutzmittel kommt aus diesem Grunde nicht in Frage. Der insgesamt geringe Befall lässt in diesem Versuch keine eindeutigen und belastbaren Aussagen über die Wirksamkeit der einzelnen geprüften Mittel zu.

Im Jahr 2011 war die Witterung zu Beginn der Blüte kühler, in der fortschreitenden Blüte fand jedoch ein Temperaturanstieg statt, so dass an beiden Standorten Infektionsbedingungen vorlagen. Appliziert wurde jeweils viermal, bei den ersten drei Applikationen erfolgte eine künstliche Inokulation der Infektionsbäume. In Vogt wurde die Bonitur des Blütenbefalls 26 Tage nach der ersten Inokulation durchgeführt, die Bonitur des Triebbefalls 53 Tage danach, in Mühlingen 30 bzw. 57 Tage danach. In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse dargestellt.

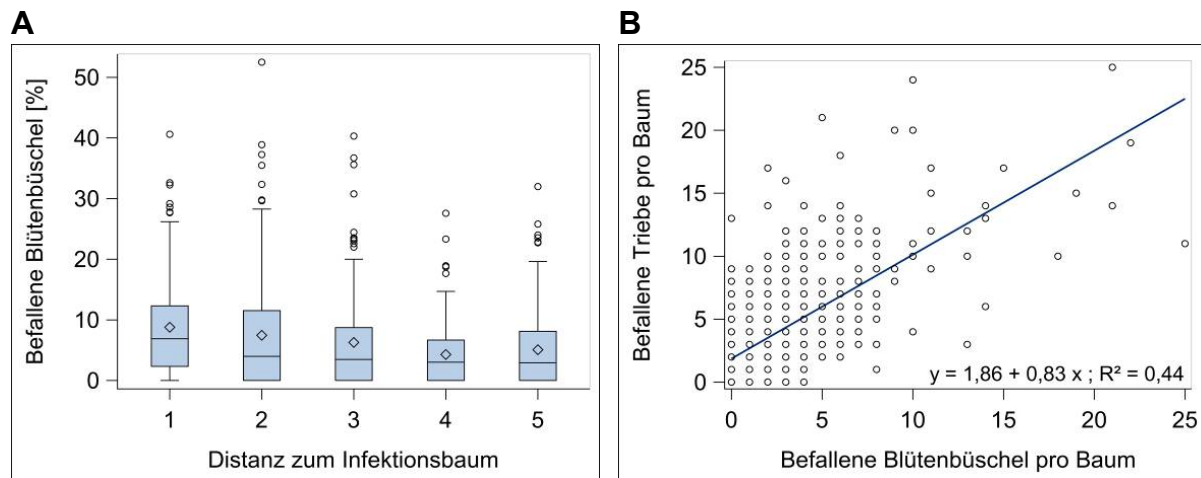
## Ergebnisse



**Abbildung 4.8** Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2011 an zwei Standorten. Blütenbefall der Versuchsvarianten mit Konfidenzintervall (Balken) und Wirkungsgrade (Kreise) [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.10]; 4 Behandlungen je Prüfmittel und Standort.

Im statistischen Modell zeigten sich der Behandlungseffekt ( $p < 0,0001$ ) und die Distanz zum Infektionsbaum ( $p < 0,0001$ ) als signifikant, während der Standort keinen signifikanten Einfluss hatte ( $p = 0,1815$ ). Der Befall in den unbehandelten Parzellen betrug 8,5 % (Abbildung 4.8). Die Applikation von Streptomycin hatte einen Befall von 0,4 % zur Folge. Die Applikation des Desinfektionsmittels Planta 4+ führte zu 4,4 % Befall. Die Antagonisten Blossom Protect und Bloomtime FB zu 3,8 bzw. 4,6 % Befall. Bei den Varianten Juglon und LMA wurde 1,7 bzw. 1,2 % Befall festgestellt. Beim Resistenzinduktor Chitoplant 4,1 %, bei Akasoil 8,5 % und beim Düngemittel AFB 4,7 %. Die Strategie (1 x Blossom Protect, 3 x Strepto) führte zu 1,0 % und das Versuchsmittel 3DS zu 5,4 % Befall, das kupferhaltige Düngemittel Vittafos + Curamin zu 3,8 % Befall. Zur Gruppe mit hohem Wirkungsgrad zählen Streptomycin (95,0 %), Juglon (80,0 %), LMA (85,6 %) und die Strategie (88,3 %). Einen mittleren bzw. niedrigen Wirkungsgrad hatten Planta 4+ (48,6 %) Blossom Protect (56,0 %) Bloomtime FB (45,4 %) Chitoplant (52,1 %), AFB (44,7 %), 3DS (36,5 %) Vittafos + Curamin (55,9 %), und Akasoil (0,1 %). Die Versuche 2011 waren vom Befall her auswertbar und zeigten ausreichende Wirkungsgrade bei der Applikation von Streptomycin und der streptomycinhaltigen Strategie sowie bei den Prüfmitteln LMA und Juglon.

Im Jahr 2011 erfolgte die Bonitur des Blüten- und Triebbefalls auf Einzelbaumbasis. Hierdurch wurden Korrelationsanalysen möglich (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9** Zusammenhang zwischen Blütenbefall und Distanz zum Infektionsbaum (A) und zwischen befallenen Blüten und befallenen Trieben (B) der Freilandblütenversuche 2011.

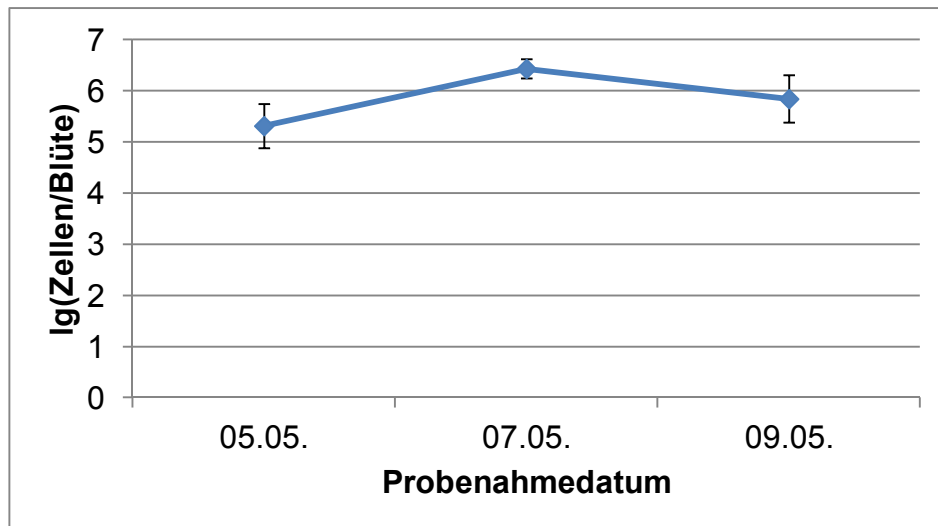
Der Abstand des ersten Baumes zum Infektionsbaum betrug 1,2 m, der Abstand zwischen den Bäumen 0,7 m, der Reihenabstand 2,0 m.

Der signifikante Einfluss der Distanz des bonitierten Baumes zum Infektionsbaum (1. Baum 1,2 m zum Infektionsbaum, 0,7 m zwischen den Bäumen der Parzelle) wurde im statistischen Modell festgestellt. Der Rohdaten-Plot zeigt die genaue Verteilung des Befalls über die Bäume der Parzelle (Abbildung 4.9 A). Eine Regressionsanalyse über die Rohdaten führte zur Formel  $y = 9,55 - 1,06 x$  ( $R^2 = 0,04$ ,  $n = 685$ ,  $p < 0,0001$ ), wobei  $y$  der prozentuale Anteil an befallenen Blütenbüscheln und  $x$  die Distanz zum Infektionsbaum beschreibt. Der Befall am ersten Baum betrug also 8,49 % und nahm von Baum zu Baum um etwa 1 % ab.

Zusätzlich erfolgte 2011 die Bonitur des Triebbefalls der einzelnen Bäume. Eine Regressionsanalyse zwischen Blütenbefall und Triebbefall zeigt eine eindeutige Korrelation der beiden Parameter mit  $y = 1,86 + 0,83 x$  ( $R^2 = 0,44$ ,  $n = 684$ ,  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 4.9 B) über alle Versuchsvarianten und Standorte hinweg. Die Verschiebung der Geraden auf der Y-Achse um 1,86 weist darauf hin, dass nicht alle befallenen Triebe bei der Blütenbonitur als befallen gewertet wurden. Die Steigung von 0,83 zeigt, dass diese Diskrepanz jedoch bei höher werdenden Befallszahlen pro Baum abnahm.

An beiden Standorten wurden während der Blüte Blütenproben genommen und auf die Zellzahlen pro Blüte untersucht. In Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11 ist der Verlauf abgebildet.

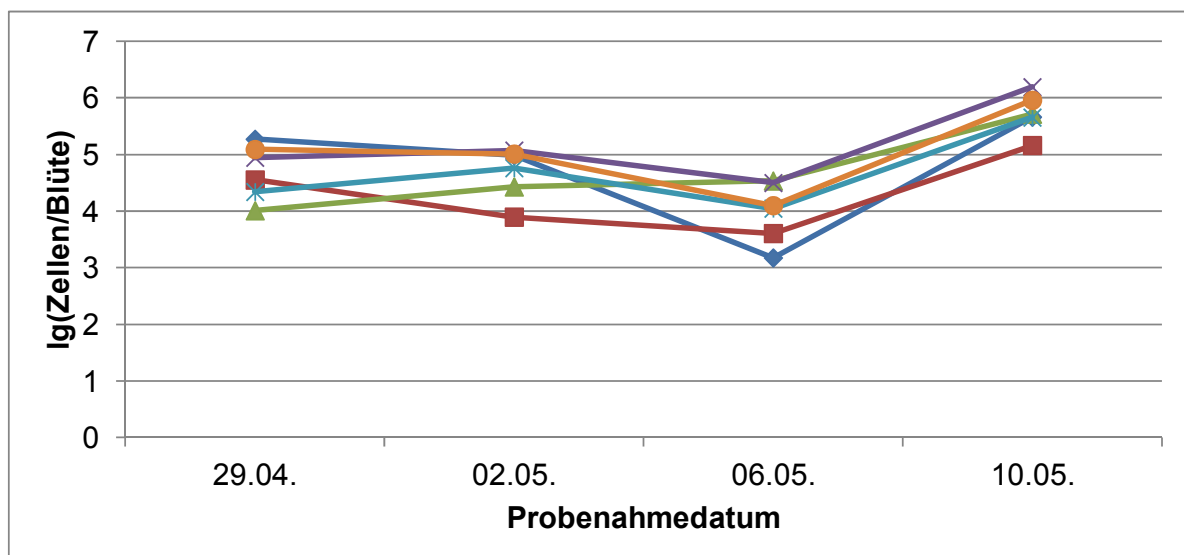
## Ergebnisse



**Abbildung 4.10** Vorkommen von *Erwinia amylovora* in den Blüten der unbehandelten Parzellen am Standort Vogt während des Wirkstoffversuchs 2011.

Entwicklung des mittleren Befalls pro Blüte (dekadischer Logarithmus der Zellzahl/Blüte mit Standardfehler) [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.11].

Am Standort Vogt (Abbildung 4.10) wurden die Blüten der unbehandelten Parzellen mit einer Mischprobe (25 Blüten/Probe) auf die Zellzahl untersucht. Das erste Mal inokuliert wurde am 30.04.2011. Die Probenahmen erfolgten an den nachfolgenden Behandlungstagen (05., 07., 09.05.). Am 05. und 07.05. wurde ebenfalls künstlich inokuliert. Am ersten Probenahmetag sind mit  $5,27 \times 10^5$  Zellen/Blüte bereits hohe Zellzahlen erreicht, die am zweiten Probenahmetag noch ansteigen ( $3,22 \times 10^6$ ) und dann wieder leicht sinken ( $1,58 \times 10^6$ ).



**Abbildung 4.11** Vorkommen von *Erwinia amylovora* in den Blüten ausgewählter Parzellen am Standort Mühlingen während des Wirkstoffversuchs 2011.

Entwicklung des mittleren Befalls pro Blüte (dekadischer Logarithmus der Zellzahl/Blüte) der jeweiligen Versuchsvariante [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.12]

◆ unbehandelt ■ Streptomycin ▲ Planta 4+ ✕ Blossom Protect \* Bloomtime FB ● Juglon

Am Standort Mühlingen (Abbildung 4.11) wurden an ausgewählten Varianten pro Parzelle 1 Baum beprobt (10 Blüten/Probe, 4 Bäume pro Variante). Am 25.05. wurde zum ersten Mal behandelt und inokuliert. Weitere Behandlungen erfolgten am 29.04., 02.05. und 06.05.. Am 29.04. und 02.05. wurde künstlich inokuliert. Die Probenahmen erfolgten am 29.04., 02., 06. und 10.05.. Tendenziell ist bei allen Varianten zuerst eine leichte Abnahme bis zum 06.05. festzustellen und dann wiederum eine stärkere Zunahme (Abbildung 4.11). Bei den unbehandelten Parzellen beträgt die Zellzahl pro Blüte am ersten Termin  $1,9 \times 10^5$ , nahm dann zuerst leicht ab ( $9,6 \times 10^4$ ), war am 3. Termin deutlich niedriger ( $1,5 \times 10^3$ ) und stieg dann stark an ( $4,6 \times 10^5$ ). Die Zellzahl am dritten Termin ist überraschend gering in Bezug auf die vorhergehenden und dem folgenden Termin. Möglicherweise liegt hier ein nicht mehr nachvollziehbarer Probenahme- oder Analysefehler vor.

Bei Streptomycin wurden am ersten Tag  $3,6 \times 10^4$  Zellen pro Blüte festgestellt. Am zweiten und dritten Termin waren die Zellzahlen geringer ( $7,9 \times 10^3$  bzw.  $4,1 \times 10^3$ ) und stiegen zum vierten Termin wieder deutlich an ( $1,5 \times 10^5$ ). Bei Planta 4+ wurde zu Beginn eine relativ geringe Zellzahl bestimmt ( $1,0 \times 10^4$ ), dann erfolgte eine schwache Zunahme ( $2,7 \times 10^4$ ;  $3,4 \times 10^4$ ) und zum letzten Termin hin eine starke Zunahme ( $5,2 \times 10^5$ ). Bei der Variante mit Blossom Protect wurden am ersten Termin  $8,8 \times 10^4$  Zellen pro Blüte festgestellt beim zweiten  $1,2 \times 10^5$ , beim dritten  $3,2 \times 10^4$  und beim vierten mit  $1,2 \times 10^6$  der höchste Wert des Versuchs. Bei Bloomtime FB betrug die Zellzahl/Blüte am ersten Termin  $2,2 \times 10^4$ , an den folgenden Terminen  $5,8 \times 10^4$ ,  $1,1 \times 10^4$  und am letzten Termin  $4,5 \times 10^5$ . Bei Juglon betrug die Zellzahl pro Blüte am ersten Termin  $1,2 \times 10^5$ , am zweiten  $1,0 \times 10^5$ , am dritten  $1,4 \times 10^4$  und am vierten  $9,2 \times 10^5$ . Die Zellzahlen am Standort Mühlingen sind etwas geringer als am Standort Vogt, reichten aber offensichtlich auch für einen Befall durch Blüteninfektionen aus.

Betrachtet man die Entwicklung der Zellzahlen der einzelnen Varianten im Zusammenhang mit dem Befall am Standort Mühlingen (unbehandelt 9,8 %, Streptomycin 2,2 %, Planta 4+ 8,1 %, Blossom Protect 7,8 %, Bloomtime FB 8,5 %, Juglon 5,9 %), so kann man keinen direkten Zusammenhang zwischen den Zellzahlen/Blüte der einzelnen Varianten an einem bestimmten Termin und dem bonitierten Befall feststellen. Möglicherweise war der Stichprobenumfang (10 Blüten eines Baumes einer Parzelle) und die Wiederholung (4 Parzellen) zu gering, so dass keine repräsentativen Proben genommen wurden. Vor allem der Verlauf und die Höhe der Zellzahlen bei unbehandelt mit dem Ausreißer nach unten und das relativ hohe Niveau der Zellzahlen bei Streptomycin decken sich nicht mit der bonitierten Befallshöhe.

Die durch das Prognosemodell berechnete Infektionswahrscheinlichkeit war zwischen dem dritten Termin bis kurz nach dem vierten Termin (08.05.-11.05.) am

## Ergebnisse

höchsten (Abbildung 7.6). Die Zellzahlen am vierten Termin sollten also für den Befall am einflussreichsten sein. Dies könnte auch darauf hinweisen, dass das Prognosemodell unter den Versuchsbedingungen mit einem hohen Infektionsdruck nicht ausreichend genau arbeitete. Das Modell unterschätzte also die Infektionsgefahr. Der Befall war das Ergebnis des aggregierten Infektionsdrucks über die Blühperiode.

Die Ergebnisse mehrerer Jahre und Standorte zeigen, dass mit diesem Versuchsdesign eine Aussage über die Wirkung eines Prüfmittels zur Verhinderung von Neuinfektionen an Blüten möglich ist. Die Verwendung von direkt inokulierten Bäumen als Ausgangspunkt für die Ausbreitung des Erregers in der Parzelle mit natürlichen Vektoren (v. a. Insekten, aber auch Wind und Regen) konnte bestätigt werden. Die Korrelation zwischen Blüten- und Triebbefall zeigte, dass der bonitierte Blütenbefall zu Triebbefall führt. Tendenziell wurden mehr befallene Triebe als befallene Blütenbüschel bonitiert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass einige befallene Blütenbüschel vor der Bonitur abgefallen sind, jedoch trotzdem eine Triebinfektion erfolgte.

Für die Unterscheidung der einzelnen Varianten kann der Vergleich zwischen den jeweiligen Medianen mit den rücktransformierten Grenzen des Konfidenzintervalles herangezogen werden. Mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit liegt der tatsächliche Wert innerhalb der Grenzen des Intervalls. Im Zuge der Rücktransformation liegen die Intervallsgrenzen asymmetrisch zum Median, was jedoch auf die Interpretation keine Auswirkung hat. Wenn sich zwei Konfidenzintervalle nicht überlappen, so kann man von statistisch signifikanten Unterschieden sprechen. Diese Darstellung ersetzt die gebräuchliche Buchstabendarstellung. Da sie direkte paarweise Vergleiche mit den abgebildeten Konfidenzintervallen ermöglicht, ist sie deutlich präziser und aussagekräftiger. Zusätzlich ist die Berechnung des Wirkungsgrads nach Abbott (1925) eine Möglichkeit, den Befall in den behandelten Parzellen zu den unbehandelten Parzellen in Bezug zu setzen.

In allen Versuchsjahren wurde der Behandlungseffekt im Unterschied zum Standorteffekt als signifikant beschrieben. Dies bedeutet, dass die Wirkung der einzelnen Wirkstoffe nicht vom Standort und der dort vorherrschenden Witterung beeinflusst wurde. Die Wirkung war vielmehr robust und nicht umweltabhängig. Im Jahr 2011 wurden die Prüfmittel in Vogt mit einer Rückenspritze und in Mühlingen mit einem Parzellensprühgerät appliziert. Wenn sich hierdurch eine Auswirkung auf die Wirkung ergeben hätte, so müsste dies in den Standorteffekt eingehen. Man kann also einen Einfluss der Applikationsart ausschließen.

Das Versuchsdesign mit indirekter Inokulation der Versuchsbäume via Inokulation der Infektionsbäume führte zu einer für die Feuerbrandepidemiologie typischen

Ausbreitung des Erregers in den Versuchspartzen auf insgesamt hohem Niveau. Trotz unterschiedlicher Witterung war das Infektionspotential in den Versuchspartzen über die Versuchsdauer konstant hoch. Sowohl die angegebenen Befallswerte als auch die Betrachtung der Effekte erlauben eine robuste Angabe über die Wirkung in unterschiedlichen Umwelten (Witterung und Applikationsart). Hierdurch kann den Versuchsergebnissen eine hohe Bedeutung zugemessen werden und eine Übertragung auf die Praxis ist möglich. Der Vergleich mit anderen Versuchsergebnissen ist ebenso möglich, muss jedoch das entsprechende Versuchsdesign und die Versuchsdurchführung berücksichtigen.

## **Fazit**

Schwerpunkt der Freilandversuche zur Wirkstofftestung war die Bestimmung der Wirkungsgrade der Prüfmittel im Vergleich zu Streptomycin. Es zeigte sich die Wirksamkeit von Streptomycin, von streptomycinhaltigen Spritzfolgen, sowie von den Prüfmitteln Antinfek, Juglon und LMA. Eine Überprüfung der Ergebnisse in weiteren Versuchen ist jedoch notwendig. Bei den Prüfmitteln handelt es sich nicht um zugelassene Pflanzenschutzmittel, die für die Praxis zugänglich sind. Eine Zulassung der Prüfmittel als Pflanzenschutzmittel muss vom Hersteller durchgeführt werden und benötigt weitere Tests u. a. zur Umweltwirkung und Anwendertoxizität. Die existierende Methode eignet sich zur Wirkstoffprüfung und wurde in der statistischen Auswertung weiter entwickelt.

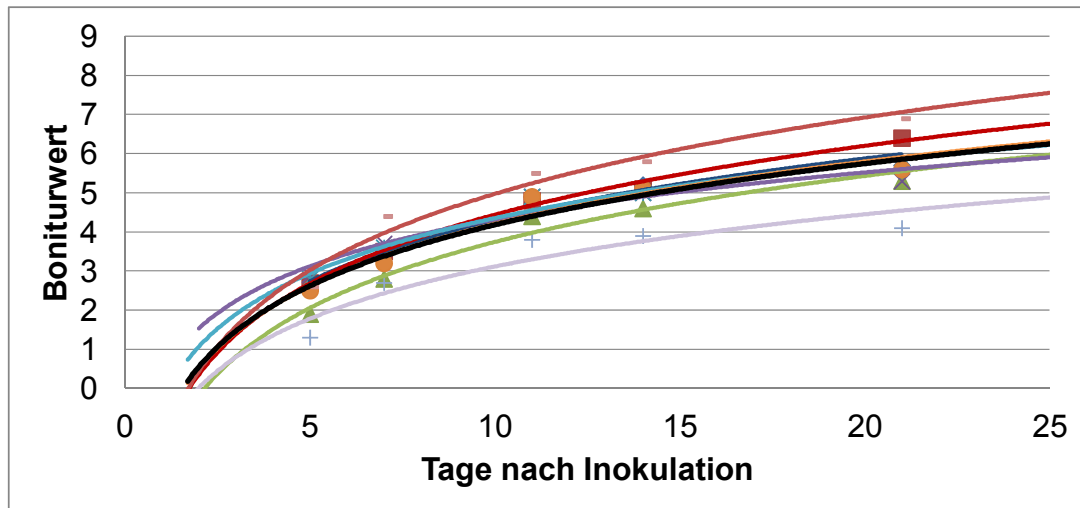
## **4.2 Apfelsortentests zur Feuerbrandanfälligkeit**

### **4.2.1 Blüteninokulationsversuche im Freiland und in der Klimakammer**

Die Auswahl feuerbrandtoleranter Sorten spielt eine Schlüsselrolle im Feuerbrandmanagement. Hierzu sollte eine Methode zur Testung von Blütenanfälligkeit an mehrjährigen Apfelbäumen in Freiland und Klimakammer etabliert werden und eine Boniturskala für den Blütenbefall entwickelt werden.

Die modernen Sorten Diwa, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova, und Wellant wurden auf ihre Anfälligkeit gegenüber Blüteninfektionen untersucht. Als Referenz dienten Sorten mit bekannter Anfälligkeit (Gala: hoch; Rewena: schwach) Hierbei wurden Blütenbüschel mit einer *Erwinia amylovora* Suspension inokuliert, die Bäume in der Klimakammer oder im Freiland aufgestellt und anschließend die Befallsentwicklung nach einer 9-Punkte-Skala (Tabelle 4.8) bonitiert und ausgewertet. Detaillierte statistische Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt (7.2). In Abbildung 4.12 ist die Befallsentwicklung über den durchschnittlichen Boniturwert je Sorte im Verlauf von 21 Tagen mit sortenspezifischen positiven logarithmischen Regressionskurven dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.12** Befallsentwicklung verschiedener Sorten beim Blütenversuch in der Klimakammer mit Regressionskurven.

Regressionskurve über alle Werte (schwarz),  $y=2,3 \times \ln(x)-1,0$ ;  $R^2=0,97$  [Detaillierte Auswertung im Anhang, Tabelle 7.13].

◆ Diwa ■ Gala ▲ Greenstar × Kanzi \* Mairac ● Pinova + Rewena - Wellant

Insgesamt war eine über alle Sorten hinweg relativ ähnliche Befallszunahme feststellbar (Abbildung 4.12). Während in den ersten 11 Tagen nach der Inokulation eine gleichmäßige Zunahme stattfand, stagnierte sie etwas bis zum 14. Tag und stieg dann bis zum 21. Tag nur noch leicht an. Die Reihenfolge der sortenspezifischen Anfälligkeit innerhalb eines Termins ist durchgehend sehr ähnlich. Während die Sorten Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Mairac und Pinova nahe an der Durchschnittskurve (schwarz) liegen, ist bei Wellant eine deutliche Abweichung nach oben und bei Rewena eine deutliche Abweichung nach unten feststellbar.

Betrachtet man die Durchschnittskurve, so kann man über die Boniturtabelle den allgemeinen Verlauf der Infektion über alle Sorten beschreiben. Nach 5 Tagen war an fast allen Blütenbüscheln eine Blüte befallen (Boniturwert 2,7), nach 7 Tagen waren bei der Hälfte der Blütenbüschel alle Blüten befallen (3,5), nach 11 Tagen waren alle Blüten und die Hälfte der Blütenstandstiele befallen, nach 14 Tagen waren alle Blütenbüschel und Blütenstandstiele befallen (5,1) und nach 21 Tagen waren zusätzlich noch die Neutriebe befallen (6,0). Zur Unterscheidung der Sorten wurde der Befall nach 21 Tage genauer betrachtet (Tabelle 4.2 und Abbildung 4.13).



**Tabelle 4.2** Tabellarische Darstellung des Blütenbefalls verschiedener Sorten 21 Tage nach der Inokulation im Freiland und in der Klimakammer.

Sorte	Freiland			Klimakammer			
	Mittelwert	Standardfehler	Anzahl Blütenbüschel	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanzklassen <sup>1</sup>	Anzahl Blütenbüschel
Diwa	5,8	0,2	22	5,7	0,3	bc	40
Gala	6,1	0,1	35	6,4	0,3	cd	26
Greenstar <sup>2</sup>	-	-	-	5,3	0,3	b	16
Kanzi	6,2	0,1	65	5,3	0,3	b	29
Mairac	5,7	0,1	32	5,7	0,3	bc	36
Pinova	5,3	0,1	27	5,6	0,3	b	37
Rewena	3,2	0,2	29	4,1	0,3	a	16
Wellant	7,0	0,1	56	6,9	0,3	d	18
Gesamtmittelwert	5,8	0,1	266	5,7	0,1	-	218

<sup>1</sup> Nur bei der Auswertung des Versuchs in der Klimakammer wurde ein statistisches Modell verwendet. Beim Versuch im Freiland wurden die Bedingungen hierfür nicht erfüllt. Deshalb bezieht sich die Angabe der Signifikanzklassen nur auf die Mittelwerte des Versuchs in der Klimakammer.

<sup>2</sup> Greenstar wurde nur im Freiland getestet.

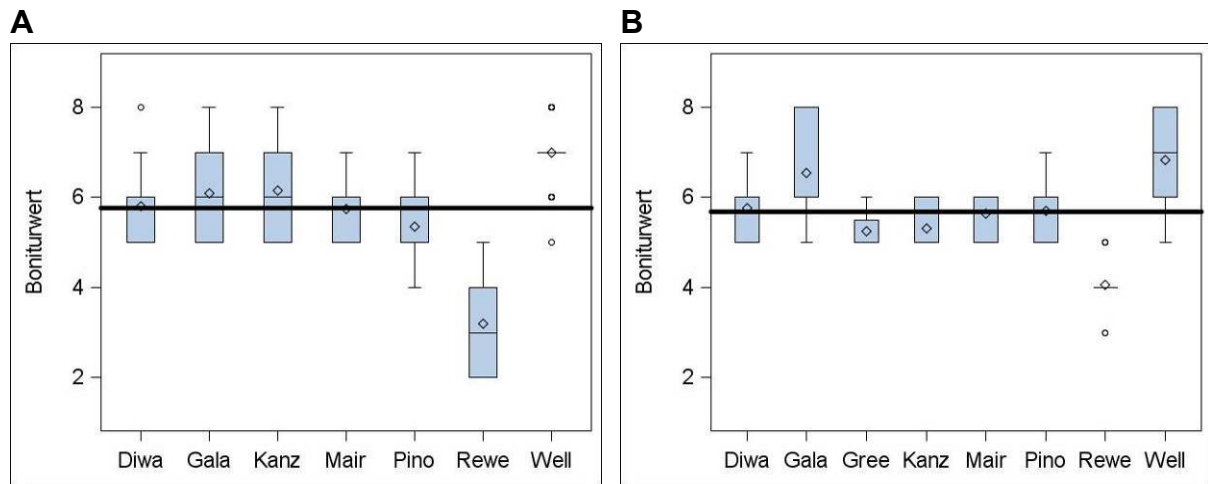
Am Beispiel des 21. Tages nach der Inokulation wurde der Blütenbefall der einzelnen Sorten genauer untersucht (Tabelle 4.2). Im Freiland betrug der mittlere Boniturwert bei Diwa 5,8, bei Gala 6,1, bei Kanzi 6,2, bei Mairac 5,7, bei Pinova 5,3, bei Rewena 3,2 und bei Wellant 7,0. Der Durchschnittswert über alle Sorten lag bei 5,8. Aufgrund versuchstechnischer Probleme (zu geringe Blütenentwicklung) liegen keine Daten für Greenstar im Freiland vor. Rewena zeigte sich deutlich geringer anfällig als die anderen Sorten. Wellant war am anfälligsten. Die anderen Sorten lagen bei erhöhter Anfälligkeit recht nahe beieinander.

Vor dem Aufstellen der Bäume im Freiland wurden die Bäume gemeinsam in einem Kühlraum bei 4 °C gelagert. Hierdurch wurde die Blüte der verschiedenen Sorten synchronisiert, die Inokulation erfolgte am selben Tag und die Symptomentwicklung erfolgte bei derselben Witterung. Daher können die Sorten direkt verglichen werden. Die Boniturwerte im Exaktversuch unter kontrollierten Witterungsbedingungen in der Klimakammer bestätigen diese Ergebnisse.

Das statistische Modell zum Befall im Klimakammerversuch zeigt den Sorteneffekt als signifikant an ( $p < 0,0001$ ). Diwa lag mit 5,7 in etwa gleich wie im Freiland, Gala mit 6,4 etwas höher, Greenstar erzielte in der Klimakammer 5,3, Kanzi war mit 5,3 ein Boniturwert niedriger als im Freiland, Mairac mit 5,7 genau gleich, Pinova mit 5,6 leicht höher, genauso wie Rewena mit 4,1, Wellant war mit 6,9 in etwa gleich wie im Freiland. Der Durchschnittswert über alle Sorten lag bei 5,7. Die statistische Auswertung mit der Einteilung in Signifikanzklassen beim Versuch in der Klimakammer zeigte, dass Rewena von den untersuchten Sorten am wenigsten anfällig war. Diwa, Greenstar, Kanzi, Mairac und Pinova bilden eine Gruppe im

## Ergebnisse

oberen Mittelfeld, während sich Gala mit Wellant im Bereich einer hohen Anfälligkeit befindet. In Abbildung 4.13 sind die Rohdaten des Blütenbefalls 21 Tage nach der Inokulation dargestellt.



**Abbildung 4.13** Rohdatenplot des Blütenbefalls verschiedener Sorten.

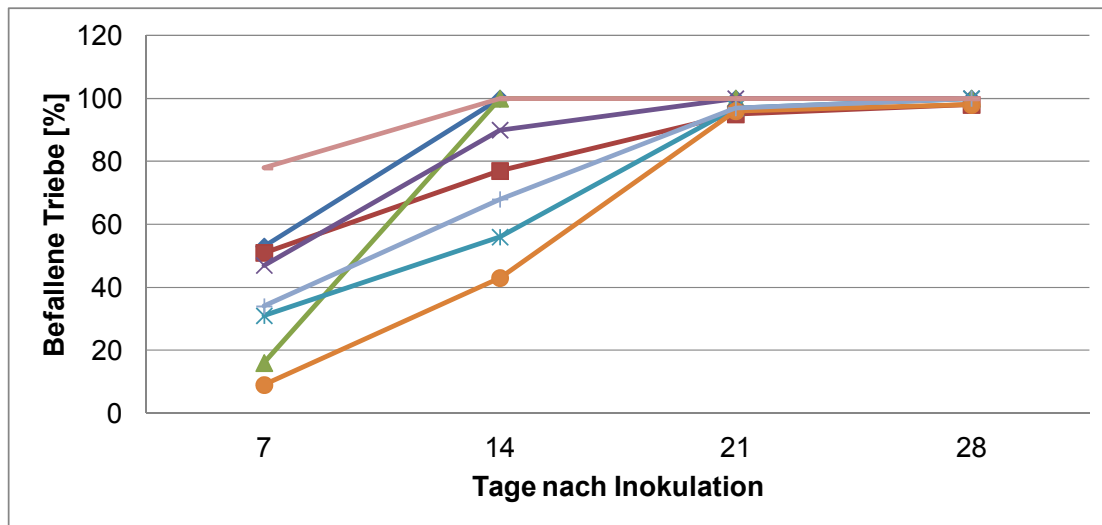
21 Tage nach der Inokulation im Freiland (A) und in der Klimakammer (B) mit Gesamtmittelwert über alle Sorten (Schwarzer Balken). Sorten: Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova, Rewena, Wellant. Greenstar wurde nur in der Klimakammer getestet.

Die Box-Plots in Abbildung 4.13 zeigen die Verteilung der einzelnen Boniturwerte. Hierbei sieht man, dass die Boniturwerte ca. 0,5-1 Boniturnoten um den Mittelwert streuen. Tendenziell streuen die Werte aus dem Klimakammerversuch weniger. Fasst man die beiden Ergebnisse zusammen, so kann jeder Sorte über einen Mittelwert eine Boniturklasse zugeordnet werden. Bei Diwa waren alle Blütenbüschel und Blütenstandstiele, sowie fast alle Neutriebe nekrotisch. Bei Gala waren alle Blütenbüschel, Blütenstandstiele und alle Neutriebe, sowie bei einigen Trieben das Holz nekrotisch (<5 cm). Bei Greenstar waren alle Blütenbüschel und Blütenstandstiele, sowie ganz wenige Neutriebe nekrotisch. Bei Kanzi waren alle Blütenbüschel und Blütenstandstiele, sowie einige Neutriebe nekrotisch. Bei Mairac waren alle Blütenbüschel und Blütenstandstiele, sowie einige Neutriebe nekrotisch. Bei Pinova und Greenstar waren alle Blütenbüschel und Blütenstandstiele, sowie wenige Neutriebe nekrotisch. Bei Rewena waren an allen Blütenbüscheln mindestens eine, bei der Hälfte mehrere Blüten befallen. Bei Wellant waren alle Blütenbüschel, Blütenstandstiele und Neutriebe befallen und bei allen Trieben eine Nekrose im Holz (<5 cm) zu beobachten.

### 4.2.2 Hagelversuch zur Sortentestung

Neben dem Test auf Feuerbrandanfälligkeit durch Blüteninfektionen soll durch die Methode der Hagelversuche (3.7.6) die Anfälligkeit nach Hagelverletzungen untersucht werden. Zeitgleich zum dritten Durchgang der Hagelversuche zur Wirkstofftestung wurden die bereits in den Blütenversuchen untersuchten Sorten auf

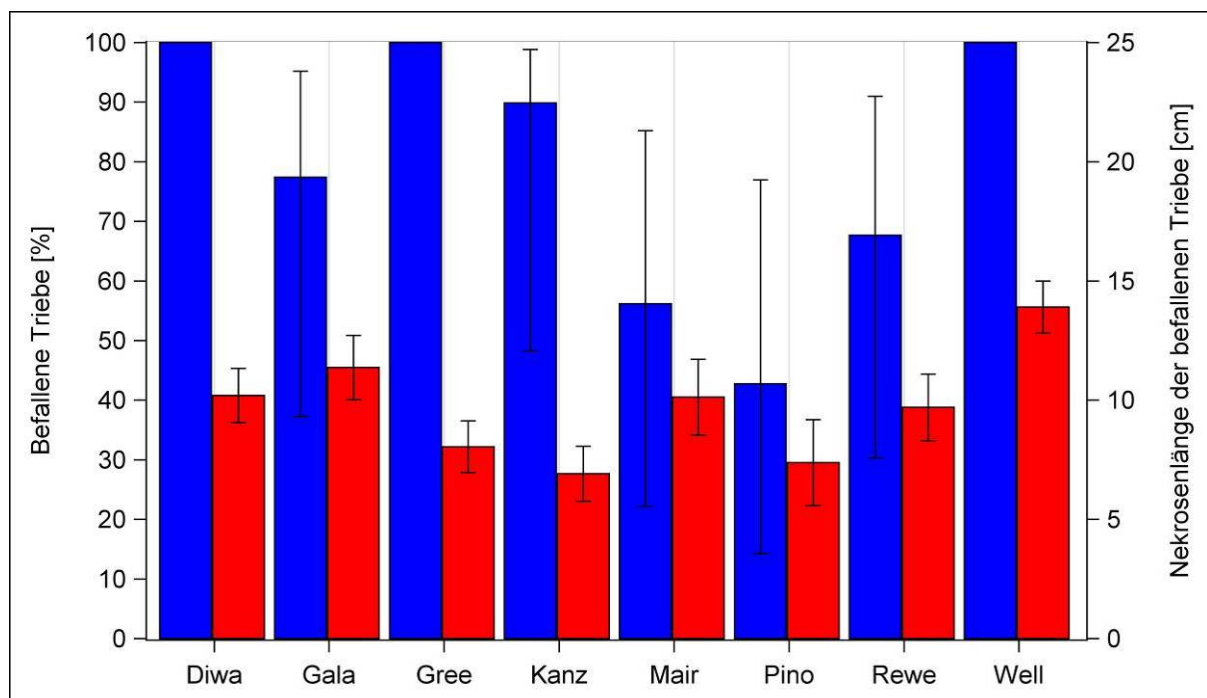
Anfälligkeit gegen Hagelinokulationen untersucht. In Abbildung 4.14 wird der Anteil der befallenen Triebe über die Zeit von 28 Tagen betrachtet



**Abbildung 4.14** Befallsentwicklung verschiedener Sorten beim Hagelversuch in der Klimakammer.

◆ Diwa ■ Gala ▲ Greenstar × Kanzi \* Mairac ● Pinova + Rewena - Wellant

Nach einer sortenspezifischen Befalldynamik zu Anfang der beobachteten Zeit glichen sich die verschiedenen Sorten nach 21 und nach 28 Tagen in ihrer Anfälligkeit stark an. Der Befall nach 14 Tagen scheint die Sortencharakteristika am besten wider zu spiegeln und wird deshalb näher untersucht (Abbildung 4.15).



**Abbildung 4.15** Feuerbrandanfälligkeit verschiedener Sorten nach Hagelverletzung, bonitiert 14 Tage nach der Inokulation.

Anteil befallene Triebe (blau) und durchschnittliche Nekrosenlänge der befallenen Triebe (rot) jeweils mit Konfidenzintervall [Detaillierte statistische Auswertung im Anhang, Tabelle 7.14].

## Ergebnisse

In Abbildung 4.15 sind die Boniturergebnisse des Hagelversuchs mit verschiedenen Sorten 14 Tagen nach der Inokulation dargestellt. Bei Diwa betrug der Befall 100 %, bei Gala 77 %, bei Greenstar 100 %, bei Kanzi 90 %, bei Mairac 56 %, bei Pinova 43 %, bei Rewena 68 % und bei Wellant 100 %. Im statistischen Modell zur Anzahl befallener Triebe war der Sorteneffekt nicht signifikant ( $p=0,3416$ ). Dennoch ist eine Gruppierung über die Befallshöhe in weniger anfällig (Mairac, Pinova, Rewena) und stark anfällig (Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Wellant) möglich. Die durchschnittlichen Nekrosenlängen der verschiedenen Sorten deckten sich nicht einheitlich mit der sortenspezifischen Befallshäufigkeit. Bei Diwa, Gala und Wellant waren ein hoher Befall und eine hohe Nekrosenlänge feststellbar. Bei Greenstar und Kanzi war der Befall hoch, die Nekrosenlänge jedoch vergleichsweise niedrig. Bei Mairac und Rewena war der Befall niedrig, die Nekrosenlänge jedoch höher. Bei Pinova waren der Befall und die Nekrosenlänge niedrig. Im statistischen Modell zur Nekrosenlänge der befallenen Triebe zeigte sich der Sorteneffekt als signifikant ( $p=0,0026$ ). Insgesamt war der Befall im Vergleich zu den Hagelwirkstoffversuchen hoch (vgl. 4.1.1), wobei Mairac, Pinova und Rewena einen relativ geringen Befall aufwiesen. Zusätzlich wurden Triebe aller Sorten auf ihre Erregerlast nach einer Hagelinokulation untersucht (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3** Quantifizierung und Ausbreitung von *Erwinia amylovora* in Trieben verschiedener Sorten nach Hagelinokulation.

		Diwa			Gala			Greenstar			Kanzi		
		positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø
Entfernung von Nekrosengrenze [cm]	+7,5 cm	0/2	0		0/3	0		0/3	0		3/3	5,86E+04	3,98E+04
	+2,5 cm	3/3	3,50E+03	2,98E+03	0/3	0		2/3	3,55E+04	3,43E+04	3/3	1,89E+05	1,00E+05
	Nekrosengrenze												
	-2,5 cm	0/0	0		3/3	5,61E+05	2,35E+05	0/0	0		1/1	1,43E+03	
	-7,5 cm	0/0	0		1/1	2,37E+05		0/0	0		0/1	0	
		Mairac			Pinova			Rewena			Wellant		
		positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø
Entfernung von Nekrosengrenze [cm]	+7,5 cm	3/3	6,41E+05	6,40E+05	1/3	8,07E+04	8,07E+04	0/3	0		0/3	0	
	+2,5 cm	3/3	2,72E+04	2,64E+04	1/3	3,17E+05	3,17E+05	2/3	5,55E+04	5,48E+04	1/3	3,29E+05	3,29E+05
	Nekrosengrenze												
	-2,5 cm	2/3	2,47E+05	1,96E+05	3/3	1,72E+06	1,32E+06	2/2	8,32E+04	1,78E+04	1/1	7,88E+03	
	-7,5 cm	1/2	9,20E+03	9,20E+03	1/1	3,12E+05		2/2	3,23E+04	2,85E+04	1/1	1,24E+04	

Farblegende Ig (Zellzahl/ mg Gewebe)					
<1	2	3	4	5	6

Bei der Untersuchung auf die Erregerlast in drei ausgewählten Trieben pro Sorte wurde 2,5 cm ober- bzw. unterhalb der Nekrosengrenze eine Triebprobe genommen (Tabelle 4.3). Bei ausreichender Trieblänge wurden außerdem noch Proben 7,5 cm ober- bzw. unterhalb der Nekrosengrenze genommen. Bei Diwa konnte nur 2,5 cm oberhalb der Nekrosengrenze eine mittlere Zellzahl pro mg Gewebe festgestellt werden ( $3,5 \times 10^3$ ). Bei Gala konnten oberhalb der Nekrosengrenze keine Bakterien

nachgewiesen werden. Unterhalb wurden in allen getesteten Trieben hohe Zellzahlen festgestellt ( $>10^5$  Zellen/mg). Bei Greenstar wurde direkt oberhalb der Nekrosengrenze bei 2 von 3 Trieben eine mittlere Zellzahl ( $3,55 \times 10^4$ ) gemessen. Bei Kanzi waren oberhalb an allen Trieben hohe Zellzahlen feststellbar ( $5,86 \times 10^4$  bzw.  $1,89 \times 10^5$ ). Bei Mairac konnten an allen Trieben hohe Zellzahlen oberhalb der Nekrosengrenze festgestellt werden ( $10^4$ - $10^5$ ). Bei Pinova wurden durchweg hohe Zellzahlen festgestellt ( $10^4$ - $10^5$ ), direkt unterhalb an allen 3 Trieben, sonst nur an einem der drei. Bei Rewena wurden direkt oberhalb der Grenze und unterhalb mittlere Zellzahlen festgestellt. Bei Wellant wurden an einem Trieb oberhalb hohe, unterhalb jedoch niedrige Zellzahlen festgestellt.

Über die Farblegende können die Stufen der Zellzahlen den Proben zugeordnet werden (grün: kein positiver Nachweis, gelb: niedrige Zellzahl, orange: mittlere Zellzahl, rot: hohe Zellzahl). Trotz des relativ geringen Befalls, konnten bei Mairac, Pinova und Rewena relativ hohe Zellzahlen in den meisten Trieben nachgewiesen werden. Der hohe Befall bei Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi und Wellant geht nicht mit einer hohen Zellzahl im Gewebe einher. Bei einigen positiven Proben sind jedoch hohe Zellzahlen festgestellt worden. Die Beziehung zwischen dem symptomatischen Befall und der Erregerlast im Gewebe ist bei den unterschiedlichen Sorten nicht klar zu bestimmen.

#### 4.2.3 Zusammenfassung der Sortenanfälligkeit

Um die einzelnen Versuche zur Sortenanfälligkeit gegen Feuerbrandinfektionen dieser Arbeit zusammenfassen zu können und eine Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten zu ermöglichen, wurde die Anfälligkeit der weltweit verbreiteten und bekannten hoch anfälligen Sorte Gala in jedem Versuch auf 100 Prozentpunkte gesetzt. Die anderen Sorten wurden dazu in Bezug gesetzt. Anschließend wurden Anfälligkeitsklassen von schwach bis sehr hoch anfällig gebildet (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4** Einstufung der sortenspezifischen Feuerbrandanfälligkeit relativ zu Gala (100 %).

<b>Anfälligkeit</b>	schwach	mittel	hoch	sehr hoch
<b>% Befall im Vergleich zu Gala</b>	51-70	71-90	91-110	111-130

Für jeden Versuch konnte nun eine sortentypische Anfälligkeit im Vergleich zu Gala angegeben werden (Tabelle 4.5). Über den Mittelwert aus den Blütenversuchen kann die Blütenanfälligkeit zusammengefasst werden. Nimmt man die relativen Anfälligkeiten aus dem Hagelversuch hinzu, so kann man eine Gesamtanfälligkeit beschreiben.

## Ergebnisse

**Tabelle 4.5** Sortentypische Feuerbrandanfälligkeit relativ zu Gala (100 %).

	Blüten Freiland		Blüten Klimakammer		Blüten Gesamt		Hagel		Gesamtanfälligkeit
Diwa	95 <sup>1</sup>	h <sup>2</sup>	89	m	92	h	129	sh	hoch
Gala	100	h	100	h	100	h	100	h	hoch
Greenstar	-	-	83	m	83	m	129	sh	hoch
Kanzi	102	h	83	m	92,5	h	116	sh	hoch
Mairac	93	h	89	m	91	h	73	m	mittel
Pinova	87	m	88	m	87,5	m	55	s	mittel
Rewena	52	s	64	s	58	s	87	m	schwach
Wellant	115	sh	108	h	111,5	sh	129	sh	sehr hoch

1 relative Anfälligkeit im Vergleich zu Gala in %

2 Anfälligkeitsstufen: s=schwach, m=mittel, h=hoch, sh=sehr hoch

Die Zusammenfassung der einzelnen Versuche zeigt eine schwache Anfälligkeit von Rewena, eine mittlere Anfälligkeit bei Mairac und Pinova, eine hohe Anfälligkeit bei Diwa, Gala, Greenstar und Kanzi und eine sehr hohe Anfälligkeit bei Wellant

### Fazit

Die entwickelte Methode zur Testung der sortenspezifischen Feuerbrandanfälligkeit zeigte im Freiland und in der Klimakammer übereinstimmende Ergebnisse. Die Boniturskala kann den fortschreitenden Befall abbilden. Die Anfälligkeit der modernen Apfelsorten Diwa, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova und Wellant für Blüten-/ und Hagelinfection im Vergleich zu den bekannten Sorten Gala (hoch anfällig) und Rewena (schwach anfällig) wurde bestimmt. Über die Zusammenfassung der Ergebnisse kann der Praxis Informationen für die Sortenwahl zur Verfügung gestellt werden.

## 4.3 Pathogeneseversuche zum Feuerbrand

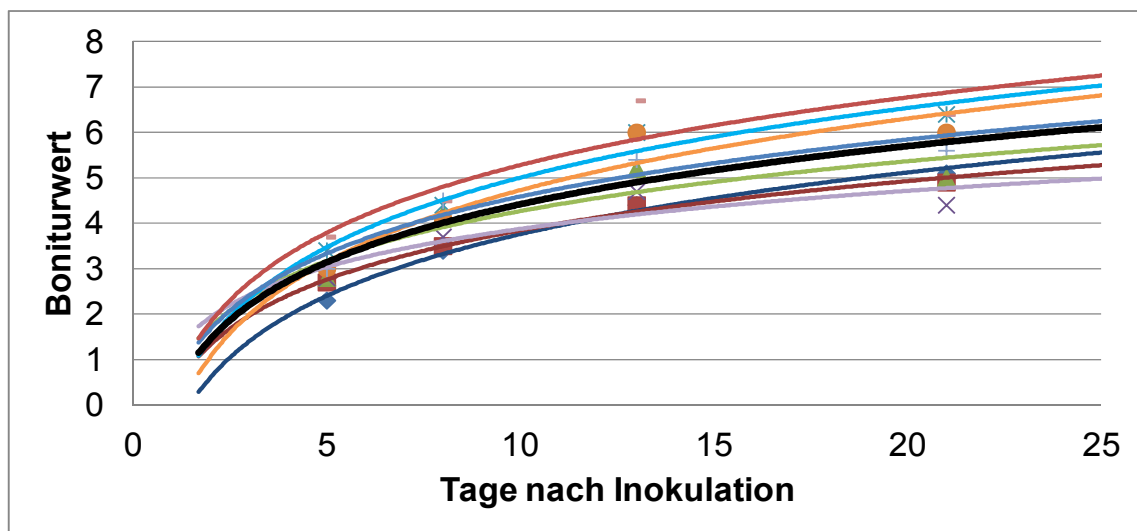
### 4.3.1 Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion

Ziel des Versuchs zur Pathogenese der Blüteninfektion war die Aufklärung des Zusammenhanges zwischen der Bakterienkonzentration der Inokulationssuspension und der Entwicklung von Symptomen im Versuchszeitraum. Hierfür wurden an Galabäumen (Unterlage M9) in der Klimakammer einzelne Blüten eines Blütenbüschels oder ganze Blütenbüschel mit 10 µl Inokulationssuspension verschiedener Konzentration ( $10^2$ - $10^9$  KbE/ml) mit Hilfe einer Mikropipette inokuliert. Die Bonitur erfolgte nach 5, 8, 13 und 21 Tagen auf Blütenbüschelbasis. An allen Boniturterminen wurden auch Blütenproben zur Bestimmung der Zellzahlen pro Blüte genommen (Tabelle 4.6). Statistische Details sind im Anhang aufgeführt (7.2).

**Tabelle 4.6** Zellzahl pro Blüte 8 Tage nach Inokulation bei unterschiedlicher Konzentration der Inokulationssuspension.

Konzentration	1	2	3	4	5	6	7	8
[KbE/ml]	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$
[KbE/Blüte]	$10^0$	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$
Zellzahl/Blüte	$1,08 \times 10^8$	$1,33 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$	$1,61 \times 10^8$	$2,04 \times 10^8$	$1,29 \times 10^8$	$1,65 \times 10^8$	$1,65 \times 10^8$

Bereits nach 8 Tagen waren die Zellzahlen pro Blüte aller Varianten in der gleichen Größenordnung von  $1,08$ - $2,04 \times 10^8$  Zellen/Blüte und damit im Vergleich zu den in den Freilandversuchen gemessenen Zellzahlen sehr hoch (Tabelle 4.6). An den folgenden Boniturtagen konnten keine *Erwinia amylovora* DNA nachgewiesen werden. Möglicherweise durch PCR-inhibierende Substanzen der verwelkten und nekrotischen Blüten. Die Bonitur der Blütenbüschel erfolgte nach der 9-Punkte Skala (Tabelle 3.8). In Abbildung 4.16 sind die Boniturergebnisse und deren Auswertung dargestellt.



**Abbildung 4.16** Befallsentwicklung der Varianten mit verschiedener Konzentration der Inokulationssuspension (KbE/ml) beim Versuch in der Klimakammer.

Regressionskurve über alle Werte (schwarz;  $y=1,8 \times \ln(x)+0,2$ ;  $R^2=0,92$ ) [Detaillierte Auswertung im Anhang, Tabelle 7.15].

◆  $10^2$  ■  $10^3$  ▲  $10^4$  ×  $10^5$  \*  $10^6$  ●  $10^7$  +  $10^8$  -  $10^9$  je (KbE/ml)

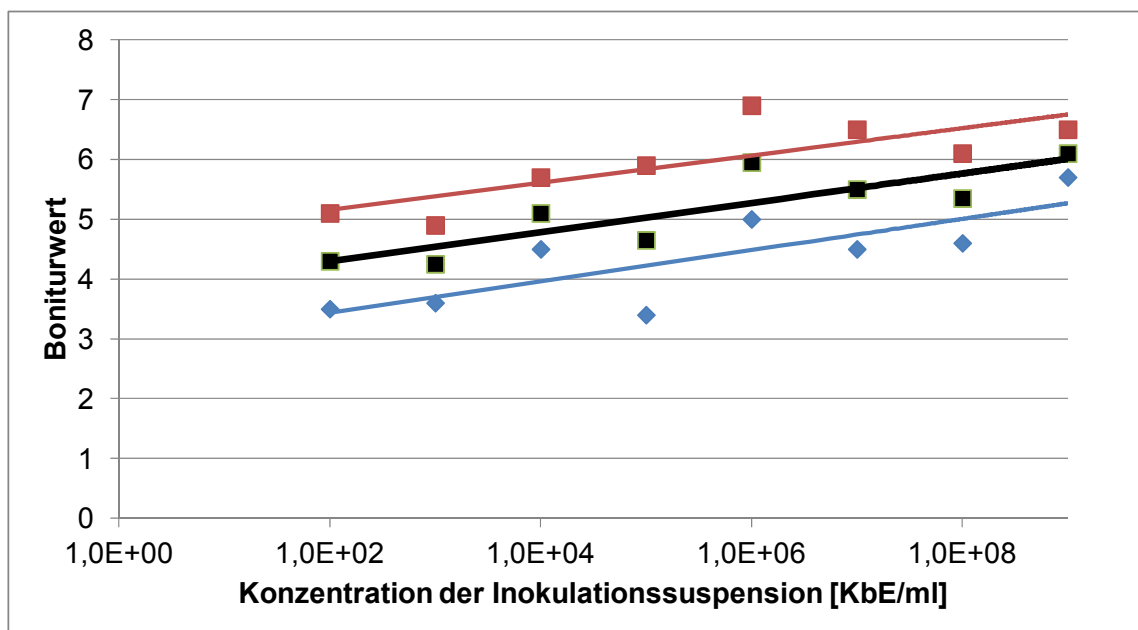
Der durchschnittliche Boniturwert stieg über den betrachteten Zeitraum kontinuierlich an (Abbildung 4.16). Insgesamt war eine über alle Varianten hinweg relativ ähnliche Befallszunahme feststellbar. Während in den ersten 13 Tagen nach der Inokulation eine gleichmäßige Zunahme stattfand, stagnierte sie etwas und stieg dann bis zum 21. Tag nur noch leicht an. Die Reihenfolge der Anfälligkeit innerhalb eines Termins war in etwa durchgehend gleich. Die Regressionskurven der verschiedenen Varianten liegen stets unter- oder oberhalb der durchschnittlichen Befallskurve (schwarz) und schneiden diese nicht. Bei keiner Konzentration kam es während des

## Ergebnisse

Versuchs zu einem Abstoppen der Infektion. Es erfolgte keine sichtbare Triebinfektion im Beobachtungszeitraum.

Betrachtet man die Durchschnittskurve, so kann man über die Boniturtabelle den allgemeinen Verlauf der Infektion über alle Inokulationsstufen beschreiben. Nach 5 Tagen war an allen Blütenbüscheln eine Blüte befallen (3,1), nach 7 Tagen waren bei den meisten Blütenbüscheln alle Blüten befallen (3,7), nach 14 Tagen waren alle Blütenbüschel und Blütenstandstiele befallen (5,0) und nach 21 Tagen waren zusätzlich noch die Hälfte der Neutriebe befallen (5,6).

Zur genaueren Unterscheidung der Varianten wurde der Befall nach 14 Tagen detaillierter betrachtet (Abbildung 4.17).



**Abbildung 4.17** Blütenbefall in Abhängigkeit der unterschiedlichen Konzentrationen der Inokulationssuspensionen 14 Tage nach der Inokulation.

Gleichung der Regressionskurve über alle Werte schwarz;  $y=0,1 \times \ln(x)+3,8$ ;  $R^2=0,72$ ; Y-Achse logarithmisch [Detaillierte Auswertung im Anhang, Tabellen 7.16 und 7.17].

◆ eine Blüte    ■ alle Blüten    ■ Gesamt

Betrachtet man den Befall der unterschiedlichen Varianten nach 14 Tagen, so zeigt sich eine logarithmische Zunahme mit steigender Konzentration (Abbildung 4.17). Der Durchschnittswert steigt von 4,2 bei  $10^2$  KbE/ml bis 6,1 bei  $10^9$  KbE/ml. Unabhängig, ob eine oder alle Blüten eines Blütenbüschels inokuliert wurden, folgen die Regressionskurven dem logarithmischen Wachstum mit derselben Steigung und nur unterschiedlichem Y-Achsen-Abschnitt ( $y=0,1 \times \ln(x)+2,9$  bzw.  $y=0,1 \times \ln(x)+4,7$ ). Die Regressionskurve über alle Werte liegt genau zwischen den beiden anderen Kurven ( $y=0,1 \times \ln(x)+3,8$ ). Trotz einiger Ausreißer bei bestimmten Varianten wurde



hier die logarithmische Zunahme des Befalls nach der 9-Punkte-Skala und der Konzentration der Inokulationssuspension deutlich.

Über die Durchschnittskurve kann auch hier jeder Inokulationsstufe eine Boniturklasse zugeordnet werden. Bei  $10^2$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel und die Hälfte der Blütenstandstiele nekrotisch (4,5). Bei  $10^3$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel und die meisten Blütenstandstiele nekrotisch (4,7). Bei  $10^4$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel und alle Blütenstandstiele nekrotisch (5,0). Bei  $10^5$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel, alle Blütenstandstiele und wenige Neutriebe nekrotisch (5,2). Bei  $10^6$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel, alle Blütenstandstiele und knapp die Hälfte der Neutriebe nekrotisch (5,4). Bei  $10^7$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel, alle Blütenstandstiele und gut die Hälfte der Neutriebe nekrotisch (5,6). Bei  $10^8$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel, alle Blütenstandstiele und fast alle Neutriebe nekrotisch (5,9). Bei  $10^9$  KbE/ml waren mehrere Blüten pro Blütenbüschel, alle Blütenstandstiele, alle Neutriebe und bei wenigen Trieben das Holz nekrotisch (6,1). Abhängig von der Konzentration der Inokulationssuspension war der Befall der Blüten und Triebe unterschiedlich stark. Wurde nur eine Blüte pro Blütenbüschel inokuliert, so lag der Boniturwert etwa eine Boniturnote unterhalb des Durchschnittswertes. Wurden alle Blüten pro Blütenbüschel inokuliert, so lag der Boniturwert etwa eine Boniturnote oberhalb des Durchschnittswertes.

### Fazit

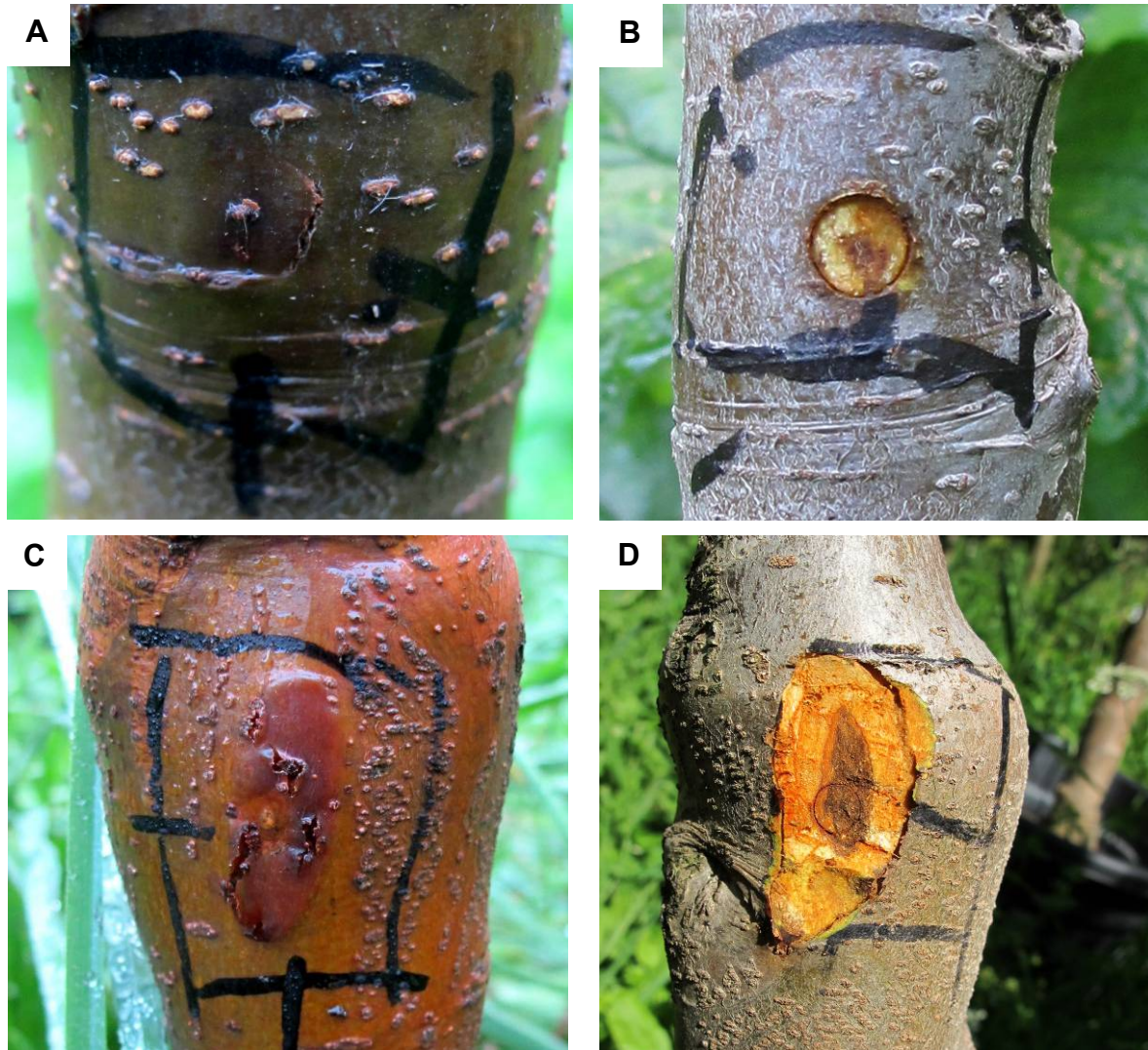
Der Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion zeigte, dass unter den vorliegenden Bedingungen alle Inokulationskonzentrationen zur einer Blüteninfektion führten. Es zeigte sich jedoch ein Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Geschwindigkeit der Symptomentwicklung und der Symptomstärke. Ebenso zeigte sich, dass der Befall stärker war, wenn nicht nur eine, sondern alle Blüten eines Blütenbüschels inokuliert wurden. Im Beobachtungszeitraum (21 Tage) konnte bei keiner Konzentration ein Abstoppen der Infektion festgestellt werden. Eine Triebinfektion blieb im Beobachtungszeitraum aus. Die Befallsentwicklung nach der verwendeten Skala folgte einem logarithmischem Wachstum mit jeweiligen spezifischen Parametern, die zu einer charakteristischen Entwicklungsgeschwindigkeit und Befallshöhe führten (Boniturwert =  $a \times \ln(x)+b$ ).

### 4.3.2 Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm

Im Pathogeneseversuch am Stamm sollte eine Methode entwickelt werden bei der über eine Stamminjektion Apfelbäume mit *Erwinia amylovora* inokuliert werden und anschließend per Real-Time PCR beprobt werden. Hierbei wurden mit einer Insulinspritze ca. 25 µl einer Inokulationssuspension (ca.  $3,6 \times 10^9$  KbE/ml) in den Stamm

## Ergebnisse

bis in das weiche Splintholz injiziert. Ziel war die Beschreibung der räumlichen und zeitlichen Ausbreitung der Bakterien im Stamm.



**Abbildung 4.18** Fotos zum Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm.

Symptome 14 Tage nach Inokulation; Inokulation oberhalb der Veredelungsstelle geschlossen (A) und geöffnet (B), Inokulation unterhalb der Veredelungsstelle geschlossen (C) und geöffnet (D).

Die Inokulation erfolgte 2,5 cm ober- bzw. unterhalb der Veredelungsstelle (Abbildung 4.18 A, B bzw. C, D). Erfolgte die Injektion in das Edelreis (Gala), so war nach 14 Tagen äußerlich eine leichte Verdunkelung und Rissigkeit um die Injektionsstelle sichtbar (A). Wurde die Rinde entfernt, so wurde im Bereich des Kambiums und Splintholzes eine räumlich sehr begrenzte Braunfärbung (< 1 cm<sup>2</sup>) des Gewebes sichtbar (B). Bei der Injektion in die M9 Unterlage war nach 14 Tagen ein deutlich ausgeprägter typischer Canker von etwa 3 cm<sup>2</sup> sichtbar (C). Nach Entfernung der äußeren Rindenschichten zeigte sich, dass die nekrotische Braunfärbung weit in das Splintholz hinein reichte (D).

Dieser Unterschied zwischen der Inokulation ober- bzw. unterhalb der Veredelungsstelle zeigte sich an allen Versuchsbäumen über den betrachteten

Zeitraum von 14 Tagen hinweg. Am Edelreis war ab 5 Tage nach der Inokulation eine leichte Nekrose im Holz um die Injektionsstelle sichtbar, die sich dann in der direkten Umgebung ausbreitete. Bei der Unterlage war bereits nach 3 Tagen eine Nekrose im Holz sichtbar. Zusätzlich wurden an 3 Probenahmepunkten ober- bzw. unterhalb der Veredelungsstelle inklusive der Injektionsstelle 3, 5, 7 und 14 Tage nach der Injektion Gewebeproben entnommen und per Real-Time PCR auf ihre Erregerlast untersucht. Die Proben enthielten Rinde, Bast, Kambium und unterschiedlich große Teile des Splintholzes. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

**Tabelle 4.7** Quantifizierung und Ausbreitung von *Erwinia amylovora* im Stamm nach Injektion oberhalb (A) oder unterhalb (B) der Veredelungsstelle 3, 5, 7 und 14 Tage nach Inokulation.

A		Tag 3			Tag 5			Tag 7			Tag 14		
		positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø
Entfernung von Veredelungsstelle [cm]	+12,5 cm	0/5	0		0/5	0		0/5	0		0/5	0	
	+7,5 cm	0/5	0		0/5	0		0/5	0		0/5	0	
	<b>+2,5 cm Injektion</b>	5/5	6,37E+05	3,47E+05	5/5	6,25E+05	4,73E+05	5/5	1,10E+06	6,81E+05	4/5	1,57E+06	1,26E+06
	Veredelungsstelle												
	-2,5 cm	0/5	0		2/5	7,50E+02	5,92E+02	1/5	2,27E+03		1/5	2,97E+02	
	-7,5 cm	0/5	0		2/5	6,91E+02	4,18E+02	1/5	3,16E+02		1/5	6,29E+01	
	-12,5 cm	0/3	0		1/5	1,67E+02		1/5	8,03E+01		0/5	0	
B		Tag 3			Tag 5			Tag 7			Tag 14		
		positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø	positive Proben	Zellen/mg Ø pos. Proben	Standardfehler des Ø
Entfernung von Veredelungsstelle [cm]	+12,5 cm	0/5	0		0/5	0		0/5	0		0/5	0	
	+7,5 cm	0/5	0		0/5	0		0/5	0		0/5	0	
	+2,5 cm	0/5	0		0/4	0		0/5	0		0/5	0	
	Veredelungsstelle												
	<b>-2,5 cm Injektion</b>	5/5	1,45E+06	5,11E+05	5/5	9,11E+05	6,58E+05	4/5	2,80E+05	1,74E+05	5/5	2,58E+06	9,21E+05
	-7,5 cm	3/5	2,14E+03	1,04E+03	3/5	8,49E+03	7,32E+03	2/5	4,67E+03	1,45E+03	3/5	2,97E+03	1,53E+03
-12,5 cm	2/5	2,62E+02	8,71E+01	3/5	5,32E+03	4,99E+03	2/5	1,57E+03	9,46E+02	0/5	0		

Farblegende lg (Zellzahl/ mg Gewebe)

<1	2	3	4	5

Die Analyse der oberhalb der Veredelungsstelle injizierten Bäume zeigen positive Proben mit hohen Zellzahlen ( $6,25 \times 10^5 - 1,57 \times 10^6$  Zellen/mg Gewebe) an der Injektionsstelle an allen Probenahmetagen. An einzelnen Trieben sind 5, 7 und 14 Tage nach Injektion geringe bis mittlere Zellzahlen ( $8,02 \times 10^1 - 2,27 \times 10^3$  Zellen/mg Gewebe) unterhalb der Veredelungsstelle gemessen worden. In den übrigen Proben konnten keine Zellen sicher nachgewiesen werden. Bei den unterhalb der Veredelungsstelle injizierten Bäumen wurden an der Injektionsstelle an allen Tagen positive Proben mit hohen Zellzahlen ( $2,6 \times 10^5 - 2,58 \times 10^6$  Zellen/mg Gewebe) bestimmt. An den darunter liegenden Probenahmepunkten wurden häufig geringe bis mittlere Zellzahlen ( $2,62 \times 10^2 - 8,49 \times 10^3$  Zellen/mg Gewebe) nachgewiesen. In keiner Probe oberhalb der Veredelungsstelle konnten Zellen nachgewiesen werden. Unabhängig von der Lage der Injektionsstelle konnten an dieser über den Probezeitraum konstant hohe Zellzahlen nachgewiesen

## Ergebnisse

werden. Bei allen Proben lag ein hoher Standardfehler vor. Die Probewerte haben also sehr stark gestreut. Die Streuung innerhalb eines Probetags war höher als zwischen den Probetagen.

Man kann davon ausgehen, dass die Nadel bis zum Kernholz vorgedrungen ist. Dies bedeutet, dass neben dem Kambium alle Leitgewebe verletzt wurden. Bakterien waren also sowohl im assimilatleitenden Siebteil (Phloem) als auch dem wasserleitenden Holzteil (Xylem) zu finden und konnten sich über diese Leitungssysteme in der Pflanze vor allem vertikal ausbreiten. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden, in welchen Gewebeteil welche Menge der Inokulationssuspension gelangt ist.

Bei der Beprobung wurden unterschiedlich große Zylinder aus dem Stamm gestochen. Dies wurde durch das variable Probengewicht abgebildet. Es war stets Rinde, Bast und Kambium in der Probe enthalten, jedoch unterschiedlich große Mengen des Splintholzes. Es konnte nur bestimmt werden, wie viele Zellen in der Gesamtprobe sind. Da jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Probengewicht und den gemessenen Zellzahlen festgestellt wurde, kann man folgern, dass die Menge an Splintholz in der Probe nicht ursächlich an der Zellzahl beteiligt ist. Dies würde bedeuten, dass die gemessenen Zellzahlen am nicht symptomatischen Gewebe vor allem in Rinde, Bast und Kambium vorlagen. An den Proben mit Symptomen, reichten die Nekrosen bis in das Splintholz hinein. Hier befanden sich die Zellzahlen also in allen beprobten Gewebearten. Bei allen Proben war ein Teil des Splintholzes und somit des Xylems enthalten.

### **Fazit**

Mit der etablierten Methode konnten Bakterien im Stamm mehrjähriger Apfelbäume nachgewiesen werden. Eine Fernausbreitung konnte nur in wenigen Fällen und stets nach unten gerichtet festgestellt werden. Durch die verwendete Methode ist nicht exakt bestimmbar, in welchem Gewebetyp die Ausbreitung statt fand. Mit größerem zeitlichem Abstand zur Injektion wurden häufiger Proben positiv getestet. An der Injektionsstelle war nekrotisches Gewebe sichtbar. Die Zellzahlen an der Injektionsstelle waren, unabhängig davon, ob diese im Edelreis (Gala) oder in die Unterlage (M9) war, auf einem hohen Niveau. Der latente Befall war also vergleichbar. Die Symptomentwicklung erfolgte jedoch an der Unterlage schneller und intensiver.

## 5 Diskussion

### 5.1 Wirkstofftests zur Feuerbrandregulierung

#### 5.1.1 Hagelversuche

##### Ziel der Hagelversuche

Über Hagelverletzungen an den Blättern können epiphytische *Erwinia amylovora* Bakterien in das pflanzliche Gewebe gelangen und Infektionen auslösen (Thomson, 2000). Die Verhinderung von Infektionen ist wirksamster Bestandteil einer nachhaltigen Feuerbrandstrategie (Steiner, 2000). Ziel dieser Arbeit war es, ein Testverfahren zu entwickeln, bei dem Hagelverletzungen simuliert werden, anschließend eine Inokulation durchgeführt wird und dann verschiedene Prüfprodukte auf ihre Wirkung zur Verhinderung von Triebinfektionen untersucht werden können.

##### Auswertung im Vergleich mit anderen Arbeiten

Im ersten Schritt der Auswertung wird der prozentuale Befall beschrieben, während im zweiten Schritt die durchschnittlichen Nekrosenlängen der befallenen Triebe angegeben sind. Nicht befallene Triebe, die den Mittelwert der Nekrosenlängen fälschlicherweise nach unten verschoben sind ausgenommen, werden jedoch in der Angabe über den Befall abgebildet. Durch dieses Vorgehen kann über die Angabe des Befalls und der Nekrosenlänge die Wirkung eines Prüfmittels umfassender beschrieben werden.

Die zweistufige Darstellung der Ergebnisse der Hagelversuche unterscheidet sich von der allgemein in der Literatur verbreiteten Darstellung des Triebbefalls als Quotient aus der Nekrosenlänge und der Gesamtrieblänge, multipliziert mit dem prozentualen Auftreten einer Infektion der untersuchten Triebe (Lespinasse und Aldwinckle, 2000). Diese von Le Lezec und Paulin (1984) entwickelte Darstellungsweise wird vor allem bei Triebinokulationen zur Sortentestung verwendet (Le Lezec und Paulin, 1984; Ozrenk et al., 2012; Sobiczewski et al., 2004; Tsiantos und Psallidas, 2004). Durch die Randomisation der Testpflanzen über die Triebblängen vor der Zuteilung zu den Versuchsvarianten und die Verwendung der Gesamtrieblänge als Co-Variable wird jedoch in der verwendeten Vorgehensweise der Einfluss der Gesamtrieblänge ausreichend abgebildet. Dadurch wurde die Darstellung der absoluten befallenen Triebblänge möglich. Dies bildet die Befallsstärke besser ab als ein prozentualer Befall ohne die Information über die Gesamtrieblänge. Der absolute Befall eines Triebes (Nekrosenlänge) wird ansonsten bei einem kurzen Trieb überschätzt und bei einem langen Trieb unterschätzt.

### **Einfluss der Temperatur auf den Befall**

Der Einfluss von Temperatur und Physiologie der Testpflanzen ist über die vier Versuchsdurchgänge bemerkbar. Bei hohen Temperaturen und wüchsigen Pflanzen (Versuch 1) war keines der Prüfmittel ausreichend wirksam gegen Neuinfektionen an den Trieben. Bei kühleren Temperaturen und schwach wüchsigen Pflanzen (Versuch 2) war der Infektionsdruck offenbar zu gering, um einen relevanten Befall auszulösen. Bei den anderen beiden Versuchen kann die Wirkung der Prüfmittel in Bezug auf unbehandelt und Streptomycin beurteilt werden (Versuch 3 und 4).

Der Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung von *Erwinia amylovora* ist vielfach beschrieben (Billing, 1974; Shrestha et al., 2011) und findet vor allem in unterschiedlichen Feuerbrandprognosemodellen Verwendung (Vanneste und Eden-Green, 2000). Temperaturen zwischen 18 und 33 °C begünstigen die Vermehrung mit einem Optimum bei 28 °C (Verdoppelung der Zellzahl in 1,44 h). Die Versuche unterscheiden sich hauptsächlich im Temperaturverlauf 12 h nach der Inokulation. Die geringfügigen Unterschiede während und kurz nach der Inokulation werden aufgrund ihrer kurzen Dauer keinen deutlichen Einfluss auf die Symptomentwicklung gehabt haben. Vielmehr scheint die Temperatur auf die Populationsentwicklung in planta und die daraus folgende Virulenz einen Einfluss zu haben. Bei höheren Temperaturen (Versuch 1) scheinen die Bedingungen für die Populationsentwicklung und die Symptomausprägung deutlich besser zu sein, als bei kühleren Temperaturen (Versuch 2).

Zusätzlich wird eine Auswirkung der Temperatur auf die Virulenz von *Erwinia amylovora* über das „Quorum Sensing“ diskutiert (Barnard, 2007; Molina et al., 2005; Whitehead et al., 2001). Hierbei soll durch die Produktion von Botenstoffen die Physiologie einer Bakterienpopulation einheitlich gesteuert werden. Somit könnten die Bakterien von einem für die Pflanze ungefährlichen Zustand in einen angreifenden Zustand „umgeschaltet“ werden. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Temperaturen auf die Pflanzen und eine ggf. damit zusammenhängende Veränderung der Anfälligkeit scheint bei den vorliegenden Temperaturunterschieden (<6 °C) eher unwahrscheinlich. Bisher postulierte Abwehrreaktionen der Pflanze wie bspw. die Eisen- und Wasserverfügbarkeit und der Gehalt an antimikrobiellen Substanzen in der Pflanze oder die hypersensitiven Reaktion lassen in diesen Temperaturbereichen nur geringe Unterschiede erwarten (Brisset und Paulin, 2006).

### **Einfluss des physiologischen Zustandes der Pflanzen auf den Befall**

Die Bedeutung des physiologischen Zustands der Pflanzen auf die Infektion und die Befallsentwicklung ist in der Literatur häufig und ausführlich beschrieben (Thomson, 2000; van der Zwet und Keil, 1979; Vanneste und Eden-Green, 2000). Allgemein wird bei stärker wüchsigen Pflanzen eine schnellere Symptomentwicklung

beobachtet. Der höhere Sorbitolgehalt von wüchsigen Pflanzen, der als Ursache für die höhere Anfälligkeit vermutet wurde (Aldridge et al., 1997; Blachinsky et al., 2006), scheint jedoch keinen direkten Einfluss zu haben (Duffy und Dandekar, 2008).

### Risikoklassifizierung der Infektionswahrscheinlichkeit nach Hagel

Aufgrund der durchgeführten Versuche lässt sich eine Risikoklassifizierung der Infektionswahrscheinlichkeit nach Hagel durchführen. Während im ersten Versuch keine Behandlung eine Wirkung zeigt (hohes Risiko) und im letzten Versuch keine Unterschiede zwischen den behandelten und der unbehandelten Variante sichtbar wurde (geringes Risiko), konnte in den beiden anderen Versuchen eine Wirkung der Prüfmittel festgestellt werden (mittleres Risiko). Außerdem sollte für die Risikobeurteilung der Infektionsdruck in der Anlage und das Vorhandensein von Inokulum sowie das Ausmaß der Verletzungen berücksichtigt werden. In Tabelle 5.1 ist eine mögliche Risikoklassifizierung dargestellt.

**Tabelle 5.1** Risikoklassifizierung für Feuerbrandneuinfektionen nach einem Hagelereignis.

Risiko	Witterung	Physiologie	Infektionsdruck	Verletzungen
gering	kühl	gering wüchsig, Triebabschluss	kein Vorbefall	gering
hoch	warm	stark wüchsig	intensive Feuerbrandgeschichte	stark

### Übertragung auf die Praxis

Grundsätzlich sind im Versuchsmodell die Faktoren für eine erfolgreiche Infektion im Vergleich zur Praxis sehr positiv gestaltet. Die hohe Konzentration der Inokulations suspension (ca.  $10^6$  KbE/ml) und deren großzügige Applikation auf die verletzten Pflanzen liegen deutlich über den gewöhnlich bestimmten epiphytischen Bakterienkonzentrationen auf den Blättern und sonstigen Inokulumquellen von ca.  $10^2$  bis  $10^4$  KbE/ml (Miller und Schroth, 1972; Norelli et al., 2008; Weißhaupt, 2008). Zusätzlich sind die gewählten Temperaturverläufe zwar nicht völlig untypisch für Witterungsverläufe nach einem Hagelereignis, jedoch eher unwahrscheinlich warm. Das Ausmaß der Verletzungen und die Anzahl verletzter Blätter gleichen der Wirkung eines starken Hagelereignisses. Für die Übertragung der Ergebnisse auf die Praxis heißt das, dass die Wirkung der Prüfmittel tendenziell unterschätzt wurde. So können Prüfmittel mit einer mittleren Wirkung im Versuch durchaus für die Praxis ausreichende Wirkungsgrade besitzen.

Betrachtet man unter diesen Gesichtspunkten den Befall in den Versuchen 2 und 3, so kann der unterschiedliche Befallsdruck festgestellt werden. In Versuch 2 war der Befall in „unbehandelt“ und „Streptomycin“ geringer als in Versuch 3. Während Streptomycin in beiden Versuchen den Befall deutlich reduzierte und somit aufgrund der Wirksamkeit, unabhängig von der Zulassungs- und Umweltproblematik, uneingeschränkt für die Praxis empfohlen werden kann, sind neben den Prüfmitteln mit Befall unter 15 % (LMA, Sergomil FB, Xedaphos) auch Prüfmittel mit mittlerem

## Diskussion

Befall zwischen 20 und 30 % (3DS, Juglon, LMA, Myco-Sin) potentiell für die Praxis interessant. Dies bedeutet eine Halbierung des Befalls im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine ausreichende Wirkung für die Praxis ist für diese Gruppe jedoch nicht eindeutig ableitbar. Betrachtet man die Ergebnisse aus dem 3. Versuch mit insgesamt höherem Befallsniveau, so konnte die Wirksamkeit von Sergomil FB und Xedaphos nicht bestätigt werden (Befall > 60 %). Die Wirkung von Juglon, LMA und Myco-Sin (Befall ca. 30-40 %) war zwar deutlich geringer als bei Streptomycin (7 % Befall), dürfte jedoch für die Praxis bei diesem Befallsdruck ausreichend sein. Neben der eindeutigen und hohen Wirksamkeit von Streptomycin ist also eine ausreichende, durch zwei Versuche bestätigte Wirkung der Prüfmittel Juglon, LMA und Myco-Sin festgestellt worden.

Die Dauer von 4 h zwischen Inokulation und Applikation sollte im Optimalfall in der Praxis erreicht werden können. Hier sind die Dauer für die Bestimmung der Schäden (Stärke, Verteilung) und die Vorbereitung der Applikation berücksichtigt. Trotz der vermehrten Installation von Hagelschutznetzen ist am Bodensee schätzungsweise nur weniger als die Hälfte der Obstplantagen geschützt. Dies trifft besonders auf Junganlagen zu. Hierdurch bekommt die Möglichkeit der Applikation eines Wirkstoffes nach einem Hagelereignis eine große Bedeutung für die Praxis.

### **Reduzierung des Inokulums in der Anlage**

Für die Reduzierung des Inokulums in der Anlage und dem damit verbundenen Infektionspotentials wird allgemein eine Behandlung mit Kupfer vor dem Knospenaustrieb oder nach Blattfall bei älteren Anlagen oder bei der Ausführung von Schnittmaßnahmen bei Baumschulen empfohlen (Steiner, 2000; van der Zwet und Beer, 1995). Die geringeren Wirkungsgrade von kupferhaltigen Produkten und ihre Phytotoxizität auf Blüten und Frucht schränken ihre Anwendbarkeit ein (Tsiantos und Psallidas, 1990). Hier stellt sich die Frage, inwieweit andere Produkte zu einer Reduzierung des Inokulums in der Anlage, auch während der Vegetationsperiode, beitragen können. In den hier durchgeführten Versuchen wurde ausschließlich die Verhinderung von Neuinfektionen nach einem Hagelereignis überprüft. Es ist jedoch vorstellbar, dass die Ergebnisse der Hagelversuche auf andere Situationen übertragen werden können. Es müssten jedoch entsprechende Exaktversuche durchgeführt werden, um eine tatsächliche Wirkung während der dormanten Phase und in Begleitung zu Sanierungs- und Schnittmaßnahmen zu bestätigen.

### **Freilandversuch**

Eine Überprüfung der Ergebnisse der Hagelversuche im Freilandversuch ist nicht gelungen. Trotz warmer und feuchter Witterung während des Versuchs und einer Vorhersage eines Befalls durch das Modell Maryblyt (vgl. Abbildung 7.8) konnten keine Symptome festgestellt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Modell die Situation nicht ausreichend genau abbilden kann. Möglicherweise ermöglichte die



Witterung keine Infektion oder die Versuchsanordnung ist nicht für Versuche im Freiland geeignet. Eventuell müsste das Inokulum durch Zugabe einer Haftsubstanz dickflüssiger gemacht werden, um den Verbleib auf und in der Wunde unter natürlichen Bedingungen sowie einen Schutz vor dem Austrocknen zu ermöglichen. Dies käme der Konsistenz des natürlich vorkommenden Bakterien Schleimes nahe. Da die Bedingungen in der Klimakammer deutlich optimaler für die Krankheitsentwicklung waren, konnte hier möglicherweise auch mit einem suboptimalen Inokulum eine Infektion erreicht werden.

### **Risiko der Ausbreitung von Feuerbrand mit der Fadenausdünnung**

Trotz der Verwendung eines Faden-Handausdünngerätes kann durch die durchgeführten Versuche kein direkter Schluss auf das Risiko der Ausbreitung von Feuerbrand innerhalb einer Anlage mit der Fadenausdünnung geschlossen werden. Möglich wäre das Benetzen der Fäden vor dem Verletzten mit einer Inokulations-suspension oder das Verletzen von künstlich inokulierten Pflanzen mit Befalls-symptomen und anschließender Verletzung gesunder Pflanzen. Ergebnisse von Ngugi und Schupp (2009) zeigen, dass durch die mechanische Ausdünnung mit einem Fadengerät Feuerbrand in einer Anlage verteilt werden kann und somit das Durchführen dieser Maßnahme nicht bei Infektionsbedingungen erfolgen sollte.

### **Diskussion der Wirkstoffe**

Durch Streptomycin konnte der Befall deutlich reduziert werden. Dies bestätigt die allgemein beschriebene Wirksamkeit des Antibiotikums in Blütenversuchen (Psallidas, 2000; Tsiantos und Psallidas, 1990; van der Zwet und Beer, 1995). Die Entwicklung streptomycinresistenter Bakterienstämme bei häufiger Applikation stellt ein Problem für den Pflanzenschutz dar (Al-Daoude et al., 2009; Chiou und Jones, 1995; Duffy et al., 2011; McManus et al., 2002). Die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers auf Humanpathogene wird jedoch als gering eingestuft (Rezzonico et al., 2009b).

Die relativ hohe Wirkung des Prüfmittels Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthalindion) beruht wahrscheinlich auf der bekannten bakteriziden Wirkung dieser Substanz (Clark et al., 1990; Gosch et al., 2011). Da es sich bei dem verwendeten Prüfmittel um kein ausformuliertes Pflanzenschutzmittel handelt, ist durch eine entsprechende Formulierung eine Steigerung und Stabilisierung der Wirkung zu erwarten. Die UV-Instabilität des Wirkstoffes wird als mögliche Ursache einer Minderwirkung diskutiert (Gosch et al., 2010). Die Hagelversuche wurden in einer Klimakammer mit Quecksilberdampflampen durchgeführt. Quecksilberdampflampen haben im Vergleich zum Tageslicht ausgeprägte Spektren im ultravioletten Bereich (Reader und Corliss, 2009). Beim 3. Versuch wurde eine zusätzliche Juglonvariante in den ersten Stunden nach der Applikation abgedeckt, um einen Schutz vor UV-Strahlung zu erzielen. Dies hatte jedoch im Vergleich zur nicht abgedeckten Variante keinen

unterschiedlichen Befall zur Folge. Möglicherweise wurde jedoch durch das nicht näher spezifizierbare Verbundsicherheitsglas unter den Lampen ein großer Teil des UV-Lichtes absorbiert, sodass zu den Pflanzen keine relevante UV-Strahlung gelangte. Die UV-Instabilität als Ursache für eine Minderwirkung konnte also im durchgeführten Versuch weder bestätigt, noch belegt werden. In den Freilandblütenversuchen konnte ebenso die Wirksamkeit von Juglon festgestellt werden (4.1.2).

Über die Wirkungsweise des Prüfmittels LMA ist nichts Näheres bekannt. In den Freilandblütenversuchen konnte jedoch ebenso ein hoher Wirkungsgrad festgestellt werden. Das für den Produzenten erhältliche Pflanzenstärkungsmittel Myco-Sin konnte sowohl in den Hagel- als auch in den Freilandblütenversuchen hohe Wirkungsgrade erzielen. Der Wirkungsmechanismus wird hierbei als Kombination aus einer bakteriziden Wirkung und einer resistenzinduzierenden Wirkung beschrieben (Kunz und Ernst, 2000). Die Verwendung von kupferhaltigen Produkten scheint durch die relative geringe Wirksamkeit und der Gefahr von Phytotoxizität weniger empfehlenswert, kann jedoch bei Junganlagen ohne nennenswerten Fruchtbehang zum Einsatz kommen (Psallidas, 2000; Tsiantos und Psallidas, 1990; van der Zwet und Beer, 1995).

### **Andere mögliche Wirkstoffe**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Prüfmittel mit einer möglichen direkten Wirkung auf *Erwinia amylovora* Bakterien untersucht. Eine Applikation von Resistenzinduktoren könnte jedoch ebenso zu einem gewissen Schutz vor Infektionen über Hagelverletzungen führen. Durch die Applikation von Acibenzolar-s-methyl soll durch eine Anreicherung von Abwehrstoffen in der Pflanze die Widerstandskraft gegen eine Feuerbrandinfektion gesteigert werden (Abo-Elyousr et al., 2011; Baysal und Zeller, 2004; Brisset et al., 2000). Ebenso wäre eine Reduktion des Befalls durch die Applikation von Prohexadion-Calcium möglich (Norelli und Miller, 2004; Spinelli et al., 2006; Spinelli et al., 2012). Eine Wirkung wird hier auf strukturelle Veränderungen des Pflanzengewebes zurückgeführt (McGrath et al., 2009). Es ist jedoch zu beachten, dass ein Hagelereignis nicht sicher vorhergesagt werden kann. Dies bedeutet, dass Behandlungen, sofern sie nicht im regulären Spritzplan enthalten sind, nur kurativ nach einem Hagelereignis bei Infektionsbedingungen erfolgen können. Dadurch wird die Verwendung von Resistenzinduktoren, die zur Entfaltung der Wirkung bereits vor dem Hagelereignis appliziert werden müssen, eingeschränkt.

### **Ergebnisse anderer Versuche**

Während die Bedeutung von Hagelereignissen für Triebneufektionen über die verletzten Blätter in der Literatur allgemein anerkannt ist (Thomson, 2000) und unter dem Begriff „Trauma Blight“ beschrieben wird (Breth et al., 1999; Breth et al., 2002; Crosse et al., 1972; Steiner, 1990), gibt es keine Exaktversuche zur Prüfung von

Wirkstoffen zur Verhinderung von Infektionen. Babini und Mazzucchi (2000) beschreiben ein System zur Erzeugung von standardisierten künstlichen Hagelverletzungen an der Rinde mit einer Vorrichtung aus einem Metallzylinder und einer Springfeder. In diesen Versuchen wird jedoch ausschließlich das Auftreten einer Infektion in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen der Verletzung und der Inokulation betrachtet, wobei in den ersten 24 h nach der Verletzung eine Reduktion von ca. 80 % auf 15 % erfolgte. Dies bedeutet, dass eine Behandlung 24 h nach der Verletzung keine Bedeutung für die Praxis hat. Die Wirkung von Streptomycin zur Verhinderung von Infektionen auf verletzte Blätter bei Applikation innerhalb von 6 h nach der Inokulation wird bei van der Zwet und Keil (1972) als zufriedenstellend beschrieben. Außerdem wird eine Folgebehandlung mit Streptomycin empfohlen. Eine weitere Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von Streptomycin nach simuliertem Hagel bei unterschiedlichen Applikationszeitpunkten (Ockey und Thomson, 2006). Hier wurden die Hagelverletzungen durch einen Bürolocher erzeugt. Die Applikation 4 h nach Verletzung und Inokulation zeigte die beste Wirkung, eine Applikation nach 24 h zeigte keine Wirkung. Die Applikation 2 h vor dem simulierten Hagelereignis brachte keine nennenswerte Wirkung.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Hagelversuche bestätigen die Ergebnisse dieser Versuche zu Hagelverletzungen und ergänzen sie um die Testung weiterer Wirkstoffe. Da die simulierten Hagelverletzungen unregelmäßiger und stärker sind als in den diskutierten Versuchen, scheinen sie den tatsächlichen Verletzungen näher zu kommen. Eine Übertragung auf die Praxis ist also besser möglich. Die Ergebnisse des Hagelversuchs zur Sortentestung (4.2.2) bestätigt die Durchführbarkeit und Aussagekraft der Methode. Eine Testung der Sorten mit der Hagelmethode gibt durch die realitätsnahen Verletzungen eine weitere Aussage zu den Sortentestungen unter kontrollierten Bedingungen mit Injektionsinokulation.

## **5.1.2 Schlussfolgerungen und Ausblick Hagelversuche**

### **5.1.2.1 Methodisch wissenschaftlich**

Die Entwicklung und Etablierung eines Systems zum Test von Prüfmitteln auf ihre Wirkung zur Verhinderung von Neuinfektionen nach simuliertem Hagel schließt eine Lücke in der bisherigen Feuerbrandforschung. Das System ermöglicht den Test von Wirkstoffen mit direkter Wirkung auf die Bakterienpopulationen auf dem Blatt und in den Verletzungen. Durch eine Vergrößerung des Stichprobenumfangs und durch die Wiederholung der Versuche können die Ergebnisse präzisiert werden. Weitere Tests können andere Wirkungsweisen (Resistenzinduktoren, Antagonisten) sowie verschiedene Applikationszeitpunkte untersuchen. Der Einfluss des physiologischen Zustandes der Pflanzen sowie des Infektionsdruckes sollte außerdem noch weiter untersucht werden. Die Durchführung von Freilandversuchen zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Exaktversuch unter kontrollierten Bedingungen ist notwendig. Die Weiterentwicklung eines Gefahrenstufenmodells als Entscheidungsgrundlage für

die Beratung und Praxis mit einer ökonomischen Schadschwelle ist als Bestandteil eines nachhaltigen Feuerbrandmanagements notwendig. Zusätzlich sollte überprüft werden, in wieweit die getesteten Wirkstoffe auch zur Reduzierung des Inokulums in der Anlage und als Begleitung zu Sanierungsmaßnahmen in Anlagen mit Befall eingesetzt werden können.

### **5.1.2.2 Für die Praxis**

Hagelverletzungen stellen einen möglichen Angriffspunkt für Feuerbrandinfektionen an Trieben dar. Bei Anlagen mit Feuerbrandvorgeschichte (Bakterien sind höchst wahrscheinlich vorhanden) und warmer Witterung (Temperaturen > 18 °C) ist eine Behandlung innerhalb von 4 h nach dem Hagelereignis möglich und sinnvoll. Das Risiko von Infektionen ist bei wüchsigen Pflanzen höher. Eine Behandlung mit Streptomycin bringt hohe Wirkungsgrade, ist jedoch aufgrund des Pflanzenschutzrechtes nicht möglich. Von den bisher für die Praxis verfügbaren Wirkstoffen hat Myco-Sin einen ausreichenden Wirkungsgrad. Kupferhaltige Präparate sind weniger potent, können aber bei geringerem Risiko ggf. befriedigende Wirkungsgrade erreichen. Die Prüfmittel Juglon und LMA, die sich in der Beforschung befinden, zeigen einen ausreichenden Wirkungsgrad für die Praxis.

### **5.1.3 Freilandblütenversuche**

#### **Ziel der Freilandblütenversuche**

In den Freilandblütenversuchen sollte die Frage beantwortet werden, welche Wirkstoffe einen ausreichenden Schutz vor Neuinfektionen während der Blüte bieten. Die dafür existierende Methode sollte überprüft und ggf. weiterentwickelt werden.

#### **Diskussion des Versuchsdesigns**

Es gibt eine Vielzahl von Versuchen zur Wirkstofftestung bei Blüteninfektionen die bei van der Zwet und Keil (1979) und Psallidas (2000) aufgelistet werden. In den aufgeführten Übersichten werden jedoch die Versuche unabhängig von ihrem Versuchsdesign miteinander verglichen. Zwar wird die Kulturart und ein Wert oder eine Beurteilung des Wirkungsgrades angegeben, es fehlt jedoch die Angabe zur Inokulationsart. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse fällt daher schwer. Weit verbreitet ist eine direkte Inokulation durch das Sprühen einer Bakteriensuspension mit ca.  $10^7 - 10^8$  KbE/ml in die geöffnete Blüte und der Bonitur dieser Blüten (Spinelli et al., 2012; Stockwell et al., 2010; Sundin et al., 2009; Tsiantos et al., 2003; Özaktan und Bora, 2004). Teilweise finden die Tests auch unter natürlichen Bedingungen ohne künstliche Inokulation statt (Adaskaveg et al., 2008; Laux et al., 2003).

Die direkte Inokulation kann zu einem sehr hohen Infektionsdruck führen, bei dem die Wirkung der Prüfmittel gering ist und nicht der möglichen Wirkung unter Praxisbedingungen entspricht (Johnson et al., 1993; Lindow et al., 1996; Tsiantos und Psallidas, 2002). Hierdurch werden die tatsächliche Wirkung und damit die

Praxistauglichkeit eines Prüfmittels unterschätzt. Wenn unter natürlichen Bedingungen getestet wird, kann es je nach Infektionsdruck in der Anlage und Witterung während des Versuchs zu einem geringen oder keinem Befall kommen. Hierdurch wird die Wirkung eines Prüfmittels überschätzt. Die Ergebnisse der Freilandversuche 2010 (4.1.2) zeigen, dass ein geringer Befall keine abgesicherte Aussage über die Wirksamkeit zulässt. Die Methode mit der indirekten Inokulation über zusätzliche, nicht bonitierte Bäume vermeidet die Problematik des zu hohen Infektionsdruckes durch direkte Inokulation. Unter kühlen Witterungsbedingungen kann jedoch ein zu geringer Befall auftreten.

In Deutschland und Österreich werden Versuche nach dem EPPO Versuchsstandard PP 1/166(3) durchgeführt (Fried, 2012; Kunz et al., 2012; Moltmann et al., 2006; Rühmer, 2012; Scheer, 2012). Prinzipiell ist also ein Vergleich zwischen den Versuchsergebnissen einfacher möglich. Es müssen dennoch spezifische Versuchsbedingungen wie bspw. die jeweilige Witterung, die verwendeten Sorten und Bakterienstämme oder die Applikationstechnik berücksichtigt werden. Hinzu kommt, dass die statistische Auswertung nicht einheitlich gehandhabt wird. Ohne nähere Angaben werden meist Mittelwerte und Signifikanzklassen angegeben. Für den direkten Vergleich der Ergebnisse ist ein vergleichbares Vorgehen notwendig. Die in dieser Arbeit verwendete Auswertung ist hierfür ein Vorschlag.

Die Einzelbaumbonitur erlaubt ein detailliertes statistisches Modell, bei dem die Ausbreitung in der Anlage mit nachvollzogen werden kann. Prinzipiell sind bei der Varianzanalyse von Wirkstoffversuchen Varianzhomogenitäten durch den Vergleich von unbehandelten mit behandelten Varianten zu erwarten. Die Winkeltransformation führt zu einer akzeptablen Varianzhomogenität. Die bei der Rücktransformation der Mittelwerte entstehenden Mediane können mögliche starke Schwankungen der einzelnen Wiederholungen besser puffern als arithmetische Mittelwerte. Eine Darstellung der Mediane scheint also dem tatsächlichen Versuchsergebnis näher zu sein. Wenn in mehreren Versuchen häufig dieselben Prüfmittel getestet werden, so können Versuche aus verschiedenen Jahren und Orten gemeinsam ausgewertet werden. Hierdurch wird eine direkte Vergleichbarkeit möglich und es können Einflüsse des Jahres und des Ortes, sowie Interaktionen der Wirkstoffe untersucht werden.

### **Diskussion der Wirkstoffe**

In Südwestdeutschland werden durch verschiedene Institutionen vergleichbare Versuche durchgeführt. Neben den Versuchen am Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee seit 2002 (Moltmann, 2007) wurden seit 1998 am Landratsamt Karlsruhe (Moltmann et al., 2002) und seit 2004 im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (Kunz et al., 2012) Feuerbrandfreilandversuche nach dem Versuchsstandard PP 1/166(3) der EPPO (EPPO, 2002) durchgeführt. Die

Ergebnisse dieser Versuche können für einen Vergleich herangezogen werden. Für eine Substitution von Streptomycin wird ein Wirkungsgrad von 80-90 % vorgeschlagen (Moltmann et al., 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirkstoffe können nach ihren Inhaltstoffen und ihrer Wirkungsweise verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. Neben dem Antibiotikum Streptomycin wurden 5 Antagonisten, 4 Desinfektionsmittel, 2 kupferhaltige Produkte, 2 Resistenzinduktoren und 6 weitere Prüfmittel untersucht. Für die Beurteilung der Wirksamkeit der einzelnen Prüfmittel werden die Versuchsergebnisse von 2009 und 2011 verwendet. Die Ergebnisse von 2010 dienen aufgrund des geringen Befalls lediglich für eine tendenzielle Aussage und werden deshalb nicht ausgiebig betrachtet.

### **Streptomycin und streptomycinhaltige Spritzfolgen**

Streptomycin konnte mit Wirkungsgraden über 90 % in allen Versuchen den Befall deutlich reduzieren. Dies stimmt mit Aussagen der Literatur überein (Psallidas, 2000; Tsiantos und Psallidas, 1990; van der Zwet und Beer, 1995). Die streptomycinhaltigen Spritzfolgen führten zu einem Wirkungsgrad um 80 % und lagen somit etwas unter der Wirkung der Varianten, die drei- bzw. viermal ausschließlich mit Streptomycin behandelt wurden. Durch die Reduzierung von einer (2011) bzw. drei (2009) Streptomycinapplikationen und deren Ersetzung mit Serenade Max bzw. Blossom Protect und LX4622 (FolanxCa29) im Jahr 2009 und Blossom Protect in 2011 konnten durchaus noch für die Praxis akzeptable Wirkungsgrade erzielt werden. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass aufgrund unterschiedlicher Witterungs- und somit auch Infektionsbedingungen an den jeweiligen Behandlungstagen nicht geklärt werden kann, in welchem Maße die unterschiedlichen Behandlungen der Spritzfolge zur Reduzierung des Befalls beitragen. Möglicherweise hatten einzelne Applikationen an Behandlungstagen mit geringem Infektionsrisiko keinen oder nur geringen Einfluss auf das Gesamtergebnis. Eine eindeutige Bestimmung des Infektionsrisikos im Versuch mit Prognosemodellen ist nicht möglich, da die Modelle an Bedingungen in Praxisanlagen mit natürlichem Inokulationspotential entwickelt wurden. Das Versuchsdesign unterscheidet sich hierzu durch den kontinuierlichen hohen Befallsdruck und der möglicherweise für die Etablierung der Bakterien auf der Blüte suboptimalen Witterung. Somit ist es schwierig die Ergebnisse der Spritzfolgen direkt auf die Praxis zu übertragen.

### **Antagonisten**

Die relativ schwachen Wirkungsgrade der Antagonisten decken sich nicht einheitlich mit den Ergebnissen anderer Versuche (Fried, 2008; Fried, 2009; Kunz et al., 2010; Scheer, 2012). Der Wirkungsgrad des *Bacillus amyloliquefaciens* Produktes war mit 40 % vergleichbar mit anderen Resultaten, die Wirkungsgrade zwischen 13 und 67 % angeben. Wobei in den unterschiedlichen Jahren verschiedene Formulierungen

des Prüfmittels getestet wurden. Die antimikrobielle Wirkung des Prüfmittels (Chen et al., 2009) konnte offenbar unter Praxisbedingungen keinen ausreichenden Schutz vor Neuinfektionen der Blüten bieten. Beim Produkt Bloomtime (*Pantoea agglomerans* E325) lag der Wirkungsgrad mit 45 % im Vergleich zum Ergebnis eines anderen südwestdeutschen Versuchs mit 17 % hoch (Fried, 2012). Die hohen Wirkungsgrade aus Versuchen in den USA und in Neuseeland von 60-80 % (Johnson et al., 2004; Pusey, 2002; Vanneste et al., 2004) konnten in den durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Blossom Protect (*Aureobasidium pullulans*) erreichte einen Wirkungsgrad von 56 %. Somit konnten die von Kunz et al. (2012) in langjährigen Versuchen bestimmten Wirkungsgrade von etwa 80 % nicht erbracht werden. Der Antagonist *Erwinia tasmaniensis* erreichte einen Wirkungsgrad von etwa 40 %, deutlich weniger als in anderen Versuchen, bei denen Wirkungsgrade zwischen 60 und 80 % erzielt wurden (Fried, 2008; Fried, 2009; Fried, 2011). Die verschiedenen Prüfprodukte mit *Bacillus subtilis* (Serenade Max/WP) hatten einen Wirkungsgrad von etwa 40 %. Dies entspricht ungefähr den Angaben aus anderen Versuchen (Fried, 2007; Kunz et al., 2012; Scheer et al., 2005; Scheer et al., 2007).

Es wird angenommen, dass die Wirkungsweisen der Antagonisten auf der Konkurrenz um Nährstoffe, der Produktion von antibiotischen Substanzen, dem Auslösen von Pflanzenabwehrreaktionen oder einer pH-Wert-Absenkung beruhen (Chen et al., 2009; Giddens et al., 2003; Halgren et al., 2011; Kunz, 2004; Petruta et al., 2008; Pusey et al., 2008; Pusey et al., 2011; Wodzinski et al., 1994). Dies bedeutet, dass bereits vor einer möglichen Besiedelung des Stigmas durch *Erwinia amylovora* (Thomson, 1986) der Antagonist schon ausreichend etabliert sein sollte, um seine Wirkung zu entfalten. Eine Applikation nach dem phänologischen Blühverlauf oder zumindest ausreichend früher vor dem ersten möglichen Infektionstag ist deshalb notwendig. Diese Bedingung wurde nicht in allen Versuchen erfüllt. Hierauf ist möglicherweise eine Minderwirkung zurückzuführen. Außerdem wird diskutiert, ob durch eine Anreicherung der Spritzbrühe mit Nährstoffen oder Osmoadaption zu einer Leistungssteigerung der Antagonisten führen kann (Cabrefiga et al., 2011; Pusey und Wend, 2012). Einige der getesteten Prüfmittel hatten in den verschiedenen Versuchsjahren leicht unterschiedliche Formulierungen, was zu unterschiedlichen Wirkungsgraden führen kann. Bei häufiger Applikation von Blossom Protect auf empfindlichen Sorten wurde eine Mehrberostung der Früchte festgestellt (Fried, 2005; Matteson-Heidenreich et al., 1997; Scheer et al., 2005; Spotts und Cervantes, 2002). Durch ein entsprechendes Management (optimale Terminierung der Applikation, Reduzierung der Anwendungshäufigkeit, Kombination mit anderen Wirkstoffen) sollte diese Problematik jedoch vermieden werden können (Kunz, 2004; Kunz et al., 2010). Bei Produkten mit *Pantoea agglomerans* wird auf die mögliche Rolle als Humanpathogen hingewiesen (Cruz et al., 2007). Rezzonico et al.

## Diskussion

(2009a) führen dies jedoch auf eine taxonomische Fehleinordnung zurück und halten *Pantoea agglomerans* für unbedenklich für den Menschen.

Insgesamt ist bei einigen Antagonisten eine ausreichende Wirkung für die Praxis vorhanden. Durch ihre Wirkungsweise ist jedoch keine einfache Substitution von Streptomycin möglich. Vielmehr muss die Anwendung von Antagonisten in eine mehrgliedrige Spritzfolge integriert werden, wie etwa bei Kunz et al. (2010) beschrieben, wo eine Kombination aus Blossom Protect mit einer Mischung aus Netzschwefel Stulln und Myco-Sin für die Feuerbrand- und Schorfregulierung während der Blüte empfohlen wird.

### **Desinfektionsmittel**

Das Desinfektionsmittel Akasoil hatte zwar im Jahr mit wenig Befall einen Wirkungsgrad von fast 70 %, konnte dies jedoch im auswertbaren Versuch im Folgejahr mit 0 % Wirkung nicht bestätigen. Der Versuch von Fried (2011) weist ebenso mit einem Wirkungsgrad von 45 % auf eine nicht ausreichende Wirkung hin. Das Prüfmittel Antinfek erreichte sehr hohe Wirkungsgrade von ca. 90 %, was sich mit den Ergebnissen von Scheer (2012) mit einer etwas anderen Formulierung deckt. Da jedoch von Seiten der Herstellerfirma kein weiteres Interesse vorlag, konnte das Prüfmittel 2011 nicht mehr getestet werden und wird voraussichtlich nicht weiter entwickelt. Das Prüfmittel Feusil erzeugte nicht akzeptable Verbrennungen an Blättern und Blüten und ist deshalb nicht von weiterem Interesse. Der mittlere Wirkungsgrad von Planta 4+ (ca. 50 %) lässt das Prüfmittel nicht als interessant für die Praxis erscheinen. Es liegen keine weiteren Versuchsergebnisse zu diesem Mittel vor.

### **Kupferhaltige Produkte**

Bei den kupferhaltigen Prüfmitteln kann bei DM31 und DM32 keine Aussage über die Wirksamkeit gemacht werden. Sie wurden nur 2010 getestet. Aufgrund der kühlen Witterung war in diesem Jahr der Befall in den Versuchen zu gering, um eine klare Aussage über die Wirksamkeit der getesteten Mittel zu treffen. Die Kombination aus einem Phosphat- und Kupferdünger, Vittafos und Curamin, führte zu einem Wirkungsgrad von ca. 55 %. Insgesamt wird in der Literatur auf die relativ geringen Wirkungsgrade und mögliche Phytotoxizität von kupferhaltigen Produkten hingewiesen (Psallidas, 2000; van der Zwet und Beer, 1995). Während der geringe Wirkungsgrad festgestellt wurde, konnten keine Beobachtungen zu Beschädigungen an der Pflanze festgestellt werden.

### **Resistenzinduktoren**

Der Resistenzinduktor ALD1901 wurde nur 2010 getestet. Da der Befall in diesem Versuchsjahr zu gering war, ist keine Aussage zur Wirksamkeit möglich. Das Prüfmittel Chitoplant erreichte einen mittleren Wirkungsgrad von ca. 50 %. Dies liegt



etwas über dem von Kunz et al. (2012) ermittelten Wirkungsgrad von ca. 35 %. Die Wirkung von Chitosan, dem Wirkstoff von Chitoplant, wird in der Literatur ausführlich belegt (Bautista-Baños et al., 2006; El Hadrami et al., 2010; Shahidi und Abuzaytoun, 2005).

### **Weitere Prüfmittel**

Mit Wirkungsgraden um 40 % konnten weder das Prüfmittel 3DS noch das Düngemittel AFB eine ausreichende Wirkung erzielen. Wie sich schon in den Hagelversuchen zeigte, kann durch das Prüfmittel Juglon, einem Inhaltsstoff der Walnuss (Cosmulescu et al., 2011), der Blütenbefall deutlich reduziert werden. Mit einem Wirkungsgrad von 80 % konnten die Laborergebnisse von Gosch et al. (2011) bestätigt werden. Da es sich bei dem geprüften Mittel nicht um ein ausformuliertes Pflanzenschutzmittel handelt, ist noch von einer Steigerung bzw. Stabilisierung der Wirkung bei einem entwickelten Produkt auszugehen. Als weiteres Prüfmittel konnte LMA einen hohen Wirkungsgrad von 85 % erzielen. Dies deckt sich mit der hohen Wirkung im Hagelversuch und in den Versuchen von Fried (2012). Das Kalziumformiat LX4630 führte zu einem Wirkungsgrad von 40 %, versetzt mit einem Additiv erhöhte sich der Wirkungsgrad auf ca. 50 %. Dies bestätigt die Ergebnisse von Scheer (2012) mit Wirkungsgraden zwischen 30 und 40 %, steht jedoch im Widerspruch zu den deutlich höheren Wirkungsgraden von 60 bis 70 % bei Fried (2009). Die organische Säure NPA 25 erzielte einen nicht ausreichenden Wirkungsgrad von 40 %.

### **Substitute von Streptomycin und alternative Spritzfolgen**

Für ein Alternativprodukt zu Streptomycin, das substitutiv eingesetzt werden kann, fordert Moltmann et al. (2002) einen Wirkungsgrad von 80 – 90 %. Dies wird nur durch die Prüfmittel Antinfek, Juglon und LMA erreicht. Eine Weiterentwicklung der Prüfmittel bis zur Marktreife erscheint deshalb sinnvoll. Positive Versuchsergebnisse zur Ausdünnwirkung, Pflanzenverträglichkeit und Nebenwirkung auf Nützlinge unterstützen diese Aussage (Fried, 2011; Fried, 2012; Scheer, 2012). Dennoch ist zu berücksichtigen, dass durch die Kombination verschiedener Wirkstoffe in einer Spritzfolge ein ausreichender Schutz vor Blütenneuinfektionen möglich ist. Versuche von Kunz et al. (2012), Norelli et al. (2003), Spinelli et al. (2012) und Stockwell et al. (2008) zeigen, dass bspw. die Kombinationen von Resistenzinduktoren und Antagonisten mit einem Mittel mit direkter Wirkung einen akzeptablen Wirkungsgrad erreichen können. Deshalb sollten in zukünftigen Versuchen unterschiedliche Spritzfolgen untersucht werden, entsprechend der in dieser Arbeit untersuchten Spritzfolgen, jedoch ohne Streptomycin. Die Antagonisten Blossom Protect und Bloomtime FB sowie der Resistenzinduktor Chitoplant haben sich in den Versuchen dieser Arbeit als interessant für Spritzfolgen herausgestellt. Kombiniert werden könnten diese Produkte mit den Prüfmitteln Antinfek, Juglon oder LMA oder anderen,

für den Anbauer verfügbaren Mitteln mit Teilwirkung gegen Feuerbrandneinfektionen.

### **5.1.4 Schlussfolgerungen und Ausblick Freilandblütenversuche**

#### **5.1.4.1 Methodisch wissenschaftlich**

In drei Versuchsjahren wurden an je zwei Standorten Freilandblütenversuche mit indirekter Inokulation der Versuchsbäume durchgeführt. Die Analyse des Befalls innerhalb der Versuchspartellen, die Entwicklung der Zellzahlen auf den Blüten als Parameter für den Befallsdruck und die enge Korrelation zwischen Blüten- und Triebbefall zeigen, dass dieses Versuchsdesign zur Prüfung der Wirksamkeit von Behandlungen zur Verhinderung von Blütenneinfektionen verwendet werden kann. Mit der entwickelten statistischen Auswertung ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse von verschiedenen Standorten und Versuchsjahren möglich, wenn ausreichend viele Versuchsvarianten in allen Versuchen getestet wurden. Über die Bonitur und Auswertung auf Einzelbaumbasis können Details über den Befall in der Versuchsanlage dargestellt werden. Das Versuchsdesign ist für die Testung von einzelnen Wirkstoffen uneingeschränkt verwendbar. Der EPPO-Standard mit indirekter Inokulation ermöglicht eine realistische und vergleichbare Testung von Wirkstoffen im Freiland. Die Auswertung der Versuche sollte vereinheitlicht werden. Für die detaillierte Testung von Spritzfolgen müsste geklärt werden, inwieweit Vergleiche zwischen einzelnen Spritzfolgen, anhängig von der Witterung bei der Applikation einzelner Wirkstoffe, möglich sind. Die Integration von Antagonisten und Resistenzinduktoren in einer Spritzfolge mit einem Wirkstoff mit direkter Wirkung gegen *Erwinia amylovora* auf der Blüte scheint für die Zukunft als umsetzbar für die Praxis.

#### **5.1.4.2 Für die Praxis**

Die mehrjährigen Versuche zeigten, dass es Prüfmittel gibt, die ohne gravierende Verluste bei der Wirksamkeit Streptomycin substituieren können. Dies sind Antinfek, Juglon und LMA. Bei diesen Prüfmitteln handelt es sich jedoch nicht um zugelassene Pflanzenschutzmittel. In wie weit sie von der Privatwirtschaft weiterentwickelt werden und der Prozess der Zulassung als Pflanzenschutzmittel durchlaufen ist nicht absehbar. Außerdem gibt es weitere Prüfmittel, die alleine appliziert zu einem nicht ausreichenden Wirkungsgrad führen, die aber bei einer Kombination verschiedener Wirkstoffe mit unterschiedlicher Wirkungsweise für die Praxis einen ausreichenden Schutz bieten können. Eine Kombination zwischen Wirkstoffen mit direkter Wirkung auf der Blüte, Antagonisten und Resistenzinduktoren erscheint möglich und sinnvoll, muss aber im einzelnen noch konkret untersucht werden, um das konkrete Potential für die Praxis zu bestimmen.

## **5.2 Apfelsortentests zur Feuerbrandanfälligkeit**

### **5.2.1 Blüteninokulationen und Hagelversuch**

#### **Bedeutung der Sortenwahl als Teil des Feuerbrandmanagements**

Neben der Verhinderung von Neuinfektionen, vor allem während der Blüte, spielt die Auswahl von Sorten, die gegenüber Feuerbrand robust sind, eine mittel- und langfristig wichtige Rolle im Feuerbrandmanagement (Norelli et al., 2003; Steiner, 2000). Für die Auswahl anbauwürdiger Sorten ist die Kenntnis über deren Feuerbrandanfälligkeit für die Praxis wichtig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sorten Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova, Rewena und Wellant auf ihre Anfälligkeit im Freiland und in der Klimakammer untersucht. Wobei Gala als Referenz für eine hoch anfällige und Rewena als Referenz für eine schwach anfällige Sorte verwendet wurden.

#### **Diskussion der Methode**

Für die Sortentestung gibt es verschiedene Methoden. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Blüteninokulation und des Hagelversuchs decken die häufigsten Wege für Neuinfektionen über die Blüte und über Verletzungen am Gewebe ab. Hierdurch kann eine für die Praxis umfassende Aussage getroffen werden. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen Versuchen zu ermöglichen, ist die Anfälligkeit relativ zu Gala ein geeignetes Mittel. Zum einen wird Gala weltweit angebaut und zum anderen liegen für die Anfälligkeit einheitliche Daten vor (Lespinasse und Aldwinckle, 2000). Neben der Möglichkeit, durch Exaktversuche mit künstlicher Inokulation präzise Ergebnisse unter kontrollierten Bedingungen zu erzielen, kann durch Feldbeobachtungen die Anfälligkeit einer Sorte geschätzt werden. Die Korrelation von Blüten- und Triebanfälligkeit ist unklar (Aldwinckle et al., 1999; Le Lezec et al., 1986; Le Lezec et al., 1997). Deshalb müssen zur vollständigen Abklärung der Anfälligkeit einer Sorte beide getestet werden. Die in dieser Arbeit verwendete 9-Punkte-Skala zur Bonitur kombiniert den Blüten- und Triebbefall, indem die fortschreitende Infektion abgebildet wird.

Allgemein wird in der Literatur für die Beschreibung der Triebanfälligkeit der durchschnittliche nekrotische Teil des Triebes in Prozent des Gesamttriebes und die Häufigkeit der erfolgten Infektion festgestellt. Ein Befallsindex wird aus dem Produkt dieser Werte gebildet und dann in fünf Befallsklassen eingeteilt (Le Lezec et al., 1997; Lespinasse und Aldwinckle, 2000). Abweichend hiervon wurde bei den Hagelversuchen dieser Arbeit die Triebanfälligkeit zweistufig beschrieben. Zuerst die Häufigkeit des Befalls und dann die durchschnittliche absolute Nekrosenlänge der befallenen Triebe. Damit wird zuerst das Risiko einer Neuinfektion abgebildet, eine für die Praxis wichtige Aussage. Im zweiten Schritt werden nur die befallenen Triebe berücksichtigt. Somit wird eine unnötige Verfälschung des Mittelwertes durch die Nullwerte der nicht befallenen Triebe vermieden. Die Verwendung von absoluten

Nekrosenlängen, ergänzt durch die Gesamtrieblängen als Co-Variablen im statistischen Modell, bildet außerdem die Befallsdynamik direkter ab. Wird der relative Befall der Triebe angegeben, so wird die Aussage ungenau. Der relativ hohe Befall bei einem kurzen Trieb kann dem relativ geringen Befall eines langen Triebes in der absoluten Nekrosenlänge exakt entsprechen. Dieses Vorgehen bei der Auswertung kann auf die Versuche zur Testung der Triebanfälligkeit mit künstlicher Inokulation mit einer Injektionsspritze (Evrenosoğlu et al., 2011; Joos et al., 2012; Le Lezec et al., 1997; Sobiczewski et al., 2004) verwendet werden. Durch das Erheben von weiteren physiologischen Parameter, wie dem Triebwachstum oder dem Gehalt an bestimmten Inhaltsstoffen, und deren Verwendung als Co-Variablen im statistischen Modell können außerdem noch über die Aussage zur Anfälligkeit der getesteten Sorten Aussagen zum Zusammenhang zwischen Anfälligkeit und Physiologie getroffen werden.

### **Diskussion der Ergebnisse**

Die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse im Freiland und in der Klimakammer weisen darauf hin, dass ein standardisiertes Verfahren mit Blüteninokulation in der Klimakammer zu Ergebnissen führt, die auf Freilandbedingungen übertragen werden können. Dies bestätigen Ergebnisse anderer Arbeiten (Quamme, 1977). Somit können aufwendige Freilandversuche reduziert werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass sortenspezifisch unterschiedliche Blühzeitpunkte zu unterschiedlichen Infektionsrisiken während der Blüte einzelner Sorten führen. So sind generell Spätblüher stark gefährdet. Durch die Synchronisierung der Blühzeitpunkte der einzelnen Sorten können diese zwar direkt miteinander verglichen werden. Das tatsächliche Blühverhalten der Sorten abhängig vom spezifischen Standort mit der vorherrschenden Witterung muss jedoch berücksichtigt werden, um eine Sortenempfehlung treffen zu können.

Die Ergebnisse der Blüten-Sorten-Tests decken sich mit den Ergebnissen der Triebinokulationsversuche an der Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil (Silvestri et al., 2011). Hierbei wurde in einer groben Einteilung Rewena als robust, die übrigen Sorten als hoch anfällig getestet. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit können die übrigen Sorten Diwa, Gala, Greenstar, Kanzi, Mairac, Pinova und Wellant noch präziser unterschieden werden. Fraglich ist jedoch, ob diese Unterscheidung Relevanz für die Praxis hat. Möglicherweise ist die mittlere Anfälligkeit bei Mairac und Pinova, die hohe bei Diwa, Gala, Greenstar und Kanzi und die sehr hohe bei Wellant für die Praxis nicht akzeptabel. Bei Silvestri und Egger (2011) wird für die Bezeichnung „robust“ eine Läsionslänge von weniger als 40 % der Läsionslänge von Gala gefordert. Dies würde bei den getesteten Sorten nur auf Rewena zutreffen, die damit eine akzeptable Toleranz gegenüber Feuerbrandinfektionen aufweist. Eine tatsächliche Resistenz einer Sorte, die den Ausbruch der Krankheit verhindert, ist nicht bekannt (Joos et al., 2012).

### **Mögliche Ursachen sortenspezifischer Anfälligkeit**

Als Ursachen der sortenspezifischen Anfälligkeit werden die Morphologie des Stigmas und Hypanthiums, die Anatomie der Nektarien, die Dynamik der Nektarsekretion und die Menge sowie die Konzentration und Zusammensetzung des Nektars beschrieben (Farkas et al., 2012; Farkas et al., 2007). Außerdem werden, nach erfolgreicher Etablierung in planta konstitutive oder induzierte Wirkungsmechanismen der Pflanzen diskutiert (Brisset und Paulin, 2006). Zu den konstitutiven Mechanismen gehören die Eisen- und Wasserverfügbarkeit, der Gehalt an antimikrobiellen Substanzen und die Immobilisierung der Bakterien. Zu den induzierten Mechanismen gehören die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen der hypersensitiven Reaktion (HR), die Synthese von PR-Proteinen und die Stimulation des Sekundärmetabolismus mit der Bildung spezifischer Substanzen. Trotz der Vielzahl der Arbeiten zur Aufklärung der Ursachen der sortenspezifischen Anfälligkeit (Dugé de Bernonville et al., 2011; Honty et al., 2005; Pontais et al., 2008; Skłodowska et al., 2011; Viljevac et al., 2009) konnten diese noch nicht mit Sicherheit geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass ein veränderter Phenylpropanoid-Stoffwechsel nach der Infektion mit *Erwinia amylovora* für die sortenspezifische Anfälligkeit mitverantwortlich ist (Brisset und Paulin, 2006). Es ist bekannt, dass die sortenspezifische Anfälligkeit von der Art des Inokulums abhängt (Norelli et al., 1984; Sobiczewski et al., 2008). Da jedoch in den vorliegenden Versuchen stets derselbe in der Bodenseeregion endemisch vorkommende Stamm 385 verwendet wurde, kann diese Wechselwirkung ausgeschlossen werden.

### **Züchtung feuerbrandtoleranter Apfelsorten und Unterlagen**

Das fehlende Wissen über Resistenz- bzw. Toleranzmechanismen erschwert die gezielte Züchtung von Sorten und Unterlagen. Dies führte dazu, dass erfolgreich versucht wurde, durch gentechnische Modifikation resistente Pflanzen zu erzeugen (Borejsza-Wysocka et al., 2007; Djennane et al., 2011; Flachowsky et al., 2010; Malnoy et al., 2003; Malnoy et al., 2007; Norelli und Aldwinckle, 2000). Es wird versucht, über die Identifikation von Quantitative Trait Loci (QTL Mapping) Geneorte zu finden, die mit der Feuerbrandtoleranz verknüpft sind, was bereits gelungen ist (Baldo et al., 2010; Calenge et al., 2005; Khan et al., 2012). Hiermit wird eine markergestützte Selektion in der Züchtung möglich (Baumgartner et al., 2012; Kellerhals et al., 2009; Khan et al., 2007; Khan et al., 2009). Wichtig erscheint auch die Kombination der Anfälligkeitstest mit der Analyse der Erregerlast per Real-Time PCR in symptomlosem Gewebe (Baumgartner et al., 2012). Hierdurch wird verhindert, dass nur symptomfreie aber nicht resistente bzw. tolerante Pflanzen gezüchtet werden. Die Arbeit von Jensen et al. (2012) zeigt, dass durch die Wahl der Unterlage die Sortenanfälligkeit deutlich beeinflusst werden kann. Dies scheint mittelfristig bis zur Marktreife feuerbrandresistenter Neuzüchtungen eine gangbare

Alternative für die Praxis, wobei hier Versuche unter Praxisbedingungen notwendig sind.

### **5.2.2 Schlussfolgerungen und Ausblick Sorten**

#### **5.2.2.1 Methodisch wissenschaftlich**

Die entwickelte Boniturskala bildet den Befall fortschreitend ab. Der Befall erfolgte bei allen Sorten über den beobachteten Zeitraum von 3 Wochen nach einem logarithmischen Wachstum. Die Versuche im Freiland und in der Klimakammer führten zu gleichen Ergebnissen. Exaktversuche in der Klimakammer sind also für eine Beschreibung der Sorte ausreichend. Durch die Methode der Hagelversuche können auch verschiedene Sorten auf ihre Feuerbrandanfälligkeit getestet werden. Mit den gewonnenen Informationen kann nach Quantitative Trait Loci im Erbgut der untersuchten Sorten gesucht werden und zur Klärung von Resistenz- bzw. Toleranzmechanismen beigetragen werden.

#### **5.2.2.2 Für die Praxis**

Zur Beurteilung der Feuerbrandanfälligkeit verschiedener Apfelsorten wurden Blüten- und Hageltests durchgeführt. Zusammengefasst zeigt sich bei Rewena eine schwache, bei Mairac und Pinova eine mittlere, bei Diwa, Gala, Greenstar und Kanzi eine hohe und bei Wellant eine sehr hohe Anfälligkeit. Die Blütentests wurden sehr praxisnah an mehrjährigen Bäumen durchgeführt. Eine Übertragung auf die Praxis ist also möglich.

### **5.3 Pathogeneseversuche zum Feuerbrand**

#### **5.3.1 Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion**

##### **Zielsetzung und Methode**

Ziel des Versuches war die Abklärung des Zusammenhanges zwischen der Bakterienkonzentration der Inokulationssuspension und der Entwicklung von Symptomen, um einen möglichen unteren Grenzwert für eine Infektion festzulegen. Hierfür wurden eine oder alle Blüten endständiger Blütenbüschel mit Bakterienkonzentrationen zwischen  $10^2$  und  $10^9$  KbE/ml mit einer Mikropipette ins Hypanthium inokuliert und die Blüten anschließend nach der 9-Punkte-Skala über einen Zeitraum von 21 Tagen bonitiert. Der Versuch erfolgte in einer Klimakammer.

##### **Diskussion der Ergebnisse**

Die gleichmäßig hohen Zellzahlen 8 Tage nach der Inokulation zeigen, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung der Bakterien auf den Blüten auf einem für alle Inokulationsvarianten gleichen Niveau eingestellt hat. Die Unterschiede der Zellzahlen auf den Blüten waren also nicht dauerhaft. Eine hohe Vermehrungsrate ist unter den vorliegenden Bedingungen nachvollziehbar, da hohe Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit für *Erwinia amylovora* optimale Lebensbedingungen sind (Billing, 1974; Shrestha et al., 2011). Jede verwendete Konzentration hat

ausgereicht, um eine Infektion auszulösen. Durch die Alterung der Blüten nimmt ihre Anfälligkeit für Infektionen bis zum 3. Tag nach Inokulation deutlich ab (Pusey und Smith, 2008; Thomson und Gouk, 2003). Möglicherweise waren vor dem Schließen dieses Infektionszeitfensters die Zellzahlen der verschiedenen Varianten noch unterschiedlich hoch, wenn auch schon etwas stärker angeglichen als zu Beginn. Dies würde die unterschiedlichen Boniturwerte der Varianten erklären. Die Streuung innerhalb einer Variante könnte u. a. auf versuchstechnisch bedingte Unterschiede in der Inokulummenge als auch durch das individuelle Blütenalter erklärt werden. Wären innerhalb des Infektionsfensters schon alle Zellzahlen gleich hoch, so müsste entsprechend der Befall in allen Varianten gleich sein.

Dies würde bedeuten, dass die Menge der Bakterien während eines offenen Infektionsfensters einen Einfluss hat auf die Geschwindigkeit und die Höhe der Befallsentwicklung, wie sie durch die Regressionskurven der einzelnen Varianten dargestellt wird. Bei geringeren Konzentrationen erfolgt die Symptomentwicklung langsamer und auf niedrigerem Niveau. Bei höheren Konzentrationen erfolgt die Entwicklung schneller und ist auf einem höheren Niveau. Durch die Inokulation nur einer statt aller Blüten eines Blütenbüschels entstand eine Verzögerung der Befallsentwicklung, die in einem Unterschied von ca. 2 Boniturnoten deutlich wurde.

### **Höhe der Zellzahlen**

Die Höhe der Zellzahlen pro Blüte 8 Tage nach der Inokulation (Tabelle 4.6) war mit ca.  $10^8$  im Vergleich zu den Zellzahlen aus den Freilandversuchen hoch. Die Zellzahlen lagen hier bei ca.  $10^3 - 10^6$  Zellen pro Blüte (Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11). Die im Freilandversuch untersuchten Blüten wurden im Vergleich zum Klimakammerversuch nicht direkt inokuliert. Während im Klimakammerversuch praktisch jede Blüte befallen war, traf dies auf die Blüten im Freiland nicht zu. Das Ergebnis von Kunz et al. (2012) aus einem Feldversuch mit indirekter Inokulation mit Zellzahlen pro Blüte von  $10^3 - 10^8$  betätigt dies. Blütenproben aus Praxisanlagen zeigten gleich hohe Zellzahlen (Olbrecht, 2008; Vögele et al., 2010). Die acht Tage nach der Inokulation festgestellten Zellzahlen sind also relativ hoch. Olbrecht (2008) fand ca.  $10^7$  Zellen/Blüte im Freiland ausschließlich bei Blüten mit Symptomen. Die Entwicklung von Symptomen im Klimakammerversuch bei allen Varianten scheint darauf bezogen nachvollziehbar.

### **Grenzwert für Infektion**

Taylor et al. (2003) nennen einen Grenzwert von mind.  $10^6$  Bakterien pro Blüte für die Entwicklung von Befallssymptomen. Hier wurden jedoch der Befall und die Symptomentwicklung nicht detaillierter untersucht. Ursache für einen Grenzwert könnte ein Unterschied der Virulenz durch „Quorum Sensing“ bei höheren Bakterienpopulationen sein (Barnard, 2007; Molina et al., 2005; Whitehead et al., 2001) oder der Zusammenbruch von Resistenzmechanismen der Pflanze bei hohen

## Diskussion

Bakterienpopulationen sein. In der Arbeit von Taylor et al. (2003) wurde in einem Freilandversuch untersucht, ob ein Befall bei einer pro Blütenbüschel auf das Stigma inokulierten Blüte erfolgt oder nicht. Eine Differenzierung des Befalls auch über einen Zeitraum ist nicht erfolgt. Der in der vorliegenden Arbeit festgestellte Unterschied von ca. 2 Boniturnoten, wenn alle statt nur eine Blüte inokuliert wird, zeigt, dass es von entscheidender Bedeutung ist, wie viele Blüten eines Büschels inokuliert werden. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine Epidemie bedeutend.

Durch die Bonitur nach einer 9-Punkte-Skala über einen Zeitraum von 21 Tagen konnte festgestellt werden, dass die Menge an Bakterien einer Auswirkung auf den Befallsverlauf hat. Bei geringeren Zellzahlen kommt es möglicherweise wegen der Resistenzmechanismen der Pflanze zu einer geringeren Vermehrung und Symptomentwicklung. Auch im Laufe der betrachteten Zeit haben die Varianten mit geringerer Anfangskonzentration nicht mehr aufgeholt. Dies würde bedeuten, dass die Reduzierung der Konzentration auf der Blüte nicht nur zur Verhinderung von Infektionen führt, sondern auch den Infektionsverlauf in planta beeinflusst. Fraglich ist jedoch, wie sich die akute und latente Infektion über einen längeren, über den im Versuch beobachteten Zeitraum verhält. Trotz der Verlangsamung und Dämpfung der Symptomentwicklung bei geringeren Konzentrationen kann es letztendlich zum Absterben der ganzen Pflanze führen. Für die Praxis wären also geringere Konzentrationen nur eine unwesentlich geringere Bedrohung, da es dennoch zum Absterben eines Baumes kommen kann.

### **5.3.2 Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm**

#### **Zielsetzung und Methode**

Ziel des Versuches war, die Migration und Vermehrung der Bakterien abhängig von der Ausbreitungsrichtung und der Sorte zu beschreiben. Im Versuch wurde eine *Erwinia amylovora* Suspension in den Stamm von dreijährigen Bäumen injiziert. Anschließend wurden im Zeitraum von 14 Tagen Gewebeproben oberhalb, unterhalb und an der Injektionsstelle aus dem Stamm entnommen und auf den Gehalt an Zellen per Real-Time PCR untersucht. Die Injektion erfolgte entweder im Edelreis (Gala) oder in der Unterlage (M9) nahe der Veredelungsstelle.

#### **Diskussion der Ergebnisse**

Die Zellzahlen an der Injektionsstelle waren, unabhängig davon, ob diese im Edelreis (Gala) oder in die Unterlage (M9) war, auf einem hohen Niveau. Der latente Befall war also vergleichbar. Die Symptomentwicklung erfolgte jedoch an der Unterlage schneller und intensiver. Dies weist auf einen Unterschied in der sortenspezifischen Toleranz hin, wie er auch in der Literatur beschrieben wird (Lespinasse und Aldwinckle, 2000). Die Feststellung, dass M9 im Vergleich zu Gala anfälliger für die Symptomentwicklung ist und bei M9 eine stärkere und häufigere Ausbreitung nach unten stattfindet, deckt sich mit den Angaben zur allgemein höheren Anfälligkeit von



M9 (Lespinasse und Aldwinckle, 2000). Die räumliche Ausbreitung der Symptome bei der Unterlage über die ursprüngliche Injektionsstelle hinaus, weist darauf hin, dass eine Vermehrung der Bakterien stattgefunden hat. Es lag also bei M9 eine absolut höhere Bakterienpopulation und größere Nekrosen im Gewebe um die Injektionsstelle vor.

Dies könnte erklären, wieso bei Injektion in Gala erst nach 5 Tagen Bakterien unterhalb der Injektionsstelle gefunden wurden, während bei Injektion in M9 bereits nach 3 Tagen Zellen unterhalb nachgewiesen wurden. Ebenso könnte dies auch erklären, dass bei Injektion in M9 unterhalb der Injektionsstelle im Vergleich zur Injektion in Gala häufiger positive Proben mit hohen Zellzahlen bestimmt wurden. Dies könnte jedoch auch durch histologische Eigenschaften der Veredelungsstelle verursacht worden sein. Möglicherweise ist eine Migration über die Veredelungsstelle durch morphologische Eigenschaften des Gewebes erschwert. Dennoch erscheint es wahrscheinlicher, dass Befallshöhe und -häufigkeit durch den Sortenunterschied erklärt werden können. Die Ergebnisse aus den Sortenversuchen (4.2) zeigen ebenso eine große Varianz in der sortenspezifischen Anfälligkeit. Während der Symptomentwicklung an den Injektionsstellen haben sich die Zellzahlen innerhalb von 14 Tagen nicht verändert. Die Symptomentwicklung war also nicht mit einer Vermehrung der Bakterien direkt im symptomatischen Gewebe gekoppelt.

Die Symptome entwickelten sich im Bereich von Rinde, Kambium und Splintholz. Eine Ausbreitung der Bakterien war also im kortikalen Parenchym, im Phloem und im Xylem möglich. Die Symptome entwickelten sich gleichmäßig von der Injektionsstelle aus nach oben und unten. In größerer Distanz wurden jedoch Bakterien nur unterhalb der Injektionsstelle bestimmt. Eine Trennung der Ausbreitung in zwei Mechanismen wäre möglich. Einerseits die Vermehrung der Bakterien und Entwicklung von Symptomen und deren Ausbreitung im kortikalen Parenchym mit anschließendem Übergang in andere Gewebetypen, sowie andererseits der Ferntransport der Bakterien durch die Leitbahnen (Phloem und Xylem). Im Zeitraum des Versuchs im August waren der Assimilatfluss im Phloem nach unten und der Wasserfluss im Xylem nach oben gerichtet. Da keine Proben oberhalb der Injektionsstelle positiv getestet wurden, kann man vermuten, dass die Fernausbreitung der Bakterien über das Phloem erfolgte. Wäre das Xylem beteiligt gewesen, müssten auch Bakterien oberhalb der Injektionsstelle vorgelegen haben. Durch die verwendete Methode wurde möglicherweise nicht in jeder Probe eine ausreichende Menge an Splintholz und somit Xylem gestochen.

### **Triebprobenanalysen**

Die Höhe der Zellzahlen pro mg Gewebe aus dem Pathogeneseversuch zur (Tabelle 4.7) deckt sich mit den Ergebnissen der Triebproben aus den Hagelversuchen zur Wirkstoff- und Sortentestung (Tabelle 4.1 bzw. 4.2). Im symptomatischen und

## Diskussion

nichtsymptomatisches Gewebe wurden zwischen  $10^3$  und  $10^6$  Zellen/mg festgestellt. Einen direkten Zusammenhang zwischen der Symptomentwicklung und der Zellzahl bzw. Sorte war nicht möglich.

In weiteren Versuchen mit derselben Analyseverfahren wurden Zellzahlen im Bereich zwischen  $10^3$  und  $10^6$  Zellen/mg in Apfeltrieben verschiedener Sorten festgestellt (Joos et al., 2012; Olbrecht, 2008; Vögele et al., 2010). Auch hier war kein Zusammenhang zwischen Zellzahl und Symptomausprägung feststellbar.

### **Vergleich mit anderen Arbeiten**

Die Ausbreitung von *Erwinia amylovora* im Apoplast des kortikalen Parenchyms und die Entwicklung von Symptomen ist in der Literatur vielfach beschrieben. Eine Beteiligung des Phloems wird weder bestätigt, noch endgültig ausgeschlossen. Eine Ausbreitung über das Xylem wird jedoch häufig angegeben (Billing, 2011; Bogs et al., 1998; Suhayda und G. Goodman, 1981; Vanneste und Eden-Green, 2000). Insgesamt wurden sehr unterschiedliche Versuche durchgeführt, so dass eine Zusammenführung der Ergebnisse zu einer Gesamtheorie schwer fällt. Versuche von Gowda und Goodman (1970), bei dem Stämme geringelt wurden, scheinen am besten zu den durchgeführten Versuchen zu passen. Hier wurde festgestellt, dass die Ausbreitung im Rindengewebe, also Phloem und kortikalen Parenchym stattfindet. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine Aufteilung der Ausbreitung in eine sukzessive räumliche Ausdehnung durch Vermehrung und Symptomentwicklung und den Ferntransport liegt durch die in dieser Arbeit erarbeiteten Versuchsergebnisse nahe. Die Zellzahlen an den Injektionsstellen, an denen sich im Beobachtungszeitraum Symptome entwickelten, sind deutlich höher als an den anderen Probestellen (ca.  $10^3$  Unterschied). Eine Vermehrung findet jedoch an diesen Stellen nicht statt. Dies weist auf einen Ferntransport unabhängig von der Symptomentwicklung an der Injektionsstelle hin.

Da keine Ausbreitung nach oben stattgefunden hat, scheint das Xylem nicht beteiligt zu sein. Möglicherweise erfolgt ein Transport im Xylem erst später. Wäre eine Ausbreitung über das kortikale Parenchym erfolgt, so lässt sich nicht schlüssig klären, wieso keine Ausbreitung nach oben, sondern nur nach unten vorgelegen hat. Zusätzlich wäre unklar, weshalb keine Vermehrung der Bakterien an den Probestellen stattgefunden hat. Da sowohl die Ausbreitungsrichtung der Bakterien als auch die Flussrichtung des Phloensaftes nach unten verläuft, liegt es nahe, die Fernausbreitung der Bakterien im Phloem zu vermuten. Dies wird auch durch die Übereinstimmung der Flussgeschwindigkeit des Phloensaftes und der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Bakterien im Versuch bestätigt. Möglicherweise ist dies jedoch nur während dieser Phänophase der Pflanzen im Stamm und während der ersten 14 Tage nach der Inokulation entsprechend der beschriebenen Methode der Fall.

Möglicherweise kann so auch der Befall von Neutrieben aus der Unterlage erklärt werden. Da der Phloemsaftstrom zum Vegetationskegel des Neutriebs hin gerichtet ist („Sink“), können Bakterien in diesem in den Neutrieb transportiert werden. Dasselbe ist auch für den Ferntransport im Frühjahr beim Austrieb denkbar. So könnten Bakterien aus latent befallenen Trieben und Stämmen in bisher nicht befallene Triebe und Knospen oberhalb transportiert werden. Unter Umständen können auf diese Weise Bakterien aus der Pflanze in neue Blüten gelangen und so als Primärinokulum dienen (Moltmann und Viehrig, 2008). Die Ausbreitung von Feuerbrand in einer Anlage über phloemsaugende Schädlinge scheint die These des Ferntransportes im Phloem ebenso zu unterstützen (van der Zwet und Beer, 1995).

Die Beobachtung, dass die Zellzahlen während der Symptomentwicklung gleich hoch blieben, könnte bedeuten, dass im Gewebe, wenn eine bestimmte Zelldichte erreicht ist, keine Vermehrung mehr stattfindet, sondern nur noch nekrotische Symptome entwickelt werden. Hier stellt sich die Frage, in wie weit die bestimmte DNA aus lebenden Bakterien stammt. Möglicherweise ist in nekrotischem Gewebe ein Teil der Bakterien schon abgestorben (Joos et al., 2012).

### **5.3.3 Schlussfolgerungen und Ausblick Pathogenese**

#### **5.3.3.1 Methodisch wissenschaftlich**

##### **Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion**

Die Geschwindigkeit und Stärke der Symptome hängt von der Zellzahl auf den Blüten während des offenen Infektionszeitfensters in den ersten drei Tagen nach der Blütenöffnung ab. Bei geringeren Zellzahlen ist die Pflanze offenbar besser in der Lage, die Besiedelung mit *Erwinia amylovora* zu tolerieren. Dies könnte mit konstitutiven oder induzierten Resistenzmechanismen zusammenhängen, die jedoch im Einzelnen noch nicht abschließend geklärt sind. Die Inokulation und der darauf folgende Befall von nicht nur einer, sondern mehrerer Blüten pro Blütenbüschel, führte zu einem deutlich stärkeren und schnelleren Befall, als wenn nur eine Blüte inokuliert wurde. Ein direkter Einfluss der Inokulummenge und -konzentration auf den Befall sollte in den Prognosemodellen berücksichtigt werden. Hierfür sind noch weitergehende detaillierte Versuche, optimalerweise an Blütenbüscheln an Trieben, unter kontrollierten Bedingungen notwendig.

##### **Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm**

Der Versuch zur Stamminjektion legt nahe, dass bei Bäumen im Sommer in der Frühphase der Besiedelung der Pflanze der Ferntransport von Bakterien im Stamm über das Phloem erfolgt und das Xylem und das kortikale Parenchym nicht beteiligt sind. Die sukzessive Entwicklung von Symptomen und deren räumliche Ausdehnung könnte ein davon abgetrennter Prozess sein, der in allen Gewebearten von Rinde und Stamm stattfindet. Eine detailliertere Untersuchung mit histologischen Untersuchungen und mit Real-Time PCR, könnte hier weitere Informationen liefern.

### **5.3.3.2 Für die Praxis**

#### **Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion**

Die Zellzahl auf der Blüte ist ursächlich an der Befallsgeschwindigkeit und -stärke beteiligt. Die Verminderung der Zellzahlen in einer Anlage durch phytosanitäre Maßnahmen (Schnitt, Reißen, Roden) und die Verhinderung von hohen Zellzahlen auf den Blüten durch die Applikation von Wirkstoffen (Direkte Wirkung, Antagonist, Resistenzinduktor) haben also einen direkten Einfluss auf den Verlauf des Befalls. Die Reduzierung der Zellzahl führt zu einem geringeren Befall. Nicht nur das vollständige Verhindern der Besiedelung der Blüte bringt also Vorteile für die Praxis, sondern auch die Verminderung der Zellzahlen auf den Blüten. Somit können auch Wirkstoffe mit einem geringeren Wirkungsgrad von Interesse für die Praxis sein. Das Zeitfenster für die Anfälligkeit einer Blüte für Infektionen ist bedeutsam für die Befallsentwicklung. Dies bestätigt die Notwendigkeit der Verwendung von Prognosemodellen zur möglichst exakten Terminierung der Applikation.

#### **Pathogeneseversuch zur Ausbreitung von Bakterien im Stamm**

Der Versuch zur Stamminjektion zeigt, dass im Sommer die Ausbreitung der Feuerbrandbakterien über eine größere Distanz nach unten erfolgt, höchst wahrscheinlich über das Phloem. Die Symptomentwicklung erfolgt räumlich begrenzt an der Injektionsstelle. Eine Entfernung des sichtbaren Befalls kann also eine asymptomatische Ausbreitung nicht verhindern. Eine Ausbreitung nach oben wurde nicht festgestellt. Dies könnte bedeuten, dass sich Bakterien aus einem befallenen Trieb im unteren Kronenbereich, die sich bis zum Stamm ausbreiten, zwar nach unten in die Unterlage, aber nicht nach oben in den bisher nicht befallenen Kronenbereich ausbreiten. Dies kann den Unterlagenbefall und den Befall von Neutrieben aus der Unterlage erklären. Ein Ferntransport im Frühjahr könnte über das Phloem in alle wachsenden Pflanzenteile erfolgen und so zu Symptomen an bisher nicht befallenen Pflanzenteilen und letztendlich zum Absterben der ganzen Pflanze führen.

Die allgemeine höhere Anfälligkeit von M9 im Vergleich zu Gala zeigte sich sowohl in einer schnelleren und stärkeren Symptomentwicklung, als auch in einem früheren und umfangreicheren Ferntransport, der auf die höheren Zellzahlen zurückzuführen sein könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- "Gemeinsam gegen Feuerbrand" (2011). Gemeinsam gegen Feuerbrand - Projekthomepage. Zitiert am 10.07.2012. Verfügbar auf <http://feuerbrand-bodensee.org/projekt>.
- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Abo-Elyousr, A.M.K., Sallam, M.A.A. und Zeller, W. (2011). Effect of Acibenzolar-S-methyl and *Rahnella aquatilis* (Ra39) on fire blight of apple plants. *Acta Horticulturae*, 896: 511-518.
- Adaskaveg, J.E., Driever, G.F., Förster, H., Gubler, W.D., Wade, L.M. und Holtz, B. (2008). Detection of *Erwinia amylovora* strains with reduced sensitivity to currently registered antibiotics and management of fire blight of pome fruits using kasugamycin in integrated strategies. *Acta Horticulturae*, 793: 375-382.
- Al-Daoude, A., Arabi, M.I.E. und Ammouneh, H. (2009). Studying *Erwinia amylovora* isolates from Syria for copper resistance and streptomycin sensitivity. *Journal of Plant Pathology*, 91: 203-205.
- Aldridge, P., Metzger, M. und Geider, K. (1997). Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Molecular and General Genetics*, 256: 611-619.
- Aldwinckle, H.S., Gustafson, H.L. und Forsline, P.L. (1999). Evaluation of the core subset of the USDA apple germplasm collection for resistance to fire blight. *Acta Horticulturae*, 489: 269-272.
- Babini, V. und Mazzucchi, U. (2000). Competence of pear shoot and fruit wounds for *Erwinia amylovora* infection. *Journal of Plant Pathology*, 82: 147-150.
- Baldo, A., Norelli, J.L., Farrell Jr., R.E., Bassett, C.L., Aldwinckle, H.S. und Malnoy, M. (2010). Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus x domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology*, 10: 1-10.
- Barnard, A.M.L. (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362: 1165-1183.
- Bastas, K.K., Maden, S., Katircioglu, Y.Z. und Boyraz, N. (2010). Determination of application time for chemical control of fire blight disease in pear varieties. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 16: 150-161.
- Baumgartner, I.O., Leumann, L.R., Frey, J.E., Joos, M., Vögele, R.T. und Kellerhals, M. (2012). Breeding apples to withstand infection pressure by fire blight and other diseases. In: *Eco-Fruit : proceedings of the 15<sup>th</sup> International Conference on Organic Fruit-Growing from February 20<sup>th</sup> to February 22<sup>nd</sup> 2012 at the University of Hohenheim, Germany*, Hrsg. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 14-21.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-Del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E. und Wilson, C.L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25: 108-118.
- Baysal, Ö. und Zeller, W. (2004). Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against Fire Blight (*Erwinia amylovora*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65: 305-315.

## Literaturverzeichnis

- Bazzi, C., Biondi, E., Berardi, R. und Brunelli, A. (2006). Efficacy of bioagents and chemicals against pear shoot blight. *Acta Horticulturae*, 704: 283-287.
- Beer, S.V. und Norelli, J.L. (1977). Fire Blight Epidemiology: Factors Affecting Release of *Erwinia amylovora* by Cankers. *Phytopathology*, 67: 1119-1125-1125.
- Billing, E. (2011). Fire blight. Why do views on host invasion by *Erwinia amylovora* differ? *Plant Pathology*, 60: 178-189.
- Billing, E. (2000). Fire blight risk assessment systems and models. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, Cabi Publishing, Wallingford, 293-318.
- Billing, E. (1974). The effect of temperature on the growth of the fireblight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Journal of Applied Bacteriology*, 37: 643-648.
- Blachinsky, D., Shtienberg, D., Zamski, E., Weinthal, D. und Manulis, S. (2006). Effects of pear tree physiology on fire blight progression in perennial branches and on expression of pathogenicity genes in *Erwinia amylovora*. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 315-324.
- BMELV (2008). Bericht über die Feuerbrandsituation im Jahr 2007. Zitiert am 17.07.2012. Verfügbar auf [http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2007.pdf;jsessionid=C64D83C0567C799DAFCB3A0F79D6DB47.2\\_cid288?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2007.pdf;jsessionid=C64D83C0567C799DAFCB3A0F79D6DB47.2_cid288?__blob=publicationFile).
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C. und Gelder, K. (1998). Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*, 88: 416-421.
- Bonn, W.G. und van der Zwet, T. (2000). Distribution and economic importance of fire blight. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, Cabi Publishing, Wallingford, 37-54.
- Borejsza-Wysocka, E.E., Malnoy, M., Aldwinckle, H.S., Beer, S.V., Norelli, J.L. und He, S.H. (2007). Strategies for obtaining fire blight resistance in apple by rDNA technology. *Acta Horticulturae*, 738: 283-286.
- Breth, D.I., Aldwinckle, H.S. und Turechek, W. (2002). Effects of weather conditions in development of "Trauma" Blight in apple shoots. *Acta Horticulturae*, 590: 143-146.
- Breth, D.I., Bentley, A., Momol, M.T., Seem, R.C. und Aldwinckle, H.S. (1999). Fire blight on apple: effects of wind and rain in development of trauma blight. *Acta Horticulturae*, 489: 471-474.
- Brisset, M.N., Cesbron, S., Thomson, S.V. und Paulin, J.P. (2000). Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 529-536.
- Brisset, M.N. und Paulin, J.P. (2006). Plant mechanisms interfering with fire blight infection. *Acta Horticulturae*, 704: 483-487.
- Cabrefiga, J., Frances, J., Montesinos, E. und Bonaterra, A. (2011). Improvement of fitness and efficacy of a fire blight biocontrol agent via nutritional enhancement combined with osmoadaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 3174-3181.
- Calenge, F., Drouet, D., Denancé, C., Van De Weg, W.E., Brisset, M.N., Paulin, J.P. und Durel, C.E. (2005). Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 128-135.
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S. und Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140: 38-44.

- Chiou, C.-. und Jones, A.L. (1995). Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 85: 324-328.
- Clark, A.M., Jurgens, T.M. und Hufford, C.D. (1990). Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, 4: 11-14.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G. und Baci, A. (2011). Juglone content in leaf and green husk of five walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39: 237-240.
- Crosse, J.E., Goodman, R.N. und Shaffer, W.H.J. (1972). Leaf damage as a predisposing factor in the infection of apple shoots by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 62: 176-182.
- Cruz, A.T., Cazacu, A.C. und Allen, C.H. (2007). *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1989-1992.
- Djennane, S., Cesbron, C., Sourice, S., Cournol, R., Dupuis, F., Eychenne, M., Loridon, K. und Chevreau, E. (2011). Iron homeostasis and fire blight susceptibility in transgenic pear plants overexpressing a pea ferritin gene. *Plant Science*, 180: 694-701.
- Duffy, B. und Dandekar, A.M. (2008). Sorbitol has no role in fire blight as demonstrated using transgenic apple with constitutively altered content. *Acta Horticulturae*, 793: 279-284.
- Duffy, B., Walsh, F., Pelludat, C., Holliger, E., Oulevet, C. und Widmer, F. (2011). Streptomycin use on orchard bacterial communities. *Acta Horticulturae*, 896: 483-488.
- Dugé de Bernonville, T., Gaucher, M., Guyot, S., Durel, C.E., Dat, J.F. und Brisset, M.N. (2011). The constitutive phenolic composition of two *Malus × domestica* genotypes is not responsible for their contrasted susceptibilities to fire blight. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 65-73.
- Eastgate, J.A. (2000). *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease. *Molecular Plant Pathology*, 1: 325-329.
- Eden-Green, S.J. (1972). Studies in fire blight disease of apple, pear and hawthorn (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.). Doktorarbeit, University of London.
- El Hadrami, A., Adam, L.R., El Hadrami, I. und Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8: 968-987.
- EPPO (2012). PQR - EPPO database on quarantine pests (Software online verfügbar). Zitiert am 08.04.2012. Verfügbar auf <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
- EPPO (2004). *Erwinia amylovora*; Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/20(1). *EPPO Bulletin*, 34: 159-171.
- EPPO (2002). EPPO Standard PP1/166 (3): Efficacy evaluation of bactericides against *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*, 32: 341-345.
- Evrenosoğlu, Y., Misirli, A., Saygılı, H., Bilen, E., Boztepe, Ö. und Acarsoy, N. (2011). Evaluation of susceptibility of different pear hybrid populations to fire blight (*Erwinia amylovora*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39: 226-236.
- Farkas, A., Mihalik, E., Dorgai, L. und Bubán, T. (2012). Floral traits affecting fire blight infection and management. *Trees - Structure and Function*, 26: 1-20.
- Farkas, Á., Orosz-Kovács, Z., Déri, H. und Chauhan, S.V.S. (2007). Floral nectaries in some apple and pear cultivars with special reference to bacterial fire blight. *Current Science*, 92: 1286-1289.
- Flachowsky, H., Szankowski, I., Fischer, T.C., Richter, K., Peil, A., Höfer, M., Dörschel, C., Schmoock, S., Gau, A.E., Halbwirth, H. und Hanke, M.V. (2010). Transgenic apple plants overexpressing the Lc gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. *Planta*, 231: 623-635.

## Literaturverzeichnis

- Fried, A. (2012). Feuerbrand Bekämpfungsversuch 2011. *Obstbau*, 2: 84-88.
- Fried, A. (2011). Feuerbrand Bekämpfungsversuch 2010. *Obstbau*, 3: 139-143.
- Fried, A. (2009). Feuerbrand-Bekämpfungsversuch 2008. *Obstbau*, 1: 13-17.
- Fried, A. (2008). Feuerbrand-Bekämpfungsversuch und Verträglichkeitsprüfung von Feuerbrand-Präparaten 2007. *Obstbau*, 2: 72-75.
- Fried, A. (2007). Feuerbrand-Bekämpfungsversuch und Verträglichkeitsprüfung von Feuerbrand-Präparaten 2006. *Obstbau*, 4: 204-208.
- Fried, A. (2005). Feuerbrand-Bekämpfungsversuche - Mehrberostung durch Hefen? *Obstbau*, 3: 118-122.
- Giddens, S.R., Houlston, G.J. und Mahanty, H.K. (2003). The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) Eh1087 and *Erwinia amylovora* in planta. *Environmental Microbiology*, 5: 1016-1021.
- Gosch, C., Fischer, T.C., Stich, K., Moosbeckhofer, R., Reisenzein, H. und Persen, U. (2011). New bactericides against fire blight (*Erwinia amylovora*) and development of a fast Bee-*Erwinia* monitoring system. *Acta Horticulturae*, 917: 139-142.
- Gosch, C., Halbwirth, H. und Stich, K. (2010). Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry*, 71: 838-843.
- Gowda, S.S. und Goodman, R.N. (1970). Movement and persistence of *Erwinia amylovora* in shoot, stem and root of Apple. *Plant Disease Reporter*, 54: 576-580.
- Griffith, C.S., Sutton, T.B. und Peterson, P.D. (Hrsg.) (2003). Fire blight: the foundation of phytobacteriology. Selected Papers of Thomas J. Burrill, Joseph C. Arthur and Merton B. Waite, The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Halgren, A., Azevedo, M., Mills, D., Armstrong, D., Thimmaiah, M., Mcphail, K. und Banowetz, G.M. (2011). Selective inhibition of *Erwinia amylovora* by the herbicidally active germination-arrest factor (GAF) produced by *Pseudomonas* bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 949-959.
- Honty, K., Hevesi, M., Tóth, M. und Stefanovits-Bányai, É. (2005). Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia aymlovora*. *Acta Biologica Szegediensis*, 49: 127-129.
- Jensen, P.J., Halbrendt, N., Fazio, G., Makalowska, I., Altman, N., Praul, C., Maximova, S.N., Ngugi, H.K., Crassweller, R.M., Travis, J.W. und McNellis, T.W. (2012). Rootstock-regulated gene expression patterns associated with fire blight resistance in apple. *BMC Genomics*, 13: 1-17.
- Johnson, K.B. und Stockwell, V.O. (1998). Management of fire blight: A case study in microbial ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 227-248.
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O., McLaughlin, R.J., Sugar, D., Loper, J.E. und Roberts, R.G. (1993). Effect of Antagonistic Bacteria on Establishment of Honey Bee-Dispersed *Erwinia amylovora* in Pear Blossoms and on Fire Blight Control. *Phytopathology*, 83: 995-1002.
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O. und Sawyer, T.L. (2004). Adaptation of fire blight forecasting to optimize the use of biological controls. *Plant Disease*, 88: 41-48.
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O. und Temple, T.N. (2008). Evaluation of kasugamycin as a component of an integrated biological and chemical strategy for suppression of blossom blight. *Acta Horticulturae*, 793: 439-444.
- Joos, M., Rehfus, A., Rex, A., Buck, S. und Vögele, R.T. (2012). Cultivar testing, pathogenesis and quantitative distiction of live an dead cells of *E. amylovora*. In: Eco-



- Fruit : proceedings of the 15<sup>th</sup> International Conference on Organic Fruit-Growing from February 20<sup>th</sup> to February 22<sup>nd</sup> 2012 at the University of Hohenheim, Germany, Hrsg. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 153-159.
- Kellerhals, M., Spuhler, M., Duffy, B., Patocchi, A. und Frey, J.E. (2009). Selection efficiency in apple breeding. *Acta Horticulturae*, 814: 177-184.
- Khan, M.A., Durel, C.E., Duffy, B., Drouet, D., Kellerhals, M., Gessler, C. und Patocchi, A. (2009). Identification and validation of QTLs linked to fire blight resistance in malus and their applicability in marker-assisted selection. *Acta Horticulturae*, 814: 753-758.
- Khan, M.A., Durel, C.E., Duffy, B., Drouet, D., Kellerhals, M., Gessler, C. und Patocchi, A. (2007). Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome*, 50: 568-577.
- Khan, M.A., Zhao, Y. und Korban, S.S. (2012). Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Resistance to the Bacterial Pathogen *Erwinia amylovora*, Causal Agent of Fire Blight Disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 247-260.
- King, E.O., Ward, M.K. und Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- Kunz, S. und Ernst, A. (2000). Wirkungsweise von Myco-Sin bei der Feuerbrandbekämpfung. In: 9. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum Ökologischen Obstbau. Beiträge zur Tagung vom 3.-4. Februar 2000 in Weinsberg/Germany, Hrsg. M. Boos, 25-29.
- Kunz, M., Sander, J. und Kottmeier, C. (2009). Recent trends of thunderstorm and hailstorm frequency and their relation to atmospheric characteristics in southwest Germany. *International Journal of Climatology*, 29: 2283-2297.
- Kunz, S. (2004). Organic Eprints - Development of "Blossom-Protect" - a yeast preparation for the reduction of blossom infections by fire blight. In: Ecofruit - 11<sup>th</sup> International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 3<sup>rd</sup> February to 5<sup>th</sup> February 2004 at Weinsberg/Germany, Hrsg. M. Boos, Weinsberg, 108-112.
- Kunz, S., Schmitt, A. und Haug, P. (2012). Summary of an eight year research project on fire blight control. In: Eco-Fruit : proceedings of the 15th International Conference on Organic Fruit-Growing from February 20th to February 22nd 2012 at the University of Hohenheim, Germany, Hrsg. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 146-152.
- Kunz, S., Schmitt, A. und Haug, P. (2010). Fire blight control strategies in organic fruit growing. In: eco-fruit : proceedings to the conference from February 22<sup>th</sup> to February to 24<sup>th</sup> February 2010 at the University of Hohenheim, Germany, Hrsg. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, FÖKO, Weinsberg, 118-125.
- Laux, P., Wesche, J. und Zeller, W. (2003). Field experiments on biological control of fire blight by bacterial antagonists. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, 110: 401-407.
- Le Lezec, M., Babin, J. und Lecomte, P. (1986). Sensibilité des variétés américaines et européennes de pommier au feu bactérien. *Arboriculture Fruitière*, 388: 23-29.
- Le Lezec, M., Lecomte, P., Laurens, F. und Michelesi, J.C. (1997). Sensibilité variétale au feu bactérien [3 parts]. *Arboriculture Fruitière*, 503: 57-61.
- Le Lezec, M. und Paulin, J.P. (1984). Shoot susceptibility of fire blight of some apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 151: 277-281.

## Literaturverzeichnis

- Lespinasse, Y. und Aldwinckle, H.S. (2000). Breeding for resistance to fire blight. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, 253-273.
- Lindow, S.E., McGourty, G. und Elkins, R. (1996). Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology*, 86: 841-848.
- LTZ Augustenberg (2012). Starker Befall mit Feuerbrand in Kernobstanlagen in 2012. Zitiert am 17.07.2012. Verfügbar auf [www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/show/1373303\\_I1/LTZ\\_Starker Befall mit Feurbrand in Kernobstanlagen in 2012.pdf](http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/show/1373303_I1/LTZ_Starker_Befall_mit_Feurbrand_in_Kernobstanlagen_in_2012.pdf).
- Malnoy, M., Jin, Q., Borejsza-Wysocka, E.E., He, S.Y. und Aldwinckle, H.S. (2007). Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 1568-1580.
- Malnoy, M., Venisse, J.S., Brisset, M.N. und Chevreau, E. (2003). Expression of bovine lactoferrin cDNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear. *Molecular Breeding*, 12: 231-244.
- Matteson-Heidenreich, M.C., Corral-Garcia, M.R., Momol, E.A. und Burr, T.J. (1997). Russet of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. *Plant Disease*, 81: 337-342.
- McGrath, M.J., Koczan, J.M., Kennelly, M.M. und Sundin, G.W. (2009). Evidence that prohexadione-calcium induces structural resistance to fire blight infection. *Phytopathology*, 99: 591-596.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W. und Jones, A.L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 443-465.
- Miller, T.D. und Schroth, M.N. (1972). Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology*, 62: 1175-1182.
- Molina, L., Rezzonico, F., Défago, G. und Duffy, B. (2005). Autoinduction in *Erwinia amylovora*: Evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight pathogen. *Journal of Bacteriology*, 187: 3206-3213.
- Moltmann, E. (2007). Feuerbrand in Baden-Württemberg 2007 - ein Situationsbericht. *Obstbau*, 8: 428-430.
- Moltmann, E. (2005). Feuerbrandbekämpfung in Baden-Württemberg; Beitrag aus der Festschrift "50 Jahre Landesanstalt für Pflanzenschutz und 50 Jahre integrierter Pflanzenschutz Baden Württemberg". Zitiert am 17.07.2012. Verfügbar auf [www.landwirtschaft-bw.info/servlet/PB/show/1170527\\_I1/6.4\\_Moltmann\\_Feuerbrandbekämpfung.pdf](http://www.landwirtschaft-bw.info/servlet/PB/show/1170527_I1/6.4_Moltmann_Feuerbrandbekämpfung.pdf).
- Moltmann, E., Fried, A. und Jelkmann, W. (2002). A new experimental design for testing control agents for fire blight on blossoms under nearly natural conditions. *Acta Horticulturae*, 590: 309-313.
- Moltmann, E., Seibold, A., Fried, A. und Lange, E. (2006). More results of testing control agents for fire blight in the field with a new experimental design. *Acta Horticulturae*, 704: 253-257.
- Moltmann, E. und Viehrig, M. (2008). Blossoms of infected pear trees may be sources of early inoculum for fire blight (*Erwinia amylovora*). *Acta Horticulturae*, 793: 39-44.
- Momol, M.T. (2000). Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, Cabi Publishing, Wallingford, 55-72.
- Ngugi, H.K. und Schupp, J.R. (2009). Evaluation of the Risk of Spreading Fire Blight in Apple Orchards with a Mechanical String Blossom Thinner. *HortScience*, 44: 862-865.

- Norelli, J.L. und Aldwinckle, H.S. (2000). Transgenic Varieties and Rootstocks Resistant to Fire Blight. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, Cabi Publishing, Wallingford, 275-292.
- Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S. und Beer, S.V. (1984). Differential Host × Pathogen Interactions Among Cultivars of Apple and Strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 74: 136-139.
- Norelli, J.L., Bassett, C.L., Lalli, D.A., Wisniewski, M.E., Farrell Jr., R.E., Baldo, A.M. und Aldwinckle, H.S. (2008). Transcriptional response of *Malus* to *Erwinia amylovora* infection. *Acta Horticulturae*, 793: 189-194.
- Norelli, J.L., Jones, A.L. und Aldwinckle, H.S. (2003). Fire blight management in the twenty-first century: Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 87: 756-765.
- Norelli, J.L. und Miller, S.S. (2004). Effect of prohexadione-calcium dose level on shoot growth and fire blight in young apple trees. *Plant Disease*, 88: 1099-1106.
- Ockey, S.C. und Thomson, S.V. (2006). Preventing shoot blight of apple with streptomycin applications following simulated hail injury. *Acta Horticulturae*, 704: 211-216.
- Olbrecht, L. (2008). Untersuchungen zur Epidemiologie und Pathogenese des Feuerbrandreggers *Erwinia amylovora* mit der Real-Time PCR. Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- Özaktan, H. und Bora, T. (2004). Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain Eh 24. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 224-229.
- Ozrenk, K., Balta, F. und Çelik, F. (2012). Levels of fire blight (*Erwinia amylovora*) susceptibility of native apple, pear and quince germplasm from Lake Van Basin, Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 229-8236.
- Paulin, J.P. (2000). *Erwinia amylovora*: General Characteristics, Biochemistry and Serologie. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, 87-116.
- Persen, U.U. (2011). Spread of *Erwinia amylovora* in apple and pear trees of different cultivars after artificial inoculation. 896: 319-330.
- Petruta, C.C., Catalina, V., Matilda, C., Sorina, D., Manuela, C., Maria, D., Valeriu, S. und Florin, O. (2008). In vitro inhibition of *Erwinia amylovora* Romanian isolates by new antagonistic bacterial strains. *Romanian Biotechnological Letters*, 13.
- Piepho, H.P. (2004). An algorithm for a letter-based representation of all-pairwise comparisons. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 13: 456-466.
- Piepho, H.P., Büchse, A. und Emrich, K. (2003). A Hitchhiker's Guide to Mixed Models for Randomized Experiments. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 189: 310-322.
- Pontais, I., Treutter, D., Paulin, J.P. und Brisset, M.N. (2008). *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiologia Plantarum*, 132: 262-271.
- Psallidas, P.G. (2000). Chemical control of fire blight. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, Cabi Publishing, Wallingford, 199-234.
- Pusey, P.L. (2002). Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. *Plant Disease*, 86: 639-644.
- Pusey, P.L. und Smith, T.J. (2008). Relation of apple flower age to infection of hypanthium by *Erwinia amylovora*. *Plant Disease*, 92: 137-142.

## Literaturverzeichnis

- Pusey, P.L., Stockwell, V.O., Reardon, C.L., Smits, T.H.M. und Duffy, B. (2011). Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. *Phytopathology*, 101: 1234-1241.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O. und Rudell, D.R. (2008). Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 98: 1136-1143.
- Pusey, P.L. und Wend, C. (2012). Potential of osmoadaptation for improving *Pantoea agglomerans* E325 as biocontrol agent for fire blight of apple and pear. *Biological Control*, 62: 29-37.
- Quamme, H.A. (1977). Resistance to naturally and artificially induced fire blight in the Harrow pear collection. *Canadian Plant Disease Survey*, 57: 9-12.
- Reader, J. und Corliss, C.H. (2009). Line spectra of the elements. In: *Handbook of chemistry and physics*, Hrsg. D.R. Lide, CRC Press, Boca Raton.
- Rezzonico, F., Smits, T.H., Montesinos, E., Frey, J.E. und Duffy, B. (2009a). Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology*, 9: 204-222.
- Rezzonico, F., Stockwell, V.O. und Duffy, B. (2009b). Plant agricultural streptomycin formulations do not carry antibiotic resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 3173-3177.
- Rühmer, T. (2012). Bekämpfung ohne Antibiotika Feuerbrand-Blüteninfektion. *Besseres Obst*, 1: 4-6.
- Salm, H. und Geider, K. (2004). Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathology*, 53: 602-610.
- Scheer, C. (2012). Feuerbrandversuche am Bodensee - Aktuelle Ergebnisse des Versuchsjahres 2011. *Obstbau*, 1: 48-50.
- Scheer, C., Trautmann, M. und Hagl, D. (2007). Ergebnisse der Feuerbrandversuche 2005 und 2006. *Obstbau*, 4: 199-202.
- Scheer, C., Trautmann, M. und Hagl, D. (2005). Das Hefepräparat Blossom-Protect fb. *Obstbau*, 3: 122-127.
- Schouten, H.J. (1989). A possible role in pathogenesis for the swelling of extracellular slime of *Erwinia amylovora* at increasing water potential. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95: 169-174.
- Shahidi, F. und Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 49: 93-135.
- Shrestha, R., Lee, S.H., Hur, J.H. und Lim, C.K. (2011). The Effects of Temperature, pH, and Bactericides on the Growth of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Plant Pathology Journal*, 21: 127-131.
- Silvestri, G. und Egger, S. (2011). Sortenwahl für eine nachhaltige Feuerbrandstrategie im Schweizer Mostapfelanbau; Schlussbericht 2008 - 2011. Zitiert am 15.05.2012. Verfügbar auf [http://www.agroscope.admin.ch/data/publikationen/1315572602\\_KTI-Projekt\\_SOFEM\\_Schlussbericht\\_08-11.pdf](http://www.agroscope.admin.ch/data/publikationen/1315572602_KTI-Projekt_SOFEM_Schlussbericht_08-11.pdf).
- Silvestri, G., Egger, S., Hunziker, K., Felder, B., Szalatnay, D., Hollenstein, R. und Müller, U. (2011). Feuerbrand Anfälligkeit von Kernobstsorten Merkblatt Nr. 732. Zitiert am 17.05.2012. Verfügbar auf [http://www.agroscope.admin.ch/data/publikationen/1315572816\\_ACW-Merkblatt\\_Nr.\\_732\\_Feuerbrand\\_2011\\_def.pdf](http://www.agroscope.admin.ch/data/publikationen/1315572816_ACW-Merkblatt_Nr._732_Feuerbrand_2011_def.pdf).

- Skłłodowska, M., Gajewska, E., Kuźniak, E., Wielanek, M., Mikiciński, A. und Sobiczewski, P. (2011). Antioxidant profile and polyphenol oxidase activities in apple leaves after *Erwinia amylovora* infection and pretreatment with a benzothiadiazole-type resistance inducer (bth). *Journal of Phytopathology*, 159: 495-504.
- Sobiczewski, P., Żurawicz, E., Berczyński, S., Mikiciński, A. und Lewandowski, M. (2008). The importance of the type of *Erwinia amylovora* inoculum in screening of apple genotypes susceptibility to fire blight. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16: 305-313.
- Sobiczewski, P., Zurawicz, E., Berczyński, S. und Lewandowski, M. (2004). Terminal shoot susceptibility of new Polish apple cultivars to fire blight. *Folia Horticulturae*, 16: 149-157.
- Spinelli, F., Andreotti, C., Sabatini, E., Costa, G., Ponti, I., Spada, G. und Geider, K. (2006). Chemical control of fire blight in pear: Application of prohexadione-calcium, Acibenzolar-S-methyl, and copper preparations in vitro and under field conditions. *Acta Horticulturae*, 704: 233-237.
- Spinelli, F., Vanneste, J.L. und Costa, G. (2012). Acylcyclohexanediones and biological control agents: Combining complementary modes of action to control fire blight. *Trees - Structure and Function*, 26: 247-257.
- Spotts, R.A. und Cervantes, L.A. (2002). Involvement of *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis* in russet of d'Anjou pear fruit. *Plant Disease*, 86: 625-628.
- Steiner, P.W. (2000). Integrated orchard and nursery management for control of fire blight. In: *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, 339-358.
- Steiner, P.W. (1990). Predicting canker, shoot and trauma blight phases of apple fire blight epidemics using the MARYBLYT model. *Acta Horticulturae*, 273: 139-148.
- Stockwell, V.O. und Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *OIE Revue Scientifique Et Technique*, 31: 199-210.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D. und Loper, J.E. (2010). Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1 applied as single strains and mixed inocula. *Phytopathology*, 100: 1330-1339.
- Stockwell, V.O., Temple, T.N., Johnson, K.B. und Loper, J.E. (2008). Integrated control of fire blight with antagonists and oxytetracycline. *Acta Horticulturae*, 793: 383-390.
- Suhayda, C. und G. Goodman, R.N. (1981). Infection Courts and Systemic Movement of <sup>32</sup>P-Labeled *Erwinia amylovora* in Apple Petioles and Stems. *Phytopathology*, 71: 656-660.
- Sundin, G.W., Werner, N.A., Yoder, K.S. und Aldwinckle, H.S. (2009). Field evaluation of biological control of fire blight in the Eastern United States. *Plant Disease*, 93: 386-394.
- Taylor, R.K., Hale, C.N., Henshall, W.R., Armstrong, J.L. und Marshall, J.W. (2003). Effect of inoculum dose on infection of apple (*Malus domestica*) flowers by *Erwinia amylovora*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31: 325-333.
- Thomas, E. (2006). *Feldversuchswesen*. Ulmer, Stuttgart.
- Thomson, S.V. (2000). Epidemiology of fire blight. In: *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, 9-36.
- Thomson, S.V. (1986). The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology*, 76: 476-482.
- Thomson, S.V. und Gouk, S.C. (2003). Influence of age of apple flowers on growth of *Erwinia amylovora* and biological control agents. *Plant Disease*, 87: 502-509.

## Literaturverzeichnis

- Tsiantos, J. und Psallidas, P. (2004). Fire blight resistance in various loquat, apple and pear cultivars and selections in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 86: 227-232.
- Tsiantos, J. und Psallidas, P. (2002). The effect of inoculum concentration and time of application of various bactericides on the control of fire blight (*Erwinia amylovora*) under artificial inoculation. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 246-251.
- Tsiantos, J. und Psallidas, P. (1990). Chemical control of fire blight (*Erwinia amylovora*) under artificial conditions. *Microbios Letters*, 45: 23-25.
- Tsiantos, J., Psallidas, P. und Chatzaki, A. (2003). Efficacy of alternatives to antibiotic chemicals for the control of fire blight of pears. *Annals of Applied Biology*, 143: 319-323.
- van der Zwet, T. und Beer, S.V. (1995). Fire blight : its nature, prevention, and control ; a practical guide to integrated disease management. United States Department of Agriculture, Washington, D.C.
- van der Zwet, T. und Keil, H.L. (1979). Fire blight - a bacterial disease of Rosaceous plants. United States, Department of Agriculture, Washington, DC.
- van der Zwet, T. und Keil, H.L. (1972). Importance of pear-tissue injury to infection by *Erwinia amylovora* and control with streptomycin. *Canadian Journal of Microbiology*, 18: 893-900.
- Vanneste, J.L., Cornish, D.A., Spinelli, F. und Yu, J. (2004). Colonization of apple and pear leaves by different strains of biological control agents of fire blight. *New Zealand Plant Protection*, 57: 49-53.
- Vanneste, J.L. (2000). What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? In: Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, 1-6.
- Vanneste, J.L. und Eden-Green, S. (2000). Migration of *Erwinia amylovora* in Host Plant Tissues. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Hrsg. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, 73-83.
- Viljevac, M., Dugalić, K., Štolfa, I., Dermić, E., Cvjetković, B., Sudar, R., Kovačević, J., Cesar, V., Lepeduš, H. und Jurković, Z. (2009). Biochemical basis of apple leaf resistance to *Erwinia amylovora* infection. *Food Technology and Biotechnology*, 47: 281-287.
- Vögele, R.T., Kunz, S., Olbrecht, L., Hinze, M., Weißhaupt, S., Schmid, A., Ernst, M., Joos, M., Matschinsky, M. und Mendgen, K. (2010). Monitoring *E. amylovora* using Real Time PCR. In: eco-fruit : proceedings to the conference from February 22<sup>th</sup> to February to 24<sup>th</sup> February 2010 at the University of Hohenheim, Germany, Hrsg. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, FÖKO, Weinsberg, 110-116.
- Weißhaupt, S. (2008). Untersuchungen zur Ausbreitung des Feuerbrandreggers *Erwinia amylovora* mittels Real-Time PCR. Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. und Salmond, G.P.C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 365-404.
- Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Rogers, L.A. und Smith, G.H. (1920). The families and genera of the bacteria; *Erwineae*. *Journal of Bacteriology*, 5: 191-229.
- Wodzinski, R.S., Umholtz, T.E., Rundle, J.R. und Beer, S.V. (1994). Mechanisms of inhibition of *Erwinia amylovora* by *Erw. herbicola* in vitro and in vivo. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 22-29.

## 7 Anhang

### 7.1 Versuchspläne, Witterungsverläufe und Versuchsprotokoll der Freilandblütenversuche und Lagepläne der Klimakammerversuche

#### Lageplan der Freilandblütenversuche

Abbildung 7.1 Lageplan der Freilandblütenversuche.

##### Vogt 2009

6a	2b	5b	3c	1d	4d
2a	3b	1b	4c	5d	6d
3a	5a	4b	1c	6c	2d
1a	4a	6b	5c	2c	3d

##### Mühlingen 2009

9a	4a	7b	6b	1c	5c	10d	11d	
10a	6a	8b	3b	4c	2c	1d	5d	8d
11a	2a	10b	1b	8c	6c	3c	9d	4d
8a	7a	4b	11c	5b	9c	7c	2d	3d
1a	3a	5a	9b	2b	10c	11c	7d	6d

##### Vogt 2010

6a	2b	5b	3c	1d	4d
2a	3b	1b	4c	5d	6d
3a	5a	4b	1c	6c	2d
1a	4a	6b	5c	2c	3d

##### Mühlingen 2010

	11d	2d	5d	9d	4d	8d	10d	7d
7c	3c	4c	2c	1c	5c	6d	3d	1d
5b	4b	1b	7b	6c	10c	9c	11c	8c
4a	1a	6b	9b	2b	8b	10b	3b	11b
6a	2a	7a	3a	9a	10a	11a	8a	5a

##### Vogt 2011

7a	2a	4a	1a	3a	6a	
1b	4b	5b	7b	2b	3b	6b
3c	5c	2c	4c	6c	1c	7c
2d	6d	1d	3d	4d	5d	

##### Mühlingen 2011

7a	1a	3a	11a	2a	9a	10a	4a	8a	5a	6a
11b	8b	10b	9b	1b	7b	4b	3b	6b	2b	5b
5c	6c	2c	4c	9c	8c	3c	7c	10c	11c	1c
1d	3d	6c	10d	7d	2d	5d	11d	9d	8d	4d

Sämtliche Freilandversuche wurden vollständig randomisiert mit vierfacher Wiederholung durchgeführt. Reihenabstand 2,0 m; Baumabstand 0,7 m; Abstand zum Infektionsbaum 1,2 m; Abstand zwischen Parzellen 1,5 m

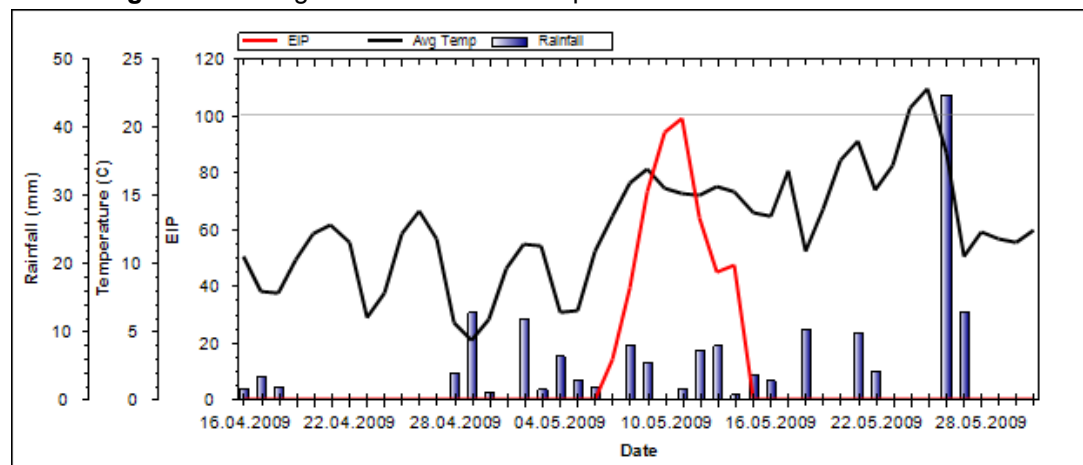
**Versuchsjahr 2009**

**Tabelle 7.1** Versuchsglieder der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2009.

Versuchsglied	Standort		Behandlung	Mittelmenge (kg bzw. l)/ha u. m KH (Konzentration)	Anwendungstermin
	Mühlingen	Vogt			
1	X	X	Unbehandelt	-	
2	X	X	Strepto	0,3 kg (0,06 %)	A
3	X		Strategie 1 Serenade Max, Strepto, LX 4622 (2x)	2,5 kg (0,5 %); 0,3 kg (0,06 %); 10 kg (2 %)	B
4	X		Strategie 2 Blossom Protect, Strepto, LX 4622 (2x)	A: 5,25 kg (1,05 %), B: 0,75 kg (0,15 %); 0,3 kg (0,06 %); 10 kg (2 %)	B
5	X		<i>Erwinia tasmaniensis</i>	0,075 kg (0,015 %)	A
6	X		NPA 25	1 l (2 %)	A
7	X	X	Antinfek	5 l (1 %)	A
8	X	X	Abi 09 fl.	25 l (5 %)	A
9	X	X	LX 4630	7,5 kg (1,5 %)	A
10	X		LX 4630 + Additiv	7,5 kg (1,5 %)+5 l (1 %)	A
11	X		Blossom Protect	A: 5,25 kg (1,05 %), B: 0,75 kg (0,15 %)	A
12		X	Serenade Max	2,5 kg (0,5 %)	A

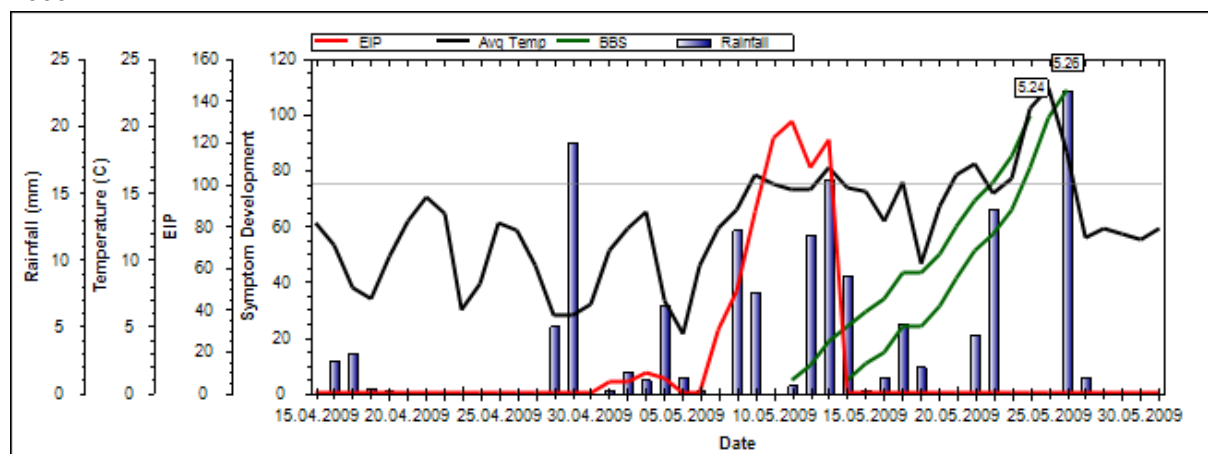
Anwendungstermine: A: ca. 2 h vor der künstlichen Inokulation und nach Warndienstaufruf, B : 1. Produkt ca. 10% offene Blüte, Strepto wie A, 3. Produkt in abgehende Blüte

**Abbildung 7.2** Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Vogt 2009.



Datum	Behandlung	BBCH
08.04.	Versuchsaufbau	
25.04.	Calypso 0,02 %, Flint 0,02 %, Runner 0,04 %	
29.04.-14.05.	Blüte	
06.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	63/65
10.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	65
12.05.	Applikation aller Versuchsglieder	65/67
13.05.	Score 0,015 %, Calypso 0,02 %	
30.05.	Bonitur Blütenbefall	



**Abbildung 7.3** Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Mühlingen 2009.

Datum	Behandlung	BBCH
07.04.	Versuchsaufbau	
22.04.	Calypso 0,02 %, Flint 0,02 %, Runner 0,04 %	56/57
29.04.-14.05.	Blüte	
05.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	62
09.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	65
11.05.	Applikation aller Versuchsglieder	65/66
14.05.	Applikation aller Versuchsglieder	67
14.05.	Flint 0,02 %, Runner 0,04 %	
29.05.	Bonitur Blütenbefall	

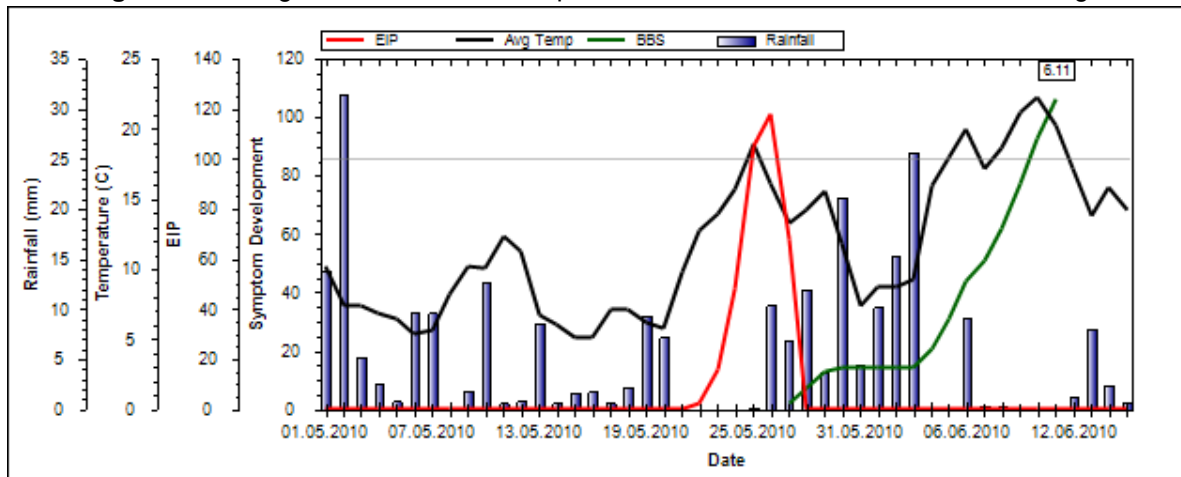
## Versuchsjahr 2010

**Tabelle 7.2** Versuchsglieder der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2010.

Versuchs- glied	Standort		Behandlung	Mittelmenge (kg bzw. l)/ha u. m KH (Konzentration)	Anwendungs- termin
	Mühlingen	Vogt			
1	X	X	Unbehandelt	-	
2	X	X	Strepto	0,3 kg (0,06 %)	A
3	X	X	LMA 01	10 kg (2 %)	A
4	X		Antinfek	5 l (1 %)	A
5	X		Strategie Vacciplant, Strepto (je 2x)	0,375 l (0,075 %) 0,3 kg (0,06 %)	B
6	X		ALD 1901	0,375 kg (0,075 %)	C
7	X		Serenade ASO	5 l (1 %)	A
8	X		<i>Erwinia tasmaniensis</i> + NPA	0,001 l (0,0001 %) 0,1 l (0,02 %)	A
9	X		Akasoil	0,5 kg (0,1 %)	A
10	X	X	Juglon	0,4 kg (0,087 %)	A
11	X		Feusil	20 l (4 %)	A
12		X	DM 31	5 l (1 %)	A
13		X	DM 31	3 kg (0,6 %)	A
14		X	DM 32	5 l (1 %)	A

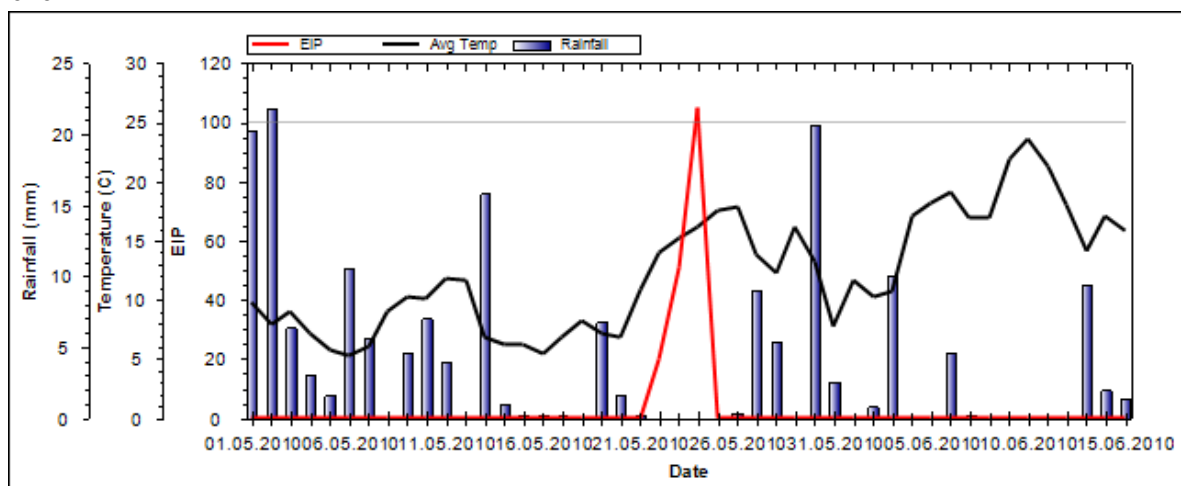
Anwendungstermine: A: ca. 2 h vor der künstlichen Inokulation und nach Warndienstaufwurf, B: Vacciplant 3-mal (BBCH 56 – 59, 60 – 65, 66 – 69), Strepto wie A, C: BBCH 53 – 69, alle 7 – 10 Tage

**Abbildung 7.4** Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Vogt 2010.



Datum	Behandlung	BBCH
13.04.	Versuchsaufbau	
03.05.	Syllit 0,125 %, Flint 0,02 %, Calypso 0,02 %, Flint 0,02 %, Harnstoff 1 %	56/57
18.05.		59
21.05.-27.05.	Blüte	
22.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	63
24.05.	Applikation aller Versuchsglieder	65
26.05.	Applikation aller Versuchsglieder	65/66
31.05.	Calypso 0,02 %, Flint 0,02 %	
16.06.	Bonitur Blütenbefall	

**Abbildung 7.5** Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Mühlingen 2010.



Datum	Behandlung	BBCH
13.04.	Versuchsaufbau	
20.04.	Applikation Versuchsglied 6	54
29.04.	Applikation VG 5, 6	56
04.05.	Syllit 0,125 %, Flint 0,02 %	59
15.05.-25.05.	Blüte	
17.05.	Applikation aller Versuchsglieder außer 5,6, künstliche Inokulation	63
21.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	65
26.05.	Applikation aller Versuchsglieder	67
31.05.	Calypso 0,02 %, Flint 0,02 %	
14.06.	Bonitur Blütenbefall	

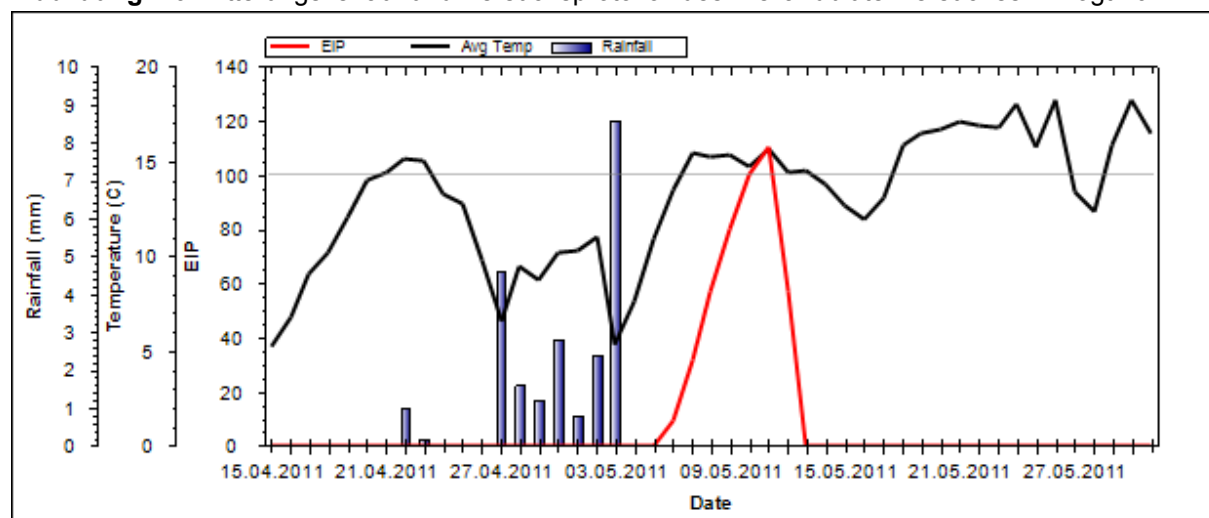
## Versuchsjahr 2011

Tabelle 7.3 Versuchsglieder der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2011.

Versuchs- glied	Standort		Behandlung	Mittelmenge kg bzw. l/ha u. m KH (Konzentration)	Anwendungs- termin
	Mühlingen	Vogt			
1	X	X	Unbehandelt	-	A
2	X	X	Strepto	0,3 kg (0,06 %)	A
3	X		Planta 4+	5 l (1 %)	A
4	X		Blossom Protect	A: 5,25 kg (1,05 %) B: 0,75 kg (0,15 %)	A
5	X	X	Bloomtime FB	0,01 kg (0,002 %)	A
6	X	X	Juglon	0,4 kg (0,087 %)	A
7	X		LMA 01	15 kg (3 %)	A
8	X		ChitoPlant	0,5 kg (0,1 %)	A
9	X		Akasoil	1 kg (0,2 %)	A
10	X		AFB 1.0	10 l (2 %)	A
11	X		Strategie Blossom Protect (1x), Strepto(3x)		B
12		X	3DS	50 l (10 %)	A
13		X	Vittafos Curamin	Je 1 kg (0,2 %)	A

Anwendungstermin: A: ca. 2 h vor der künstlichen Inokulation und nach Warndienstaufwurf; B: wie A, 1. Anwendung Blossom Protect, anschließend Streptomycin

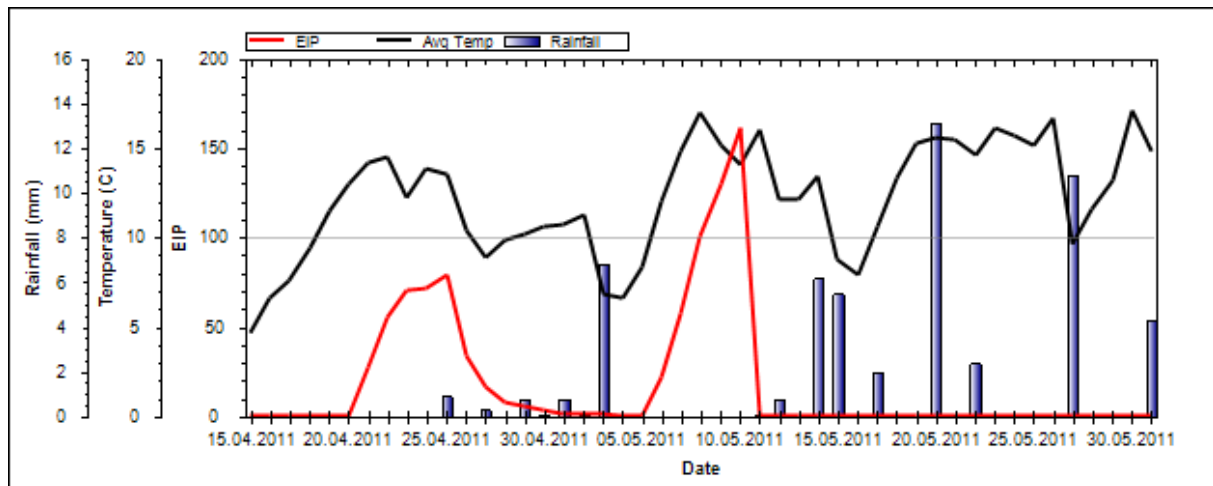
Abbildung 7.6 Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Vogt 2011.



Datum	Behandlung	BBCH
29.03.	Versuchsaufbau	
29.04.-11.05.	Blüte	
30.04.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	63
05.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	65
07.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	66
09.05.	Applikation aller Versuchsglieder	67
11.05.	restliche offene Blüten entfernt	
25.05.	Bonitur Blütenbefall	
22.06.	Bonitur Triebbefall	

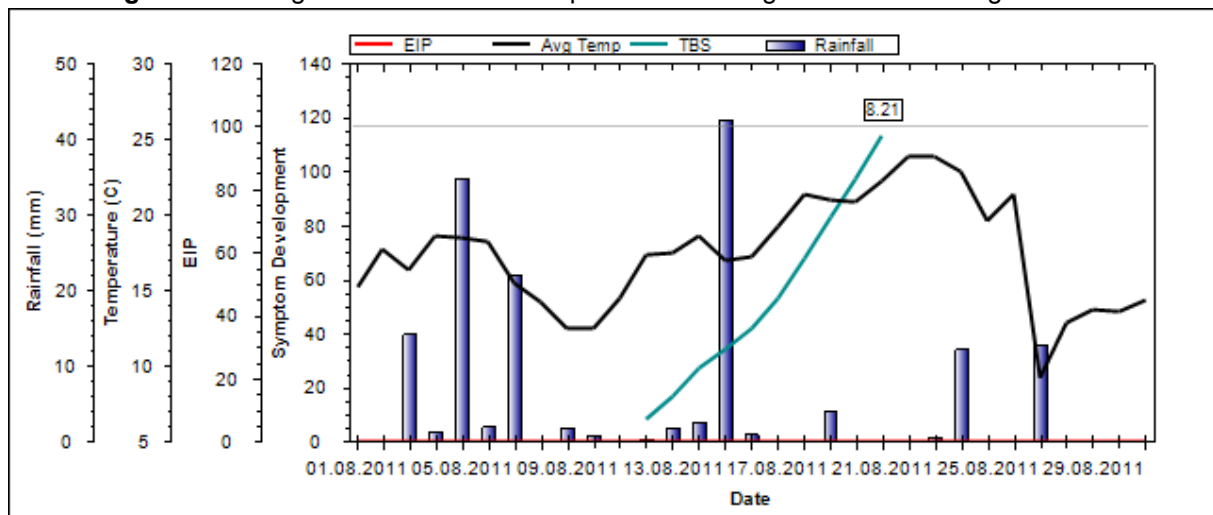
## Anhang

**Abbildung 7.7** Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Freilandblütenversuches in Mühlingen 2011.



Datum	Behandlung	BBCH
06.04.	Versuchsaufbau	
22.04.-09.05.	Blüte	
25.04.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	63/65
29.04.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	65
02.05.	Applikation aller Versuchsglieder, künstliche Inokulation	66
06.05.	Applikation aller Versuchsglieder	67
25.05.	Bonitur Blütenbefall	
22.06.	Bonitur Triebbefall	

**Abbildung 7.8** Witterungsverlauf und Versuchsprotokoll des Hagelversuches in Vogt 2011.



Datum	Behandlung	BBCH
05.08.	Versuchsaufbau	
11.08.	Verletzung, Inokulation, Applikation Versuchsglieder	63/65
22.08.	Bonitur Triebbefall	
01.09.	Bonitur Triebbefall	

### Lagepläne der Klimakammerversuche

Bei den Hagelversuchen wurden die einzelnen Handveredelungen auf Kultursteigen mit acht Plätzen verteilt. Als Randomisationseinheit dienten, je nach Anzahl der Versuchsglieder, eine oder zwei Kultursteigen. Beispielhaft ist der Lageplan des dritten Hagelversuchs dargestellt.

Abbildung 7.9 Lagepläne der Hagelversuche.

#### Hagelversuch 1

	6	3	5	2	4	1			4	6	3	1	5	2		
	1	4	2	6	5	3			5	2	1	4	3	6		
	4	2	6	1	5	3			1	5	3	3	5	1		
	5	3	1	6	2	4			2	4	6	4	5	2		
	1	4	3	1	4	3										
	5	2	6	6	5	2										

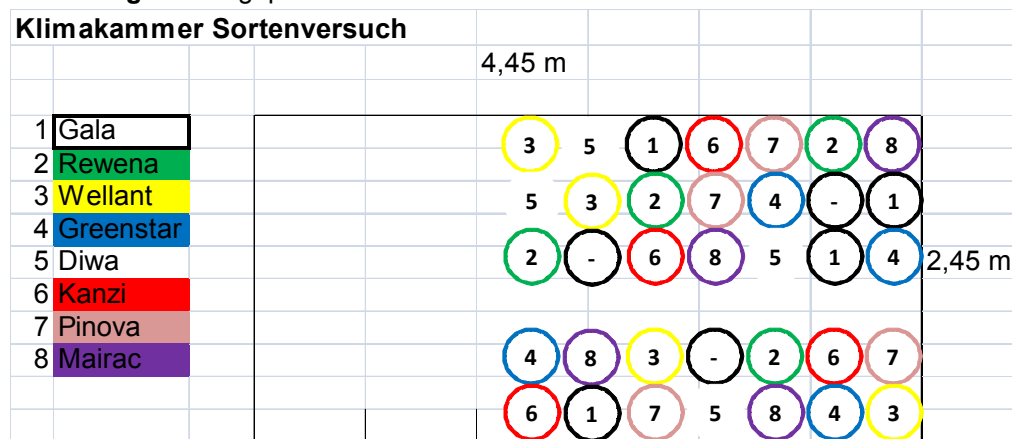
#### Hagelversuch 2 und 4

8	4	7	11	9	10	1	2	10	4	11	7	1	12	4	7
9	12	2	1	7	8	3	12	2	3	1	5	6	10	11	8
10	8	9	3	4	9	6	2	3	2	10	5	2	5	1	6
1	6	7	5	1	12	3	10	11	7	8	12	8	11	10	4
12	5	11	7	9	7	6	1	10	4	11	3	4	8	5	9
6	9	3	4	5	12	11	10	12	8	5	9	10	6	12	2
6	7	2	11	9	1	8	2	12	5	1	4				
9	3	8	4	6	5	11	3	2	6	3	7				

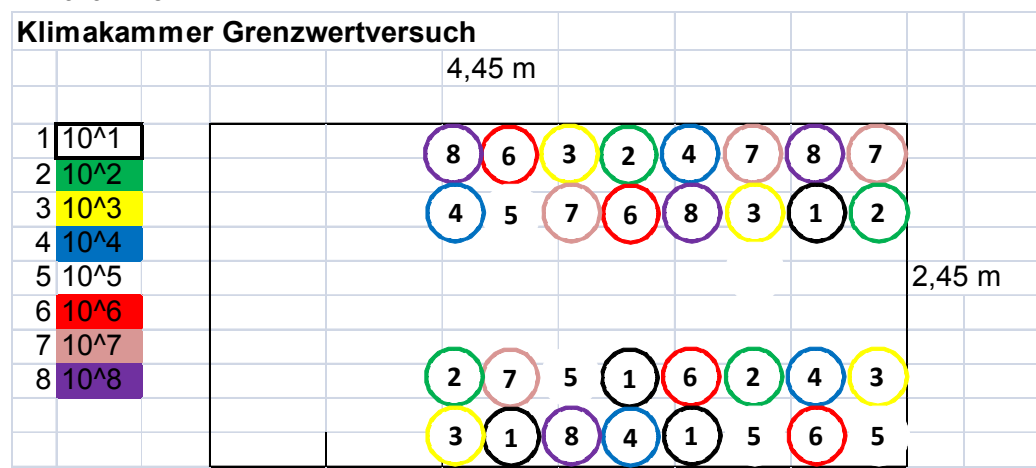
#### Hagelversuch 3

5	6		8	7	11	10	4	13	3	7	4	8	6	5	15
3	9	2	12	15	13	14	1	9		12	14	11	10	1	2
7	6	14	10	1	4	5	8	2		13	14	8	7	9	6
3	2	12	11	15	13	9		11	3	5	15	10	12	1	4
4	8	11		7	15	6	3	11	10	4	3	2	14		1
13	5	1	12	10	14	2	9	5	12	6	8	9	7	15	13
3	4	15	7	1	2	14	6	12	10	13	8	3	11	5	4
8	13	11	10	9		5	12	2	7	9	1		15	6	14
9	15	14	10	2	12		3		2	7	11	12	13	14	9
6	1	5	4	8	7	13	11	1	15	6	8	5	4	10	3

Abbildung 7.10 Lageplan des Sortentests in der Klimakammer.



**Abbildung 7.11** Lageplan des Versuchs zur unterschiedlichen Inokulationskonzentration in der Klimakammer.



## 7.2 Detaillierte statistische Ergebnisse sämtlicher Versuche

### Hagelversuche zur Wirkstofffestung

**Tabelle 7.4** Detailliertes statistisches Ergebnis des 1. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation.

**A** Durchschnittlicher Befall mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung

**B** Durchschnittliche Nekrosenlänge mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung und Signifikanzklassen (t-Test; Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0.05$ ))

A			B			
Behandlung	Befall [%]	Standardfehler	Behandlung	Ø Nekrose [cm]	Standardfehler	
unbehandelt	1	-	unbehandelt	16,4	1,4	a
Streptomycin	99,8	27,6	Streptomycin	13,1	1,6	a
AFB	1	-	AFB	13,4	1,5	a
Vitafos+Curamin	99,8	27,6	Vitafos+Curamin	13,9	1,5	a
Chitoplant	1	-	Chitoplant	13,2	1,4	a
Sergomil FB	1	-	Sergomil FB	14,7	1,4	a
Generalisiertes Lineares Gemischtes Modell			Gemischtes Lineares Modell			
Befall = Behandlung + Spalte : Block			Nekrose = Behandlung + Trieblänge: Block			
Behandlung $p=1,0$			Behandlung $p=0,5586$			
Spalte $p=0,5502$			Trieblänge $p=0,0417$			

**Tabelle 7.5** Detailliertes statistisches Ergebnis des 2. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation.**A** Durchschnittlicher Befall mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung**B** Durchschnittliche Nekrosenlänge mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung und Signifikanzklassen (t-Test; Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0.05$ ))

<b>A</b>			<b>B</b>			
Behandlung	Befall [%]	Standardfehler	Behandlung	Ø Nekrose [cm]	Standardfehler	
unbehandelt	72,6	15,8	unbehandelt	15,1	1,8	a
Streptomycin	0	-	Strepto	0	0	b
Juglon hell	26,4	16,8	Juglon hell	13,2	3,3	a
Juglon dunkel	27,6	15,0	Juglon dunkel	14,6	2,8	a
3DS	22,0	13,9	3DS	14,2	2,7	a
LMA	8,7	9,2	LMA	9,1	4,8	a
AFB	40,0	17,1	AFB	12,5	2,3	a
Myco-Sin	27,8	15,2	Myco-Sin	11,3	2,8	a
Vittafos+Curamin	32,0	15,5	Vittafos+Curamin	13,8	2,5	a
Chitoplant	34,5	16,3	Chitoplant	13,1	2,2	a
Sergomil FB	15,2	11,0	Sergomil FB	12,2	3,4	a
Xedaphos	10,8	11,1	Xedaphos	10,4	4,8	a

Generalisiertes Lineares Gemischtes Modell  
 Befall = Behandlung + Spalte + neue Blätter : Wiederholung  
 Behandlung  $p=0,4534$ , Spalte  $p=0,5610$ , neue Blätter  $p=0,0699$

Gemischtes Lineares Modell  
 Nekrose=Behandlung+Spalte:Wiederholung  
 Behandlung  $p=0,9625$   
 Spalte  $p=0,5873$

**Tabelle 7.6** Detailliertes statistisches Ergebnis des 3. Hagelversuches 21 Tage nach Inokulation.**A** Durchschnittlicher Befall mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung**B** Durchschnittliche Nekrosenlänge mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung und Signifikanzklassen (t-Test; Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0.05$ ))

<b>A</b>			<b>B</b>			
Behandlung	Befall [%]	Standardfehler	Behandlung	Ø Nekrose [cm]	Standardfehler	
unbehandelt	84,3	12,4	unbehandelt	13,5	1,1	a
Streptomycin	6,7	7,6	Streptomycin	8,1	3,4	a
Juglon	39,0	20,0	Juglon	12,4	1,9	a
Myco-Sin	27,9	18,4	Myco-Sin	13,4	2,0	a
LMA	30,8	18,8	LMA	9,0	2,0	a
Selecta Disperss	84,0	12,7	Selecta	13,2	1,2	a
Sergomil FB	66,0	17,6	Disperss			
Xedaphos	86,0	11,0	Sergomil FB	10,8	1,2	a
			Xedaphos	12,1	1,1	a

Generalisiertes Lineares Gemischtes Modell  
 Befall = Behandlung + Spalte : Wiederholung  
 Behandlung  $p=0,0431$   
 Spalte  $p=0,1311$

Gemischtes Lineares Modell  
 Nekrose = Behandlung + Spalte + Trieblänge: Wiederholung  
 Behandlung  $p=0,3579$   
 Spalte  $p=0,0526$   
 Trieblänge  $p=0,0122$

## Anhang

**Tabelle 7.7** Detailliertes statistisches Ergebnis des 4. Hagelversuches 28 Tage nach Inokulation.

**A** Durchschnittlicher Befall mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung

**B** Durchschnittliche Nekrosenlänge mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung und Signifikanzklassen (t-Test; Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0.05$ ))

<b>A</b>			<b>B</b>		
Behandlung	Befall [%]	Standardfehler	Behandlung	Ø Nekrose [cm]	Standardfehler
unbehandelt	22,3	14,5	unbehandelt	13,8	4,1
Strepto 4h	12,1	9,7	Strepto 4h	14,5	5,9
Strepto 8h	5,6	5,9	Strepto 8h	16,0	8,3
Strepto 12h	5,1	5,7	Strepto 12h	6,0	8,3
Strepto 24h	3,9	4,8	Strepto 24h	16,0	8,3
LMA 8h	22,0	15,7	LMA 8h	1,5	5,9
LMA 12h	0	0	LMA 12h	0	0
LMA 24h	9,5	9,8	LMA 24h	1,0	8,3
MNQ 4h	30,3	19,7	MNQ 4h	23,0	5,9

Generalisiertes Lineares Gemischtes Modell Befall = Behandlung + Spalte + Trieblänge : Wiederholung Behandlung $p=0,6514$ Spalte $p=0,7114$ Trieblänge $p=0,0179$	Gemischtes Lineares Modell Nekrose = Behandlung: Wiederholung Behandlung $p=0,3472$
--	---

## Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung

**Tabelle 7.8** Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2009.

**A** Anzahl der Versuche pro Variante, Blütenbefall und Wirkungsgrad mit Signifikanzklassen (t-Test, Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0.05$ )); **B** Statistisches Modell mit p-Werten

<b>A</b>				<b>B</b>
Behandlung	Anz. Vers.	Befall [%]	WG [%]	
unbehandelt	2	8,2	-	d
Streptomycin	2	0,6	93,3	a
Strategie 1	1	1,9	77,0	abc
Strategie 2	1	1,3	83,9	ab
<i>E. tasmaniensis</i>	1	4,9	40,8	bd
NPA 25	1	5,1	37,9	bd
Antifek	2	0,6	92,8	a
Abi 09	2	4,9	40,1	bd
LX4630	2	5,0	39,9	bd
LX4630+Additiv	1	3,9	52,7	bd
Serenade Max	1	6,7	18,1	cd

Gemischtes Lineares Modell Befall = Behandlung + Ort : Ort•Reihe + Ort•Spalte Behandlung: $p<.0001$ Ort: $p=0,3083$  Zur statistischen Auswertung wurden die Befallswerte arcsin-Wurzel-transformiert, für die Darstellung der Ergebnisse erfolgte eine Rücktransformation; die angegebenen Befallswerte entsprechen dem Median. Der Wirkungsgrad wurde nach Abbott berechnet.
---



**Tabelle 7.9** Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2010.

**A** Anzahl der Versuche pro Variante, Blütenbefall und Wirkungsgrad mit Signifikanzklassen (t-Test, Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0.05$ )); **B** Statistisches Modell mit p-Werten

<b>A</b>				<b>B</b>
Behandlung	Anz. Vers.	Befall [%]	WG [%]	Gemischtes lineares Modell
unbehandelt	2	3,8	-	d
Streptomycin	2	0,6	84,7	a
LMA	2	1,7	56,0	b
Antinfek	1	0,4	88,7	a
Strategie	1	1,7	56,0	abc
ALD 1901	1	2,7	29,5	bd
Serenade ASO	1	3,0	20,3	bd
<i>E. tasmaniensis</i> +NPA	1	3,6	6,3	cd
Akasoil	1	1,2	67,6	ab
Juglon	2	1,8	54,0	bc
DM 31 1%	1	2,3	39,4	bd
DM 31 0,6%	1	1,3	65,8	ab
DM 32 1%	1	2,6	31,9	bd

Zur statistischen Auswertung wurden die Befallswerte arcsin-Wurzel-transformiert, für die Darstellung der Ergebnisse erfolgte eine Rücktransformation; die angegebenen Befallswerte entsprechen dem Median. Der Wirkungsgrad wurde nach Abbott berechnet.

Befall = Behandlung + Ort : Ort•Reihe + Ort•Spalte  
 Behandlung:  $p=0,0002$   
 Ort:  $p= 0,9588$

**Tabelle 7.10** Ergebnisse der Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2011.

**A** Anzahl der Versuche pro Variante, Blütenbefall und Wirkungsgrad mit Signifikanzklassen (t-Test, Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0.05$ )); **B** Statistisches Modell mit p-Werten

<b>A</b>				<b>B</b>
Behandlung	Anz. Vers.	Befall [%]	WG [%]	Gemischtes lineares Modell
unbehandelt	2	8,5	-	g
Streptomycin	2	0,4	95,0	a
Plata 4+	1	4,4	48,6	deg
Blossom Protect	1	3,8	56,0	bce
Bloomtime FB	2	4,6	45,4	ef
Juglon	2	1,7	80,0	acd
LMA	1	1,2	85,6	ac
Chitoplant	1	4,1	52,1	cef
Akasoil	1	8,5	0,1	fg
AFB	2	4,7	44,7	ef
Strategie	1	1,0	88,3	ab
3DS	1	5,4	36,5	eg
Vitafos + Curamin	1	3,8	55,9	bcef

Zur statistischen Auswertung wurden die Befallswerte arcsin-Wurzel-transformiert, für die Darstellung der Ergebnisse erfolgte eine Rücktransformation; die angegebenen Befallswerte entsprechen dem Median. Der Wirkungsgrad wurde nach Abbott berechnet.

Befall = Behandlung + Ort + Distanz: Ort•Block + Ort•Block•Behandlung + Ort•Block•Distanz  
 Behandlung:  $p < 0,0001$   
 Ort:  $p= 0,1815$   
 Distanz:  $p < 0,0001$

## Anhang

**Tabelle 7.11** Vorkommen von *Erwinia amylovora* in den Blüten der unbehandelten Parzellen am Standort Vogt während des Wirkstoffversuchs 2011.

Übersicht der Einzelwerte je Parzelle mit Mittelwert und Standardfehler über den Versuchszeitraum (Zellzahl/Blüte).

	05.05.	07.05.	09.05.
<b>unbehandelt a</b>	5,28E+04	1,20E+06	1,44E+06
<b>unbehandelt b</b>	1,41E+06	5,47E+06	-
<b>unbehandelt c</b>	-	2,98E+06	8,51E+04
<b>unbehandelt d</b>	1,16E+05	-	3,22E+06
<b>Mittelwert</b>	5,27E+05	3,22E+06	1,58E+06
<b>Standardfehler</b>	4,43E+05	1,24E+06	9,07E+05

**Tabelle 7.12** Vorkommen von *Erwinia amylovora* in den Blüten ausgewählter Parzellen am Standort Mühlingen während des Wirkstoffversuchs 2011.

Übersicht der Einzelwerte je Versuchsvariante mit Mittelwert (MW) und Standardfehler (Stdfehler) über den Versuchszeitraum (Zellzahl/Blüte).

	29.04		02.05.		06.05.		10.05	
	MW	Stdfehler	MW	Stdfehler	MW	Stdfehler	MW	Stdfehler
<b>unbehandelt</b>	1,88E+05	1,59E+05	9,60E+04	6,35E+04	1,50E+03	1,17E+03	4,62E+05	2,18E+05
<b>Streptomycin</b>	3,58E+04	3,52E+04	7,89E+03	5,76E+03	4,05E+03	4,05E+03	1,45E+05	3,95E+04
<b>Planta 4+</b>	1,02E+04	5,76E+03	2,69E+04	1,66E+04	3,43E+04	3,38E+04	5,22E+05	4,77E+05
<b>Blossom Prot.</b>	8,82E+04	6,41E+04	1,19E+05	7,88E+04	3,17E+04	1,78E+04	1,56E+06	8,97E+05
<b>Bloomtime FB</b>	2,20E+04	2,10E+04	5,80E+04	3,62E+04	1,11E+04	9,62E+03	4,53E+05	3,70E+05
<b>Juglon</b>	1,24E+05	9,37E+04	1,03E+05	9,15E+04	1,26E+04	1,10E+04	9,17E+05	3,46E+05

## Sortentestung auf Feuerbrandanfälligkeit

**Tabelle 7.13** Logarithmische Regressionskurven für die Blütenbefallsentwicklung in der Klimakammer mit Bestimmtheitsmaß beim Sortenversuch.

Sorte	Regressionskurve	Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup>
<b>Diwa</b>	y=2,3 x ln(x)-0,9	0,96
<b>Gala</b>	y=2,5 x ln(x)-1,4	0,99
<b>Greenstar</b>	y=2,4 x ln(x)-1,9	0,96
<b>Kanzi</b>	y=1,7 x ln(x)+0,3	0,92
<b>Mairac</b>	y=2,0 x ln(x)-0,4	0,97
<b>Pinova</b>	y=2,3 x ln(x)-1,1	0,95
<b>Rewena</b>	y=1,9 x ln(x)-1,3	0,86
<b>Wellant</b>	y=2,8 x ln(x)-1,5	0,96
<b>Gesamt</b>	y=2,3 x ln(x)-1,0	0,97

**Tabelle 7.14** Feuerbandanfälligkeit verschiedener Sorten bei Hagelverletzung 14 Tage nach der Inokulation.**A** Durchschnittlicher Befall mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung**B** Durchschnittliche Nekrosenlänge mit Standardfehler und statistischem Modell mit Auswertung und Signifikanzklassen (t-Test; Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ))

A			B			
Sorte	Befall [%]	Standardfehler	Sorte	$\bar{x}$ Nekrose [cm]	Standardfehler	
Diwa	100,0	-	Diwa	10,2	1,1	ab
Gala	77,4	15,0	Gala	11,4	1,3	bc
Greenstar	100,0	-	Greenstar	8,0	1,1	ab
Kanzi	89,9	10,1	Kanzi	6,9	1,2	a
Mairac	56,2	18,2	Mairac	10,1	1,6	ac
Pinova	42,8	18,0	Pinova	7,4	1,8	ab
Rewena	67,7	16,9	Rewena	9,7	1,4	ab
Wellant	100,0	-	Wellant	13,9	1,1	c

Generalisiertes Lineares Gemischtes Modell  
Befall = Sorte : Wiederholung  
Sorte  $p=0,3416$

Gemischtes Lineares Modell  
Nekrose = Sorte + Wiederholung•Plot:  
Wiederholung  
Sorte  $p=0,0026$  ;Wiederholung•Plot  
 $p=0,0483$

## Versuche zur Pathogenese des Feuerbrands

**Tabelle 7.15** Logarithmische Regressionskurven für die Befallsentwicklung bei unterschiedlicher Inokulationskonzentration beim Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion.

Konzentrationsstufe der Inokulationssuspension [ZZ/ml]	Regressionskurve	Bestimmtheitsmaß $R^2$
$10^2$	$y=2,0 \times \ln(x)-0,8$	0,99
$10^3$	$y=1,6 \times \ln(x)+0,2$	0,99
$10^4$	$y=1,6 \times \ln(x)+0,6$	0,81
$10^5$	$y=1,2 \times \ln(x)+1,1$	0,78
$10^6$	$y=2,2 \times \ln(x)-0,1$	0,96
$10^7$	$y=2,3 \times \ln(x)-0,5$	0,90
$10^8$	$y=1,8 \times \ln(x)+0,4$	0,80
$10^9$	$y=2,1 \times \ln(x)+0,3$	0,83
Gesamt	$y=1,8 \times \ln(x)+0,2$	0,92

**Tabelle 7.16** Logarithmische Regressionskurven für die Blütenbefallsentwicklung bei unterschiedlicher Inokulationskonzentration beim Pathogeneseversuch zur Blüteninfektion.

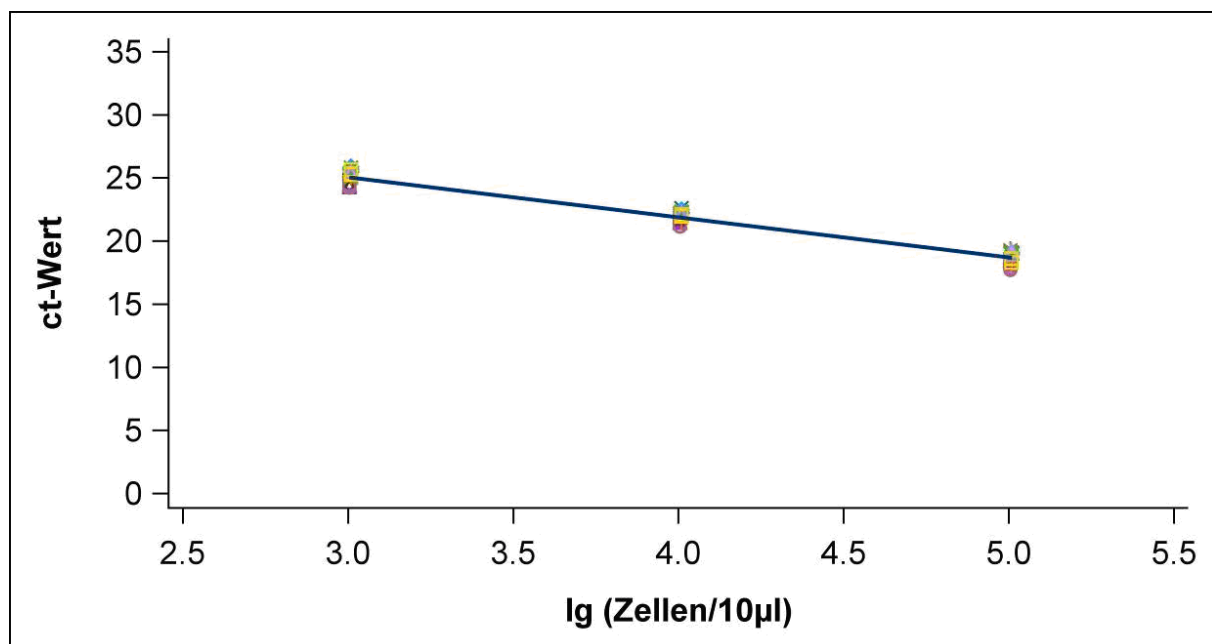
Anzahl inokulierter Blüten pro Blütenbüschel	Regressionskurve	Bestimmtheitsmaß $R^2$
eine Blüte	$y=0,1 \times \ln(x)+2,9$	0,63
alle Blüten	$y=0,1 \times \ln(x)+4,7$	0,64
Gesamt	$y=0,1 \times \ln(x)+3,8$	0,72

## Anhang

**Tabelle 7.17** Mittelwert und Standardfehler des Blütenbefalls in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Konzentrationen der Inokulationssuspensionen und Inokulationsmethode sowie Werte aus den Regressionsgeraden nach 14 Tage nach der Inokulation.

ZZ/ml	eine Blüte		alle Blüten		Gesamt		Werte aus Regressionsgeraden
	Mittelwert	Standardfehler	Mittelwert	Standardfehler	Mittelwert	Standardfehler	
10 <sup>2</sup>	3,5	0,4	5,1	0,4	4,3	0,3	4,5
10 <sup>3</sup>	3,6	0,4	4,9	0,3	4,3	0,3	4,4
10 <sup>4</sup>	4,5	0,4	5,7	0,3	5,1	0,3	4,8
10 <sup>5</sup>	3,4	0,4	5,9	0,5	4,7	0,4	4,2
10 <sup>6</sup>	5,0	0,4	6,9	0,3	6,0	0,3	5,7
10 <sup>7</sup>	4,5	0,4	6,5	0,3	5,5	0,3	5,6
10 <sup>8</sup>	4,6	0,4	6,1	0,4	5,4	0,3	5,2
10 <sup>9</sup>	5,7	0,4	6,5	0,4	6,1	0,3	5,8

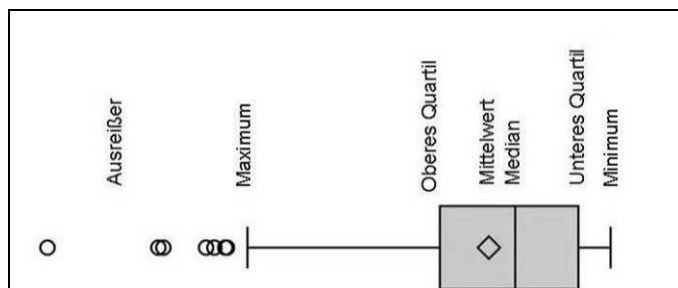
### 7.3 Standarddeichgerade für Real-Time PCR



**Abbildung 7.12** Standarddeichkurve aus 108 Standardproben von 17 analysierten Platten (Regressionsmodell  $p < 0,0001$ ).

$$ct = -3,18 \times (\text{Zellen}/10\mu\text{l}) + 34,61; \text{Zellen}/10\mu\text{l} = 10^{(-0,31 \times ct + 10,89)}$$

## 7.4 Anhang zur Statistik



**Abbildung 7.13** Beschreibung der Box-Whisker-Plots bzw. Kastengrafiken.

**Tabelle 7.18** Verwendete Modelle statistisch ausgewerteter Versuche (Darstellung nach Piepho (2003)).

Versuch	Modell
Hagel-/ Sorten Wirkstoff-Versuch- in der Klimakammer	Befall = Behandlung bzw. Sorte + Nekrosenlänge + Trieblänge + Anzahl verletzter/neuer Blätter + Triebabschluss + Spalte : Block + Zeile Nekrosenlänge = Behandlung bzw. Sorte + Trieblänge + Anzahl verletzter/neuer Blätter + Triebabschluss + Spalte : Block + Zeile
Freilandblütenversuche zur Wirkstofftestung 2009/2010 (2011)	Befall = Behandlung + Standort (+ Distanz) : Standort•Reihe + Standort•Reihe (Standort•Block + Standort•Block•Distanz)
Sortentest Blüten Klimakammer	Boniturwert = Sorte : Zeile + Spalte
Versuch zur Konzentration der Inokulationssuspension	Boniturwert = Inokulationssuspension + Inokulationsmethode : Zeile + Spalte

Mögliche und untersuchte Interaktionen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

## 7.5 Boniturskala für Blüteninfektionen

Beschreibung der 9-Punkte-Boniturskala mit Fotos nach Silvestri und Egger (2011).

### 1 = keine Infektion

Alle Blüten bzw. ganzer Büschel ohne optisch erkennbare Symptome (nicht verfärbt). Verfärbung und Verwelken entsprechen dem sortentypischen Abblühen.

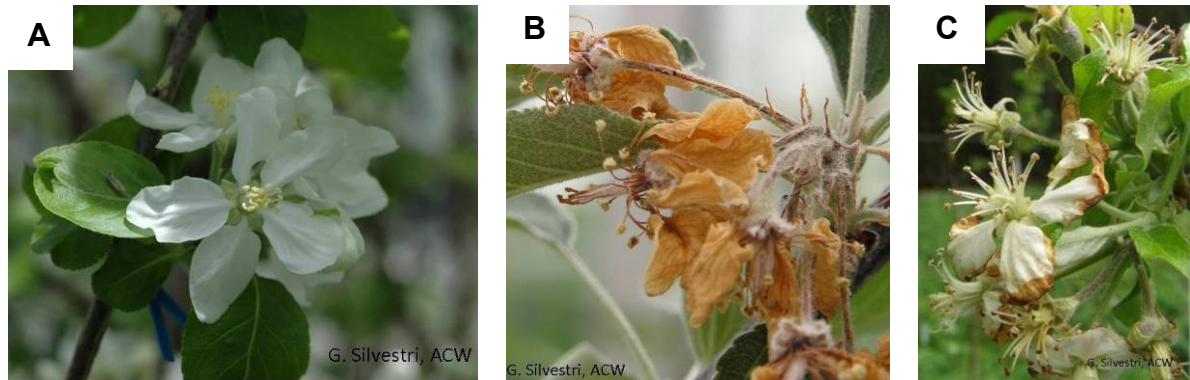


Abbildung 7.14 Blüten der Boniturstufe 1.

### 2 = unklare Symptome

Einzelblüte:

Blütenboden, -stiel und Kelchblätter grün.

Staub- und/oder Fruchtblätter braun-schwarz verfärbt. Symptome nicht eindeutig als Feuerbrand einzustufen.

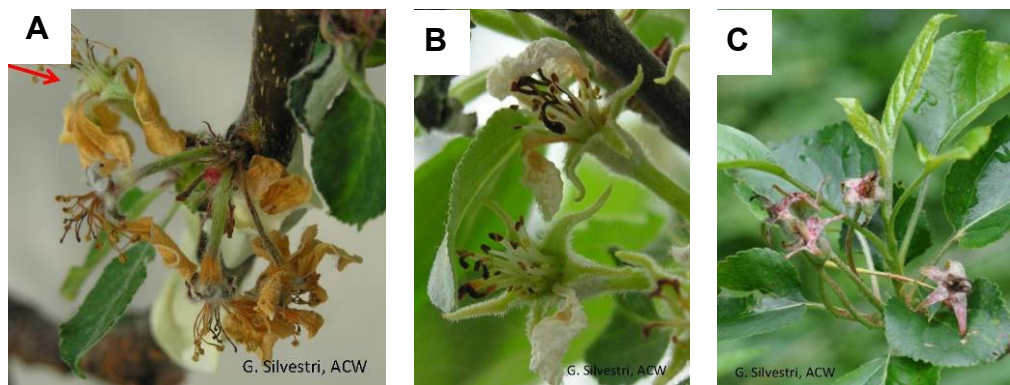


Abbildung 7.15 Blüten der Boniturstufe 2.

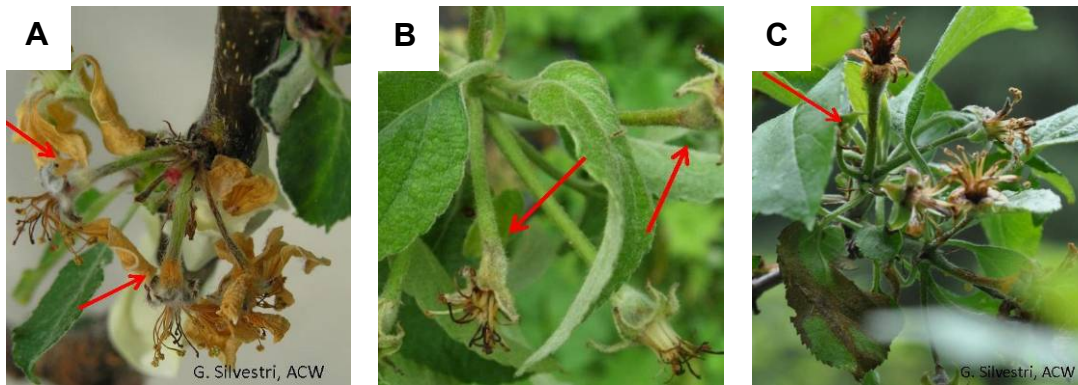
### 3 = Blüteninfektion

Einzelblüte:

Staub-, Fruchtblätter braun-schwarz verfärbt. Kelchblätter und/oder Blütenboden orange bis schwarz verfärbt. Stiel ohne Nekrose oder weniger als 1/3 nekrotisch verfärbt.

Büschel:

Mindestens eine Blüte gemäß Beschreibung oben. Höchstens eine Blüte mit Symptome der Boniturstufe 4 (oft Zentralblüte).



**Abbildung 7.16** Blüten der Boniturstufe 3.

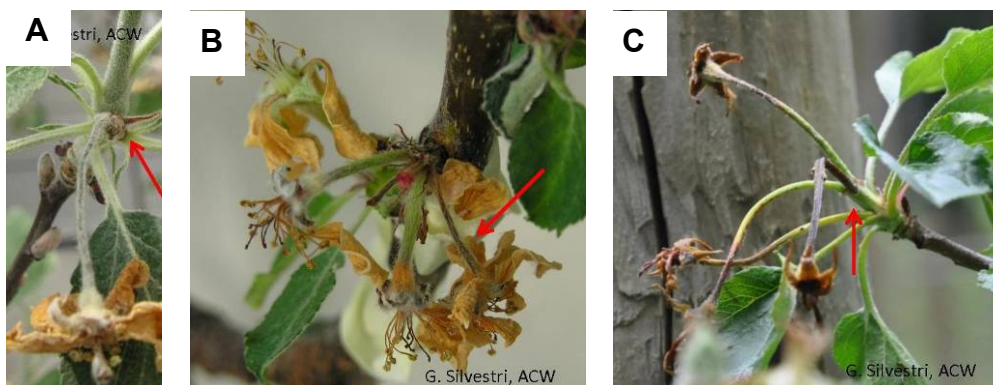
#### 4 = Blüteninfektion

Einzelblüte:

Blütenboden und -stiel orange bis schwarz verfärbt. Stiel ganz oder mindestens 1/3 nekrotisch verfärbt. Blütenstandstiel grün, klare Abtrennung.

Büschel:

Mehr als eine Blüte gemäß Beschreibung oben. Alle Blütenstiele schwarz, jedoch klare Abtrennung zum Blütenstandstiel.



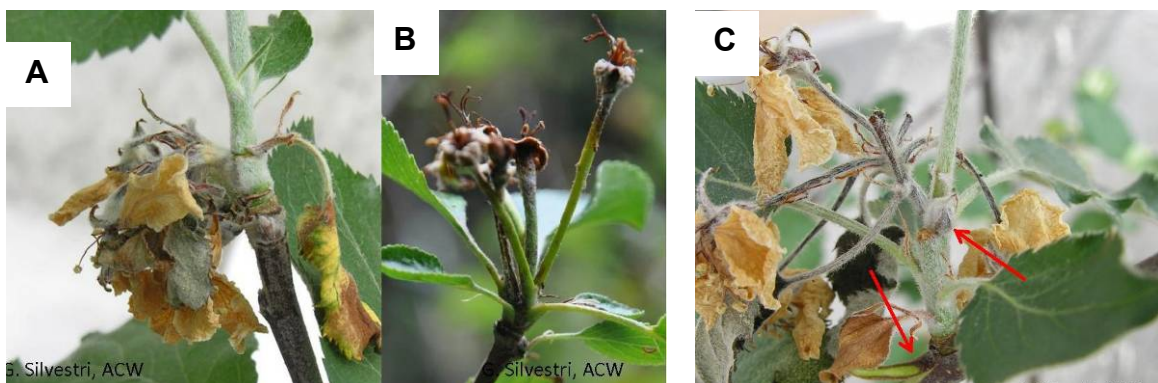
**Abbildung 7.17** Blüten der Boniturstufe 4.

#### 5 = Blütenbüschel und Blütenstandstiel

Blüten krank.

Nekrose nicht nur auf Blütenstiele beschränkt. Blütenstandstiele dunkel verfärbt, Blätter gesund.

Nekrose auf Blütenstandstiel beschränkt. Vorhandene Jungtriebe optisch gesund.



**Abbildung 7.18** Blüten der Boniturstufe 5.

## Anhang

### 6 = Blütenbüschel, Blütenstandstiel und Jungtrieb

Vorhandene Jungtriebe krank.

Sind keine Jungtriebe vorhanden, ganzer Büschel bis zum Holz krank (inkl. Blütenstandstiel und Blätter). Keine (deutliche) Nekrose im Holz sichtbar.

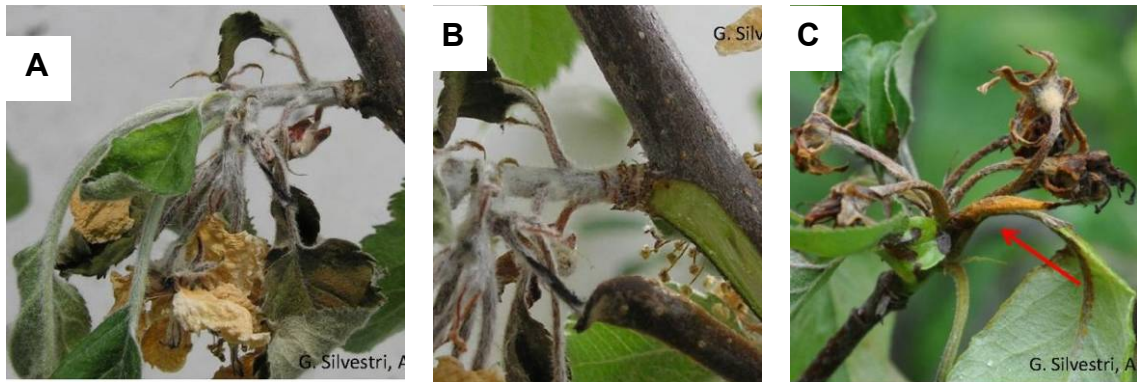


Abbildung 7.19 Blüten der Boniturstufe 6.

### 7 = Nekrose im Holz < 5 cm

Nekrose auch im Holz sichtbar (< 5 cm).

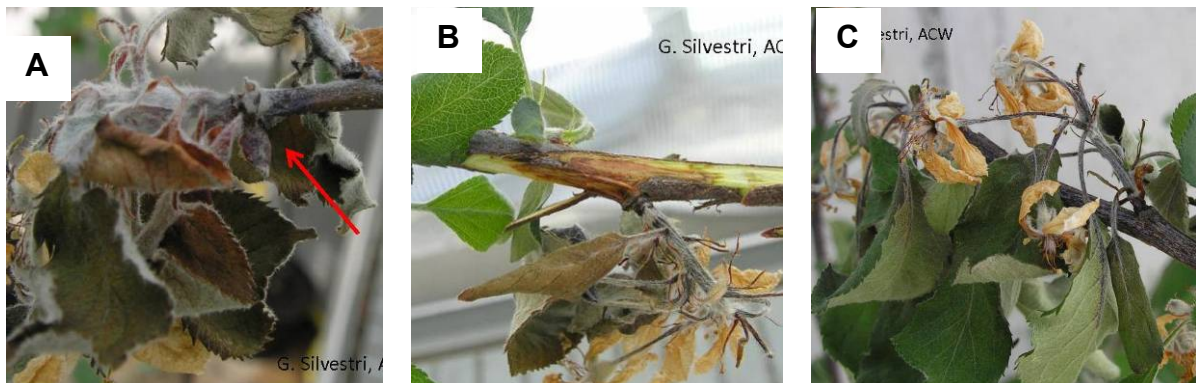


Abbildung 7.20 Blüten der Boniturstufe 7.

### 8 = Nekrose im Holz < 10 cm

Optischer Befall breitet sich im Baum weiter aus. Nekrose im Holz sichtbar < 10 cm).



Abbildung 7.21 Blüten der Boniturstufe 8.

### 9 = Nekrose im Holz > 10 cm

Nekrose im Holz sichtbar (> 10 cm).



## Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Vögele für die außergewöhnliche, vielseitige und engagierte Betreuung. Ohne Deinen Einsatz und Deine Leidenschaft für die Wissenschaft gäbe es dieses Werk nicht! Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Wünsche für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Kompetenzzentrums Obstbau Bodensee möchte ich mich bedanken. Für die Finanzierung und Bereitstellung der Stelle und die Betreuung der Arbeiten danke ich Herrn Geschäftsführer Dr. Büchele und dem Leiter des Arbeitsbereichs Pflanzenschutz Herrn Dr. Scheer. Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Arbeitsbereichs Pflanzenschutz: Daniel Hagl, Melanie Hagl, Dr. Martina Mayus, Benjamin Maack, Diana Isabel Neira León, Benjamin Pförtner, Martin Trautmann und Elke Weinmann. Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Phytomedizin für die Unterstützung im Labor und die anregenden Fachdiskussionen. Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit danke ich Michael Joos. Ein großes Dankeschön gilt Frau Dr. Hartung vom Fachgebiet Bioinformatik für die hervorragende und intensive Betreuung bei der statistischen Planung und Auswertung.

Für die Unterstützung bei Labor und Versuchsarbeit im Feld danke ich Malin Hinze, Dr. Stefan Kunz, Martina Matschinsky, Luise Olbrecht und Sonja Weißhaupt von der Universität Konstanz. Ich danke den Kollegen von der Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil für die fruchtbare Zusammenarbeit, besonders Gabriella Silvestri. Vom LTZ Augustenberg möchte ich Frau Dr. Moltmann für die versuchstechnische und wissenschaftliche Unterstützung und Helge de Boer für wettermesstechnischen Beistand danken.

Die Arbeit wurde gefördert durch das Interreg IV Projekt „Gemeinsam gegen Feuerbrand“ und das Ministerium für Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg. Ich danke allen Expertinnen und Experten des Interreg-Projekts.

Ich möchte mich bei allen Lehrenden in meiner Zeit an der Schule, der Universität und in der Praxis bedanken, die mit ihrem Engagement mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank geht an die Familie und Freunde:

Divinité des grandes âmes,  
Amitié, viens armer mon bras!  
Remplis mon cœur de tes célestes flammes,  
Je vais sauver Oreste ou courir au trépas.

Arie des Pylades in „Iphigenie en Tauride“, 3. Akt, 7. Szene von C. W. Gluck