



vorgelegt von

Mag. Thomas Rühmer

HYGIENICUM[®]

Institut für Mikrobiologie und Hygiene-Consulting, Graz

Projektleitung: Dr. Michael Stelzl

in Zusammenarbeit mit

**Österreichisches Forschungszentrum
Seibersdorf**

Graz, im Juli 2001

EINLEITUNG

Das erste Auftreten des Krankheitsbildes von *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, früher unter der Bezeichnung *Endothia parasitica* (Murr.) And. bekannt, wurde 1904 im Zoologischen Park von New York City beobachtet. Durch den Import asiatischer Edelkastanien, die gegen den Krankheitserreger resistent sind, wurde der Kastanienrindenkrebs vermutlich auf den amerikanischen Kontinent übertragen. Der pilzliche Krankheitserreger ist auf diesen in Japan und China heimischen Arten (*Castanea crenata*, *C. mollissima*) endemisch, ohne das Krankheitsbild auszulösen (vgl. Griffin, 1986). Das Krankheitsbild ist durch typische Merkmale charakterisiert. Zuerst beginnt das Rindengewebe rund um die Befallsstelle nekrotisch zu werden, d.h. es sinkt ein und wird aufgeweicht. Es zeigen sich auf der Befallsstelle deutlich orangepigmentierte Strukturen, die Konidienlager (Pyknidien) des Pilzes. Nach einiger Zeit hat der Pilz das Rindengewebe soweit zerstört und durchwachsen, dass die Versorgung des Baumes mit Wasser und Nährstoffen nicht mehr gewährleistet ist. Die Blätter in der Baumkrone beginnen zu welken. Charakteristisch für diese Krankheit ist, dass die Wurzeln des Baumes nicht angegriffen werden (vgl. Waindinger-Wilhelm, 1993).

Innerhalb von 40 Jahren breitete sich die Krankheit im gesamten östlichen Bereich der USA aus und drang durch Pflanzentransporte sogar in einige westliche Bundesstaaten vor. *Cryphonectria parasitica* hatte sich an allen natürlichen Standorten der in den USA heimischen Edelkastanienart *Castanea dentata* ausgebreitet und die in früheren Zeiten den Waldbestand dominierende Baumart völlig ausgerottet (vgl. Griffin, 1986). Welchen Stellenwert die Edelkastanie in den Vereinigten Staaten hat, wird klar, wenn man durch kleine Städte im Grenzgebiet zu Kanada fährt. Jede noch so kleine Stadt besitzt eine Straße mit der Bezeichnung „Chestnut street“.

In Europa wurde die Krankheit erstmals 1938 im Gebiet um Genua entdeckt. Innerhalb von 30 Jahren hatte sich die Krankheit bis nach Südtirol ausgebreitet. Weitere bisher bekannte betroffene europäische Staaten sind neben Italien die Schweiz, Deutschland, Frankreich, Spanien, Slowenien, Griechenland, Ungarn, die Türkei und Österreich (vgl. Griffin, 1986).

In Österreich entdeckte Prof. Donaubauer 1964 als erster den Erreger des Kastanienrindenkrebsses auf der mitteleuropäischen Edelkastanie (*Castanea sativa*). Aufgrund der natürlichen Standorte der Edelkastanie in Österreich sind vor allem die Bundesländer Steiermark und Burgenland vom Kastanienrindenkrebs betroffen.

Lange Zeit schien die Lage zur Behandlung von befallenen Bäumen hoffnungslos, es gab keine Gegenmaßnahmen, die erfolgreich eingesetzt werden konnten. Einige Forschungsergebnisse brachten durch Aufbringen von Erdkompressen an der Befallsstelle erste Erfolge. Diese Wirkung wird auf eine Antagonismuswirkung durch andere Mikroorganismen und deren Metaboliten zurückgeführt. Weitere Erfolge für die Entwicklung einer Behandlungsmethode gegen Kastanienrindenkrebs brachte eine Entdeckung des italienischen Forschers Biraghi. Er entdeckte 1953 erstmals Bäume, die trotz Befalls in der Lage waren, die Befallsstelle selbst auszuheilen, ohne einen dauerhaften Schaden davonzutragen (vgl. Griffin, 1986). Zuerst wurde vermutet, dass es sich dabei um resistente

Baumarten handle, später stellte sich jedoch heraus, dass dieses Erscheinungsbild vom Pilz selber ausgelöst wird. Das Phänomen bezeichnete Biraghi als „Hypovirulenz“, den schwächer virulenten Pilzstamm als „hypovirulenten“ Stamm.

Später wurde entdeckt, dass das Phänomen der Hypovirulenz durch Weitergabe eines virusähnlichen Genmaterials (Doppelstrang-RNA, dsRNA) auf virulente Pilzstämme übertragbar ist, und somit war der Weg für die Entwicklung einer Heilungsmethode mittels eines biologischen Prinzips geebnet.

Das Prinzip der übertragbaren Hypovirulenz kann genutzt werden, um Heilungsprozesse von Edelkastanien (*Castanea sativa*), die vom Rindenkrebs befallen sind, in Gang zu setzen. Der pilzliche Erreger der Krankheit (*Cryphonectria parasitica*) kommt in zwei unterschiedlichen Grundtypen vor. Der virulente Typus verursacht die deutlich sichtbaren Schäden, die zum Welken der Bäume und somit zum Absterben ganzer Waldflächen führen. Der hypovirulente Typus verursacht eine wesentlich schwächere Form der Krankheit. Er bildet kleinere Nekrosen, die der Baum durch Überwallung ausheilen kann. Die Befallsstelle wird überwuchert, wodurch die Leitbahnen für Wasser und Nährstoffe wieder vorhanden sind und der Baum die Krankheit überleben kann.

Die hypovirulenten Eigenschaften werden durch eine virusähnliche Doppelstrang-RNA (dsRNA) hervorgerufen (vgl. MacDonald & Fulbright, 1991). Da diese dsRNA über Hyphenanastomosen bzw. über die vegetativen Vermehrungseinheiten (Konidiosporen, Konidien) auch auf virulente Stämme übertragen werden kann und die virulenten Stämme dadurch die hypovirulenten Merkmale übernehmen können, spricht man von übertragbarer Hypovirulenz (vgl. Grente & Berthelay-Sauret, 1978). Die Übertragung von hypovirulenten Merkmalen auf einen virulenten Pilzstamm wird als Konversion bezeichnet.

Wichtig für einen erfolgreichen Einsatz dieses Prinzips im Rahmen des biologischen Pflanzenschutzes ist ein möglichst direkter Kontakt des schädlichen Pilzes mit dem hypovirulenten Stamm. Daher ist die Wahl der Methode, mit der der hypovirulente Pilzstamm am besten ausgebracht wird, von großer Bedeutung.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Ausbringung der Pilzhyphen oder der Konidien. Die wichtigste Frage dabei ist die Art der Formulierung, d.h. in welcher Form das biologische Agens leicht transportiert, aufbewahrt und ausgebracht werden kann (vgl. Lumsden et al., 1995; Steinke & Giles, 1995).

Eine der Möglichkeiten ist die Formulierung in Form einer Paste. Mycel und Konidien werden in eine klumpig-gelartige Matrix (Stärke etc.) eingebettet und können in Tuben oder Tiegeln aufbewahrt werden (vgl. Lewis & Papavizas, 1991).

Eine weitere Möglichkeit ist die Anzucht des Pilzes auf Kastanienholzspänen. Dabei stellt das Trägermaterial gleichzeitig einen Großteil der Bedingungen dar, die der Pilz auch im Baum vorfindet. Diese Formulierung kann auf die gleiche Art und Weise wie die Paste aufbewahrt und ausgebracht werden.

Der Vorteil solcher Formulierungen ist die einfache Handhabung im Freiland. Allerdings muss dabei gewährleistet sein, dass die Befallsstellen, die ausgeheilt werden sollen, gut erreichbar sind. Das setzt

voraus, dass der Baumbestand noch relativ jung und leicht zugänglich ist. Optimale Einsatzorte für diese Formulierungen dürften also landwirtschaftlich angelegte Edelkastanienkulturen sein. Flüssige Suspensionen sind das optimale Medium zur Ausbringung von Konidiosporen. Auch hier ist die Art der Ausbringung recht einfach, da großflächige Behandlungen durch Spritzen der Suspension möglich wären. Das Problem dieser Methode ist die relativ geringe Sporulationsrate hypovirulenter Pilzstämme.

Eine Steigerung der Konidienproduktion *in vitro* ist daher für die Herstellung dieser Formulierung notwendig. Einflüsse unterschiedlicher Parameter (physikochemische Parameter, Zusammensetzung des Nährmediums,...) auf die Sporenbildung von Pilzen werden in der Literatur häufig erwähnt (vgl. Knudsen et al., 1991; Kuhlman, 1983; Figl, 1991; Vézina et al., 1965; Elson et al., 1998; Evans & Black, 1981). Es zeigen bereits grundlegende Faktoren große Wirkung auf die Rate der Sporenbildung. Die Anzucht bei einer bestimmten Temperatur oder bei Sonnenlicht können die Bildung von Konidien deutlich erhöhen (vgl. Knudsen et al., 1991; Figl, 1991).

Außerdem ist die Applikationstechnik, d.h. wie die Formulierung auf die befallenen Stellen aufgebracht wird, für die praktische Anwendung von großer Bedeutung.

Steinke und Giles (1995) stellen in ihrer Arbeit über die Ausbringung von biologischem Material fest, dass es schwierig ist, ausreichend Material zum gewünschten Einsatzort zu bringen. Sinnvoll ist laut Steinke und Giles (1995) der Einsatz von biologischen Agenzien über bereits bestehende Pestizidausbringungsapparaturen.

Ein häufig auftretendes Problem bei der Ausbringung von biologischem Material ist, dass beispielsweise Scherkräfte, die in Pumpen, Filtrationselementen und anderen Teilen auftreten, lebende Organismen zerstören. Weiters kann bei der Ausbringung die extreme Änderung von Feuchtigkeit, Temperatur und anderen Umweltparametern zu einem „Schock“ führen, der das biologische Material beeinträchtigt (vgl. Steinke & Giles, 1995).

Lumsden et al. (1995) beschreiben, dass es bei solchen Prozessen unbedingter Vorsicht bei jedem einzelnen Schritt bedarf, um

- die Lebensfähigkeit des Inokulums während der Fermentation und Formulierung,
- die Einfachheit der Ausbringung,
- die Effizienz nach der Anwendung, sowie
- ein angemessenes Überleben während dem Transport und der Lagerung zu gewährleisten.

Nicht nur das Ausbringen von chemischen Agenzien in der Umwelt birgt Risiken, auch bei der Ausbringung von biologischem Material sollten einige mögliche Gefahren bedacht werden.

Nach Tiedje et al. (1989) werden sieben Kriterien von negativen Effekten auf die Umwelt bei der Ausbringung biologischer Agenzien unterschieden:

1. Schaffen neuartiger Krankheiten
2. Verstärkung der Effekte bereits bestehender Krankheiten

3. Gefährdung nicht betroffener Arten
4. Zerstörungswirkung auf lebende Gemeinschaften
5. nachteilige Effekte auf Ökosystem-Prozesse
6. unvollständiger Abbau gefährlicher Chemikalien
7. Verschwenden wertvoller biologischer Ressourcen

(vgl. Ehler, 1991)

Auch die unterschiedlichen Formen der Ausbringung und Formulierung können nachteilige Wirkungen nach sich ziehen. Trockenpulver oder Staub wird leicht durch Regen oder andere Witterungseinflüsse (z.B. Wind) an andere Stellen abtransportiert.

Flüssigkeiten gelangen relativ leicht auf Böden oder in Gewässer, wo mögliche negative Auswirkungen einsetzen können.

Einbettung in Pellets kann die Wirkung des biologischen Materials verzögern, da es einige Zeit dauert, bis die Wirkorganismen aus dem Pellet freigesetzt werden. Außerdem gelangen schwere Pellets leichter in Bodennähe, was für einige Anwendungen von Nachteil sein kann. (vgl. Moore, 1991)

Der Rindenkrebs der Edelkastanie hat auf dem nordamerikanischen Kontinent die Edelkastanienbestände stark dezimiert und teilweise vollständig vernichtet. In Europa setzt man die Hoffnung auf die Anwendung des Prinzips der Hypovirulenz zur Bekämpfung dieser Pilzkrankheit. Die Edelkastanie ist ein fester Bestandteil des süd- und mitteleuropäischen Waldbestandes und soll auf diesen Standorten erhalten bleiben. Die Möglichkeit der Bekämpfung des Rindenkrebses hat die Natur für sich selbst geschaffen, jetzt müssen wir nur noch lernen, dieses Prinzip für uns und für die bedrohten Bäume zu nutzen.

In den Versuchsreihen, die im Rahmen dieses Projektes durchgeführt wurden, soll eine praxisorientierte Anwendungsmethode zur Bekämpfung des Edelkastanienrindenkrebses entwickelt werden.

Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Entwicklung einer Formulierung, in der die hypovirulenten Pilzstämme längere Zeit überdauern können, ohne ihre hypovirulenten Merkmale zu verlieren.

Außerdem soll die entwickelte Formulierung in der Praxis optimal anwendbar sein.

Weiters wurde im Rahmen dieses Projektes die Applikation optimiert und ein Handbuch für den praktischen Anwender erarbeitet.

EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	7
<i>II.1. Verwendete Pilzstämme (Cryphonectria parasitica)</i>	7
<i>II.2. Stammhaltung der Cryphonectria parasitica-Stämme</i>	8
<i>II.3. Produktion der Formulierungen</i>	9
II.3.1. Pilzpastenformulierung	9
II.3.2. Formulierung auf Kastanienholz	9
II.3.3. Formulierung als Malzextrakt-Suspension	10
II.3.4. Pilzkleisterformulierung	10
<i>II.4. Laborversuche</i>	11
II.4.1. L ₁ : Wachstumstest auf PDA _{mb} -Platten	11
II.4.2. L ₂ : Bestimmung der Konversionskapazität	11
II.4.3. L ₃ : Einfluss von Temperatur und Licht auf die Konidienproduktion	12
II.4.4. L ₄ : Lagerungsversuche	12
II.4.5. Statistische Auswertungsmethode	13
II.4.6. L ₅ : Bestimmung nachweisbarer wachstumsfähiger Anteile (Hyphen und Konidien) in den entwickelten Formulierungen	13
II.4.7. L ₆ : Beeinflussung des Pilzwachstums durch den Einsatz verschiedener Wundverschlussmittel	14
<i>II.5. Freilandversuche</i>	15
II.5.1. F ₁ : Bestimmung der optimalen Ausbringungstechnik für entwickelte Formulierungen zur Behandlung bestehender virulenter Nekrosen	15
II.5.2. F ₂ : In vivo-Konversionsfähigkeit der hypovirulenten Pilzstämme in den entwickelten Formulierungen	18
II.5.3. F ₃ : Eignung des Einsatzes verschiedener Wundverschlussmittel im Freiland	19
II.5.4. F ₄ : Optimierung der Applikationstechnik und praxisnahe Anwendung in einer landwirtschaftlich genutzten Kastanienanlage	20
II.5.5. F ₅ : Impfung von Jungpflanzen in der Baumschule zur Sensibilisierung gegen virulente Stämme	21
III. ERGEBNISSE	22
<i>III.1. Laborversuche</i>	22
III.1.1. Kultureigenschaften der Stämme	22

III.1.2. Wachstumsfähigkeit der hypovirulenten Pilzstämmen in den entwickelten Formulierungen auf Nährbodenplatten (L ₁)	23
III.1.3. Konversionskapazität der hypovirulenten Pilzstämmen in den entwickelten Formulierungen (L ₂)	33
III.1.4. Bildung von Konidien in Pilzpastenformulierung bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (L ₃)	35
III.1.5. Bestimmung nachweisbarer wachstumsfähiger Pilzteile in den unterschiedlichen Formulierungen (L ₅)	36
III.1.6. Statistischer Vergleich der Ergebnisse für die entwickelten Formulierungen	39
III.1.7. Bestimmung der Lagerfähigkeit und Temperaturbeständigkeit der entwickelten Formulierungen (L ₄)	42
III.1.8. Statistischer Vergleich der Formulierungen hinsichtlich der Lagerfähigkeit	78
III.1.9. Bestimmung des Einflusses verschiedener Wundverschlussmittel auf das Pilzwachstum (L ₆)	82
<i>III.2. Freilandversuche</i>	<i>84</i>
III.2.1. Optimierung der Ausbringungstechnik zur Behandlung von bestehenden hypovirulenten Nekrosen mit den entwickelten Formulierungen (F ₁)	84
III.2.2. Konversionsfähigkeit der hypovirulenten Pilzstämmen in den entwickelten Formulierungen bei der praktischen Anwendung im Freiland (F ₂)	94
III.2.3. Bestimmung des Einflusses auf behandelte Nekrosen durch die Verwendung verschiedener Wundverschlussmittel (F ₃)	115
III.2.4. Optimierung der Applikationstechnik und praxisnahe Anwendung in einer künstlich angelegten Kastanienanlage (F ₄)	119
III.2.5. F ₅ : Impfung von Jungpflanzen in der Baumschule zur Sensibilisierung gegen virulente Stämme	121
DISKUSSION	123
LITERATUR	133

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Verwendete Pilzstämme (*Cryphonectria parasitica*)

Für die Versuche wurden 13 in vitro konvertierte hypovirulente *C. parasitica*-Stämme und sieben virulente heimische Stämme, die aus österreichischen Standorten isoliert wurden, verwendet. Drei davon wurden in der Steiermark gefunden und im Labor vom Österreichischen Forschungszentrum Seibersdorf konvertiert. Diese werden mit den Kürzeln II/3, II/4 und II/5 bezeichnet. Alle übrigen Stammbezeichnungen stehen für Pilze, die im Burgenland gefunden und in vitro konvertiert wurden. Die Bezeichnung der Pilzstämme besteht aus zwei Teilen. Die römische Ziffer bezeichnet die Zugehörigkeit zur vegetativen Kompatibilitätsgruppe (VC-Gruppe), die arabische Ziffer nummeriert die Isolate durch (siehe Tabelle 1). Beide Ziffern werden durch einen Schrägstrich getrennt. Alle Pilzstämme wurden vom Österreichischen Forschungszentrum Seibersdorf (ÖFZS) zur Verfügung gestellt, wo auch die Konversion der Stämme erfolgte.

Tabelle 1

Aufstellung der für die Versuche verwendeten Pilzstämme; grau unterlegte Felder sind hypovirulente in vitro-Konversionspartner, die nicht für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Nr.	EU-VC	VC	Bezeichnung	Typus	Komp.	Konv.	Fundort
I/1	EU17	I	Tr x S-3	ko hv	I	I	in vitro konv. I/8
I/2			Tr X R-6	ko hv	I	I	in vitro konv. I/8
I/3			Tr x IHB	ko hv	I	I	in vitro konv. I/8
I/4			Tr x Euro7	ko hv	I	I	in vitro konv. I/8
I/5			Tr x R-5	ko hv	I	I	in vitro konv. I/8
I/6			AW30 x Euro7	ko hv	I	I	in vitro konv. I/9
I/7			AW30 x Tr5abw	ko hv	I	I	in vitro konv. I/9
I/8			Tr	v	I	-	Forchtenstein (Bgl.)/Trimmel
I/9			AW30	v	I	-	Forchtenstein (Bgl.)/Antoniweg
		I	Tr5abw	hv	I	I	Forchtenstein (Bgl.)/Trimmel

Nr.	EU-VC	VC	Bezeichnung	Typus	Komp.	Konv.	Fundort
II/1	EU13	II	Stau1 x M773	ko hv	II	II	in vitro konv. II/6
II/2			Stau1 x C2	ko hv	II	II	in vitro konv. II/6
II/3			Mimü6 x M773	ko hv	II	II	in vitro konv. II/8
II/4			Mimü1 x C2	ko hv	II	II	in vitro konv. II/7
II/5			Arn7 x M773	ko hv	II	II	in vitro konv. II/9
II/6			Stau1	v	II	-	Burgenland
II/7			Mimü1	v	II	-	Stmk./ Gärtnerei Mittermüller
II/8			Mimü6	v	II	-	Stmk./ Gärtnerei Mittermüller
II/9			Arn7	v	II	-	Stmk./Arnfels
III/1	EU12	III	Ehe7 x IHB	ko hv	III	III	in vitro konv. III/2
III/2			Ehe7	v	III	-	Heiligenkreuz/ Gärtnerei Egger

IHB	hv	I	I,III	Ungarn
Euro7	hv		I	Italien
R-5	hv		I	Ungarn
R-6	hv		I	Ungarn
S-3	hv		I	Ungarn
M773	hv	II	II	Schweiz
C2	hv	II	II	Ungarn

Legende:	Komp.	...	kompatibel zu VC-Gruppe
	Konv.	...	Konversionsfähigkeit für VC-Gruppe
	Typus:		
	v	...	virulent
	hv	...	hypovirulent
	ko hv	...	konvertiert hypovirulent

II.2. Stammhaltung der *Cryphonectria parasitica*-Stämme

Die Pilzstämme werden auf PDA_{mb}-Platten (39 g/l potato-dextrose-Agar; 0,2 mg/l Biotin; 0,1 g/l Methionin; 1000 ml A.dest.; pH=5,8) angezüchtet. Ein ca. 0,5 x 0,5 cm großes mycelbewachsenes Agarstück wird mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in die Mitte einer PDA_{mb}-Platte gelegt. Die Platten werden bei 22,5°C im Dunkeln inkubiert.

Die Überimpfung der Pilzstämmen auf einen frischen Nährboden erfolgt alle sieben Tage, längstens jedoch alle 14 Tage.

Für die Dauerkulturen wird ein 0,5 x 0,5 cm großes mycelbewachsenes Agarstück auf einen PDA_{mb}-Schrägagar gegeben. Die Schrägagarröhrchen werden ca. fünf bis sieben Tage bei 22,5°C im Dunkeln inkubiert, danach mit Parafilm verschlossen und können so etwa sechs Monate im Kühlschrank gelagert werden.

II.3. Produktion der Formulierungen

II.3.1. Pilzpastenformulierung

Von den PDA_{mb}-Platten (siehe Kap. II.2.) wird ein ca. 0,5 x 0,5 cm großes mycelbewachsenes Stück mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in die Mitte einer Malzextrakt-Agar überimpft (30 g/l Malzextrakt, 10 g/l Agar-Agar, 1000 ml A.dest., pH=6,1). Die Platten werden sieben bis acht Tage bei 22,5°C im Dunkeln inkubiert.

Die vollständig bewachsenen Platten werden in acht Teile zerschnitten und in einem sterilen Stomacher-Beutel (= Kunststoffbeutel zur Homogenisierung von Lebensmittelproben) mit 60 ml sterilem A.dest. gut vermischt. Die dabei entstehende Brühe wird mit ca. 250 ml autoklavierter Maisstärke (Maizena) vermengt und händisch zu einer klumpigen Paste vermischt. Die Beutel werden verschlossen und im Dunkeln gelagert.

II.3.2. Formulierung auf Kastanienholz

Kastanienholz wird mit der Motorsäge zerschnitten. Die dabei entstehenden Späne werden für die Herstellung der Formulierung verwendet.

Die Späne werden im Autoklaven bei 125°C und 1,5 bar sterilisiert und dann zu ca. 200 ml in sterile Stomacher-Beutel gefüllt und mit 50 ml sterilem A.dest. vermischt.

Von den PDA_{mb}-Platten (siehe Kap. II.2.) wird ein ca. 1 x 1 cm großes mycelbewachsenes Stück herausgeschnitten und mit den feuchten Holzspänen gut vermischt. Die Beutel werden verschlossen und bei 22,5°C im Dunkeln inkubiert.

Nach sieben Tagen erfolgt eine weitere Beimpfung mit einem 1 x 1 cm großen Agarstück und eine Bebrütung bei 22,5°C im Dunkeln.

II.3.3. Formulierung als Malzextrakt-Suspension

Ein 0,5 x 0,5 cm großes mycelbewachsenes Agarstück wird mit einem sterilen Skalpell aus den PDA_{mb}-Platten (siehe Kap. II.2.) ausgeschnitten und in 250 ml Malzextrakt-Bouillon (17 g/l

Malzextrakt; 1000 ml A.dest.; pH=5,96) in sterile Zellkulturflaschen (Fa. Greiner) gegeben. Die Nährlösung wird drei Tage bei 22,5°C im Dunkeln inkubiert.

Danach wird die Suspension gut geschüttelt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der gebildeten Hyphen in der gesamten Nährlösung zu gewährleisten. Nach weiteren vier Tagen Inkubationszeit wird die Suspension neuerlich geschüttelt und bei Tageslicht und Raumtemperatur drei Tage weiterbebrütet.

II.3.4. Pilzkleisterformulierung

Von den PDA_{mb}-Platten (siehe Kap. II.2.) wird ein ca. 0,5 x 0,5 cm großes mycelbewachsenes Stück mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und auf Malzextrakt-Agar überimpft (siehe Kap. II.3.1.). Die Platten werden sieben bis acht Tage bei 22,5°C im Dunkeln inkubiert.

Die vollständig bewachsenen Platten werden in acht Teile zerschnitten und in einem sterilen Stomacher-Beutel mit 100 ml autoklaviertem (121°C, 15 min) Maiskeimöl gut vermischt. Die dabei entstehende Brühe wird mit ca. 250 ml autoklavierter Maisstärke (Maizena) vermengt und händisch zu einer klumpigen Paste vermischt. Um eine schmierige Konsistenz der Formulierung zu erzeugen, werden je nach Bedarf noch weitere 10 - 15 ml autoklaviertes Maiskeimöl zugegeben. Die Beutel werden verschlossen und im Dunkeln gelagert.

II.4. Laborversuche

II.4.1. L₁: Wachstumstest auf PDA_{mb}-Platten

Die jeweilige Formulierung wird in die Mitte einer PDA_{mb}-Agarplatte gelegt (siehe Kap. II.2.). Dabei wird darauf geachtet, dass ein möglichst kleines Stück der Formulierung (bei der Suspensionsformulierung ein Tropfen zu je ca. 50 µl) für den Test verwendet wird, um festzustellen, ob auch noch in der kleinsten Menge wachstumsfähige Hyphen oder Konidien vorhanden sind. Die Untersuchung wird in vier parallelen Ansätzen durchgeführt.

Die Platten werden bei 22,5°C im Dunkeln über einen Zeitraum von mehreren Tagen inkubiert und täglich ausgewertet. Bei der Auswertung werden der Durchmesser der Kolonie, die Pyknidienbildung sowie die Kulturmerkmale der einzelnen Stämme in der entsprechenden Formulierung untersucht.

II.4.2. L₂: Bestimmung der Konversionskapazität

Petrischalen mit PDA_{mb}-Agar mit pH-Indikator (PDA_{mb}-Agar - siehe Kap. II.2. + 50 mg/l Bromkresolgrün; nach Powell, 1995) werden auf einer Hälfte am Rand der Petrischale mit der jeweiligen Formulierung des hypovirulenten Stammes belegt. Auf den Rand der anderen Hälfte der PDA_{mb}-Platten (siehe Kap. II.2.) wird ein mycelbewachsenes Agarstück mit dem virulenten Konversionspartner gelegt. Die Untersuchung wird in drei parallelen Ansätzen durchgeführt. Die Platten werden bei 22,5°C im Dunkeln inkubiert und täglich ausgewertet. Bei der Auswertung wird die erfolgte oder nicht erfolgte Konversion des virulenten Stammes untersucht. Der Erfolg der Konversion wird beurteilt aufgrund der Bildung einer Barrage-Zone, aufgrund von auffälligen Änderungen in der Pyknidienbildung bzw. der Übereinstimmung bestimmter Kulturmerkmale mit dem hypovirulenten Konvertanten.

II.4.3. L₃: Einfluss von Temperatur und Licht auf die Konidienproduktion

Da sich aufgrund des Ansatzes zum Lagerungsversuch (L₄, siehe Kap. II.4.4.) gleichzeitig der Einfluss der Temperatur auf die Produktion von Konidiosporen untersucht werden kann, wurde dies durchgeführt, um die Ergebnisse aus der Literatur bestätigen zu können (vgl. z.B. Knudsen et al., 1991).

Teile der Formulierung als Paste werden in sterile Petrischalen gegeben, die mit Parafilm verschlossen werden. Die Behälter werden bei unterschiedlichen Temperaturen (-20°C, +4°C, Raumtemperatur) aufbewahrt, um den Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Pyknidien untersuchen zu können.

Außerdem wird ein Stamm (I/1) in dieser Formulierung mit einer dem Tageslicht zugewandten Seite aufbewahrt, um beurteilen zu können, ob Licht einen Einfluss auf die Bildung von Pyknidien hat.

Nach ca. 3 Wochen werden die Formulierungen auf die Ausprägung der (aufgrund der weissen Pastenmatrix deutlich sichtbaren) orangegefärbten Pyknidien untersucht.

II.4.4. L₄: Lagerungsversuche

Teile der jeweiligen Formulierung werden in sterilen Petrischalen bei unterschiedlichen Temperaturen im Dunkeln aufbewahrt, um die Lagerfähigkeit untersuchen zu können. Dabei werden folgende Temperaturen untersucht:

Raumtemperatur (ca. 22°C), Kühlschrank (+4°C), Gefrierschrank (-20°C).

Die gelagerten Formulierungen werden halbjährlich auf ihre Wachstumsfähigkeit auf PDA_{mb}-Platten mit der Methode wie in Kap. II.4.1. beschrieben untersucht.

II.4.5. Statistische Auswertungsmethode

Die statistische Auswertung der Daten wird mittels Computerprogramm SPSS, Version 7.0 durchgeführt.

Folgende Daten, die nach verschieden langer Lagerzeit bestimmt wurden, werden dabei einer statistischen Überprüfung unterzogen:

Wachstumsfähigkeit der Pilzstämmen in den jeweiligen Formulierungen unmittelbar nach der Herstellung bei siebentägiger Bebrütung bei 22,5°C im Dunkeln (siehe Kap. III.1.2.),

Anteil an nachweisbarem wachstumsfähigem Material in den jeweiligen Formulierungen (siehe Kap. III.1.5.), sowie die Wachstumsfähigkeit der Pilze nach sechs und 12 Monaten Lagerzeit bei oben angeführten Temperaturen in den jeweiligen Formulierungen (siehe Kap. III.1.7.)

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede werden einfaktorielle, univariate Varianzanalysen durchgeführt. Die Post hoc - Tests von Scheffé werden durchgeführt, um die Signifikanz einzelner Unterschiede genau bestimmen zu können. Die Signifikanzniveaus werden folgendermaßen festgesetzt:

p < 0.01	...	hoch signifikant
p < 0.05	...	signifikant

II.4.6. L₅: Bestimmung nachweisbarer wachstumsfähiger Anteile (Hyphen und Konidien) in den entwickelten Formulierungen

Es werden 25 g der jeweiligen Formulierung in sterile Stomacher-Kunststoff-Beutel eingewogen und mit 225 ml autoklaviertem gepufferten Peptonwasser (pH=7,2) im Homogenisator „Stomacher 400“ (Seward) eine Minute bei 230 Schlägen/min gut vermischt. Von dieser Suspension ausgehend wird eine Verdünnungsreihe in 10er-Schritten mit 0,9% NaCl-Lösung hergestellt. Die Verdünnungsreihe wird folgendermaßen hergestellt: 1:10, 1:100 und 1:1000.

Von der Ausgangssuspension und von jeder Verdünnung werden 0,1 ml entnommen und mit einem sterilen, abgeflamten Drigalski-Spatel auf PDA_{mb}-Platten (siehe Kap. II.2.) verteilt. Die Platten werden bei 25°C im Dunkeln bebrütet. Nach fünf Tagen werden die Kolonien ausgezählt. Aufgrund der koloniebildenden Einheiten können die nachweisbaren wachstumsfähigen Anteile pro Gramm Formulierung berechnet und dadurch direkt miteinander verglichen werden.

II.4.7. L₆: Beeinflussung des Pilzwachstums durch den Einsatz verschiedener Wundverschlussmittel

Ein ca. 0,5 x 0,5 cm großes mycelbewachsenes Agarstück von den Original-PDA_{mb}-Platten wird mit einem abgeflamten Skalpell ausgeschnitten und auf eine PDA_{mb}-Platte (PDA_{mb}-Agar - siehe Kap. II.2.) gelegt.

Mit einer sterilen Impföse werden ca. 2 cm entfernt vom Agarstück mit den Wundverschlussmitteln, die ausgetestet werden sollen, fünf Striche in Form eines Fünfecks aufgetragen (siehe Abb. 1). Es werden jeweils zwei Parallelansätze untersucht.

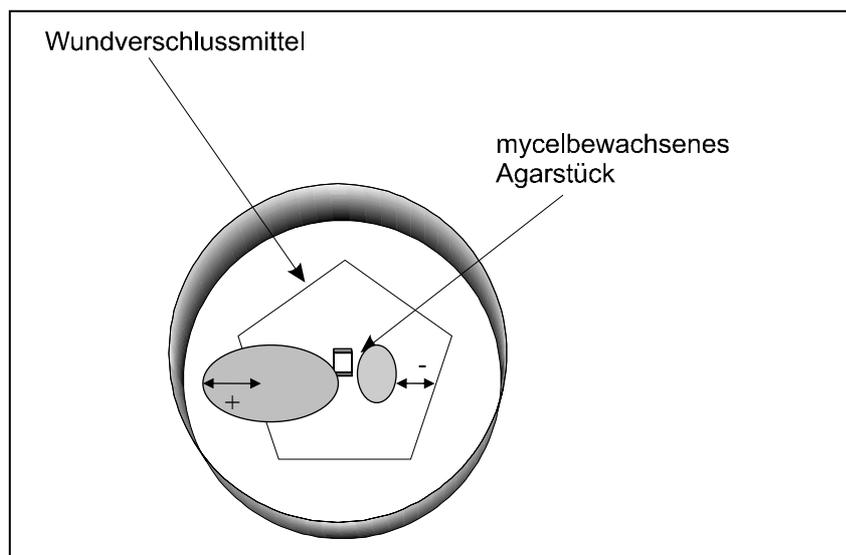


Abb. 1: Ansatz des Laborversuches zur Auswertung der Beeinflussung des Pilzwachstums durch den Einsatz von verschiedenen Wundverschlussmitteln; Ein Überwachsen des Verschlussmittels durch den Pilz wird als positiver Wert (links), ein Hinwachsen des Pilzes bis zum Verschlussmittel als negativer Wert (rechts) bestimmt.

Folgende Mittel werden untersucht:

- **Santar® SM** Wundverschlusspaste für Holzgewächse auf
Diflolan-Basis
Sandoz AG, CH-4002 Basel
- **Lac® Balsam** Künstliche Rinde
Scheidler GmbH & Co KG, D-32425 Minden
- **Kambisan** Flüssigrinde, Pfl. Reg. Nr. 728
Avenarius-Agro GmbH, A-4600 Wels
- **Baumwachs** Amtl. Pfl. Reg. Nr. 122
Avenarius-Agro GmbH, A-4600 Wels

Die Platten werden bei 22,5°C im Dunkeln bebrütet. Nach sieben Tagen wird das Wachstum der Pilzstämmen beobachtet und die Entfernung des Mycel vom Wundverschlussmittel gemessen. Dabei wird ein Überwachsen des Mittels durch den Pilz als positiver Wert, ein Wachstum bis hin zum Mittel als negativer Wert bestimmt (siehe Abb. 1).

II.5. Freilandversuche

II.5.1. F₁: Bestimmung der optimalen Ausbringungstechnik für entwickelte Formulierungen zur Behandlung bestehender virulenter Nekrosen

Auf einer Waldfläche in der Südsteiermark (Kärnerberg, Südsteirische Weinstraße zwischen Gamlitz und Leutschach) werden Edelkastanientriebe ausgewählt, die in etwa vier bis 20 Jahre alt sind und deutlich orange-dunkle Nekrosen in Augenhöhe aufweisen, aber noch gesunde Blattentwicklung in der Baumkrone zeigen.

Die behandelten Nekrosen weisen eine Fläche zwischen 50 und 350 cm² auf.

Die Bäume werden markiert und im Protokoll vermerkt. Insgesamt werden neun Bäume ausgewählt, um für drei Formulierungen (Paste, Kastanienholzspäne und Malzextrakt suspension) je drei parallele Behandlungsansätze durchführen zu können.

Als hypovirulenter Stamm wird der Stamm II/5 gewählt, da sein virulenter Konversionspartner (II/9) ein steirischer Typus aus der Region um Arnfels ist.

Dadurch wird vermieden, dass eine neue VC-Gruppe (**vegetative compatibility**, vegetative Kompatibilität) ins Freiland eingebracht wird, wodurch eine Vermehrung untereinander inkompatibler Stämme nicht auszuschließen ist.

Ober- und unterhalb der Nekrose werden jeweils drei Löcher mit einem Akkubohrer gebohrt (Durchmesser = 8 mm). In die Löcher wird die jeweilige Formulierung gegeben und die behandelte Stelle wird mit einem Abdeckband verschlossen (siehe Abb. 2 c, 3 b, 4 b). Dadurch wird eine

Auswaschung der hypovirulenten Stämme sowie eine Neuinfektion über die entstandene Wunde verhindert. Zwei Wochen nach der Ausbringung wird das Abdeckband wieder entfernt. Die Entwicklung der behandelten Nekrosen wird regelmäßig beobachtet und fotografisch dokumentiert.

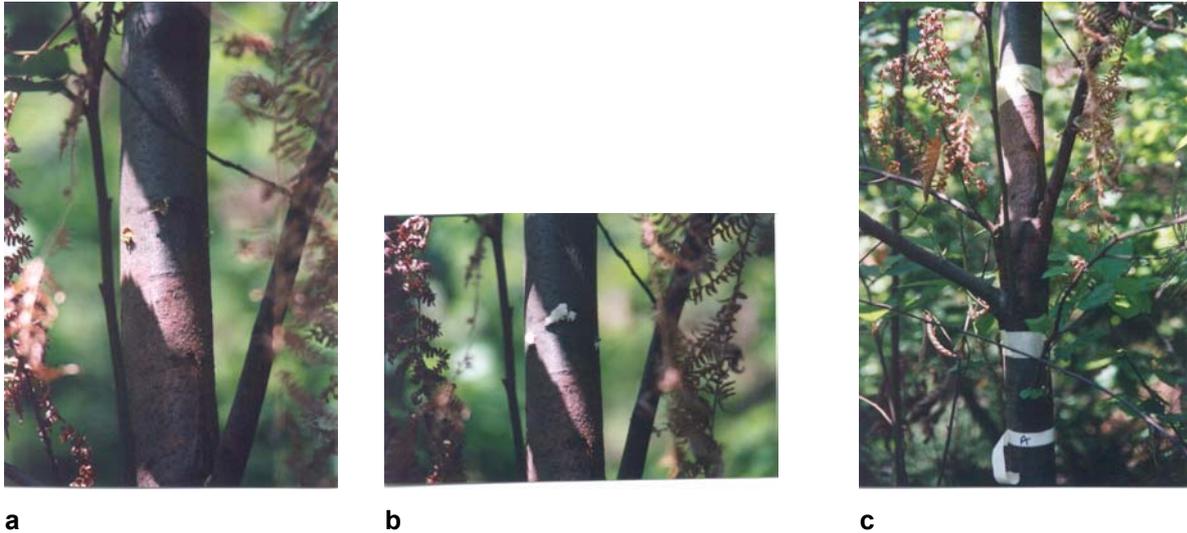


Abb. 2: Behandlung einer Nekrose (Baum A) mit Pilzpastenformulierung. Zuerst werden ober- und unterhalb der Nekrose jeweils drei Löcher mit einem Akkubohrer gebohrt (Bild a), danach die Löcher mit Pilzpaste befüllt (Bild b) und mit Abdeckband verschlossen (Bild c).



Abb. 3: Behandlung einer Nekrose (Baum C) mit der Formulierung auf Kastanienholzspänen. Die Löcher werden mit der Formulierung befüllt (Bild a) und mit Abdeckband verschlossen (Bild b).

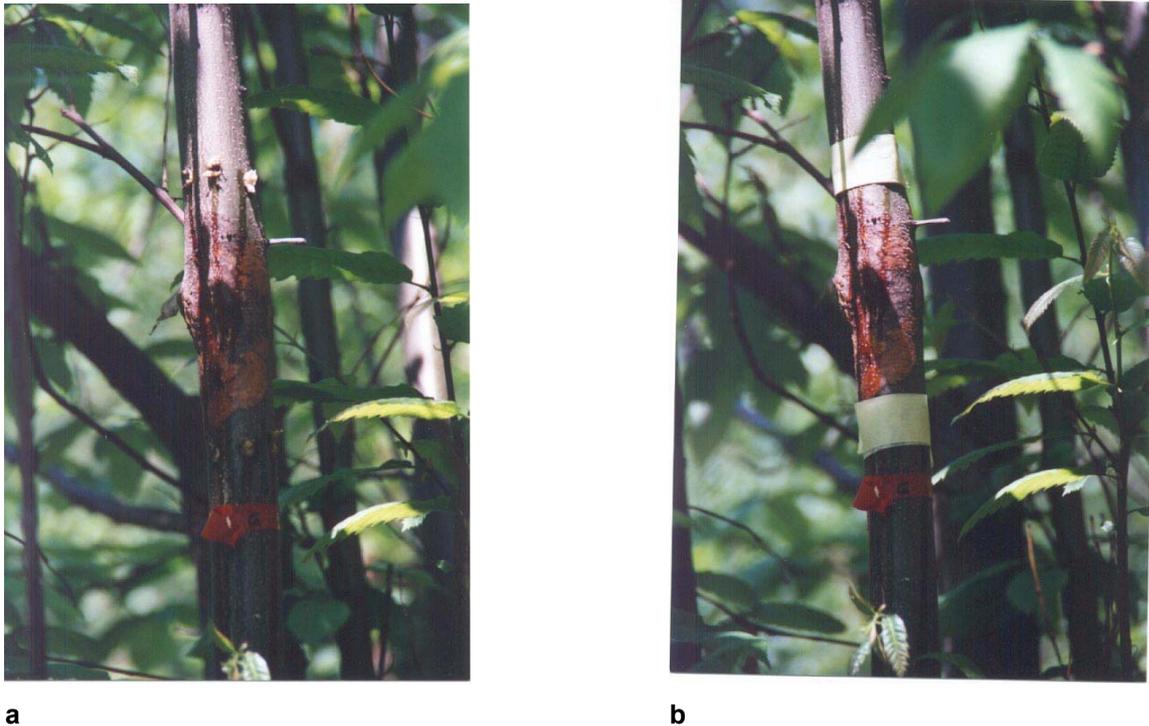


Abb. 4: Behandlung einer Nekrose (Baum G) mit der Malzextraktsuspension. Die Löcher werden mit der Suspension bestückt (Bild a) und mit Abdeckband verschlossen (Bild b).

II.5.2. F₂: In vivo-Konversionsfähigkeit der hypovirulenten Pilzstämmen in den entwickelten Formulierungen

Für diese Versuchsreihe werden wiederum im oben genannten Waldbestand (siehe Kap. II.5.1) 12 Edelkastanien ausgewählt, die in etwa drei bis fünf Jahre alt sind und keine Anzeichen eines Befalls durch *Cryphonectria parasitica* aufweisen. Die Bäume werden mit steirischen virulenten Stämmen (II/7, II/8, II/9) künstlich infiziert, wobei jeweils vier mit demselben virulenten Stamm infiziert werden. Dazu werden Äste ausgewählt, die einen Durchmesser von 2,2 bis 3,7 cm haben. Pro Ast werden untereinander mit einem Akkubohrer drei Löcher in einem Abstand von etwa 25 cm gebohrt und mit einem mycelbewachsenen Agarstück von den PDA_{mb}-Platten bestückt. Die künstlich infizierte Stelle wird mit einem Abdeckband verschlossen.

Nach 16 Tagen waren deutliche ovale, dunkle Nekrosen mit einem Durchmesser von etwa 100 cm² feststellbar. Die drei Nekrosen pro Ast werden von oben nach unten von 1 bis 3 durchnummeriert. Nekrose 1 wird mit Pilzpastenformulierung, Nekrose 2 mit Kastanienholzspänen und Nekrose 3 mit Malzextraktsuspension behandelt. Dabei wird die Behandlung der virulenten Pilzstämmen (II/7, II/8 bzw. II/9) mit dem entsprechenden hypovirulenten Konversionspartner (II/4, II/3 bzw. II/5) durchgeführt (siehe Tabelle 1).

In dieser Versuchsreihe wurde weiters die Kleisterformulierung eingesetzt. Die Behandlung der künstlich angelegten virulenten Nekrosen erfolgte durch Ausbringen der jeweiligen hypovirulenten Konversionspartner folgendermaßen:

1 ... Kleisterformulierung

- 2 ... Kleisterformulierung
3 ... unbehandelte Kontrolle

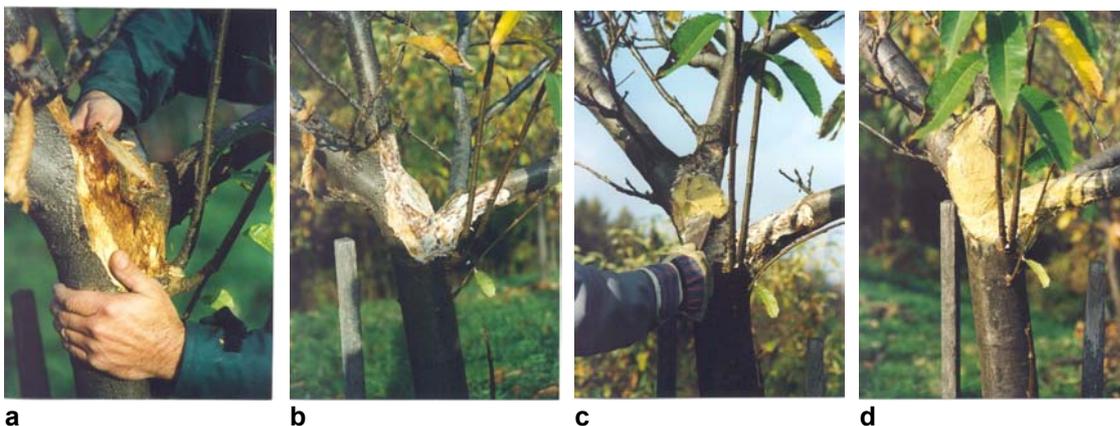
Die behandelten Stellen werden mit einem Abdeckband verschlossen. Nach ca. zwei Wochen wird das Abdeckband wieder entfernt. Die Versuchsreihe wird regelmäßig beobachtet und fotografisch dokumentiert.

II.5.3. F₃: Eignung des Einsatzes verschiedener Wundverschlussmittel im Freiland



Abb. 5: Die Versuchsfäche beim Landesgut Remschnigg in der Südsteiermark.

Auf der Fläche des Landesgutes Remschnigg (in der Nähe von Arnfels, Südsteiermark, siehe Abb. 5) werden befallene Kastanienbäume (10 bis 12 Jahre alt) behandelt. Die Befallsstellen werden ausgeschnitten, mit Kleisterformulierung des steirischen konvertierten hypovirulenten Stammes II/5 behandelt und anschließend mit vier verschiedenen Wundverschlussmitteln verschlossen (siehe Abb. 6 a-d).



- Abb. 6:
- a) Ausschneiden der Nekrose (Nekrosenfläche ca. 400 cm²)
 - b) Einstreichen mit Kleisterformulierung (hypovirulenter Pilzstamm II/5)
 - c) Aufbringen des Wundverschlussmittels (Baumwachs) mit einer Spachtel
 - d) Baum nach Behandlung (Baum I, am 05.11.1999)

Die untersuchten Wundverschlussmittel sind (siehe Kap.II.4.7.):

- Veredelungswachs
- Lac-Balsam
- Kambisan
- Santar SM

Die Bäume wurden im November 1999 behandelt und werden regelmäßig beobachtet.

II.5.4. F₄: Optimierung der Applikationstechnik und praxisnahe Anwendung in einer landwirtschaftlich genutzten Kastanienanlage

Auf der Kastanienanlage des Gutes Remschnigg wird eine großflächige Behandlung befallener Bäume durchgeführt. Dabei werden 10 bis 12 Jahre alte Bäume mit Kleisterformulierung behandelt, um die Ausbreitung der hypovirulenten Pilzstämmen in einer landwirtschaftlich angelegten Anlage zu beobachten und die Heilungschancen durch Einsatz dieser Methode ermitteln zu können.

Es werden die Pilzstämmen II/3, II/4 und II/5 eingesetzt. Die Behandlung erfolgt durch Abheben der Rinde bis zum Kambium ober- und unterhalb der Befallsstelle, um einen möglichst raschen Kontakt zwischen dem virulenten und dem eingesetzten hypovirulenten Pilz zu gewährleisten. Danach wird der Kleister aufgetragen und die Behandlungsstelle durch Andrücken der Rinde und gleichmäßigem Verstreichen des restlichen Kleisters verschlossen. Teilweise wird die Rinde mit einem Bast befestigt. Es werden ca. 10 Bäume pro Pilzstamm behandelt, wobei teilweise zwei bis drei Behandlungen (je nach Nekrosenfläche) durchgeführt werden. Die Behandlungen erfolgen einerseits in gesundem Gewebe, andererseits aber auch in befallenem, nekrotischem Gewebe.

II.5.5. F₅: Impfung von Jungpflanzen in der Baumschule zur Sensibilisierung gegen virulente Stämme

In der Baumschule des Gutes Remsnigg wird an zweijährigen Jungkastanien im Juli 2000 dieser Versuch zur Sensibilisierung junger Pflanzen gestartet.

Dazu wird mit einem Veredlungsmesser ein Schnitt hinter einem Austriebsauge gemacht und die Rinde abgehoben. Hinter einem Austriebsauge befindet sich eine sehr vitale und regenerationsfähige Zone (vgl. Keppel et al., 1998). Auf diese Stellen wird der Pilzkleister mit den Stämmen II/3, II/4 und II/5 aufgebracht.

Ein Ansatz wird mit einer Behandlung ober- und unterhalb der Veredelungsstelle (siehe Abb. 7 a), ein weiterer mit einer Behandlung nur unterhalb der Veredelungsstelle (siehe Abb. 7 b) durchgeführt. Die behandelte Stelle wird mit Okuletten (Fleischhackerblättchen), die im Obstbau zur Abdeckung von Veredelungsstellen verwendet werden, abgedeckt.



Abb. 7 a: Impfung einer Jungpflanze mit Pilzkleister ober- und unterhalb der Veredelungsstelle.



Abb. 7 b: Impfung einer Jungpflanze in der Baumschule des Gutes Remsnigg nur unterhalb der Veredelungsstelle.

DISKUSSION

Eigenschaften virulenter und hypovirulenter *Cryphonectria parasitica*-Stämme

Eine strikte Trennung von hypovirulenten und virulenten Pilzstämmen *in vitro* erwies sich als schwierig. Die Wachstumsgeschwindigkeit der untersuchten konvertierten hypovirulenten Stämme ist deutlich langsamer, die Bildung von Konidiosporen wesentlich geringer als bei den jeweiligen virulenten Konversionspartnern. Die Pigmentierung der Kolonien hingegen ist nur ein ungenaues Merkmal zur Unterscheidung von hypovirulenten und virulenten Stämmen, da beide Typen, v. a. wenn sie im Dunkeln inkubiert werden, *in vitro* meist weißes Luftmycel bilden. Die Eigenschaften hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit und Pigmentierung bzw. Ausbildung von Pyknidien sind in Tabelle 2 dargestellt. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass sich auch hypovirulente Pilzstämmen unter Laborbedingungen stark unterscheiden können.

Vor allem im Zuge der Stammhaltung verändern sich die Kultureigenschaften oft unerwartet und plötzlich. Nach einem oder mehreren weiteren Überimpfungsschritten treten die ursprünglichen Merkmale meist wieder auf.

Eigenschaften der entwickelten Formulierungen

Aus Abb. 8 und Abb. 23 wird ersichtlich, dass für die meisten Stämme die Kleisterformulierung deutliche Vorteile bezüglich der Wachstumsleistung auf PDA_{mb}-Platten bietet (I/3, I/5, I/6, I/7, II/2, II/4, III/1) (siehe Tabelle 3). Für einige Stämme lässt sich jedoch keine Bevorzugung für eine Formulierung aus diesem Versuch ableiten (I/3, II/1, II/5), da für diese Pilzstämmen in den verschiedenen Formulierungen kaum ein Unterschied in der Wachstumsleistung festgestellt werden konnte (siehe Abb. 8, Tabelle 3).

Auch in der Pastenformulierung ergeben sich gute Wachstumswerte für die hypovirulenten Pilzstämmen (siehe Abb. 23).

Die Formulierungen auf Kastanienholzspänen und die Malzextraktsuspensionen weisen schlechtere Werte in der Wachstumsleistung auf den Platten auf (siehe Abb. 8, Tabelle 3, Abb. 23).

Ein weiterer Vorteil der Pasten- und Kleisterformulierung ist, dass alle untersuchten konvertierten hypovirulenten Pilzstämmen in diesen beiden Formulierungen anwachsen. Auf den Kastanienholzspänen wachsen die Stämme I/1 und I/5, in Malzextraktsuspension der Stamm I/6 nicht an (siehe Abb. 8). Da diese beiden Formulierungen mit einer relativ geringen Menge an pilzlichem Ausgangsmaterial beimpft werden, ist es möglich, dass einzelne Stämme nicht in der Lage sind, sich unter den gegebenen Bedingungen in der jeweiligen Formulierung zu vermehren und anzuwachsen.

Teilweise liegen sehr hohe Standardabweichungen der Wachstumswerte vor. Das kann eine Folge des Versuchsablaufes sein. Es wurde zwar darauf geachtet, dass auf jeder Platte eine möglichst kleine Menge der Formulierung aufgebracht wird, um festzustellen, ob selbst dann noch

wachstumsfähiges Pilzmaterial vorhanden ist, allerdings stellte es sich als schwierig heraus, exakt gleich große Stücke auf die jeweiligen Parallelen zu geben.

Daher kann es sein, dass in einem größeren Stück der Formulierung mehr Hyphen oder Konidien vorliegen, während auf der Parallelplatte nur ein kleines Stück mit relativ wenig Material liegt. So hat z.B. auf Parallele A mehr Ausgangsmaterial für ein schnelleres Wachstum, Parallele B hingegen weniger und das Wachstum verläuft entsprechend langsamer. Da vier Parallelen im Versuch angesetzt wurden, liefert der Mittelwert die beste Aussage über das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme in der jeweiligen Formulierung (siehe Tabelle 3, Abb. 8).

Neben der Fähigkeit, auf einem Medium anzuwachsen, ist auch die Menge des vorhandenen wachstumsfähigen Materials in der jeweiligen Formulierung ein wichtiges Kriterium zur Wahl der geeigneten Ausbringungsmethode. Hier zeigt die Pilzpaste gegenüber den anderen drei Formulierungen deutliche Vorteile, da sie den höchsten Anteil an wachstumsfähigem Material (Hyphenstücken und Konidiosporen), aufweist (siehe Abb.22, Tabelle 6).

Bemerkenswert ist der sehr geringe Anteil an wachstumsfähigem Material in der Kleisterformulierung (siehe Abb. 24), da die Menge des Ausgangsmaterials bei der Produktion in etwa gleich groß ist wie bei der Pilzpaste. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sich durch den Ölgehalt in der Formulierung die Hyphen und Konidien nicht homogen auf die gesamte Matrix aufteilen und sogenannte „Nester“ bilden. Beim praktischen Einsatz des Pilzkleisters würde das jedoch keinen Nachteil darstellen, da immer eine ausreichende Menge der Formulierung auf die Befallsstelle aufgebracht wird. Dadurch ist auch genügend hypovirulentes Pilzmaterial zur Konversion des virulenten Stammes auf dem Baum vorhanden. Außerdem sollte bei der Produktion auf eine gute Durchmischung geachtet werden.

Die statistische Auswertung ergibt sowohl hinsichtlich der Wachstumsleistungen auf PDA_{mb}-Platten als auch hinsichtlich des Anteils an wachstumsfähigem Pilzmaterial keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den vier entwickelten Formulierungen (siehe Tabelle 7, Tabelle 8).

Die Laborversuche zur Bestimmung der Konversionskapazität der hypovirulenten Pilzstämme in unterschiedlichen Formulierungen zeigen, dass auch hier die Pasten- und Kleisterformulierung bessere Ergebnisse liefern als die beiden anderen untersuchten Formulierungen (siehe Tabelle 4) und somit der, Malzextraktsuspension und der Formulierung auf Kastanienholzspänen vorzuziehen sind.

Die Konsistenz der entwickelten Formulierungen ist direkt nach der Produktion sehr gut geeignet für eine praktische Anwendung zur Behandlung von Kastanienrindenkrebs. Die Paste und der Kleister sind schmierig bis pastenartig, die Kastanienholzspäne halten aufgrund der Feuchtigkeit klumpenartig zusammen und die Malzextraktsuspension ist eine zähflüssige Brühe.

Die Paste und die Formulierung auf Kastanienholzspänen trocknet allerdings nach mehrwöchiger Lagerung vollständig aus, wodurch die Konsistenz für eine Behandlung sehr ungünstig wird. Der Pilzkleister behält bei einer Lagerzeit von einem Jahr seine Konsistenz bei und kann ausserdem in sterile Einmalspritzen abgefüllt werden. Daher ist sie diesbezüglich für eine praktische Anwendung am besten geeignet.

Der Nachteil des Kleisters, der Paste und der Malzextraktsuspension im Vergleich zur Formulierung auf Kastanienholzspänen ist, dass die Umgebungsbedingungen nicht den Bedingungen im Baum entsprechen. Es ist daher möglich, dass es bei diesen Formulierungen im Freilandeinsatz etwas länger brauchen wird, bis das Pilzwachstum einsetzt. Dadurch kann sich eine leichte zeitliche Verzögerung beim Einsatz dieser Formulierungen ergeben.

Die Ergebnisse aus dem Versuch zur Bildung von Konidien bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (siehe Tabelle 5) sowie Ergebnisse aus der Literatur (vgl. Elson & Jackson, 1998; Evans & Black, 1981; Figl, 1991) bieten einen interessanten Ansatzpunkt zur Produktion weiterer Formulierungen der Pilzstämmen in Form von Konidiosporen. Durch Optimierung der Bedingungen (höhere Temperatur, Lichteinwirkung,...) kann man die Sporulation der hypovirulenten Stämme eventuell soweit erhöhen, dass die Produktion einer Konidien suspension möglich wird. Es konnte zwar gezeigt werden, dass bestimmte Faktoren die Sporenbildung von hypovirulenten *Cryphonectria parasitica*-Stämmen anregen können, eine ausreichende Anregung für die Herstellung einer geeigneten Sporensuspension ist im Rahmen vorliegender Projektarbeit allerdings nicht gelungen.

Flüssige Formulierungen sind deswegen von Bedeutung, weil ein Einsatz auf vielerlei Art und Weise möglich ist. Die Suspensionen (ob als Näh suspension für Pilzmycel oder aber als reine Sporensuspension) großflächig durch Spritzen auszubringen, macht diese Formulierungen so interessant. Denn vor allem befallene Forstflächen mit Edelkastanienbeständen unterschiedlichen Alters sind Problemfälle, wenn man an den Einsatz von Pasten oder ähnlichem denkt. Nur mühsam können dort alle Befallsstellen direkt behandelt werden. Für den Einsatz in einer landwirtschaftlich angelegten Kastanienplantage ist hingegen die Pastenformulierung bisher sicher die effektivste Methode (vgl. Robin, C., persönl. Mitteilung).

Lagerungsfähigkeit der entwickelten Formulierungen

Die Ergebnisse der Lagerungsversuche zeigen, dass die Malzextraktsuspension für den Zeitraum von sechs Monaten schlecht lagerfähig ist (siehe Abb. 33, Tabelle 17, Abb. 34). Der Unterschied zwischen der Wachstumsfähigkeit der Pilzstämmen in dieser Formulierung vor und nach Lagerung ist statistisch sehr signifikant (siehe Tabelle 18). Nach 12 Monaten steigt die Wachstumsleistung der Stämme in Malzextrakt-Suspension wieder an (siehe Tabelle 19, Abb. 35, Abb. 36). Durch die Veränderung der Konsistenz während der Lagerung (Austrocknen, etc.) scheinen für das Pilzwachstum wieder bessere Bedingungen (bessere Sauerstoffversorgung) vorzuliegen und der Pilz kann verstärkt wachsen. Da aber die Veränderung der Konsistenz und ständige Schwankungen der Umgebungsbedingungen für die praktische Anwendung nicht optimal sind, wird die Formulierung als Malzextrakt-Suspension für weitere Versuche nicht mehr herangezogen.

Die Pastenformulierung und die Formulierung auf Kastanienholzspänen weisen keine schlechteren Wachstumsleistungen auf PDA_{mb}-Platten nach sechs- und nach 12-monatiger Lagerung bei Raumtemperatur oder bei +4°C auf als gleich nach der Produktion der jeweiligen Formulierung (siehe

Abb. 43 und 44). Das heisst, diese Formulierungen sind über den untersuchten Zeitraum von 12 Monaten gut lagerfähig.

Der Pilzkleister ist bei kühlen Lagerungstemperaturen über einen Zeitraum von 12 Monaten lagerfähig, ohne statistisch signifikante Verluste in der Wachstumsfähigkeit unter Laborbedingungen zu zeigen (siehe Abb. 40, Tabelle 24). Bei Raumtemperatur nimmt die Fähigkeit, auf Nährbodenplatten zu wachsen deutlich ab (siehe Abb. 40). Dieser Unterschied in der Wachstumsleistung von hypovirulenten Pilzstämmen in Kleisterformulierung, die bei Raumtemperatur gelagert wurde, ist statistisch hoch signifikant (siehe Tabelle 24).

Bezüglich der Konsistenz, die für die Anwendung eines Bekämpfungsmittels in der Praxis eine wichtige Rolle spielt, ist der Pilzkleister am besten geeignet. Seine Konsistenz ist nach 12 Monaten Lagerzeit noch immer gleich schmierig und haftfähig wie direkt nach der Produktion. Die Pilzpaste hingegen wird extrem bröselig, die Kastanienholzspäne trocknen stark aus und haften nicht mehr auf der Stelle, an der sie ausgebracht werden.

Einfluss der Lagertemperatur

Bezüglich der optimalen Lagertemperatur kann beobachtet werden, dass ein Aufbewahren im Tiefkühlschrank (-20°C) negative Effekte auf die Wachstumsleistung in vitro mit sich bringt. Die Malzextraktsuspension war bei keiner der drei untersuchten Temperaturen gut lagerfähig, ohne im Wachstum eingeschränkt zu werden (siehe Abb. 43).

Die Pilzpaste und die Formulierung auf Kastanienholzspänen sind sowohl bei Raumtemperatur als auch im Kühlschrank (+4°C) gut lagerfähig (siehe Abb. 43 und 44), wobei die Lagerung bei wärmeren Temperaturen die Wachstumsleistung geringfügig weniger beeinträchtigt (siehe Abb. 43 und 44). Diese Ergebnisse bestätigen auch bisherige Untersuchungen, in denen festgestellt wurde, dass bei höheren Temperaturen die Sporenproduktion und das Mycelwachstum verstärkt wird (vgl. Knudsen et al., 1991; Kuhlman & Bhattacharyya, 1984).

Für den Pilzkleister ist eine Lagerung im Kühlschrank hinsichtlich der Wachstumsfähigkeit am besten geeignet (siehe Abb. 44). Die Wachstumsleistung ist zwar bei Raumtemperatur nur unmerklich schwächer, aber die kühle Lagerung beeinträchtigt das Mycelwachstum in dieser Formulierung weniger.

Eine mögliche Erklärung wäre ein schwach negativer Effekt der Inhaltsstoffe des Maiskeimöls auf das Wachstum des Mycels bei Einwirkung von höheren Temperaturen.

Die Lagerung im Kühlschrank scheint für alle entwickelten Formulierungen hinsichtlich ihrer Wachstumsfähigkeit die optimalste Lagertemperatur darzustellen. Eine Lagerung dieser Formulierungen bei Raumtemperatur über sechs Monate ist ebenfalls ohne nachteilige Auswirkungen möglich. Von einer Lagerung bei -20°C wird aufgrund der in der Literatur erwähnten negativen Auswirkungen auf die dsRNA (vgl. Friese et al., 1992) und aufgrund der Beeinträchtigung der Wachstumsfähigkeit abgeraten.

Applikation im Freiland - die praktische Anwendung

Die Freilandversuche die seit Mai 1999 in der Südsteiermark (Karnerberg) auf einer Forstfläche durchgeführt wurden, zeigen erste Erfolge. Nach einem Jahr konnten erste Überwallungserscheinungen der hypovirulenten Pilzstämme, die zur Behandlung der künstlich angelegten Nekrosen (F_2) ausgebracht wurden, festgestellt werden (siehe Abb. 55 bis 88). Teilweise waren die Nekrosen schon vollständig von neu gebildetem Rindengewebe überwachsen und beinahe nicht mehr erkennbar (siehe z.B. Abb. 56, 61, 67). Diese Überwallungen können als erste Anzeichen einer einsetzenden Heilung der virulenten Befallsstellen durch die Bäume angesehen werden. Außerdem ist bemerkenswert, dass alle für die Freilandversuche ausgewählten Bäume während des Versuchszeitraums überlebten, ohne sichtbare Schäden (welkende Blätter) durch die virulenten *C. parasitica*-Stämme aufzuweisen. Nur ein einziger Versuchsbaum ist abgestorben (Baum J**). Die Ursache für das Absterben war allerdings nicht die behandelte Nekrose, sondern eine basale Befallsstelle, die zu Beginn des Versuchs nicht bemerkt wurde (siehe Abb. 63). Auch bei den behandelten, natürlich vorkommenden Nekrosen (F_1) war zu bemerken, dass sich die hypovirulenten Pilzstämme im Baum etablieren konnten. Weiters ist festzuhalten, dass sich die virulenten Nekrosen nicht über die Behandlungsstellen hinweg ausbreiteten (siehe Abb. 46 bis 54). Es war deutlich bemerkbar, dass der Behandlungserfolg bei der Malzextraktsuspension geringer war (siehe Abb. 52 bis 54) als bei den Nekrosen, die mit Pilzpaste und Kastanienholzspänen (siehe Abb. 46 bis 51) behandelt wurden.

Der Einsatz von Wundverschlussmitteln ist nur bei großen zu behandelnden Stellen sinnvoll, wenn die Nekrose durch Ausschneiden komplett entfernt und erst danach behandelt wird. Durch das Aufbringen des Verschlussmittels wird eine Sekundärinfektion verhindert. Hier zeigt sich, dass auf die Wahl des Verschlussmittels unbedingt geachtet werden muss, damit zusätzliche negative Effekte für die hypovirulenten Pilze vermieden werden (siehe Abb. 89 bis 93).

Die Ergebnisse der Laborversuche spiegeln die Ergebnisse aus den Freilandversuchen nicht wider, da das Baumwachs im Labor nicht günstig auf das Wachstum von *C. parasitica* wirkte (siehe Abb. 45), im Freiland hingegen mit diesem Mittel behandelte Stellen deutliche Überwallungserscheinungen zeigen (siehe Abb. 89 und 92), was aufgrund von Erfahrungen aus der obstbaulichen Praxis auf eine Ausheilreaktion des Baumes auf den eingebrachten Pilz gewertet werden kann.

Bei vorbeugender Behandlung bzw. bei Ausbringen ober- und unterhalb von Befallsstellen ist ein Einsatz von Wundverschlussmitteln nicht notwendig, da die Behandlungsstellen punkt- oder schlitzförmig sind und durch die Pilzformulierung abgedeckt werden können.

Sinnvoll ist ein Ausbringen im gesunden Gewebe, damit sich der hypovirulente Pilz möglichst rasch ausbreiten und mit dem virulenten Stamm in Kontakt treten kann. Die Ausbringung sollte bei punktförmiger Behandlung (mit Akkubohrer) in etwa im Abstand von 10 cm ober- und unterhalb der Nekrose über die gesamte Nekrosenlänge erfolgen. Besser geeignet ist ein rechteckiges Aufschneiden der Rinde mit einer Spachtel oder einem Veredlungsmesser bis zum Kambium, wobei oben der Rindenlappen am Baum bleibt. Die Formulierung kann unter den Rindenlappen eingebracht

werden und durch Andrücken der Rinde wird die Behandlungsstelle verschlossen (siehe Abb. 99). Hier kann der Abstand der Behandlungsstellen aufgrund der größeren Menge an Pilzmaterial 15 bis 20 cm betragen.



Abb. 99: Rindenlappenmethode zur Ausbringung des Pilzkleisters im Freiland.

Aufgrund der beobachteten natürlichen Ausbreitung der hypovirulenten Pilzstämme auf den Versuchsfeldern im Rahmen vorliegender Projektarbeiten und in anderen Ländern (vgl. Bissegger et al., 1997; Shain, 1982; Willey, 1982) erschien die Behandlung von jungen Edelkastanien in der Baumschule vor Ausbringen ins Gelände als eine sinnvolle Technik zur einfachen Verbreitung der Hypovirulenz.

Einerseits sind die Jungpflanzen an sich geschützt gegen den Ausbruch des Kastanienrindenkrebeses, andererseits tragen die sensibilisierten Bäume das Potential der Hypovirulenz, das durch natürliche Verbreitung in einem bestimmten Gebiet ausgebracht werden kann.

Da die Behandlung der Jungbäume in der Baumschule erfolgt, sind die Pflanzen leicht zugänglich und können gleichzeitig mit anderen herkömmlichen Erziehungsmaßnahmen in der Baumschule behandelt und regelmäßig kontrolliert werden.

Wie die Ergebnisse aus dem Versuch F₅ zeigen, weisen die behandelten Jungpflanzen bisher keine Beeinträchtigung in ihrer Entwicklung auf (siehe Abb. 97). Da diese Versuche erst ein Jahr laufen, kann über die tatsächliche Beeinträchtigung noch kein Rückschluss getroffen werden. Dieser Ansatz sollte zur Verbreitung der Hypovirulenz in Österreich unbedingt weiter untersucht werden, da diese Art der Ausbringung einfach durchführbar und auch für den Forstbereich einsetzbar ist.

Der Pilzkleister

Am besten geeignet hinsichtlich Wachstumsleistung, Lagerfähigkeit, Konsistenz und praktischer Anwendbarkeit ist die **Pilzkleisterformulierung**.

Der Kleister kann über einen Zeitraum von einem Jahr bei +4°C gelagert werden, ohne das Wachstum des Pilzmycels zu beeinträchtigen. Über einen kürzeren Zeitraum kann er auch bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Der Pilzkleister zeigt sowohl unter Labor-, als auch unter Freilandbedingungen die besten Eigenschaften hinsichtlich Konversionsleistung und Anwendbarkeit.

Für eine effektive Ausbreitung der Hypovirulenz in Österreich sollte die Sensibilisierung der Jungpflanzen in den Baumschulen mit Pilzkleister weiter untersucht werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt für künftige Forschungsschwerpunkte könnte die Aufklärung der wichtigsten Ausbreitungsmechanismen von *Cryphonectria parasitica* sein. Eine Vermeidung der Weiterverbreitung virulenter und eine Förderung der Ausbreitung hypovirulenter Pilzstämmen ist denkbar und könnte einen neuen oder zusätzlichen Bekämpfungsansatz bieten.

**Detaillierte Ergebnisse
siehe Langfassung des Abschlussberichtes**