



Technische Universität München
Fachgebiet Pathologie der Waldbäume

Infektion von Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*)
mit *Verticillium dahliae*
unter Berücksichtigung von Trockenstress

Nicole Burgdorf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Axel Göttlein
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Wolfgang Oßwald
2. Prof. Dr. Hardy Pfanz
3. Prof. Dr. Johan Philipp Benz

Die Dissertation wurde am 01.08.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.01.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Problematik	1
1.2 <i>Verticillium dahliae</i>	4
1.3 Bergahorn (<i>Acer pseudoplatanus</i>).....	8
1.4 Zielsetzung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Freilandstudien in Bergahornbeständen	11
2.1.1 Stammnekrosen in Erst- und Wiederaufforstungsflächen	11
2.1.1.1 Untersuchungsflächen.....	11
2.1.1.2 Vermessung der Stammnekrosen	12
2.1.1.3 Computertomographische Aufnahmen	13
2.1.1.4 Mikroskopische Aufnahmen.....	14
2.1.1.5 Jahrringanalyse.....	15
2.1.2 Isolierung von <i>V. dahliae</i> aus Stammnekrosen	15
2.1.3 Verseuchungsgrad des Bodens.....	16
2.2 Einfluss von Trockenstress auf die Infektion mit <i>V. dahliae</i> bei Bergahorn.....	18
2.2.1 Vegetationshallenversuch unter kontrollierten Bedingungen	18
2.2.1.1 Versuchsvarianten.....	18
2.2.1.2 Inokulation mit <i>V. dahliae</i>	19
2.2.1.3 Randomisierte Blockanlage mit Bewässerung	20
2.2.2 Klimatische Bedingungen	21
2.2.3 Beurteilungsparameter	22
2.2.3.1 Welkesymptome	22
2.2.3.2 Gaswechsellmessungen	22
2.2.3.3 Hydraulische Leitfähigkeit	23
2.2.3.4 Wuchshöhe und Frischgewicht	24
2.2.3.5 Reisolierung von <i>V. dahliae</i>	24
2.3 Inokulation von Bergahorn mit <i>V. dahliae</i> und <i>F. solani</i>	26
2.3.1 Wurzeltauch-Inokulation von Bergahornsämlingen	26
2.3.2 Stamm-Inokulation von Bergahornen	27
2.3.3 Boniturparameter.....	27
2.4 Molekularbiologischer Nachweis	28
2.4.1 Probenahme	28
2.4.2 Amplifikation	30
2.4.2.1 DNA-Extraktion und Aufreinigung.....	30

2.4.2.2	Messung der DNA-Gehalte	30
2.4.2.3	Amplifikationsbedingungen	30
2.4.2.4	Gelelektrophorese	31
2.4.3	Nachweismethoden	32
2.4.3.1	PCR mit artspezifischen Primern	32
2.4.3.2	<i>Next Generation Sequencing</i>	32
2.5	Statistische Datenauswertung	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Freilandstudien in Bergahornbeständen	40
3.1.1	Stammnekrosen in Erst- und Wiederaufforstungsbeständen	40
3.1.1.1	Exposition der Nekrosen	43
3.1.1.2	Computertomographische Aufnahmen	44
3.1.1.3	Mikroskopische Aufnahmen	47
3.1.1.4	Entwicklung der Stammnekrosen	52
3.1.1.5	Alter der Stammnekrosen	53
3.1.2	Isolierung von <i>V. dahliae</i> aus Stammnekrosen	54
3.1.3	Erregerdichte im Boden	54
3.2	Einfluss von Trockenstress auf die Infektion mit <i>V. dahliae</i> bei Bergahorn	57
3.2.1	Trockenstressversuch I	57
3.2.1.1	Welkesymptome	57
3.2.1.2	Gaswechsel	65
3.2.1.2.1	Photosyntheserate	65
3.2.1.2.2	Stomatäre Leitfähigkeit	67
3.2.1.3	Hydraulische Leitfähigkeit	69
3.2.1.4	Wuchshöhe und Frischgewicht	70
3.2.1.5	Reisolierung von <i>V. dahliae</i>	71
3.2.2	Trockenstressversuch II	72
3.2.2.1	Welkesymptome	73
3.2.2.2	Gaswechsel	79
3.2.2.2.1	Photosyntheserate	79
3.2.2.2.2	Stomatäre Leitfähigkeit	81
3.2.2.3	Hydraulische Leitfähigkeit	82
3.2.2.4	Wuchshöhe und Frischgewicht	83
3.2.2.5	Reisolierung von <i>V. dahliae</i>	84
3.3	Inokulation von Bergahorn mit <i>V. dahliae</i> und <i>F. solani</i>	85
3.3.1	Wurzeltauch-Inokulation von Bergahornsämlingen	85
3.3.1.1	Welkesymptome	85
3.3.1.2	Wuchshöhe	86
3.3.1.3	Gaswechsel	86
3.3.2	Stamm-Inokulation von Bergahornen	87

3.3.2.1 Welkesymptome	87
3.3.2.2 Wuchshöhe und Gefäßverfärbungen	87
3.3.2.3 Reisolierung	88
3.4 Molekularbiologischer Nachweis mittels <i>Next Generation Sequencing</i>	89
3.4.1 Laborkontrollen	89
3.4.2 Nachweis im Boden	91
3.4.3 Nachweis in Zweig- und Blattmaterial.....	92
3.4.4 Nachweis in Stammnekrosen	93
3.4.5 Anteile von <i>V. dahliae</i> in Nekrosenbereichen	101
4 Diskussion	102
4.1 Stammnekrosen und Tracheomykosen bei Bergahorn.....	102
4.2 Einfluss von Trockenstress auf die Infektion mit <i>V. dahliae</i> bei Bergahorn.....	108
4.3 Infektion von Bergahorn mit <i>V. dahliae</i> und <i>F. solani</i>	113
4.4 Molekularbiologischer Nachweis	115
5 Zusammenfassung	121
6 Summary	123
7 Literaturverzeichnis	125
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	137
9 Anhang.....	142

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AUDPC	<i>Area Under Disease Progress Curve</i>
AUWPC	<i>Area Under Wilt Progress Curve</i>
BaySF	Bayerische Staatsforsten
BHD	Brusthöhendurchmesser
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBS	<i>CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Niederlande</i>
cm	Zentimeter
CT	Computertomograph
DNA	<i>Desoxyribonuclein Acid</i>
d	Durchmesser
dpi	<i>Days Past Inoculation</i>
EAF	Erstaufforstung
ETS	<i>External Transcribed Spacer</i>
FA	<i>Fusarium avenaceum</i>
FC	<i>Fusarium circinatum</i>
FS	<i>Fusarium solani</i>
FVA	Forstliche Versuchsanstalt
g	Gramm
hPa	Hektopascal
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
J	Joule
kg	Kilogramm
l	Liter
Lab K	Laborkontrolle
m	Meter
ME	<i>Mortierella elongata</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minuten
MS	Mikrosklerotien

mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NN	Normalnull
ng	Nanogramm
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
n.s.	nicht signifikant
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PAR	<i>Photosynthetic Active Radiation</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i>
R	Bestimmtheitsmaß
rDNA	<i>Ribosomal Desoxyribonucleinacid</i>
SCAR	Sequenz-charakterisierte amplifizierte Region
sec	Sekunde
SD	<i>Standard Deviation</i> / Standardabweichung
TA	<i>Trichoderma asperellum</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TV	<i>Trichoderma virens</i>
UV	Ultraviolett
VD	<i>Verticillium dahliae</i>
VL	<i>Verticillium longisporum</i>
vol.	volumetrisch
vs.	versus
VT	<i>Verticillium tricorpus</i>
WA	Wasseragar
WAF	Wiederaufforstung
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Problematik

Waldökosysteme und Forstbestände sind vielfach durch den Einfluss biotischer Faktoren Stress ausgesetzt. Zunehmend führen invasive Arten oder klimatisch begünstigte Erreger zu Schäden und gleichzeitig nimmt durch Witterungsextreme eine Schwächung und Prädisposition der Wirtsbaumarten zu. Insbesondere pathogene Pilze mit einem hohen Temperaturoptimum und einer Toleranz gegenüber Trockenheit scheinen begünstigt.

Bei dem Erreger des Kieferntriebsterbens *Diplodia pinea* handelt es sich beispielsweise um einen thermophilen Schwächeparasiten, dessen Ausbreitung in Mitteleuropa durch klimatische Veränderungen und die künstliche Verbreitung der Wirtspflanze Kiefer gefördert wurde (SCHUMACHER 2012). Auch führen invasive pathogene Arten wie die Erreger des Eschentriebsterbens *Chalara fraxinea*, des Kastanienrindenkrebsses *Cryphonectria parasitica* und des Ahornstammkrebsses *Eutypella parasitica* verstärkt zu Schäden in temperaten Laubwäldern Mitteleuropas.

Der weltweit verbreitete Erreger der Verticillium-Welke *Verticillium dahliae* KLEB. konnte sich durch die Kombination aus großem Wirtspflanzenkreis und langlebiger Dauerorgane in vielen kultivierten Böden etablieren und scheint von den erhöhten Temperaturen zu profitieren. Über die Verbreitung des Pathogens in natürlichen Böden und Waldökosystemen ist jedoch bislang wenig bekannt (INDERBITZIN & SUBBARAO 2014). Der Ascomycet führt seit Jahrzehnten insbesondere in Gartenbau und Baumschulen zu Erkrankungen und wirtschaftlichen Schäden. Typische Symptome nach einer Infektion sind Blattchlorosen, Welke einzelner Kronenteile oder der kompletten Krone, vermindertes Wachstum bis hin zum Absterben der Pflanzen, wobei neben dem akuten Krankheitsverlauf eine über Jahre verlaufende symptomlose chronische Phase auftreten kann.

Als Wirtspflanzen von *V. dahliae* sind einige Hundert Pflanzenarten aus verschiedenen Gattungen beschrieben (SINCLAIR et al. 1987, WERRES 1997, HIEMSTRA & HARRIS 1998). Innerhalb der Gehölze ist insbesondere die Gattung *Acer* durch die Verticillium-Welke betroffen (ZIMM 1918, SMITH 1979, SINCLAIR et al. 1981, TOWNSEND et al. 1990). Der zunehmende Anbau von Ahorn, in Bayern insbesondere nach den Stürmen Vivian und Wiebke im Jahr 1990, verschärft die Problematik. Neben Ahorn werden beispielsweise auch Winterlinde (*Tilia cordata* MILL.), Bergulme (*Ulmus glabra* HUDS.) und Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior* L.) als empfindlich eingestuft. Beim Oliven-Anbau in warm-trockenen mediterranen Gebieten stellt die Verticillium-Welke die am weitesten verbreitete Erkrankung dar und führt zu erheblichen Ernteaussfällen (LÓPEZ-ESCUADERO & BLANCO-LÓPEZ 2005).



Abb. 1: Stammnekrosen im unteren Stammabschnitt bei Bergahorn, A: geschädigter Bergahorn mit Überwallungen an zwei Nekrosen, B: Stammnekrose mit Wundleiste im Querschnitt mit olivgrünen Verfärbungen (markiert mit Pfeil) der mit *V. dahliae* besiedelten Jahrringe (Fotos: N. Burgdorf).

Innerhalb des letzten Jahrzehnts traten in vielen Bergahornbeständen Bayerns verstärkt Schäden verursacht durch *V. dahliae* auf. Es wurden Stammrisse und Nekrosen im unteren Stammabschnitt, insbesondere in etwa 20-jährigen Pflanzungen von Bergahornen, beobachtet (SIEMONSMEIER et al. 2012, BURGDORF et al. 2015). Bei fortschreitender Krankheitsentwicklung können sich offene Stammrisse als auch endogene Risse ausbilden, wobei häufig mehrere versetzt auftreten, die nach außen als offene Nekrosen oder Wundleisten erkennbar sind (BUTIN 2011). Bei der Infektion mit *V. dahliae* über das Wurzelsystem von Ahorn werden im Querschnitt olivgrüne Verfärbungen einzelner Jahrringe sichtbar (s. Abb. 1).

Als primäre Ursache der Ausbildung der Stammrisse wird die Koinzidenz einer *V. dahliae*-Infektion mit sommerlicher Trockenheit vermutet. Nach Untersuchungen von SCHNEIDEWIND (2006) an Bergahorn-Alleebäumen entstanden die durch *V. dahliae* verursachten Stammrisse zu 80 Prozent während heißer und trockener Wetterperioden von Mai bis September. Bei intensiver Sommertrockenheit, die im Rahmen der prognostizierten klimatischen Veränderungen in Zukunft verstärkt auftreten wird, fällt es befallenen Wirtspflanzen schwerer, eine Infektion mit *V. dahliae* zu kompensieren. Als Ursache der Entstehung der Risse wird eine physikalische Blockade durch Gefäßverschluss gesehen, was einerseits durch das Pathogen selber, aber vornehmlich durch die Reaktion des Baumes als Abwehrmechanismus verursacht werden kann (FRADIN & THOMMA 2006).

Die Problematik von Welke und Verticilliosen an Bäumen, insbesondere bei der Gattung *Acer*, ist seit langem bekannt (RANKIN 1914, ZIMM 1918, WOLLENWEBER 1929, RUDOLPH 1931, ENGELHARD 1957, HIMELICK 1969, STARK 1961, PHILLIPS & BURDEKIN 1982, SINCLAIR et al. 1981, SLAWSON 1987). Zu Beginn wurde in vielen Fällen *V. albo-atrum* als Verursacher benannt. Hierbei stellte sich jedoch im Laufe verschiedener Studien heraus, dass *V. dahliae* das verantwortliche Pathogen darstellt. Nach derzeitigem Kenntnisstand werden mit wenigen Ausnahmen alle Erkrankungen der Verticillium-Welke an Gehölzen durch *V. dahliae* verursacht (KEYKHASABER et al. 2017b). Neben *V. dahliae* können auch Arten der weit verbreiteten Gattung *Fusarium* als Verursacher von Welke und Mortalität bei vielen Pflanzenarten verantwortlich sein (FRADIN & THOMMA 2006). Der Erreger *Fusarium solani* steht im Verdacht insbesondere an Bergahorn zu Schäden zu führen (LANGER et al. 2013).

Durch klimatische Veränderungen mit verstärktem Auftreten von saisonalem Trockenstress erhöht sich die Prädisposition verschiedener Baumarten, was eine mögliche Schädigung durch Pflanzenpathogene begünstigt (DESPREZ-LOUSTAU et al. 2006, LA PORTA et al. 2008). Die durch *Verticillium* sp. bedingten Schäden nehmen seit Mitte der 90er Jahre zu (GOUD 2003, NEUBAUER et al. 2007a). Die Kombination von großem Wirtspflanzenkreis und dem Mangel an einsetzbaren Fungiziden intensiviert das Problem der Verticillium-Welke (TJAMOS 2000). Eine Kontrolle des Erregers gilt wegen der Langlebigkeit der bodenbürtigen Dauerorgane, der Mikrosklerotien, als schwierig.

1.2 *Verticillium dahliae*

In der Gattung *Verticillium* sind derzeit zehn pathogene Arten beschrieben (INDERBITZIN et al. 2011a), die in Gartenbau, Land- und Forstwirtschaft zu teils extremen Schäden führen. *V. dahliae* als Verursacher der Verticillium-Welke wurde bereits bei einigen Hundert Arten, darunter krautige und verholzte Pflanzen, nachgewiesen. Das Pathogen führt bei vielen Infektionsverläufen zu Welkesymptomen, Nekrosen bis hin zu einem Absterben der Pflanzen (SINCLAIR et al. 1987, HIEMSTRA & HARRIS 1998, PEGG & BRADY 2002, BUTIN 2011). Durch die Ausfälle entstehen wirtschaftliche Schäden, die vielfach auf mit *V. dahliae* besiedelte Böden zurückzuführen sind. Bei gartenbaulichen Kulturen, wie z.B. Tomaten, Paprika und Erdbeeren, als auch beim Anbau von Kartoffeln, Baumwolle und Oliven stellt die Verticillium-Welke ein großes ökonomisches Problem dar. Bei der Kultivierung von Gehölzen in Pflanzgärten und Baumschulen wird oftmals eine frühzeitige Seneszenz bis hin zur Mortalität der Wirtspflanzen bei einer Infektion mit *V. dahliae* beobachtet.

NEES VON ESSENBECK benannte im Jahr 1816 die Gattung *Verticillium* spp. nach Ausbildung der Konidiophoren mit drei- bis fünffach verzweigten Wirteln, an denen die Sporen abgeschnürt werden (PEGG & BRADY 2002). REINKE & BERTHOLD beschrieben 1879 die Welke von Kartoffeln und benannten den Erreger als *Verticillium albo-atrum*. Im Jahr 1913 beobachtete KLEBAHN erstmals das Auftreten einer Welke-Erkrankung an Dahlien und beschrieb die Art als *Verticillium dahliae*. Etwa 190 verschiedene *Verticillium* Arten sind seitdem beschrieben worden (ZARE et al. 2004). *V. dahliae* gilt als weltweit am weitesten verbreitete Art der Gattung (INDERBITZIN et al. 2011a), wobei Monokotylen und Gymnospermen als Wirtspflanzen auszuschließen sind (HIEMSTRA & HARRIS 1998, PEGG & BRADY 2002).

Zur Gattung *Verticillium* zählen bodenbürtige Pilze, die der Familie der Plectosphaerellaceae in der Abteilung der Ascomyceten angehören und als Anamorphe (Nebenfruchtform) Konidiosporen ausbilden, eine sexuelle Fortpflanzung bzw. Teleomorphe (Hauptfruchtform) ist nicht bekannt (USAMI et al. 2009). Zur Verbreitung werden Myzel sowie Konidien gebildet und unter ungünstigen Verhältnissen melanisierte Mikrosklerotien, die weit über zehn Jahre in Abwesenheit eines Wirts im Boden überleben können (WILHELM 1955, SCHNATHORST 1981). Durch die Einlagerung von Melanin wird in den Dauerstadien eine höhere Toleranz gegenüber UV-Strahlen, hohen Temperaturen und enzymatischem Abbau induziert (BELL & WHEELER 1986). Die Mikrosklerotien liegen häufig in Clustern im Boden vor (XIAO et al. 1997) und können mehrmals in Abhängigkeit ihrer Größe keimen, was den ersten Schritt der Pathogenese darstellt (BEN-YEPHET & PINKAS 1977).

Die Ausscheidung von Wurzelexsudaten der Wirtspflanze regt die Sklerotien zur Keimung an, woraufhin die Ausbildung von Hyphen erfolgt, mit denen die Wurzeln penetriert werden (s. Abb. 2). Von der Wurzel zu den Mikrosklerotien muss ein Abstand von etwa 100-300 μm unterschritten werden, um eine Keimung zu induzieren (HUISMAN 1982, BOWERS et al. 1996, NAGTZAAM et al. 1997). Nach dem Durchwachsen der Endodermis bildet der Ascomycet weiteres Myzel und Konidien, die sich mit dem Transpirationsstrom über das Gefäßsystem ausbreiten. Die Konidien können mit dem Transpirationsstrom bis ans Ende der Gefäße aufsteigen (HIEMSTRA 2014). Hier kann der Pilz durch die Gefäßwand in benachbarte Tracheen wachsen, wo wiederum neue Konidien gebildet werden. Das Vermögen intensiv Konidien zu bilden und sich damit in der gesamten Pflanze auszubreiten, korreliert nach SCHNATHORST (1963) mit der Aggressivität eines Isolats. Für den Welke-Erreger ist je nach herrschenden Umweltbedingungen eine dormante, pathogene und saprophytische Phase beschrieben (FRADIN & THOMMA 2006).

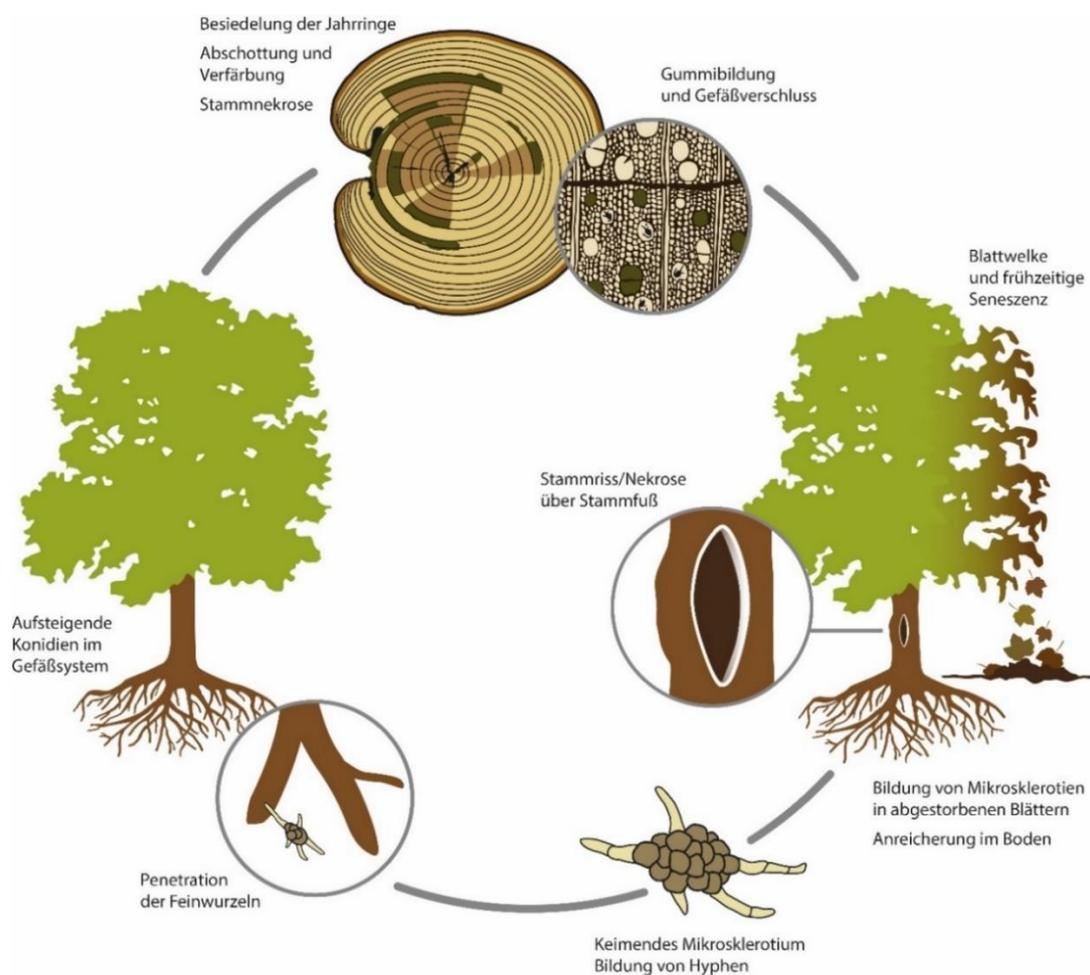


Abb. 2: Infektionszyklus von *V. dahliae* an Bergahorn mit Ausbildung einer Stammnekrose (Graphik: C. Hopf).

In den besiedelten Jahrringen entstehen olivgrüne Verfärbungen, die sich häufig in brauner Färbung bis ins Kernholz ausdehnen. Der Baum bildet als Reaktion auf die Infektion gummiartige Verschlüsse in den Gefäßen, um den Pilz abzuschotten, wodurch die Wasserleitbahnen verstopft werden (BONSEN 1991, HIEMSTRA & HARRIS 1998). Dies führt zur Ausbildung von Welke und frühzeitiger Seneszenz, was auch mit der Bildung von Wasserreisern einhergehen kann (s. Abb. 3). Bei einem extremen Befall können Stammrisse oder endogene Risse entstehen (BUTIN 2011), die als Wundleisten sichtbar werden (s. Abb. 1). Auf den vertrockneten Blättern bilden sich die Mikrosklerotien von *V. dahliae* aus, was zur Anreicherung und zur Erhöhung des Inokulumpotentials im Boden führt.

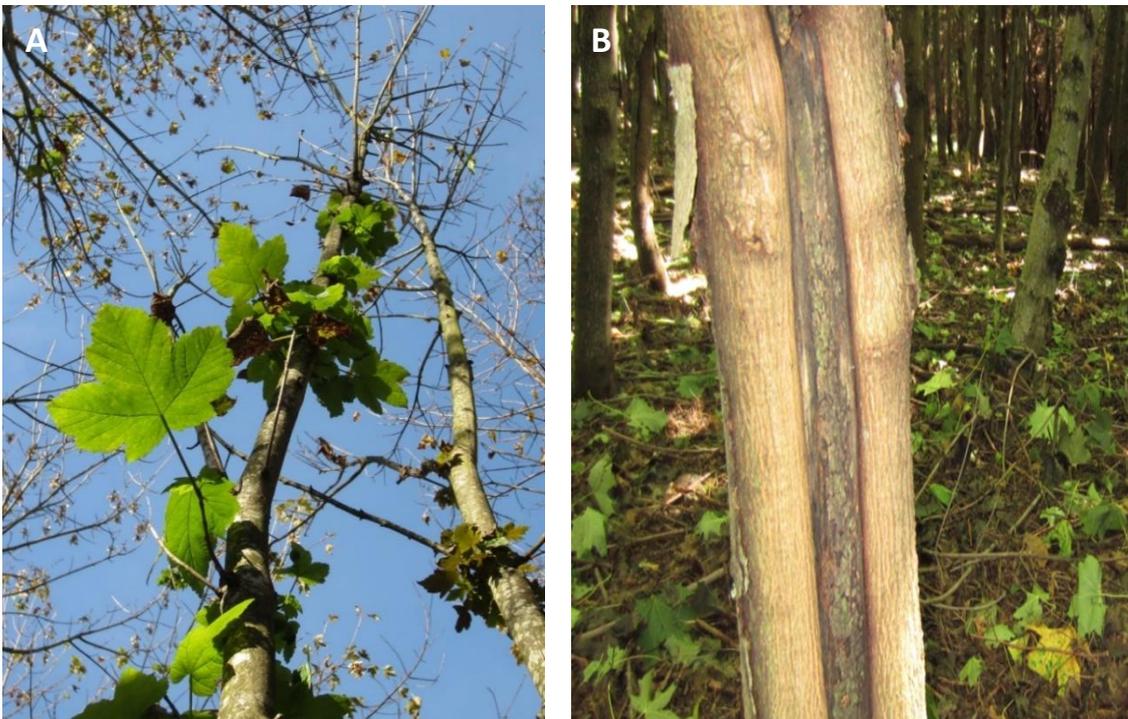


Abb. 3: Verticillium-Welke, A: Ausbildung von Wasserreisern bei *A. pseudoplatanus* in der Hallertau, B: Welke mit frühzeitigem Blattfall und Stammnekrose bei *A. platanoides* in der Rhön (Fotos: N. Burgdorf).

Der Schaderreger *V. dahliae* ist weltweit in temperaten und subtropischen Regionen verbreitet (PEGG & BRADY 2002). Anhand der geographischen Verbreitung folgern FRADIN & THOMMA (2006), dass das Pathogen von erhöhten Temperaturen profitiert. Auch konnte unter experimentellen Laborbedingungen für Isolate von verschiedenen Wirtspflanzen ein Wachstumsoptimum bei 20 bis 25°C (SUBBARAO et al. 1995, BHAT et al. 2003, HU et al. 2014) bestimmt werden. Zudem beschreiben KLOSTERMAN et al. (2009) eine hohe genetische Plastizität für *V. dahliae*, die auf ein gutes Anpassungsvermögen an unterschiedliche Umweltbedingungen hinweisen könnte.

Die Anzahl der phytopathogenen *Verticillium*-Arten wurde jüngst von sechs (PEGG & BRADY 2002, BARBARA & CLEWES 2003, GOUD et al. 2003) auf zehn Arten korrigiert (INDERBITZIN et al. 2011a). Innerhalb der Gattung stellt *V. longisporum* (C. STARK) KARAPAPA, BAINBR. & HEALE ein weiteres bedeutendes Pathogen dar, das mit *V. dahliae* eng verwandt ist und im Rapsanbau in Europa zu Welke und erheblichen Ernteaufällen führt.

Innerhalb der Art von *V. dahliae* sind fünf verschiedene vegetative Kompatibilitätsgruppen (VCG) beschrieben (BHAT et al. 2003, JIMÉNEZ-DÍAZ et al. 2006). Für Gehölzpflanzen gelten zumeist Isolate der VCG 1 als relevant (CHEN 1994). GOUD & THERMORSHUIZEN (2002) fanden bei der Infektion von Berg-, Spitz-, Feldahorn und anderen Baumarten heraus, dass *V. dahliae*-Isolate verschiedener VCGs keine Unterschiede in ihrer Virulenz aufwiesen, sondern die Intensität der Ausprägung typischer Symptome vielmehr als spezifisch für die betroffene Wirtsbaumart anzusehen war. Unterschiede zwischen den VCGs bestanden lediglich in der Ausprägung der Verfärbungen im Leitgewebe der Pflanzen. Des Weiteren fanden GOUD & THERMORSHUIZEN (2002) heraus, dass Isolate, die von ihrer ursprünglichen Wirtspflanze isoliert und wiederum an dieser inokuliert wurden, die höchste Pathogenität aufwiesen. Wahrscheinlich adaptiert sich der Erreger an seinen Wirt und gelangt so zu einer erhöhten Pathogenität. Ob *V. dahliae* überhaupt als wirtsspezifisch anzusehen ist, scheint fragwürdig (SUBBARAO et al. 1995), eher kann davon ausgegangen werden, dass der Pilz auch eigentliche Nicht-Wirtspflanzen besiedeln kann. Nach neuen Erkenntnissen ist *V. dahliae* z.B. auch bei Monokotylen als Endophyt nachweisbar (MALCOLM et al. 2013).

1.3 Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*)

Der Bergahorn (*Acer pseudoplatanus* L.) ist in Wald, Forst sowie im urbanen Grün ein wichtiger Vertreter der Gattung und die in Mitteleuropa am weitesten verbreitete Ahornart. Er scheint sich tendenziell in der Ausbreitung zu befinden, sowohl innerhalb seines natürlichen Areals als auch darüber hinaus (ROLOFF et al. 2010).

Das natürliche Verbreitungsgebiet des Bergahorns erstreckt sich von den mitteleuropäischen Gebirgen von den Pyrenäen zu den Alpen und den Karpaten, weiter östlich über Südpolen und den westlichen Kaukasus und über die südliche Schwarzmeerküste. Im Süden Europas findet man ihn bis auf Sizilien und Sardinien sowie über Mittel- und Südfrankreich bis ins nördliche Spanien (ROLOFF et al. 2010). Als nördliche Verbreitungsgrenze wird Norddeutschland angenommen, wobei es Hinweise gibt, dass er vor 500 Jahren an der Küste noch unbekannt war. Mittlerweile wird er auch in Südschweden kultiviert. *Acer pseudoplatanus* klettert bis auf 2000 m in den Bergregionen und steigt damit höher als die meisten anderen Laubbaumarten Mitteleuropas. Im Flachland erreicht der Bergahorn ein Alter von etwa 150 Jahren, in den Hochlagen wird er 400 bis 500 Jahre alt (ROLOFF et al. 2010). Die maximale Wuchshöhe dieser Baumart liegt mit ca. 35 m an der Obergrenze in der mitteleuropäischen Klimazone. Der Bergahorn stellt in manchen Bergregionen auf einer Höhe von 1000 bis 1800 m die beherrschende Baumart dar (SCHMIDT & ROLOFF 2009), sein Optimum erreicht er auf hochgelegenen Almen, wie im Hochtal des Karwendelgebirges (s. Abb. 4).



Abb. 4: *Acer pseudoplatanus* auf dem Großen Ahornboden im Karwendelgebirge (Foto: N. Burgdorf).

In der Jugend gilt der Bergahorn als sehr schnellwüchsige Baumart, die in kühl-feuchten mitteleuropäischen Bergregionen und auf feuchten, tiefgründigen und kalkhaltigen Böden heimisch ist. Nach ELLENBERG (1996) gilt der Bergahorn als Pionier und Klimaxbaumart. In natürlichen Waldökosystemen bildet der Bergahorn gemeinsam mit *A. platanooides*, *Tilia platyphyllos*, *Ulmus glabra* und *Fraxinus excelsior* das *Aceri-fraxinetum* (ELLENBERG 1996). MAYER (1992) beschreibt den Bergahorn als wertholzfähige Laubbaumart, welche die ökonomische Leistungsfähigkeit von buchenreichen Beständen steigern kann. Waldbaulich gilt der Bergahorn als unkompliziert, er verjüngt sich intensiv und ist anfangs schattentolerant, jedoch ist er empfindlich gegenüber Trockenheit und benötigt daher genügend Wurzelraum (ROLOFF et al. 2010). Bergahorn benötigt eine gute Wasserversorgung, die im Gebirge zumeist gegeben ist, im Flachland jedoch unter weniger günstigen Bedingungen problematisch sein kann (LEMOINE et al. 2001).

A. pseudoplatanus bildet zerstreutporiges Holz mit relativ englumigen Wasserleitbahnen, die über Jahre hinweg aktiv bleiben (MATYSSEK et al. 2010). Als mittlerer Durchmesser der Gefäße sind Werte unter 100 µm beschrieben. Die Baumart weist insbesondere das Gefäßverschlusskonzept der Ausbildung von homogenem und fädigem Gummi auf (BONSEN 1991), was bei Verletzungen oder zur Pathogenabwehr gebildet wird.

Die Gattung *Acer* und insbesondere der Bergahorn wird von vielen Blattpilzen besiedelt (WULF 1989). Hauptsächlich sind folgende Erkrankungen verbreitet: der Ahornmehltau (*Sawadaea bicornis*), die Pleuroceras-Blattbräune (*Pleuroceras pseudoplatani*), die Teerfleckenkrankheit (*Rhytisma acerinum*) und die Weißfleckigkeit (*Cristulariella depraedans*) des Bergahorns (WULF 1994). Die entstehenden Blatterkrankungen haben jedoch kaum Auswirkungen auf die Wuchskraft der Bäume (BUTIN 1981, WULF 1989, KIRISITS 2007, BUTIN 2011). Weitaus gefährlicher ist der Erreger der Rußrindenkrankheit *Cryptostroma corticale*, welcher 2005 erstmalig in Deutschland nachgewiesen wurde und durch großflächige Sporenlager unter der Rinde gesundheitliche Schäden bei Menschen auslösen kann (METZLER 2006, ROBECK et al. 2008). Eine weitere neuartige Erkrankung der Gattung *Acer* ist der Ahornstammkrebs, hervorgerufen durch die invasive Art *Eutypella parasitica*, die 2013 erstmalig in Deutschland im Stadtgebiet von München detektiert wurde (CECH et al. 2016). Die Ahornarten gelten zudem als hochanfällig gegenüber *V. dahliae*, dem Erreger der Verticillium-Welke. Bei einem Befall mit dem bodenbürtigen Pilz kann es neben der Welke im Extremfall zum Absterben der Bäume kommen (BUTIN 2011), doch häufig erholen sich befallene Bäume in den folgenden Jahren wieder (HIEMSTRA & HARRIS 1998). SCHNEIDEWIND zeigte 2005, dass *V. dahliae* ausgeprägte Stammnekrosen an *A. pseudoplatanus* im unteren Stammbereich verursachen kann.

1.4 Zielsetzung

In den letzten Jahren wurden vielfach Stammnekrosen verursacht durch den bodenbürtigen Pilz *V. dahliae* an Bergahorn in bayerischen Wäldern diagnostiziert (SIEMONSMEIER et al. 2012). Klimatische Bedingungen mit erhöhten Temperaturen und längeren Trockenperioden während der Sommermonate begünstigen den thermophilen Erreger und erhöhen die Anfälligkeit der Wirtsbaumarten. Über die Verbreitung des Erregers der Verticillium-Welke ist in Wald und Forst bislang wenig bekannt (INDERBITZIN & SUBBARAO 2014), da bisherige Untersuchungen auf agrar- oder gartenbaulich genutzte Kulturpflanzen beschränkt waren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war (I.), die Entwicklung der durch *V. dahliae* verursachten Stammnekrosen in geschädigten Bergahornbeständen zu untersuchen, um ein besseres Verständnis von Symptomatik und Pathogenese zu gewinnen. Für morphologische Untersuchungen auf zellulärer Ebene sollten Stämme mit Nekrosen erstmalig mittels computertomographischer Verfahren und mikroskopischer Aufnahmen von Mikrotomschnitten analysiert werden. Um Schadschwellen zu identifizieren, sollte die Verbreitung der Dauerorgane von *V. dahliae* in den Böden von Bergahornbeständen und benachbarter Kontrollflächen ohne Wirtsbaumarten bestimmt werden.

Da sommerlicher Trockenstress bei einem Befall mit *V. dahliae* zu Stammschäden führen kann (SCHNEIDEWIND 2007) und die Verticillium-Welke intensiviert, sollte (II.) vor dem Hintergrund der sich ändernden klimatischen Bedingungen in zwei Versuchen unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden, inwiefern Trockenstress Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Bergahorn bei einer Infektion mit *V. dahliae* nimmt und ob Interaktionen zwischen beiden Faktoren bestehen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob (III.) auch Pilze der Gattung *Fusarium* an der Ausprägung von Welke an Bergahorn beteiligt sein könnten. Daher sollte durch die Infektion von Sämlingen und zweijährigen Bergahornen untersucht werden, ob *F. solani* ebenfalls als pathogen gegenüber Bergahorn einzustufen ist.

Anhand der neuen Technologie des *Next Generation Sequencing* sollte (IV.) *V. dahliae* in den Stammnekrosen nachgewiesen und quantifiziert werden. In den teils über zehn Jahre alten Nekrosen der Bergahorne hatten bereits starke Zersetzungsprozesse stattgefunden und Sekundärerreger den Verursacher verdrängt, weshalb *V. dahliae* nicht über die klassische PCR-Methodik mit artspezifischen Primern nachweisbar war. Daher sollte die Barcode-Region des ITS-Bereichs von pilzlicher DNA aus verschiedenen Bereichen von Stammnekrosen durch die Illumina-MiSeq-Sequenzierung generiert werden, um einen Erregernachweis zu erzielen.

2 Material und Methoden

2.1 Freilandstudien in Bergahornbeständen

2.1.1 Stammnekrosen in Erst- und Wiederaufforstungsflächen

2.1.1.1 Untersuchungsflächen

Im Rahmen des Projekts vom Fachgebiet Pathologie der Waldbäume der TU München und der Abteilung Waldschutz der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft wurde ein bayernweites Monitoring durchgeführt, um zu untersuchen in welchen Bergahornbeständen Stammnekrosen auftraten und wie sich diese entwickelten. Die Untersuchungsflächen waren vornehmlich auf Bestände fokussiert, die im Rahmen von Erst- oder Wiederaufforstungen gepflanzt wurden, wie z.B. nach den Stürmen Vivian und Wiebke im Jahr 1990. Nach Begutachtung von 35 geschädigten Bergahornbeständen fand eine Auswahl von zehn Untersuchungsflächen statt, die über die Projektlaufzeit beobachtet wurden (s. Abb. 5). Nahe der Bergahornbestände fand im Umkreis von maximal 100 m eine Anlage von Kontrollflächen ohne Wirtsbaumarten statt, in denen ebenfalls Bodenuntersuchungen durchgeführt wurden. Die Bergahorn- und Kontrollbestände wurden kreisförmig mit einem Durchmesser von 20 m angelegt. In den zehn Bergahorn-Untersuchungsflächen fand eine Aufnahme aller Baumarten mit Brusthöhendurchmesser (BHD) statt.

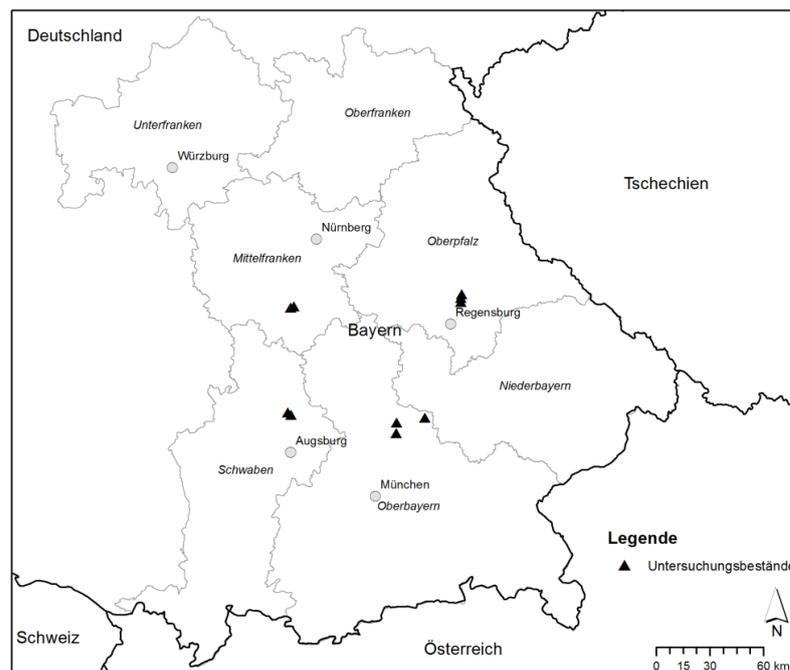


Abb. 5: Lage der zehn Untersuchungsflächen in Bayern: Bergahornbestände mit *Verticillium*-Stammnekrosen (Karte: B. Hausknecht).

Die für die Untersuchungen ausgewählten Bergahornbestände lagen im mittleren und südlichen Bayern auf einer Höhe um 500 m über NN und waren von den klimatischen und edaphischen Bedingungen relativ gut vergleichbar (s. Tab. 1, s. Anhang Tab. A1). Die Böden bestanden aus pseudovergleyten und podsoligen Braunerden mit guter Humusaufgabe. Auffällig war einzig im Bestand Mauern ein gestörter, heterogener Oberboden. Die Bestände in der Oberpfalz nördlich von Regensburg wiesen durch die geographische Lage ein leicht vermindertes Niederschlagsregime gegenüber den anderen Beständen auf.

Tab. 1: Bergahornbestände: Lage, Bestandesalter und Aufforstungsform der zehn Untersuchungsflächen im Jahr 2013, Kreisfläche mit einem Durchmesser von 20 m (EAF: Erstaufforstung, WAF: Wiederaufforstung).

Standort	Region	Bestandesalter [a]	Aufforstung
Mauern	Oberbayern	20	EAF
Jägersdorf	Oberbayern	22	EAF
Osseltshausen	Oberbayern	17	EAF
Drackenstein 1	Oberpfalz	25 - 40	WAF
Drackenstein 2	Oberpfalz	25 - 40	WAF
Drackenstein 3	Oberpfalz	> 40	WAF
Thannhausen 1	Mittelfranken	50	WAF
Thannhausen 2	Mittelfranken	50	WAF
Meitingen 1	Schwaben	24	EAF
Meitingen 2	Schwaben	24	EAF

2.1.1.2 Vermessung der Stammnekrosen

In den zehn Flächen wurden die Nekrosen der geschädigten Bergahorne vermessen. Dazu wurde die Ausdehnung der offenen Nekrosen mit einem Maßband in tangentialer und horizontaler Richtung und die Exposition mit Hilfe eines Kompasses bestimmt. Die Vermessung der Nekrosen der geschädigten Bergahorne erfolgte im Oktober 2012 und im Oktober 2014, um die Veränderung der Überwallungen über den zweijährigen Untersuchungszeitraum zu bestimmen. Zudem wurde die Länge der überwallten Nekrosen bzw. Wundleisten vermessen.

2.1.1.3 Computertomographische Aufnahmen

Die Anfertigung der CT-Scans der Bergahornstämme erfolgte in Kooperation mit Dr. Franka Brüchert der Abteilung Waldnutzung der Forstlichen Versuchsanstalt (FVA) Freiburg. Für die Untersuchung der Holzeigenschaften von Bergahornen mit Stammnekrose wurden in zwei Untersuchungsflächen in der Hallertau jeweils vier geschädigte und zwei gesunde Stämme ausgewählt. Die Bäume wurden gefällt und die Stämme im Bereich der Nekrose mit einer Länge von 2,5 m entnommen. Im Anschluss fand ein Scan mit dem Computertomographen CT.Log an der FVA Freiburg statt (s. Abb. 6), um die Ausbreitung von nekrotischem Gewebe und Verfärbungen im Holz zu analysieren.

Für die computertomographischen Analysen wurde mit einem rotierenden Röntgenstrahl (15 mA, 180 mV) durch den Stamm alle 5 mm ein Bild erzeugt, das den Stammabschnitt in seiner gesamten Länge spiralförmig erfasst. Aus den Daten wurden Querschnittsbilder erzeugt, die eine dreidimensionale Darstellung der Stämme erlaubten. Durch unterschiedliche Strahlungsabsorption der inneren Stammstrukturen wurden auf den CT-Bildern verschiedene Graustufen sichtbar gemacht. Durch die stärkere Strahlungsabsorption erschienen innere Strukturen mit höherer Dichte, wie zum Beispiel das wasserführende Splintholz oder das Spätholz eines Jahrrings, im CT-Bild heller. Bereiche niedrigerer Strahlungsabsorption, wie das Frühholz, nekrotisches Gewebe oder durch pilzlichen Holzabbau in der Dichte reduziertes Gewebe, erschienen im CT-Bild dunkler.



Abb. 6: Computertomograph CT.Log an der Forstlichen Versuchsanstalt Freiburg (Foto: N. Burgdorf).

2.1.1.4 Mikroskopische Aufnahmen

Die Anfertigung der Mikrotomschnitte, der mikroskopischen Aufnahmen und deren Auswertung wurde in Kooperation mit Gabriele Ehmcke von der Holzforschung München der TUM durchgeführt. Für die mikroskopischen Aufnahmen von geschädigtem Holzgewebe der Stammnekrosen fand eine Entnahme von Stammscheiben von fünf Stämmen aus zwei Bergahornbeständen in der Hallertau statt. Die Entnahmestellen innerhalb eines Stamms wurden mit den Buchstaben von A bis E gekennzeichnet (A: unterhalb der Nekrose, B: unterer Nekrosenabschnitt, C: mittlerer Nekrosenabschnitt, D: oberer Nekrosenabschnitt, E: oberhalb der Nekrose, s. Abb. 7). Im Anschluss fertigte die Holzforschung mikroskopische Aufnahmen von Mikrotomschnitten in Querschnitts-, Radial- und Tangentialrichtung an. Auf den Stammscheiben wurde ein Raster für den Zuschnitt aufgezeichnet, wobei insbesondere der Übergangsbereich von verfärbtem zu gesundem Gewebe von Interesse für die Analysen war. Das Raster wurde an die Ausformung der Verfärbungen auf dem Querschnitt angepasst. Die Größe der Prüfkörper lag bei einer Kantenlänge von etwa 1,5 cm. Nach dem Zuschnitt fand die Auswahl dreier Probestücke von einer Stammscheibe aus dem Übergangsbereich sowie einer Referenzprobe aus dem gesunden Bereich für die anatomische Betrachtung statt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte an Proben aus insgesamt 25 Stammscheiben.

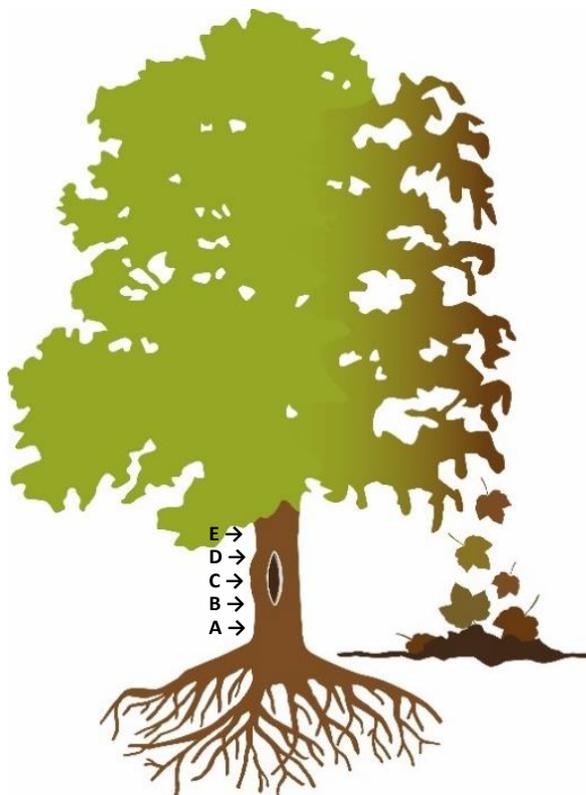


Abb. 7: Entnahmestellen der Stammscheiben für mikroskopische Untersuchungen von Stammnekrosen an der TUM Holzforschung (Graphik: C. Hopf).

Entnahmestellen:

- A: über dem Stammfuß unterhalb der Nekrose,
- B: im unteren Bereich der Nekrose,
- C: im mittleren Bereich der Nekrose,
- D: im oberen Bereich der Nekrose,
- E: oberhalb des offenen Holzkörpers.

Die Prüfkörper wurden in 70 %igem Ethanol zum Einweichen und Lagern eingelegt. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden ca. 25 µm dicke Mikrotomschnitte an einem Schlittenmikrotom (Leica Biosystems) erstellt. Die Anfertigung von je vier Dünnschnitten eines Prüfkörpers erfolgte entlang der drei anatomischen Hauptschnittrichtungen. Daraus wurden zwei ungefärbte und zwei gefärbte Präparate erstellt, welche eine Doppelfärbung mit Safranin für lignifizierte Zellen und mit Astrablau für Pilzhyphen durchliefen. Nach der Durchführung einer Alkoholreihe zur Entwässerung erfolgte die Einbettung der Mikrotomschnitte in Euparal. Die Trocknung der Präparate erfolgte in einem Wärmeschrank für 6 bis 8 Wochen. Die Untersuchungen erfolgten an einem mit einer AxioCam-Digitalkamera (Zeiss) ausgestattetem Durchlichtmikroskop (Zeiss).

2.1.1.5 Jahrringanalyse

Bei acht für die CT-Aufnahmen im Oktober 2013 entnommenen Bergahornen aus zwei stark geschädigten Bergahornbeständen in der Hallertau wurden Jahrringauszählungen der Überwallungen vorgenommen. Des Weiteren wurden Stammscheiben von sechs Stämmen, die für die Probenahme des *Next Generation Sequencing* (s. Kapitel 2.4.1) gefällt wurden, für die Auszählung genutzt. Die Auszählungen der Jahrringe der Überwallungen sollten für eine Datierung des Entstehungsjahres des Stammrisses herangezogen werden. Dazu wurden Stammscheiben aus dem mittleren Bereich der Nekrose getrocknet und geschliffen. Anschließend erfolgte eine wiederholte Auszählung der Jahrringe innerhalb der Überwallung unter dem Binokular.

2.1.2 Isolierung von *V. dahliae* aus Stammnekrosen

In zwei Bergahornbeständen in der Hallertau wurden im Herbst 2013 Stämme für die CT-Aufnahmen entnommen. Aus diesen Stämmen fand eine Probenahme von Spänen aus unterschiedlichen Höhen der Stammnekrosen mit Hilfe einer Bohrmaschine statt. Dafür wurden etwa handbreite Stammscheiben aus dem Bereich unterhalb (A) und oberhalb der Nekrose (E), im unteren (B), mittleren (C) und oberen Bereich der Nekrose (D) mit einer Kettensäge geschnitten (s. Abb. 7). In drei stark geschädigten Beständen bei Dachau, Augsburg und Regensburg wurden im Sommer 2015 jeweils zwei geschädigte Stämme entnommen und nach dem gleichen Raster Proben gewonnen. Aus drei Beständen in der Hallertau nördlich von München fand eine Probenahme von Ast- und Zweigmaterial aus dem Kronenbereich mit Hilfe eines Baumkletterers statt, da nach

HIEMSTRA (2014) ein Nachweis von *V. dahliae* insbesondere aus zweijährigem Zweigmaterial gut gelingt.

Für den morphologischen Nachweis von *V. dahliae* wurde eine Isolierung aus den Übergangsbereichen von gesundem zu verfärbtem Gewebe der Stammnekrosen von *Acer pseudoplatanus* durchgeführt. Dafür fand mit einer Bohrmaschine mit desinfiziertem Bohraufsatz eine Entnahme von Spänen aus den Stammscheiben statt. Von Zweigmaterial wurden Abschnitte nach einer zweiminütigen Oberflächensterilisation mit 3 %igem Natriumhydroxid und dreimaligem Waschen mit bidestilliertem Wasser getrocknet. Nach Entfernung der Rinde fand eine Abtragung dünner Gewebestücke statt. Die Späne wurden im Anschluss auf einen Streptomycin-haltigen *Potato Dextrose Agar* (PDA, Merck) sowie einen nährstoffarmen Wasseragar aufgelegt. Auf PDA bildet *V. dahliae* Myzel und Mikrosklerotien, kann aber durch andere konkurrenzstarke Pilze verdrängt werden. Daher wurde zusätzlich Material auf Wasseragar aufgelegt, auf dem das Wachstum vieler Arten unterdrückt wird, aber von *V. dahliae* in den Agar eingelassene Mikrosklerotien gebildet werden. Die Inkubation der mit Parafilm verschlossenen Petrischalen erfolgte bei 20°C im Klimaschrank. Nach drei bis vier Wochen erfolgte eine Auswertung der Platten mithilfe von Binokular und Mikroskop.

2.1.3 Verseuchungsgrad des Bodens

In den zehn Untersuchungsbeständen fand eine Entnahme von Bodenproben nach einem definierten Raster an 16 Punkten statt. Der Mittelpunkt der Fläche wurde eingemessen und markiert und bei jeder Probenahme ausgehend von diesem Punkt in einem je 45° voranschreitendem Winkel im Abstand von 3,3 m und 6,6 m zum Mittelpunkt ein Einschlag vorgenommen. Dafür wurde mit dem Pürckhauer bis in 30 cm Bodentiefe eingeschlagen und die Erde aus dem Gerät entnommen. Die Proben wurden zu einer Mischprobe vermengt, um eine Einschätzung des Bodenverseuchungsgrads des Bestandes treffen zu können. In zehn Kontrollflächen ohne Wirtsbaumarten erfolgte die Bodenprobenahme nach gleichem Raster. Die nahen Vergleichsbestände bei Thannhausen 1 und 2 waren mit Eichen und Buchen bestockt, die Vergleichsbestände bei Meitingen 1 und 2 waren mit Eichen und Linden bewachsen. Bei den weiteren Kontrollflächen handelte es sich um Fichten-Pflanzungen.

Die Aufarbeitung der Bodenproben erfolgte nach der Methodik von NEUBAUER & HEITMANN (2011). Die Bodenmischproben wurden bei Raumtemperatur für zwei Wochen getrocknet und anschließend auf 2 mm fein gesiebt. Mithilfe einer Vibrations-Nass-Siebmaschine (Retsch) fand eine Abtrennung der Bodenfraktion von 20 bis 125 µm Größe statt. In dieser Fraktion befanden

sich die Dauerorgane des Pilzes, die Mikrosklerotien (MS). Von der Bodenlösung wurden definierte Volumina auf Agarplatten mit einem Selektivnährmedium nach HARRIS et al. (1993) ausgebracht und im Klimaschrank inkubiert. Pro Probe sind zehn Wiederholungen angelegt worden. Nach drei Wochen konnten die Mikrosklerotien unter dem Binokular ausgezählt werden. Die Bodenprobenahme und Durchführung zur Bestimmung der Erregerdichte wurde im Herbst 2012, 2013 und 2014 in Bergahorn- und Vergleichsflächen durchgeführt.

Anhand der Mikrosklerotiedichte pro Gramm Boden können Flächen in Befallsklassen eingeteilt werden (s. Tab. 2). Mit dieser Methode ist jedoch keine Differenzierung zwischen den Arten *V. dahliae* und der an Kreuzblütlern pathogenen Art *V. longisporum* möglich, weshalb keine exakte Befallsprognose getroffen, sondern nur eine Einschätzung vorgenommen werden kann.

Tab. 2: Bodenverseuchungsgrad mit *V. dahliae* nach Mikrosklerotiedichte (NEUBAUER & HEITMANN 2011).

Befallsklasse	MS g ⁻¹ Boden	Verseuchungsgrad	Befallsrisiko
1	< 0,4	nicht nachweisbar	gering
2	0,4 - 2	gering	gering
3	2 - 5	mäßig - mittel	mittel
4	5 - 15	stark	groß
5	> 15	sehr stark	sehr groß

2.2 Einfluss von Trockenstress auf die Infektion mit *V. dahliae* bei Bergahorn

2.2.1 Vegetationshallenversuch unter kontrollierten Bedingungen

2.2.1.1 Versuchsvarianten

Zur Untersuchung des Einflusses von Trockenstress auf *V. dahliae*-inokulierten Bergahorn wurden Vegetationshallenversuche unter kontrollierten Bedingungen am Gewächshauslaborzentrum (GHL) Dürnast der TU München durchgeführt (s. Abb. 8). Pro Versuch wurden 192 Bergahorne aufgeteilt in sechs Versuchsvarianten mit jeweils 32 Bergahornen untersucht: Kontrollpflanzen und inokulierte Ahorne unter saisonalem feuchten (ca. 22 %), moderaten (ca. 17 %) und trockenen (ca. 12 %) Bodenwassergehalten (s. Tab. 3). Die Varianten wurden mit K für Kontrollpflanzen und VD für *V. dahliae*-infizierte Pflanzen gekennzeichnet, sowie mit F für feuchten, M für moderaten und T für trockenen Bodenwassergehalt während der Trockenstressphase benannt. Es wurden zwei Versuche unter annähernd gleichen Bedingungen durchgeführt. Der erste Versuch erfolgte von Herbst 2012 bis Herbst 2014, ein zweiter Versuch wurde von Herbst 2013 bis 2015 durchgeführt. Die zu Versuchsbeginn bei der Inokulation mit dem Welke-Erreger ½-jährigen Bergahorne (Herkunft 801 10) stammten vom Pflanzgarten Laufen der Bayerischen Staatsforsten.



Abb. 8: Bergahorne mit Bewässerungsanlage in der Vegetationshalle am Gewächshauslaborzentrum Dürnast der TU München (Foto: N. Burgdorf).

Tab. 3: Sechs Versuchsvarianten der Trockenstressversuche: Kontrollpflanzen (K) und mit *V. dahliae* (VD) inokulierte Bergahorne unter feuchtem (F), moderatem (M) und trockenem (T) Bodenwassergehalt während der sommerlichen Trockenstressphase (Versuch I: 6 Wochen, Versuch II: 8 Wochen, n=32).

Variante	Abkürzung	Inokulation	Volumetrischer Bodenwassergehalt	Bezeichnung für Bodenwassergehalt
Variante 1	K - F	PDB-Nährmedium	22 %	feucht
Variante 2	K - M	PDB-Nährmedium	17 %	moderat
Variante 3	K - T	PDB-Nährmedium	12 %	trocken
Variante 4	VD - F	<i>V. dahliae</i>	22 %	feucht
Variante 5	VD - M	<i>V. dahliae</i>	17 %	moderat
Variante 6	VD - T	<i>V. dahliae</i>	12 %	trocken

2.2.1.2 Inokulation mit *V. dahliae*

Die Inokulation wurzelnackter Bergahornsämlinge mit dem Erreger der Verticillium-Welke erfolgte nach der von BHAT & SUBBARAO (1999) und GOUD & THERMORSHUIZEN (2002) beschriebenen Wurzeltauchmethode. Das für die Versuche verwendete *V. dahliae*-Isolat wurde von *Acer pseudoplatanus* isoliert und stammte von Benedikt Heitmann von der Hochschule Osnabrück. Die Anzucht von *V. dahliae* erfolgte für drei Wochen in einer 1 %igen PDB-Lösung (*Potato Dextrose Broth*, Difco) in Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler mit 90 Umdrehungen min^{-1} bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung des Myzels und der Sporenlösung von *V. dahliae* mit einem Ultra-Turrax (IKA). Die Konidiendichte wurde in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und die gewünschte Konzentration durch Verdünnung eingestellt. Die Sporenlösung mit einer Konzentration von 1×10^6 Konidien ml^{-1} wurde während des Wurzeltauchens auf einem Magnetrührer (IKA) in Bewegung gehalten, um eine gleichmäßige Verteilung der Sporen beim Eintauchen jeder Pflanze zu gewährleisten. Die Wurzeln der Bergahorne wurden einzeln für jeweils 30 sec eingetaucht. Die Kontrollpflanzen wurden ebenfalls für 30 sec in eine sterile 0,5 %ige PDB-Lösung getaucht. Direkt im Anschluss wurden die Bergahorne in 15 l-Töpfe mit 12 kg Erde eingetopft. Die Bäume überwinterten in einem Gewächshaus des Gewächshauslaborzentrums Dürnast der TU München und wurden vor Austrieb in die Vegetationshalle umgestellt.

2.2.1.3 Randomisierte Blockanlage mit Bewässerung

Zu Beginn der Vegetationsperiode wurden die Pflanzen in einer randomisierten Blockanlage in einer überdachten, seitlich offenen Vegetationshalle aufgestellt. Ein Block bestand aus jeweils sechs Reihen der sechs Versuchsvarianten in randomisierter Aufstellung mit je acht Bergahornen einer Variante. Es wurden vier Blöcke nebeneinander angeordnet. Durch fünf Bodenwassergehaltssonden Echo 5 (Decagon Devices) wurde der volumetrische Bodenwassergehalt in fünf Pflanztöpfen pro Variante kontinuierlich aufgenommen, woraus ein mittlerer Bodenwassergehalt für jede Variante ermittelt wurde. Über die Steuerung mit Hilfe der Software LabVIEW (National Instruments) fand eine definierte Wasserzugabe über eine Magnetventilsteuerung bei Unterschreitung des Schwellenwerts von 12 %, 17 % und 22 % volumetrischem Bodenwassergehalt statt. Um innerhalb der insgesamt 32 Töpfe einer Variante Unterschiede auszugleichen, wurde vor und während der Trockenstressphase der Bodenwassergehalt mit einer TDR-Sonde Fieldscout 100 (Time Domain Reflektometrie-System, Campbell Scientific) bei allen Pflanzen aufgenommen und über eine definierte Wasserzugabe ein Ausgleich erbracht. Die Bewässerungsvarianten wurden in Versuch I für sechs Wochen von Anfang Juli bis Mitte August 2013 und in Versuch II für etwa acht Wochen von Ende Juni bis Ende August 2014 aufrechterhalten.

Für den ersten Trockenstressversuch fand als Substrat ein Boden aus einem Waldbestand Verwendung. Dafür wurde an mehreren Stellen im Kranzberger Forst nahe Freising der Oberboden abgetragen. Die Erde wurde auf 2 cm gesiebt und um eine Infektion mit bodenbürtigen Pilzen zu vermeiden bei 80°C für zwei Tage gedämpft. Der verwendete Boden aus schluffig-lehmigen Sand wies einen pH [H₂O]-Wert von 4,73 auf. Im zweiten Versuch fand ein Mutterboden aus dem Raum Freising Verwendung. Da vorab bei Nutzung des Bodens in einem anderen Versuch keine unerwünschten bodenbürtigen Infektionen bei Bergahorn feststellbar waren, wurde auf das Dämpfen der Erde im zweiten Versuch verzichtet. Die Erde bestand aus Tonschluff mit einem höheren pH [H₂O]-Wert von 7,95.

2.2.2 Klimatische Bedingungen

Während des ersten Trockenstressversuchs im Sommer 2013 korrelierten die natürlichen klimatischen Bedingungen gut mit der ab Anfang Juli beginnenden Trockenstressphase in der Vegetationshalle (s. Abb. 9). Die natürlichen warm-trockenen Bedingungen im Juli und August führten zu einer niedrigen Luftfeuchte bei einer intensiven PAR-Strahlung in der halboffenen Vegetationshalle (s. Anhang Tab. A6). Im Jahr 2014 folgte ein niederschlagsreicher Sommer, in dem während der experimentellen Trockenstressphase des zweiten Versuchs das natürliche Klima weniger mit den artifiziellen Versuchsbedingungen für die Bergahorne korrelierte (s. Abb. 10). Die hohen Niederschläge im Juli und August übten durch eine hohe Luftfeuchtigkeit vermutlich Einfluss auf die Pflanzen aus (s. Anhang Tab. A7).

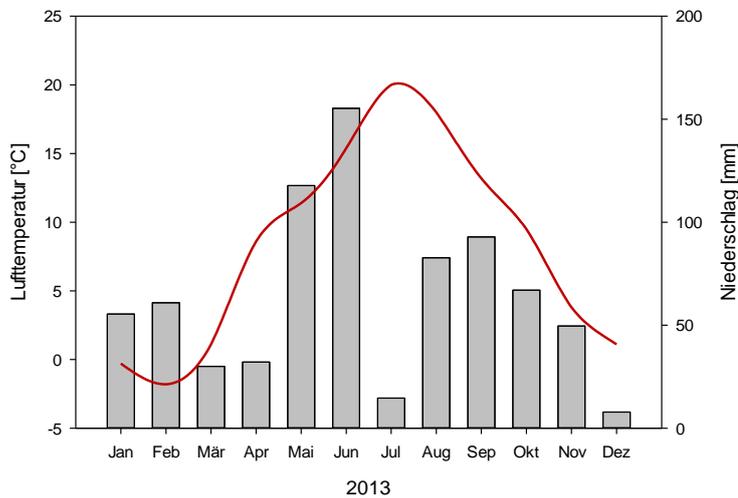


Abb. 9: Klimadiagramm für 2013 mit monatlicher Durchschnittstemperatur in 2 m Höhe (Linie) und monatlichem Niederschlag (Balken) am Messpunkt Weihenstephan.
(Quelle: Deutscher Wetterdienst)

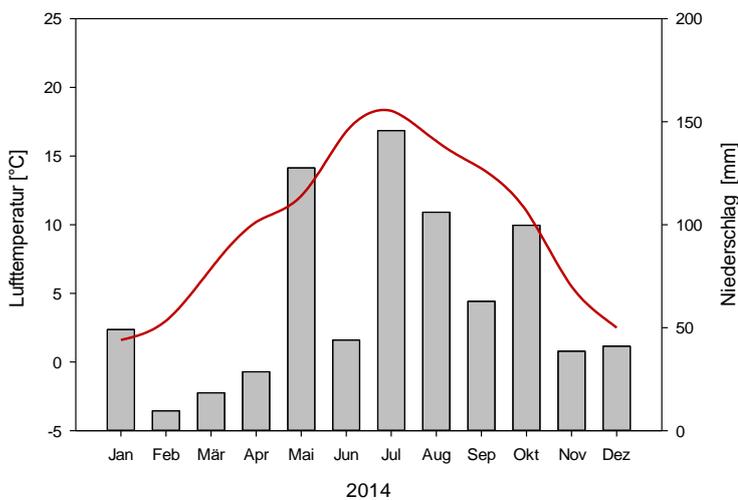


Abb. 10: Klimadiagramm für 2014 mit monatlicher Durchschnittstemperatur in 2 m Höhe (Linie) und monatlichem Niederschlag (Balken) am Messpunkt Weihenstephan.
(Quelle: Deutscher Wetterdienst)

2.2.3 Beurteilungsparameter

2.2.3.1 Welkesymptome

Ab Austrieb der Bergahorne wurden die Welkesymptome der 192 Bergahorne alle zwei Wochen mit Hilfe eines Boniturschlüssels nach NEUBAUER et al. (2007b) beurteilt (s. Tab. 4). Ahorne ohne Welkesymptome erhielten die Boniturnote 1, mit der Note 2 wurden leichte Vergilbungen erfasst, von 2 bis 8 waren zunehmende Anteile der Blätter mit Welke beschrieben und mit Boniturnote 9 wurde eine komplett abgestorbene Pflanze bewertet.

Tab. 4: Boniturskala der Welkesymptome nach NEUBAUER et al. (2007b).

Boniturnote	Befallssymptome
1	gesund, symptomlos
2	leichte Vergilbungen an einzelnen Blättern
3	Blattchlorosen und -Nekrosen, und/oder Welke an den ersten 1-2 Blättern
4	bis 25 % der Blätter einer Pflanze welken und beginnen einzutrocknen
5	bis 50 % der Blätter einer Pflanze welken und beginnen einzutrocknen
6	bis 75 % der Blätter einer Pflanze welken und beginnen einzutrocknen
7	bis 100 % der Blätter einer Pflanze welken und beginnen einzutrocknen
8	Pflanze welkt vollständig und beginnt einzutrocknen
9	Pflanze komplett abgestorben

Zur Gewichtung der gesamten über die Vegetationsperiode erfassten Boniturdaten wurde ein an den *Area Under Disease Progress Curve*-Wert AUDPC (SHANER & FINNEY 1977, CAMPBELL & MADDEN 1990) angelehnter AUWPC-Wert (*Area Under Wilt Progress Curve*) berechnet, der der Fläche unter der Befallsverlaufskurve entspricht.

2.2.3.2 Gaswechselfmessungen

Über die Vegetationsperiode wurden Gaswechselfmessungen mit dem portablen Gerät LI-6400 (LI-COR Biosciences) vorgenommen, um physiologische Auswirkungen der Infektion mit *V. dahliae* bei sommerlichem Trockenstress an Bergahorn zu untersuchen (s. Abb. 11). Das oberste vollständig entwickelte Blatt wurde in die Gaswechselfkuvette eingespannt. Bei einer eingestellten PAR-Strahlung von $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ und einer Temperatur von 25°C innerhalb der Kuvette fanden die Messungen der H_2O - und CO_2 -Konzentration gegenüber einer Referenzkammer mit definierten Gehalten von Wasser und Kohlendioxid statt. Aus den veränderten Konzentrationen von Wasser und Kohlendioxid waren die Photosyntheserate, Leitfähigkeit, blattinterne CO_2 -

Konzentration und Transpiration berechenbar. Für die Vergleichbarkeit der Messdaten an unterschiedlichen Terminen wurde bei möglichst optimaler natürlicher Photosyntheserate bei hoher Sonneneinstrahlung und Temperatur gemessen. Die Durchführung der Messungen erfolgte in beiden Trockenstressversuchen im etwa zweiwöchigen Rhythmus. In Versuch I wurde bei jeder Variante an jeweils acht Bergahornen eine Gaswechselfmessung durchgeführt, in Versuch II wurde bei 12 Pflanzen jeder Variante gemessen. Die Auswahl der Ahorne für die Messung erfolgte nach einem randomisierten Raster und wurde über die Messkampagne hinweg beibehalten.



Abb. 11: Gaswechselfmessung mit LI-6400 an Bergahorn in der Vegetationshalle am Gewächshauslaborzentrum Dürnast der TU München.

2.2.3.3 Hydraulische Leitfähigkeit

Für die Ermittlung der hydraulischen Leitfähigkeit des Xylems nicht-inokulierter und mit *V. dahliae* inokulierter Bergahorne wurden zu Versuchsende Pflanzen geerntet und der älteste Stammteil entnommen. Um Embolien zu vermeiden fand die Durchführung aller Schritte unter Wasser statt. Es wurde eine Lösung aus entionisiertem Wasser mit 1 mmol CaCl_2 und 10 mmol KCl hergestellt, was den natürlichen Xylemsaft simuliert. Die Präparate wurden in die Halterungen des Xyl'em-Plus (Bronkhorst) eingepasst. Zunächst wurde ein zehninütiger *Flush* durchgeführt, wofür Wasser mit Druck durch die Präparate gepresst wurde. Die Messung erfolgte bis sich der Wert für die Leitfähigkeit stabilisierte. Danach erfolgte ein zweiter zehninütiger *Flush* im *Low Pressure Mode*. Die Prozedur wurde wiederholt bis die Werte für die Leitfähigkeit stabil blieben. Anschließend fand eine Messung der Länge und des äußeren und inneren Durchmessers des

Splintholzes im Querschnitt statt, um die maximale hydraulische Leitfähigkeit k_{\max} berechnen zu können.

2.2.3.4 Wuchshöhe und Frischgewicht

Zur Beurteilung des Einflusses von Trockenstress auf die Infektion mit *V. dahliae* an jungen Bergahornen wurden die Parameter Wuchshöhe, Wurzelhalsdurchmesser und Sprossfrischgewicht aufgenommen. Die Wuchshöhe und der Wurzelhalsdurchmesser wurden zu Beginn und Ende der Vegetationsperiode erfasst. Die Bestimmung des Sprossfrischgewichts erfolgte zu Versuchsende. Da eine Reisolierung des Pilzes bei Versuchsende aus den Bergahorn Stämmchen als auch Messungen der hydraulischen Leitfähigkeit durchgeführt wurden, konnte das Sprosstrockengewicht nicht ermittelt werden. In Versuch I erfolgte zusätzlich eine Entnahme von Wurzelmaterial von je 8 Bergahornen jeder Variante für die Bestimmung des Wurzelfrischgewichts.

2.2.3.5 Reisolierung von *V. dahliae*

Für die Erfüllung der Koch'schen Postulate wurde *V. dahliae* aus den wurzelinfizierten Bergahornen reisoliert als auch Proben von Kontrollpflanzen entnommen. Bei Versuchsende wurde Gewebe aus Stammstücken nach einer einminütigen Oberflächensterilisation mit 70 %igem Ethanol und dreimaligem Waschen mit bidestilliertem Wasser und anschließendem Trocknen auf *Potato Dextrose Agar* (PDA) und Wasseragar (WA) aufgelegt und im Klimaschrank bei 20°C inkubiert. Nach einer dreiwöchigen Inkubationszeit wurden die Agarplatten auf ein Auswachsen von Myzel und Sklerotien von *V. dahliae* beurteilt (s. Abb. 12).



Abb. 12: *V. dahliae* auf *Potato Dextrose Agar*.

Für den molekularbiologischen Nachweis wurden aus den Stämmen der infizierten Bergahorne sowie von Kontrollpflanzen Späne entnommen. Aus dem Holz erfolgte eine Extraktion von DNA und eine PCR mit artspezifischen Primern (s. Kapitel 2.4.2). Für den Nachweis von *V. dahliae* fanden in Trockenstressversuch I die Primer DB19/DB22 nach CARDER et al. (1994) und in Trockenstressversuch II die Primer Df/Dr nach INDERBITZIN et al. (2013) Anwendung (s. Tab. 6, Kapitel 2.4.3.1).

2.3 Inokulation von Bergahorn mit *V. dahliae* und *F. solani*

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Arten der Gattung *Fusarium* spp. an der Ausprägung von Welke und Nekrosen bei Ahorn beteiligt sein könnten. Um die Infektion mit dem Erreger der Verticillium-Welke mit einem möglicherweise ähnliche Welkesymptome induzierenden Pathogen bei Bergahorn vergleichen zu können, wurden zwei Versuche durchgeführt. Es wurde ein Versuch in der Klimakammer mit Bergahornsämlingen und ein Versuch in der Vegetationshalle mit etwa zweijährigem Bergahorn bei Inokulation mit *V. dahliae* und *F. solani* durchgeführt. Das für die Versuche verwendete Isolat von *F. solani* wurde von Bergahorn isoliert und von Dr. Langer der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt Göttingen zur Verfügung gestellt. Das bereits in den Trockenstressversuchen verwendete *V. dahliae*-Isolat wurde ebenfalls von *Acer pseudoplatanus* isoliert und stammte von der Arbeitsgruppe von Prof. Neubauer der Hochschule Osnabrück.

2.3.1 Wurzeltauch-Inokulation von Bergahornsämlingen

Bergahornsämlinge mit dem zweiten voll ausgebildeten Blattpaar wurden im Klimakammerversuch unter kontrollierten Bedingungen mit *V. dahliae* sowie *F. solani* infiziert. Die Pflanzen der Herkunft 801 10 wurden vom Pflanzgarten Laufen der Bayerischen Staatsforsten zur Verfügung gestellt. Die Inokulation der Sämlinge mit *V. dahliae* erfolgte wie bereits wie in den Trockenstressversuchen (siehe Kapitel 2.2.1.2). Es wurde eine höhere Konzentration der Konidiensuspension mit 25×10^6 Sporen ml^{-1} verwendet.

Die Anzucht von *F. solani* erfolgte auf eingeweichten, autoklavierten Weizen in Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur. Die Sporen wurden nach zwei Wochen mit bidestilliertem Wasser abgeschwemmt. Nach Auszählung der Konidiendichte in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop, wurde die gewünschte Sporenkonzentration durch Verdünnung eingestellt. Die Konidiensuspension wurde auf einem Magnetrührer in Bewegung gehalten, um eine gleichmäßige Konzentration zu gewährleisten. Bei je 20 Pflanzen fand durch Eintauchen der Wurzeln für 30 sec in die jeweilige Konidiensuspension mit 25×10^6 Sporen ml^{-1} eine Inokulation mit den Pathogen *V. dahliae* sowie *F. solani* statt. 20 Kontrollpflanzen wurden für 30 sec in eine 0,5 %ige *Potato Dextrose Broth*-Lösung getaucht. Anschließend wurden die Sämlinge in Vermiculit in Multitopfpfplatten gepflanzt und in der Klimakammer bei tags 20°C und nachts 15°C bei einer PAR-Strahlung von $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % inkubiert.

2.3.2 Stamm-Inokulation von Bergahornen

Zweijährige Bergahorne wurden in der Vegetationshalle des Gewächshauslaborzentrums Dürnast durch eine Rindenverletzung mit den Erregern *V. dahliae* und *F. solani* infiziert. Den Ahornen wurde mit Hilfe eines Korkbohrers etwa 10 cm über dem Stammfuß auf der sonnenabgewandten Seite eine 5 mm große Verletzung beigefügt. Im Anschluss wurde ein 5 mm großes mit *V. dahliae* beziehungsweise *F. solani* bewachsenes Agarstück aufgesetzt und mit Parafilm fixiert. Auf die Rindenverletzung bei den Kontrollpflanzen wurde ein unbewachsenes Agarstück gesetzt. Die Infektion erfolgte Anfang Juni 2014 an je zehn Bergahornen pro Variante in der Vegetationshalle. Die Bergahorne wuchsen unter normalen Temperatur- und Strahlungsbedingungen und wurden mit Hilfe einer Bewässerungsanlage versorgt.

2.3.3 Boniturparameter

Im Klimakammerversuch wurden alle zwei Wochen die Wuchshöhe und die Welkesymptome der wurzelinfizierten Sämlinge nach einem fünfklassigen Boniturschlüssel aufgenommen (s. Tab. 5). Anfang August fand eine Gaswechsellmessung mit dem LI-6400 an je zehn Pflanzen statt (s. Kapitel 2.2.3.2).

Die zweijährigen Bergahorne in der Vegetationshalle wurden über die Vegetationsperiode 2014 beobachtet und nach dem gleichen Boniturschlüssel hinsichtlich des Auftretens von Welke bonitiert. Zu Versuchsbeginn und Versuchsende im Mai 2015 erfolgte die Aufnahme von Wuchshöhe und Wurzelhalsdurchmesser. Zu Versuchsende wurde das Sprossfrischgewicht der Pflanzen bestimmt und durch das Aufspalten des Stämmchens die Verfärbungen des Splintholzes vermessen.

Tab. 5: Boniturskala der Welkesymptome.

Boniturnote	Symptome
1	gesund, symptomlos
2	bis 25 % der Blätter einer Pflanze welken und beginnen einzutrocknen
3	bis 50 % der Blätter einer Pflanze welken und beginnen einzutrocknen
4	bis 75 % der Blätter einer Pflanze welken und beginnen einzutrocknen
5	bis 100 % der Blätter einer Pflanze verwelkt, Pflanze abgestorben

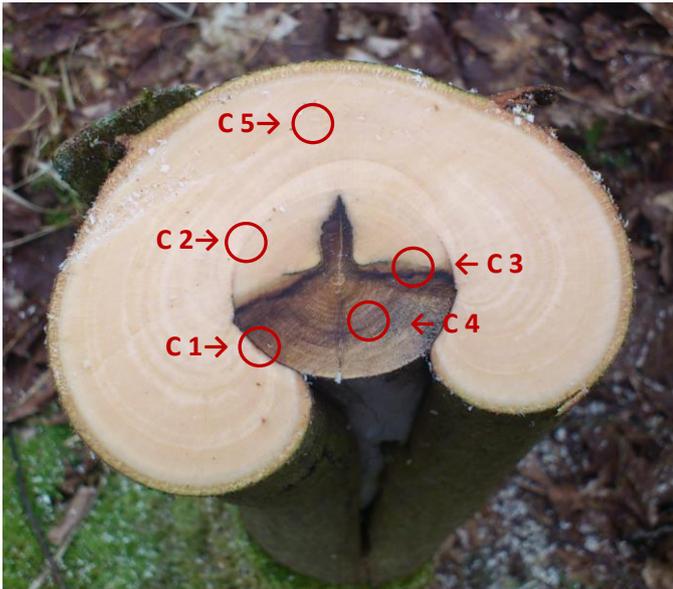
2.4 Molekularbiologischer Nachweis

2.4.1 Probenahme

Für den molekularbiologischen Nachweis mit Hilfe der neuen Technologie des *Next Generation Sequencing* (NGS) wurden aus fünf geschädigten Bergahornbeständen (Mauern und Jägersdorf nördlich von München, Drackenstein nahe Regensburg, Meitingen nahe Augsburg und ein Bestand bei Dachau) jeweils zwei Stämme mit Nekrose entnommen. Es wurden zwei NGS-Miseq-Sequenzierungen (Illumina) durchgeführt.

Für die erste Sequenzierung von Stammnekrosen aus den Beständen bei Mauern und Jägersdorf wurde eine Stammscheibe unterhalb der Nekrose (Probe A), im unteren Bereich (B), im mittleren Bereich (C), im oberen Bereich (D) und oberhalb des Stammschadens (E) entnommen (s. Abb. 7, Kapitel 2.1.1.4). Aus den Stammscheiben wurden mit einer vor jedem Schritt mit 70 %igen Ethanol desinfizierten Bohrmaschine an je drei Stellen des Übergangsbereichs von verfärbtem zu gesundem Gewebe Holzspäne entnommen. In der Vakuumgefriertrocknung (SP Scientific) wurde den Proben das Wasser entzogen und anschließend wurde das Material in der Kugelmühle (Retsch) in 2 ml Eppendorf Cups für 30 min fein gemahlen. Die Proben wurden bis zur DNA-Extraktion bei -40°C eingefroren. In den Beständen bei Mauern und Jägersdorf fand zudem die Entnahme von Blatt- und Zweigmaterial aus der Baumkrone mit Hilfe eines Baumkletterers statt. Bei etwa zweijährigen Zweigmaterial wurde nach einer Oberflächensterilisation mit 70 %igen Ethanol und dreimaligem Waschen mit bidestilliertem Wasser die Rinde entfernt. Im Anschluss wurden an drei Stellen Holzspäne gewonnen und zu einer Probe vermengt.

In drei Bergahornbeständen in der Hallertau (Mauern, Jägersdorf, Osseltshausen) und dem Bestand Meitingen fand eine Entnahme von Bodenproben mit Hilfe eines Pürckhauers an 16 Einstichstellen statt, die im Anschluss getrocknet, homogenisiert und auf 2 mm fein gesiebt wurden. Zudem wurden aus den Mikrosklerotien-Agarplatten (s. Kapitel 2.1.3) mit Hilfe einer Impfnadel unter dem Binokular Sklerotien aus den Pektatagar herausgelöst, getrocknet und in Eppendorfcups in der Kugelmühle gemahlen. Alle Proben wurden bis zur DNA-Extraktion bei -40°C eingefroren.



Proberaster für 2. Sequenzierung:

- C1: Jahrring der Stammrisszone,
- C2: gesunder Jahrring fortlaufend vom Jahrring, von dem der Riss ausging,
- C3: Übergangsbereich radial von gesundem zu nekrotischem Gewebe,
- C4: mittleres nekrotisches Gewebe,
- C5: gesundes Überwallungsgewebe.

Abb. 13: Probeschema für die zweite Amplikon-Sequenzierung im mittleren Bereich von sechs Stammnekrosen (Foto: N. Burgdorf).

In der zweiten Illumin-MiSeq-Sequenzierung wurden auf halber Länge der Nekrosen von sechs Stämmen aus drei Beständen (Drackenstein, Meitingen, Dachau) an verschiedenen Stellen Proben entnommen (s. Abb. 13). Der Bestand nahe Dachau, der nicht zu den zehn Untersuchungsflächen zählte, wurde aufgrund der extremen Ausprägung von Stammnekrosen an Bergahornen und Eschen für eine Probenahme für die zweite Sequenzierung ausgewählt.

Für die Sequenzierung wurden nach einem definierten Probeschema im Querschnittsbereich Holzspäne entnommen. Im mittleren Bereich wurde der nekrotische Jahrring, von dem der Stammriss ausging (Probe C1), der gesunde fortlaufende Jahrring der Stammrisszone (C2), der radiale Übergangsbereich von gesundem zu verfärbtem Gewebe (C3), innerhalb des nekrotischen Gewebes (C4) und im Überwallungsgewebe (C5) beprobt. Zusätzlich fanden wie im ersten Sequenzierungsschema Probenahmen unterhalb und oberhalb der Nekrose (Probe A und E) als auch in 5 m Höhe statt. Zudem wurde in jedem Bestand ein asymptomatischer Bergahornstamm entnommen und Späne auf 0,5 m und 1 m Höhe für die NGS-Probenahme gewonnen.

Es wurden an jeweils drei Stellen mit einer durch Tauchen des Aufsatzes in 70 %iges Ethanol desinfizierten Bohrmaschine Späne gebohrt und zu einer Mischprobe vereinigt. Anschließend wurden die Holzspäne in der Vakuumgefrieretrocknung getrocknet, in 2 ml Eppendorfcups in der Kugelschwingmühle fein gemahlen und bis zur DNA-Extraktion bei -40°C eingefroren.

2.4.2 Amplifikation

2.4.2.1 DNA-Extraktion und Aufreinigung

Die DNA-Extraktion aus Holz- und Pflanzenmaterial erfolgte mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die Extraktion aus Bodenmaterial wurde mit dem PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobia) durchgeführt, die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung der DNA wurde mit dem Wizard DNA Clean-up System (Promega) durchgeführt. Bei Proben, die nach der Aufreinigung kein Amplikon lieferten, wurde eine zweite Reinigung mit dem MagMAX DNA Magnetic Bead Kit (Ambion) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Da sich die Gewinnung von DNA aus den melanisierten Dauerstadien schwierig gestaltete, wurden zum Aufbrechen der Mikrosklerotien je 500 mg getrockneter Boden in 2 ml Eppendorfcups eingewogen und für 2 min in Flüssigstickstoff gefroren und anschließend 2 min im Wasserbad bei 70°C erhitzt. Dieser Prozess wurde in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

2.4.2.2 Messung der DNA-Gehalte

Die DNA-Gehalte der Proben wurde mit dem Fluorometer Qubit 2.0 (Invitrogen) bestimmt, wofür das DNA Broad Range Assay (Invitrogen) verwendet wurde. Für die PCR mittels artspezifischer Primer fand eine Probemenge von 2 µl DNA Einsatz. Für die NGS-Sequenzierung (Illumina) wurde insgesamt eine Menge von 10 ng DNA eingesetzt.

2.4.2.3 Amplifikationsbedingungen

Die Durchführung der Amplifikation fand in 25 µl PCR-Reaktionsgefäßen im Thermocycler C1000 Touch (Biorad) statt. Im Thermocycler wurden die jeweiligen PCR-Bedingungen entsprechend des verwendeten Primerpaares eingestellt (s. Anhang Tab. A16).

PCR-Ansatz:	12,5 µl Maxima Hot Start PCR Mastermix (Thermo Fisher)
	5 µl H ₂ O
	1,5 µl Primer 1 (10 mM)
	1,5 µl Primer 2 (10 mM)
	2,5 µl BSA
	2 µl DNA

2.4.2.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Amplikons erfolgte in einem 1,5 %igen Agarosegel für 60 min mit einer Spannung von 90 mV in der mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (Merck) befüllten Gelelektrophoresekammer. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel mit Midori Green (Biozym) gefärbt. Die Längenmarker und Banden der DNA wurden in der Geldokumentation unter UV-Licht (Intas) sichtbar gemacht und mit einer Fotoaufnahme dokumentiert. Ein Längenmarker mit definierten DNA-Fragmenten von 50-1000 bzw. 100-1500 Basenpaaren (Thermo Scientific) wurde stets in der Elektrophorese mitgeführt. Zur Ergebnisabsicherung wurde bei jeder PCR eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt, um falsch negative/positive Ergebnisse auszuschließen.

2.4.3 Nachweismethoden

2.4.3.1 PCR mit artspezifischen Primern

Die DNA wurde mittels PCR mit artspezifischen Primern (s. Tab. 6) nach den jeweiligen PCR-Bedingungen (s. Anhang Tab. A16) vervielfältigt. Als Referenz wurde in der PCR eine Positivkontrolle mit DNA von *V. dahliae* (CBS 130 341) sowie eine Negativkontrolle mit Wasser verwendet. Die Primerpaare gelten mit Einschränkungen als artspezifisch für *V. dahliae*. Das Primerpaar VdTubF2/VdTubR4 codiert in der β -Tubulinregion von *V. dahliae* und *V. longisporum*, wobei ein zweites Primerpaar VITubF2/VITubR1 (DEBODE et al. 2011) für die Differenzierung von *V. longisporum* hinzugezogen werden muss. Das Primerpaar Df/Dr kann unter Verwendung mehrerer Primer bei Durchführung einer Multiplex-PCR nach Inderbitzin et al. (2013) ebenfalls zwischen *V. dahliae* und drei Linien von *V. longisporum* unterscheiden.

Tab. 6: Primerpaare für *V. dahliae* mit Sequenzangabe in 5'-3'-Richtung, Genlokus, Größe des Amplikons und Literaturangabe (SCAR: Sequenz-charakterisierte amplifizierte Region).

Primer	Primersequenz	Genlokus	Amplikongröße (bp)	Referenz
Df	CCG GTC CAT CAG TCT CTC TG	ITS	490	INDERBITZIN et al. 2013
Dr	CTG TTG CCG CTT CAC TCG			
DB19	CGG TGA CAT AAT ACT GAG AG	SCAR	580	CARDER et al. 1994
DB22	GAC GAT GCG GAT TGA ACG AA			
VerBt-F	AAC AAC AGT CCG ATG GAT AAT TC	β -Tubulin	115	ATALLAH et al. 2007
VertBt-R	GTA CCG GGC TCG AGA TCG			
VdTubF2	GGC CAG TGC GTA AGT TAT TCT	β -Tubulin	82	DEBODE et al. 2011
VdTubR4	ATC TGG TTA CCC TGT TCA TCC			

2.4.3.2 Next Generation Sequencing

Für die Illumina-Amplikon-Sequenzierung der pilzlichen DNA aus den Holz- und Bodenproben (s. Tab. 7 und 8) wurde das Primerpaar ITS 1F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA A-3' (GARDES & BRUNS 1993) und ITS 2 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' (WHITE et al. 1990) verwendet. Die Primer wurden für eine Unterscheidung der einzelnen Proben mit einer 7 bis 12 Nukleotide langen Erkennungs-Sequenz markiert, da alle Amplikons vor der Sequenzierung gepoolt und gemeinsam sequenziert werden. Mit den markierten ITS 1F/ITS 2-Primern wurde die DNA vervielfältigt, die für die ITS 1-Region (*Internal Transcribed Spacer*) der pilzlichen rDNA codiert. Die nichtcodierende

ITS-Region, die keinem Selektionsdruck unterliegt, wurde in der Sequenzierung verwendet, da der Bereich hoch variabel und konserviert ist und in vielen Wiederholungen nacheinander im Genom vorliegt. Diese pilzliche Barcode-Region (SCHOCH et al. 2012) wurde bereits vielfach für phylogenetische Untersuchungen verwendet. Mittels Illumina-MiSeq Technologie wurde die ITS 1-Region (s. Abb. 14) mit einer Größe um 230-280 bp der Gesamtheit der im Gewebe der Stammnekrosen oder der in den Bodenproben befindlichen Ascomyceten und Basidiomyceten sequenziert.

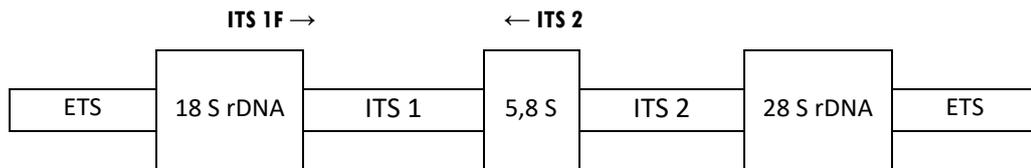


Abb. 14: ITS-Region (*Internal Transcribed Spacer*) der ribosomalen DNA von Eukaryonten mit Bindungsstellen der verwendeten Primer.

Als erster Schritt wurde eine PCR durchgeführt, wobei für jede Probe drei Wiederholungen mit je 25 µl als auch eine Positiv- und eine Negativkontrolle angesetzt wurden. Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte unter folgenden Bedingungen: Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 min in Einzelstränge erfolgte eine 30 sec Denaturierung, woraufhin das Annealing der Primer bei 58°C für 15 sec erfolgte und im Anschluss die Anlagerung und Synthese der Nukleotide durch die *Taq*-Polymerase bei 72°C für 30 sec stattfand. Die Schritte 2 bis 4 wurde in 35 Zyklen wiederholt. Abschließend fand eine finale Elongation zu doppelsträngiger DNA durch die *Taq*-Polymerase bei 72°C für 10 min statt.

Durch die Gelelektrophorese erfolgte die Kontrolle, ob die Vervielfältigung der ITS 1-Region erfolgreich war (s. Abb. 15). Bei gelungener Amplifikation wurden die drei Proben gepoolt. Im Anschluss wurden mit Hilfe des MagJet Magnetic Bead Kits (Thermo Scientific) überschüssige Nukleotide, Primer und die *Taq*-Polymerase entfernt und der DNA-Gehalt mit dem fluorometrischen Qubit (Invitrogen) gemessen.



Abb. 15: Amplikons der Proben 11 bis 14 der ITS 1-Region nach PCR mit Primerpaar ITS 1F/ITS 2 für Illumina-MiSeq-Sequenzierung.

Nach Vereinigen aller Amplikons mit jeweils gleichem DNA-Gehalt zu einer Mischprobe von insgesamt 10 ng DNA und nochmaliger Aufreinigung mittels MagJet Magnetic Bead Kit und DNA-Quantifizierung mit dem DNA Broad Range Assay, erfolgte die Sequenzierung der Amplikons durch die Illumina-MiSeq-Technologie, was extern durch die Firma Eurofins ausgeführt wurde.

Als *Next Generation Sequencing* (NGS) wird eine Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode bezeichnet, bei der parallel mehrere Millionen Sequenzen aus einer gepoolten Probe generiert werden. Das Sequenzierungssystem stammt von der Firma Illumina (San Diego, USA), die zugrundeliegende Technologie wird als *Sequencing By Synthesis* bezeichnet.

Die gepoolten Proben wurden zunächst an die Sequenzierungsadapter ligiert, die die Adaptersequenzen für die Bindung an die Flusszelle des MiSeq als auch die Sequenzen für die Sequenzierungsprimer enthalten. Diese Sequenzierungs-Library-DNA wurde im Sequenziergerät auf einen Glasobjektträger aufgetragen, auf dem anschließend die Reaktion stattfand. Der Amplifikations-schritt erfolgte in einer sogenannten Brücken-PCR. Im *Paired End*-Modus wurden beide DNA-Stränge mit einer Länge bis 300 Basenpaaren sequenziert, wobei *Forward*- und *Reverse-Reads* generiert wurden. Die *Reads* bestehen aus kurzen Nukleotidsequenzen mit einer Größe bis 300 Basenpaaren. Während der Sequenzierung wurde durch die Abspaltung von Basen-spezifischen Fluoreszenz-markierten Molekülen ein Lichtsignal generiert, das detektiert wurde. Nach der Sequenzanalyse wurden die *Paired End-Reads* den ursprünglichen Proben durch die Erkennungssequenzen zugeordnet.

Für die bioinformatische Auswertung fand die methodische Pipeline nach BÁLINT et al. (2014) unter Linux Mint 17.3 Anwendung (s. Abb. 16). Verwendet wurden ausschließlich Sequenzen, die keinen Basenfehler im *Forward*- und *Reverse-Read* aufwiesen. Die *Reads* bestanden nach Abschluss der Auswertung aus etwa 160 Basenpaaren langen Sequenzen und konnten für die taxonomische Zuordnung über die DNA-Sequenzdatenbanken UNITE genutzt werden.

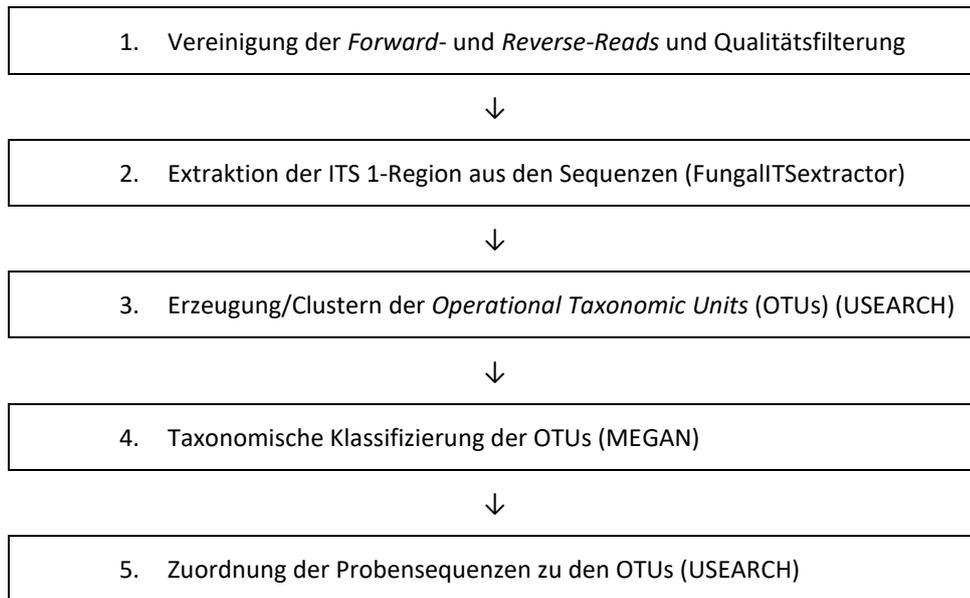


Abb. 16: Auswertungspipeline für NGS-Proben mit Angabe zur Software.

Die phylogenetische Identifikation erfolgte über ein Clustering gleicher Sequenzen, die als *Operational Taxonomic Unit* (OTU) zusammengefasst wurden. Nach der taxonomischen Zuordnung der OTUs konnten anhand der Anzahl der Sequenzen, die *V. dahliae/longisporum* zugeordnet wurden, die relativen Häufigkeiten in der jeweiligen Probe bestimmt werden. Anhand der Basenabfolge in der ITS 1-Region sind viele beschriebene Pilz-Arten durch Abgleich der generierten Sequenzen der OTUs über die Sequenzdatenbanken wie GenBank und UNITE mittels BLAST-Algorithmus (ALTSCHUL et al. 1990) identifizierbar.

Die OTUs wurden mithilfe der Datenbank UNITE bekannten Arten oder Gattungen mit einem *Similarity Index* von 98 % zugeordnet, woraus sich eine Auflistung aller OTUs der Proben generierte. Der E-Value gibt die Wahrscheinlichkeit an, ob die Ähnlichkeit des sequenzierten Amplikons im Abgleich zu bekannten Sequenzen der genutzten Datenbank ein zufälliges Ergebnis ist. Je kleiner der Wert, desto unwahrscheinlicher ist eine falsche Zuordnung. Für die Qualitätsabsicherung der Zuordnung auf Art-Ebene fand ein weiterer Abgleich der am häufigsten detektierten OTUs mittels Nukleotid-BLAST über die Sequenzdatenbanken statt.

Tab. 7: Probenpool A für die erste Amplikon-Sequenzierung der ITS 1-Region von DNA aus Holzmaterial von Stammnekrosen der Standorte Mauern und Jägersdorf (A: unterhalb der Nekrose, B: im unteren Bereich, C: im mittleren Bereich, D: im oberen Bereich, E: oberhalb des Stammschadens), Zweig- und Blattmaterial, Proben aus Boden und Mikrosklerotien-Agarplatten von vier Standorten und Laborkontrollen mit Angabe zum DNA-Gehalt nach PCR (*: Bei Mau 1D konnte keine PCR-fähige DNA extrahiert werden).

Nr.	Standort	Lage in Nekrose	Probe	ng/ μ l DNA
1	Mauern	unterhalb	Mau 1A	19,7
2	Mauern	unteres Ende	Mau 1B	11,0
3	Mauern	Mitte	Mau 1C	16,5
4	Mauern	oberes Ende	Mau 1D	5,0
5	Mauern	oberhalb	Mau 1D	-*
6	Mauern	unterhalb	Mau 2A	13,7
7	Mauern	unteres Ende	Mau 2B	14,3
8	Mauern	Mitte	Mau 2C	21,6
9	Mauern	oberes Ende	Mau 2D	5,5
10	Mauern	oberhalb	Mau 2E	14,6
11	Mauern	Zweig	Mau Zweig	7,9
12	Mauern	Blatt	Mau Blatt	5,8
13	Jägersdorf	unterhalb	Jäg 1A	24,3
14	Jägersdorf	unteres Ende	Jäg 1B	25,3
15	Jägersdorf	Mitte	Jäg 1C	23,8
16	Jägersdorf	oberes Ende	Jäg 1D	2,9
17	Jägersdorf	oberhalb	Jäg 1E	5,4
18	Jägersdorf	unterhalb	Jäg 2A	4,4
19	Jägersdorf	unteres Ende	Jäg 2B	24,8
20	Jägersdorf	Mitte	Jäg 2C	26,8
21	Jägersdorf	oberes Ende	Jäg 2D	10,7
22	Jägersdorf	oberhalb	Jäg 2E	5,2
23	Jägersdorf	Zweig	Jäg Zweig	8,8
24	Jägersdorf	Blatt	Jäg Blatt	13,5
25	Mauern	Boden	Mau Boden	49,9
26	Jägersdorf	Boden	Jäg Boden	63,9
27	Osseltshausen	Boden	Oss Boden	73,4
28	Meitingen	Boden	Mei Boden	50,4
29	Mauern	Mikrosklerotien	Mau MS	29,9
30	Jägersdorf	Mikrosklerotien	Jäg MS	48,6
31	Osseltshausen	Mikrosklerotien	Oss MS	37,7
32	Meitingen	Mikrosklerotien	Mei MS	42,8
34	Positivkontrolle	V2 Dürnast Stamm	V2 Stamm	4,1
35	Positivkontrolle	V2 Dürnast Boden	V2 Boden	11,5
36	Laborkontrolle 1	VT, VD, FS, TA, TV, ME	Lab K 1	54,1
37	Laborkontrolle 2	VT, VD, FS, TA, TV, ME	Lab K 2	2,7
38	Negativkontrolle	<i>Fusarium circinatum</i>	FC	37,2

Tab. 8: Probenpool B für die zweite Amplikon-Sequenzierung der ITS 1-Region von DNA aus Holzmaterial von Stammnekrosen der Standorte Drackenstein, Meitingen und Dachau (A: unterhalb der Nekrose, C: im mittleren Bereich mit Differenzierung (s. Abb. 13), E: oberhalb des Stammschadens) und Laborkontrollen mit Angabe zum DNA-Gehalt nach PCR (*: Bei insgesamt 8 Proben konnte keine PCR-fähige DNA extrahiert werden).

Nr.	Standort	Lage in Nekrose	Probe	ng/ μ l DNA
1	Drackenstein	unterhalb	Drack 1 A	18,9
2	Drackenstein	Jahrring Stammriss	Drack 1 C1	5,3
3	Drackenstein	Jahrring gesund	Drack 1 C2	3,1
4	Drackenstein	Übergang radial	Drack 1 C3	3,2
5	Drackenstein	Mitte der Nekrose	Drack 1 C4	69,1
6	Drackenstein	Überwallungsgewebe	Drack 1 C5	5,8
7	Drackenstein	oberhalb	Drack 1 E	6,0
8	Drackenstein	5 m Höhe	Drack 1 F	7,2
10	Drackenstein	unterhalb	Drack 2 A	2,4
11	Drackenstein	Jahrring Stammriss	Drack 2 C1	13,6
12	Drackenstein	Jahrring gesund	Drack 2 C2	3,9
13	Drackenstein	Übergang radial	Drack 2 C3	8,5
14	Drackenstein	Mitte der Nekrose	Drack 2 C4	90,1
15	Drackenstein	Überwallungsgewebe	Drack 2 C5	12,6
16	Drackenstein	oberhalb	Drack 2 E	8,8
17	Drackenstein	5 m Höhe	Drack 2 F	2,3
19	Drackenstein	Bah gesund	Drack 3 A	14,1
20	Drackenstein	Bah gesund	Drack 3 B	11,1
21	Meitingen	unterhalb	Mei 1 A	3,1
22	Meitingen	Jahrring Stammriss	Mei 1 C1	3,0
23	Meitingen	Jahrring gesund	Mei 1 C2	1,9
24	Meitingen	Übergang radial	Mei 1 C3	10,0
25	Meitingen	Mitte der Nekrose	Mei 1 C4	50,8
26	Meitingen	Überwallungsgewebe	Mei 1 C5	7,2
27	Meitingen	oberhalb	Mei 1 E	5,4
28	Meitingen	5 m Höhe	Mei 1 F	20,7
29	Meitingen	unterhalb	Mei 2 A	8,6
30	Meitingen	Jahrring Stammriss	Mei 2 C1	11,4
31	Meitingen	Jahrring gesund	Mei 2 C2	12,6
32	Meitingen	Übergang radial	Mei 2 C3	2,1
33	Meitingen	Mitte der Nekrose	Mei 2 C4	11,1
34	Meitingen	Überwallungsgewebe	Mei 2 C5	29,0
35	Meitingen	oberhalb	Mei 2 E	.*
36	Meitingen	5 m Höhe	Mei 2 F	3,8
37	Meitingen	Bah gesund 0,5 m	Mei 3A	.*
38	Meitingen	Bah gesund 1 m	Mei 3B	.*
39	Dachau	unterhalb	Dach 1 A	27,3
40	Dachau	Jahrring Stammriss	Dach 1 C1	.*
41	Dachau	Jahrring gesund	Dach 1 C2	6,3

42	Dachau	Übergang radial	Dach 1 C3	4,2
43	Dachau	Mitte der Nekrose	Dach 1 C4	10,4
44	Dachau	Überwallungsgewebe	Dach 1 C5	-*
45	Dachau	oberhalb	Dach 1 E	-*
46	Dachau	5 m Höhe	Dach 1 F	7,6
47	Dachau	unterhalb	Dach 2 A	3,7
48	Dachau	Jahrring Stammriss	Dach 2 C1	4,9
49	Dachau	Jahrring gesund	Dach 2 C2	7,8
50	Dachau	Übergang radial	Dach 2 C3	2,5
51	Dachau	Mitte der Nekrose	Dach 2 C4	5,0
52	Dachau	Überwallungsgewebe	Dach 2 C5	3,8
53	Dachau	oberhalb	Dach 2 E	31,9
54	Dachau	5 m Höhe	Dach 2 F	-*
55	Dachau	Bah gesund 0,5 m	Dach 3 A	0,8
56	Dachau	Bah gesund 1 m	Dach 3 A	-*
57	Positivkontrolle	VL CBS 110 233	<i>V. longisporum</i>	104,0
58	Positivkontrolle	VT CBS 447.54	<i>V. tricorpus</i>	8,7
59	Laborkontrolle	VT, VD, FS, FA, TA, TV, ME	Lab K 3	62,1
60	Negativkontrolle	FC	<i>F. circinatum</i>	79,6

2.5 Statistische Datenauswertung

Die Daten wurden mithilfe des Programms SPSS Statistics 25 (IBM) analysiert. Die Welke-Indices der beiden Trockenstressversuche wurden in R 3.5.0 (R Development Core Team) ausgewertet. Die Normalverteilung wurde nach Shapiro-Wilk getestet. Bei Datensätzen, die keine Normalverteilung aufwiesen, wurde eine Datentransformation vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde bei allen Datenanalysen auf $p=0,05$ gesetzt, was einem Konfidenzintervall von 95 % entspricht.

Zur Analyse der Veränderung der Stammnekrosen wurde der T-Test mit gepaarten Stichproben durchgeführt. Die Dichte der Dauerorgane in Bergahorn- und Vergleichsflächen wurde mit dem T-Test analysiert, bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-Rangsummentest angewandt.

Für die Datenanalyse beider Trockenstressversuche wurden faktorielle Varianzanalysen (*Analysis of Variance*, ANOVA) durchgeführt, um zu untersuchen, welche Haupteffekte signifikant waren. Zur Testung der Varianzhomogenität für die ANOVA wurde der Levene-Test durchgeführt. Die nichtparametrischen Datensätze der Welke-Indices wurden nach Datentransformation mit dem Conover-Test (CONOVER & IMAN 1981) in R 3.5.0 mit dem Package `conover.test` (Version 1.1.5) analysiert. Bei signifikanten Unterschieden zwischen den Haupteffekten in der ANOVA wurden *Post hoc*-Tests mit multiplen paarweisen Vergleichen nach Tukey-HSD (*Honestly Significant Difference*) durchgeführt. Die AUWPC-Werte des zweiten Trockenstressversuchs wurden durch Anwendung des Duncan-*Post hoc*-Tests analysiert (DUNCAN 1955).

Für die Datenanalyse der Infektionsversuche in der Klimakammer mit *V. dahliae* und *F. solani* wurde die einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, bei den nichtparametrischen Datensätzen der Welke-Indices fand der Kruskal-Wallis-Test (KRUSKAL & WALLIS 1952) Anwendung.

Die Signifikanzen der Haupteffekte der faktoriellen ANOVA wurden in Tabellen gekennzeichnet mit Sternen angegeben ($p > 0,05$: n.s. (nicht signifikant); $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***). Die Ergebnisse durch den T-Test und der *Post hoc*-Vergleiche nach Tukey-HSD, Conover, Duncan etc. wurden in die Graphiken anhand von Buchstaben gekennzeichnet (gleiche Buchstaben: keine signifikanten Unterschiede, unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede).

3 Ergebnisse

3.1 Freilandstudien in Bergahornbeständen

3.1.1 Stammnekrosen in Erst- und Wiederaufforstungsbeständen

Im Rahmen eines bayernweiten Monitorings wurden im Herbst 2012 über 35 Bergahornbestände hinsichtlich des Auftretens von Stammnekrosen und Verticillium-Welke untersucht. In zehn ausgewählten Untersuchungsflächen, die kreisförmig mit einem Durchmesser von 20 m angelegt wurden, wiesen 33 % der Bergahorne Stammnekrosen im unteren Stammbereich auf. Der Großteil der Stammnekrosen überwallte, da der Zeitpunkt der Entstehung bereits Jahre zurücklag (s. Abb. 17 A-D, 18 A-D). Auch waren endogene Risse zu beobachten, die nach außen mit einer Wundleiste verschlossen waren (s. Abb. 17 C). Bei dem am stärksten geschädigten Bestand Thannhausen 1 wiesen 57 % der Ahorne Stammschäden auf (s. Tab. 9). Im vergleichsweise jungen Bestand Osseltshausen waren im August 2012 und 2013 Symptome der Triebwelke sichtbar, doch waren keine Nekrosen am Stamm ausgebildet. In acht weiteren Bergahornbeständen wiesen 24 bis 49 % der Bäume Stammschäden auf, bei denen mechanische Verletzungen als auch Sonnenbrand als Ursache ausgeschlossen werden konnten.

Im Querschnitt der Nekrosen waren Verfärbungen zu beobachten, die häufig einen großen Anteil des gesamten Holzkörpers einnahmen (s. Abb. 18 B), wobei im Überwallungsbereich gesundes Gewebe zu sehen war. Knapp ein Drittel der geschädigten Bergahorne wies zwei oder mehrere Nekrosen oder Wundleisten auf, wovon ein Teil annähernd oder komplett geschlossen war. Bei den Verfärbungen waren zwei Bereiche zu differenzieren. Einerseits waren olivgrüne Verfärbung einzelner Jahrringe zu beobachten, die als relativ typisch für eine Besiedlung des Gewebes

Tab. 9: Bestandesalter, Anzahl der Bergahorne, prozentualer Anteil der Bergahorne mit Stammnekrose und Anzahl anderer Bäume in zehn Untersuchungsflächen im Jahr 2013 (Kreisfläche, d=20 m).

Standort	Bestandesalter [a]	Bergahorne [n]	Bergahorne mit Nekrose [%]	Andere Bäume [n]
Mauern	18	70	49	2
Jägersdorf	20	75	24	11
Osseltshausen	15	58	0	5
Drackenstein 1	25 - 40	45	27	0
Drackenstein 2	25 - 40	46	35	4
Drackenstein 3	> 40	21	24	6
Thannhausen 1	50	57	57	10
Thannhausen 2	50	36	36	11
Meitingen 1	22	33	33	14
Meitingen 2	22	41	41	8

von Ahorn durch *V. dahliae* gelten, andererseits waren braune Verfärbungen des Gewebes, die sich bis ins Mark ausdehnten zu beobachten. In zwei Fällen waren im Querschnitt mehrere Jahrringe mit dunkelgrüner Verfärbung sichtbar, jedoch war nach außen hin nur ein Stammriss ausgeprägt (s. 17 C, D). Das Bestandesalter lag zwischen etwa 15 und 50 Jahren.

Absterbe-Erscheinungen wurden bei Bergahornen nur vereinzelt beobachtet. Im Rahmen der Flächenauswahl im Sommer und Herbst 2012 konnten auch Stammrisse und Nekrosen an Spitzahorn (*Acer platanoides* L.) und Gemeiner Esche (*Fraxinus excelsior* L.) festgestellt werden.

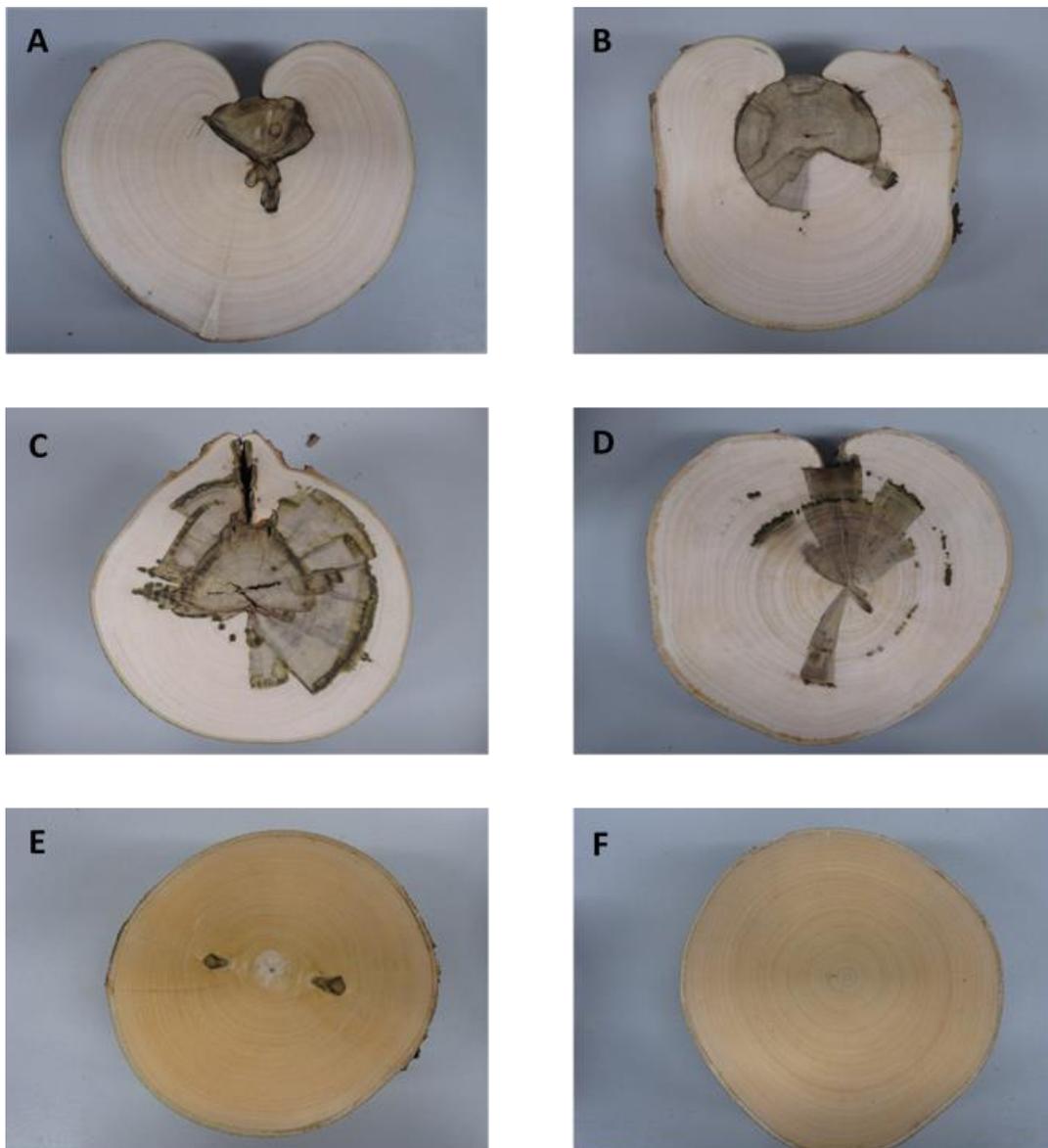


Abb. 17 A-F: Bergahorne im Querschnitt, A, B: überwallende Stammnekrose ausgehend von einem Jahrring mit Verfärbungen, C: endogene Stammrisse nach Infektionen in verschiedenen Jahrringen, D: Stammnekrose nach Infektion in verschiedenen Jahrringen E, F: Bergahorne ohne Stammschaden, Bestand Jägersdorf, Hallertau (Fotos: N. Burgdorf).

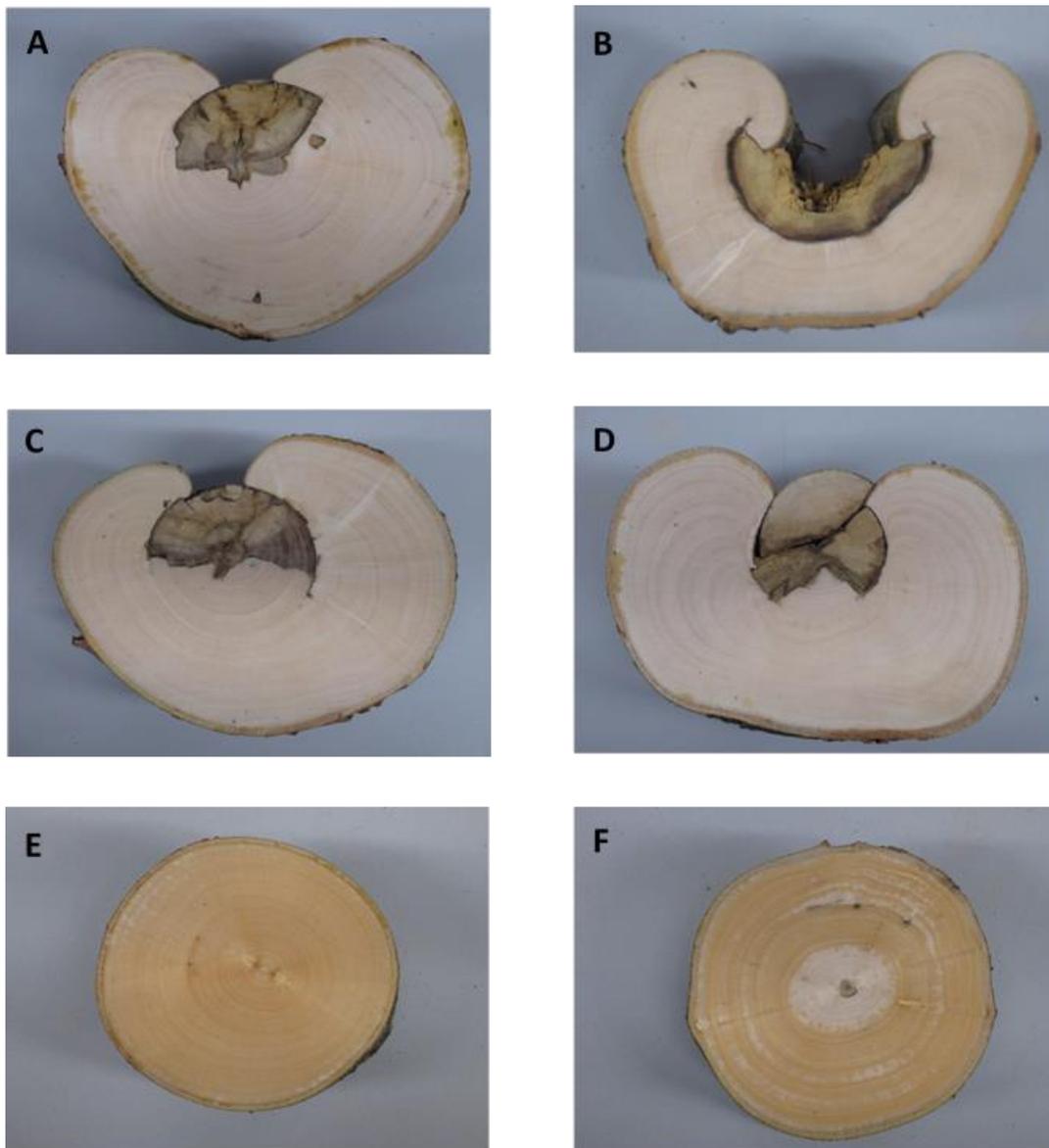


Abb. 18 A-F: Bergahorne im Querschnitt, A: überwallende Stammnekrose und Verfärbungen des Holzkörpers, B: Stammnekrose mit stark zersetztem Holzkörper, C: überwallende Stammnekrose mit Verfärbungen, D: Stammnekrose mit gebrochenem Holzkörper, E, F: Bergahorne ohne Stammschaden, Bestand Mauern, Hallertau (Fotos: N. Burgdorf).

3.1.1.1 Exposition der Nekrosen

Die Stammnekrosen traten an den Bergahornen der Untersuchungsbestände in allen Expositionen auf. Im Mittel waren mehr als 20 % in jeweils südlicher und südöstlicher Exposition ausgerichtet (s. Abb. 19), ein Anteil von 17 % war in nordwestlicher Exposition ausgebildet und jeweils 10 bis 12 % der Stammrisse traten in nördlicher, östlicher und südwestlicher Ausrichtung auf. Die Nekrosen waren somit relativ variabel in der Exposition, mit der Ausnahme des Bestandes bei Mauern, in dem ein großer Anteil der offenen Nekrosen in süd-südwestlicher Richtung auftrat.

Da bei etwa einem Drittel der geschädigten Bergahorne häufig mehrere Risse mit versetzter Exposition beobachtet wurden, waren Sonnenbrand und Frostriss als Ursache weitestgehend auszuschließen, zumal die Untersuchungsflächen in geschlossenen Beständen ohne Waldrandlage eingerichtet wurden.

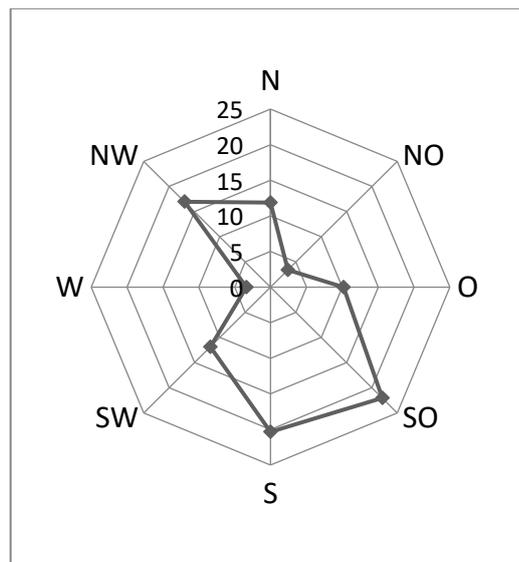


Abb. 19: Prozentuale Anteile der Exposition der Nekrosen.

3.1.1.2 Computertomographische Aufnahmen

An der FVA Freiburg wurden computertomographischen Aufnahmen von acht geschädigten und vier gesunden Bergahornen erstellt. Die etwa 20-jährigen Bergahorne wurden im Bereich über dem Stammfuß mit einer Länge von 2,5 m gescannt und wiesen einen BHD von 7 bis 19 cm auf. Bei den geschädigten Stämmen waren in den Bereichen der Nekrosen intensive Verfärbungen des Holzes erkennbar. Einerseits wurden durch die CT-Scans dunkle Verfärbungen in den Stammrissbereichen im Vergleich zum gesunden Gewebe sichtbar, die sich vom oberflächlichen Bereich der Nekrose teils bis ins Mark ausdehnten. Die sich dunkel abgrenzenden Abschnitte, die aus Bereichen geringerer Strahlungsabsorption hervorgingen, deuten auf in der Dichte reduziertes Gewebe hin, wie es im Frühholz, in nekrotischem Gewebe und nach pilzlichem Holzabbau entsteht. Andererseits waren helle Bereiche sichtbar, die durch Einlagerungen von Inhaltsstoffen oder von Wasser entstanden sind, was im CT aufgrund erhöhter Strahlungsabsorption hell erschien.

Die Verfärbungen der Jahrringe, die im CT als helle Bereiche abgrenzbar waren, dehnten sich radial im Holzkörper aus (s. Abb. 20). Die Verfärbungen gingen zudem in axialer Richtung teils weit über den Bereich des offenen Holzkörpers hinaus. Bei sechs der acht gescannten Bergahorne mit Nekrose war ein einzelner Jahrring verfärbt (s. Abb. 21 A, B, 22 A-D). Bei zwei Ahornen war eine Verfärbung mehrerer Jahrringe zu beobachten, wobei jedoch nur ein Stammriss

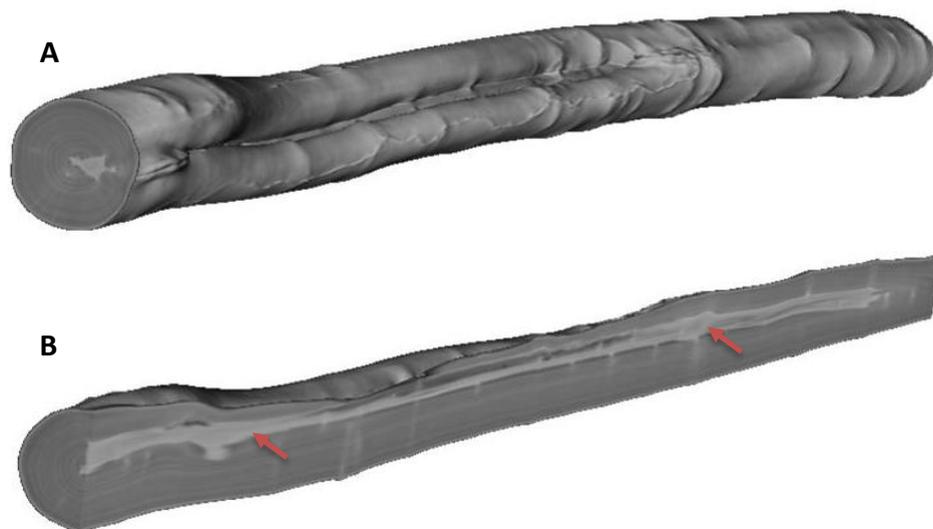


Abb. 20: Computertomographische Aufnahme eines Bergahorns mit Stammnekrose mit einer Länge von 2,5 m aus der Hallertau, A: überwallende Nekrose in Aufsicht, B: Radialschnitt durch Nekrose mit hellen Verfärbungen (markiert mit roten Pfeilen) durch Gewebeverdichtungen (CT-Scan: FVA Freiburg).

ausgeprägt wurde (s. Abb. 21 C, D), was auf eine Mehrfachinfektion mit dem Erreger der Verticillium-Welke hindeutet. Die im CT hell erscheinenden Bereiche deckten sich insbesondere mit den optisch dunkelgrün gefärbten Jahrringen.

Bei den asymptomatischen Bergahornen, die als Kontrollbäume entnommen wurden, waren keine deutlichen Verfärbungen sichtbar (s. Abb. 21 E, F, 22 E). Nur bei einem Stamm war eine leichte helle Verfärbung in einem Jahrring zu beobachten (s. Abb. 22 F), was sich mit der optischen Ausprägung deckte (s. Abb. 18 F).

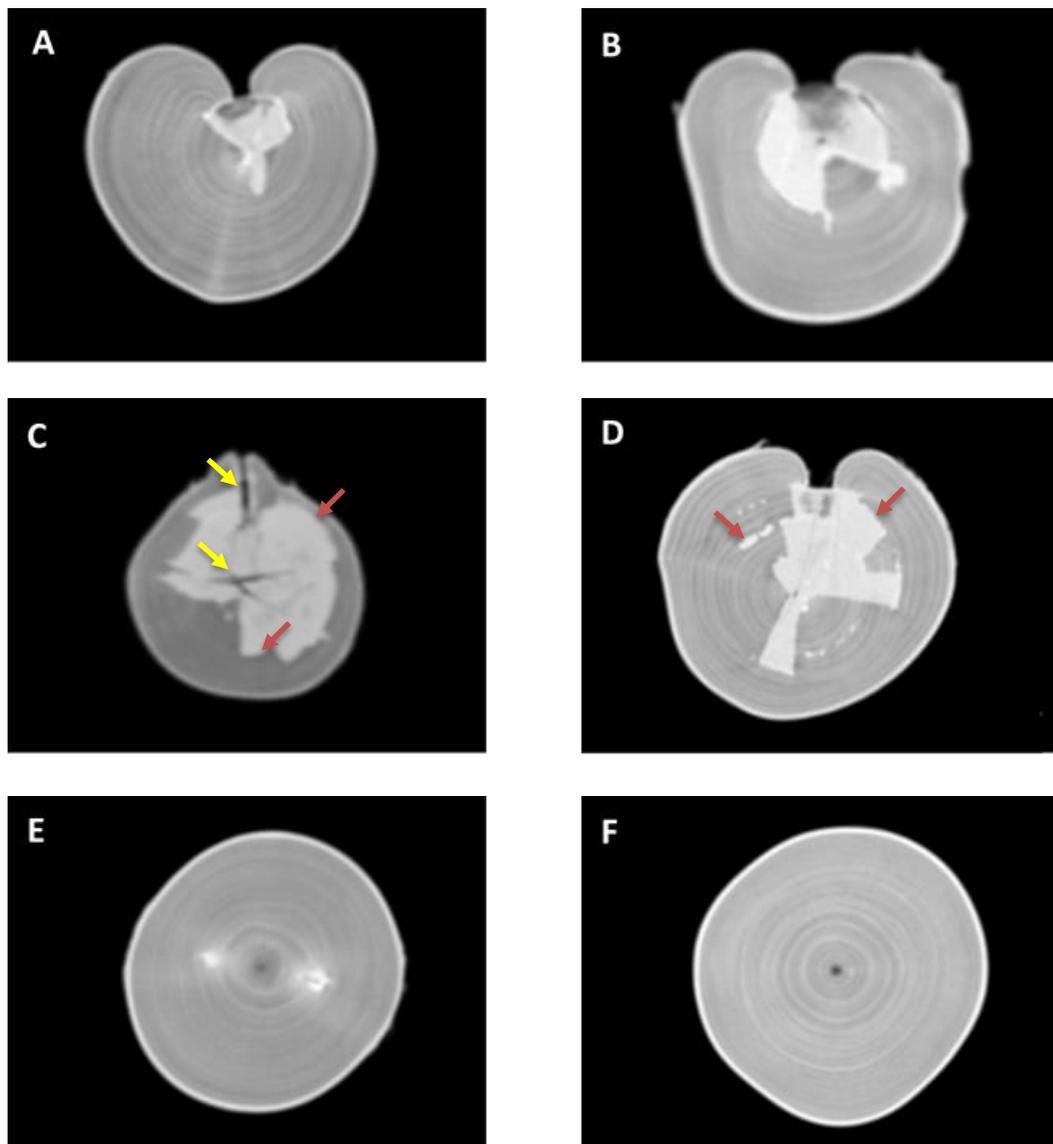


Abb. 21 A-F: CT-Aufnahmen von Bergahornen im Querschnitt, A, B: Stammnekrose mit dunklem nekrotischen und hellem verdichteten Gewebe, C: Ahorn mit endogenen Stammrissen (markiert mit gelben Pfeilen) und mehreren hell gefärbten Jahrringen (markiert mit roten Pfeilen), D: Stammnekrose mit mehreren hell gefärbten Jahrringen (markiert mit roten Pfeilen), E, F: Bergahorne ohne Stammnekrose, Bestand Jägersdorf (CT-Scan: FVA Freiburg).

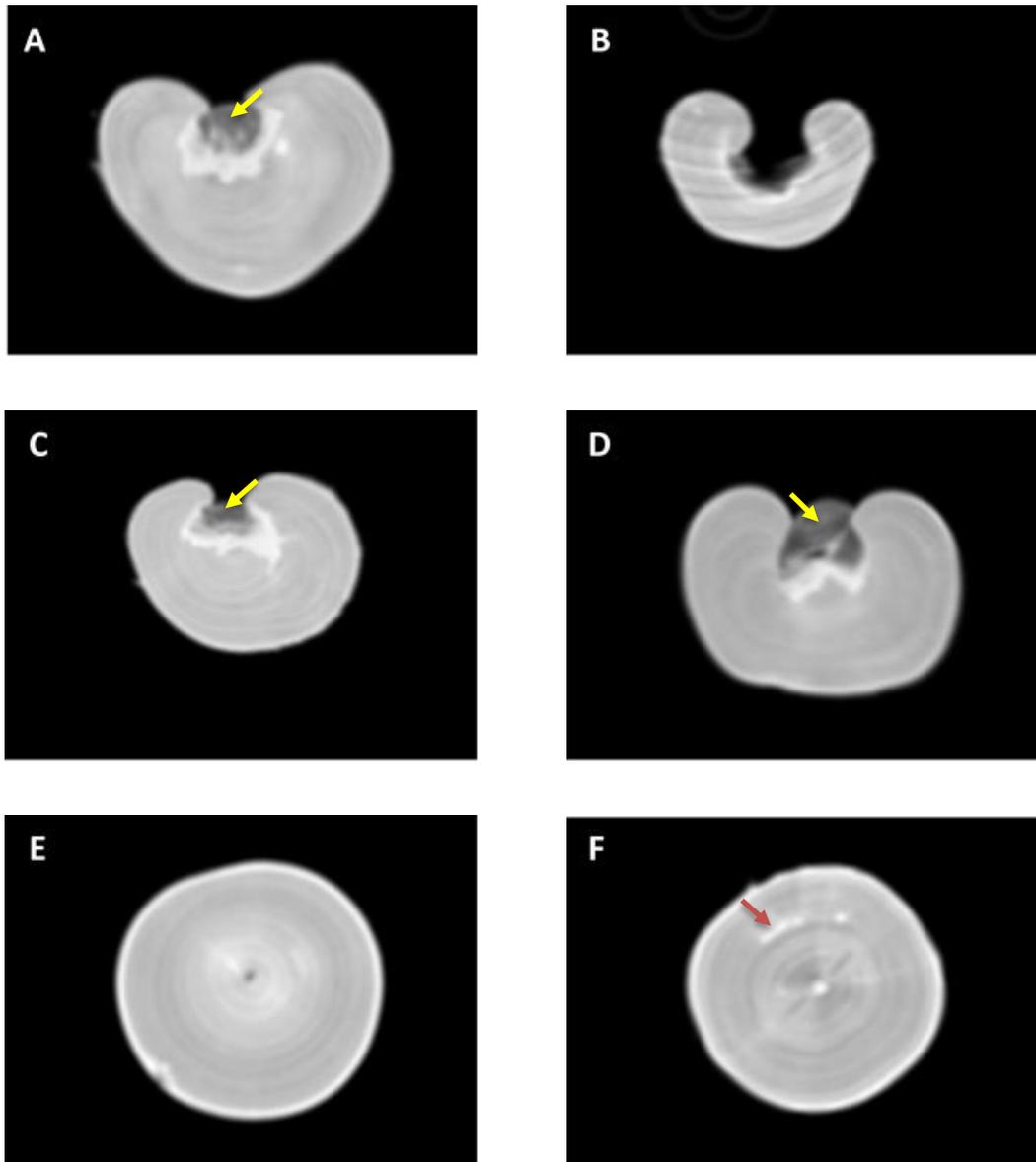


Abb. 22 A-F: CT-Aufnahmen von Bergahornen im Querschnitt, A-D: mittlerer Bereich der Nekrose mit dunklem nekrotischen (markiert mit gelben Pfeilen) und hellem verdichteten Gewebe und mit Überwallung, E, F: Bergahorne ohne Stammschaden (helle Verfärbung in Jahrring markiert mit rotem Pfeil), Bestand Mauern (CT-Scan: FVA Freiburg).

3.1.1.3 Mikroskopische Aufnahmen

Aus den Beständen in der Hallertau wurden fünf Bergahorne mit überwallender Stammnekrose für lichtmikroskopische Untersuchungen an der TUM Holzforschung entnommen (s. Abb. 23). Dafür wurden in verschiedenen Bereichen von fünf Nekrosen Mikrotomschnitte in Querschnitts-, Tangential- und Lateral-Richtung in Bereichen des Übergangs von verfärbtem zu gesundem Gewebe als auch Proben aus gesunden Bereichen mikroskopiert.

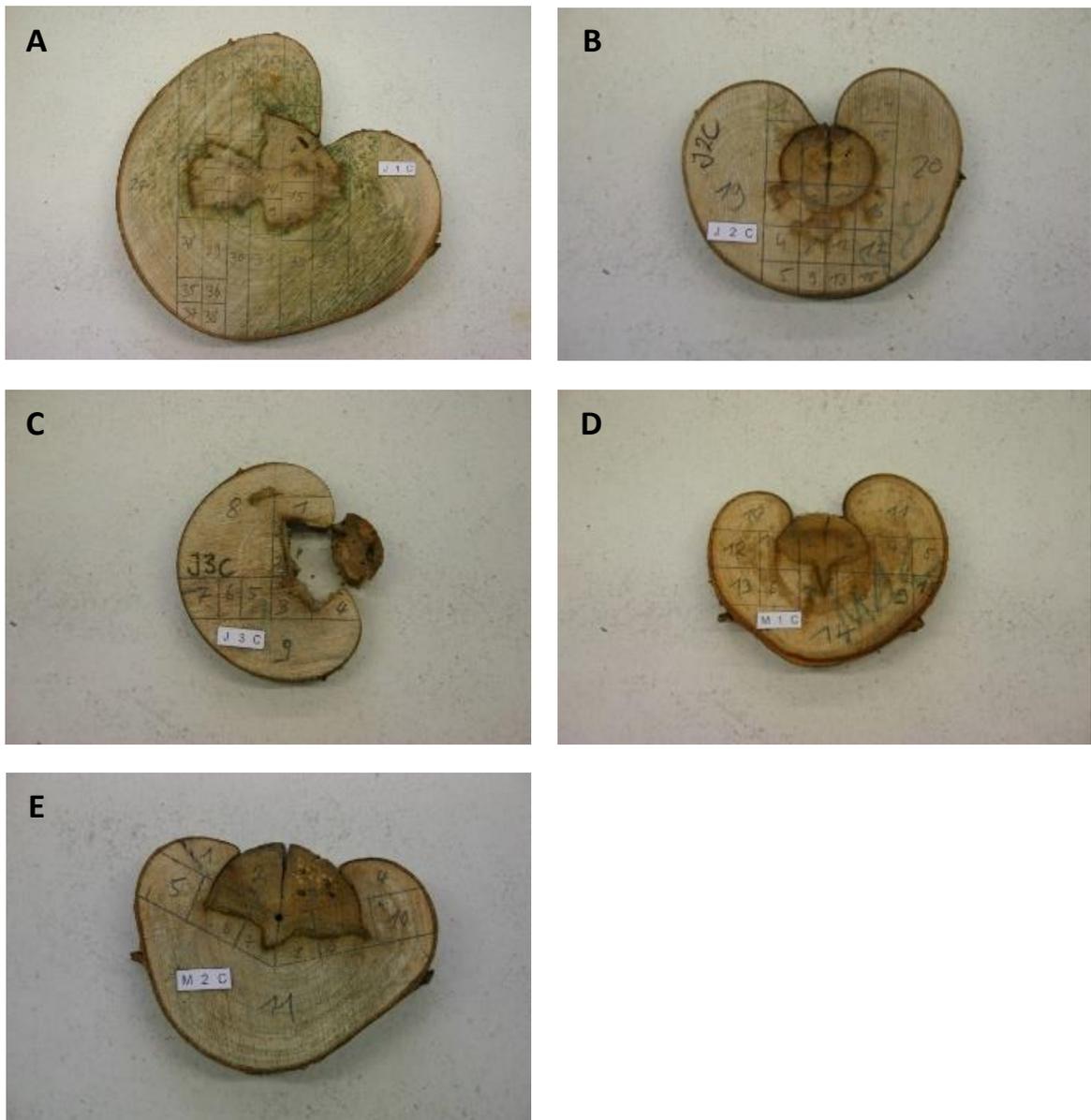


Abb. 23 A-E: Bergahorne im Querschnitt auf mittlerer Höhe der Nekrose mit Einteilung in unterschiedliche Bereiche der Mikrotomschnitte für mikroskopische Aufnahmen, A-C: Bestand Jägersdorf, D, E: Bestand Mauern (Fotos: TUM Holzforschung).

In den Referenzproben aus gesundem Gewebe der Stammscheiben waren insgesamt keine bzw. nur wenige leichte Verfärbungen sichtbar (s. Abb. 24, 25). Es wurden keine Einlagerungen wie Thyllen oder gummiartige Verschlüsse und keine Hyphen im Gewebe und Xylem beobachtet.

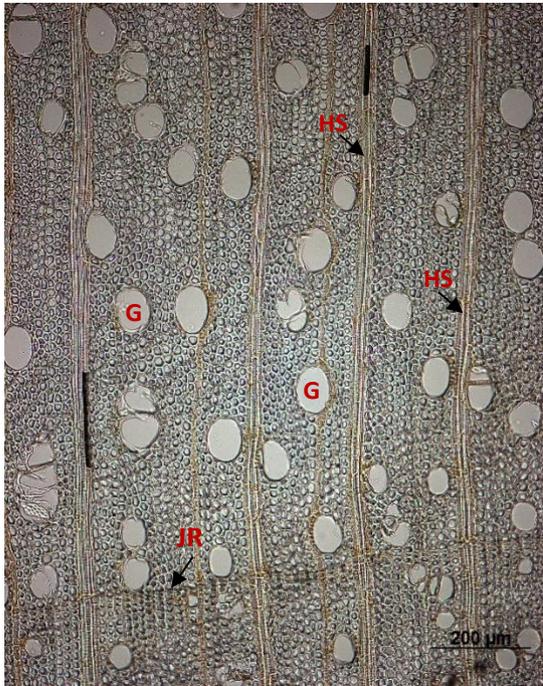


Abb. 24: Querschnitt aus gesundem Gewebe von zerstreutporigem Bergahorn mit Gefäßen (G), Holzstrahlen (HS) und Jahringgrenze (JR), mikroskopische Aufnahme, Bestand Jägersdorf, ungefärbt.

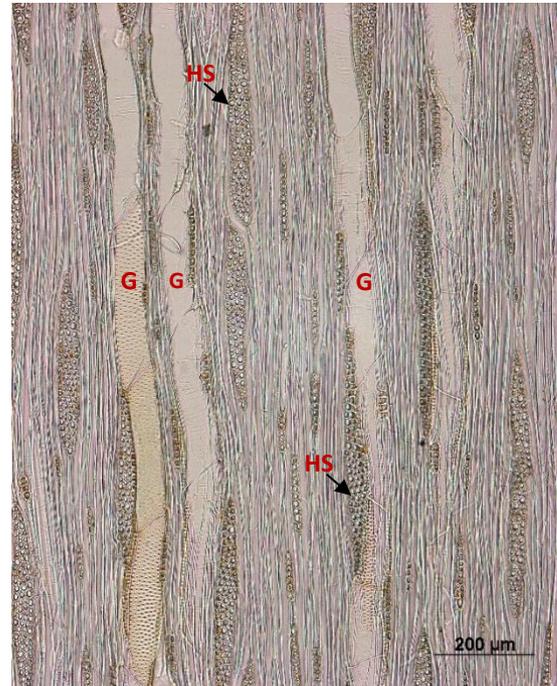


Abb. 25: Tangentialschnitt aus gesundem Gewebe von Bergahorn mit mehreren Gefäßen (G) und Holzstrahlen (HS), mikroskopische Aufnahme, Bestand Jägersdorf, ungefärbt (Fotos: TUM Holzforschung).

Bei fünf Stammnekrosen wurden Bereiche des Übergangsgewebes zwischen gesundem und nekrotischem Gewebe mikroskopiert. In Nekrosen der Bergahorne von den Beständen bei Mauern und Jägersdorf waren in diesen Übergangsbereichen vielfach Einschlüsse zu erkennen (s. Abb. 26, 27). In den Bereichen der Verfärbungen wurden in den fünf Nekrosen die nach BONSEN (1991) für europäische Ahornarten typischen gummiartigen Einlagerungen in Gefäßen beobachtet.

Bei den mikroskopischen Aufnahmen von Stammnekrosen des Standorts Jägersdorf (s. Abb. 26) waren in den Querschnitten vielfach Einlagerungen von dunkelbraunen Inhaltsstoffen in den Gefäßen als auch im Parenchym und in den Holzstrahlen erkennbar (s. Abb. 26 A, B). Die Verfärbungen im Xylem konnten in vielen Fällen den von BONSEN (1991) beschriebenen für *Acer* typischen gummiartigen Einlagerungen zugeordnet werden. Häufig wurden dabei Hohlräume eingeschlossen, was in den Tangentialschnitten zu beobachten war (s. Abb. 26 C). Neben den intensiven Verfärbungen unspezifischer Einschlüsse im Parenchym und in den Holzstrahlen war teilweise auch intaktes Gewebe vorhanden (s. Abb. 26 D).

Bei den Untersuchungen der Stammscheiben vom Standort Mauern (s. Abb. 27) wurden ebenfalls braune Verfärbungen in den mikroskopischen Quer-, Tangential- und Radialschnitten der Stammnekrosen beobachtet. Die Einlagerungen von dunkelbraunen Inhaltsstoffen traten gehäuft im wasserleitenden Xylem (s. Abb. 27 A, B) sowie in axialen und radialen Parenchymzellen auf (s. Abb. 27 C). In den Übergangsbereichen von gesundem zu verfärbtem Gewebe waren vereinzelt braune Hyphen und feinere blaue Hyphen in den Gefäßen und Parenchymzellen zu erkennen.

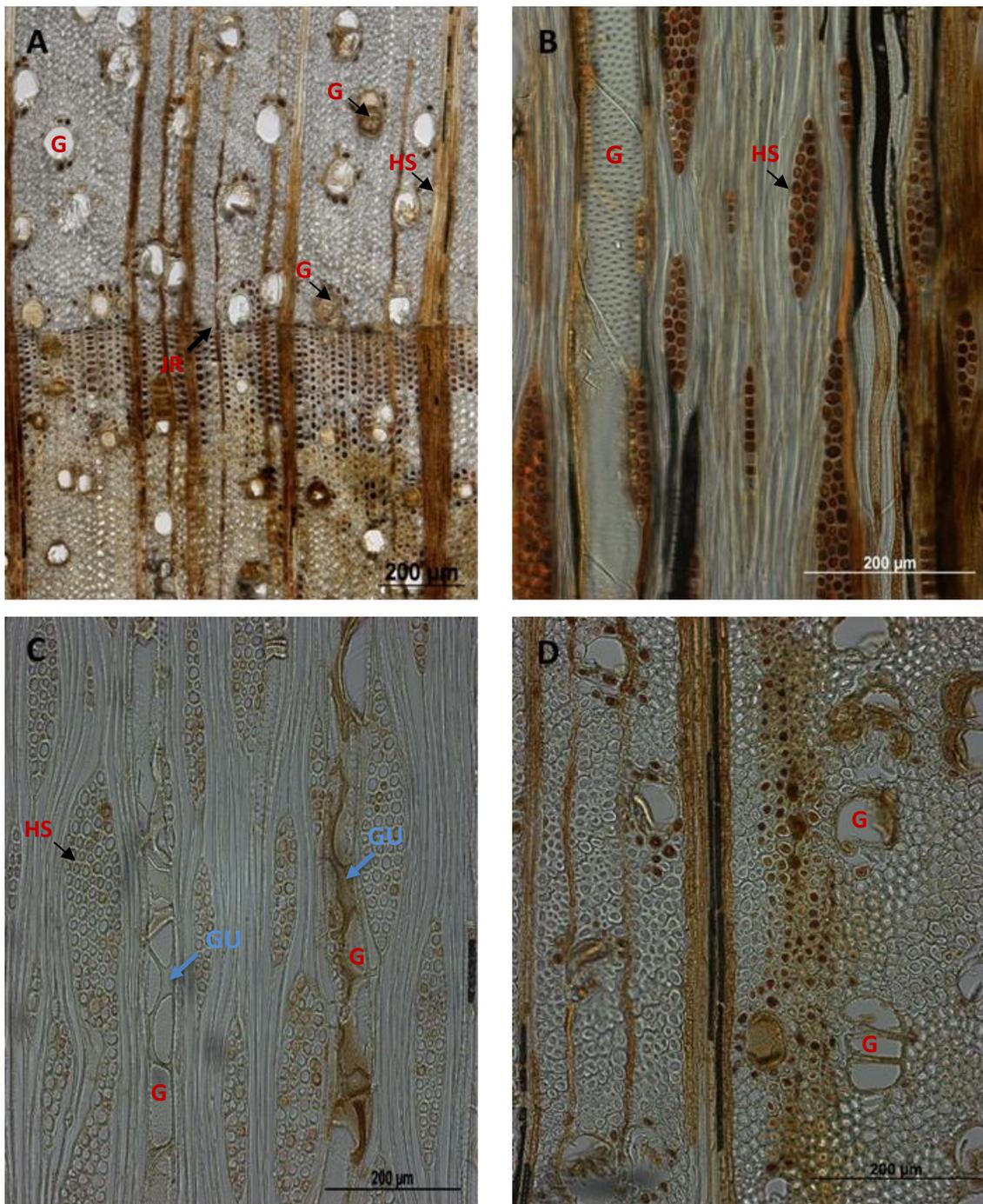


Abb. 26 A-D: Mikroskopische Aufnahmen von Mikrotomschnitten aus Stammnekrosen vom Bestand bei Jägersdorf, ungefärbt, A: Querschnitt von verfärbtem Gewebe mit braunen Einlagerungen in Gefäßen (G), Holzstrahlen (HS) und Parenchym der Jahrringgrenze (JR), B: Tangentialschnitt von Gefäßen und Holzstrahlen mit braunen Einlagerungen, C: Tangentialschnitt mit Hohlräumen zwischen Gummieinlagerungen (GU) in Gefäßen, D: Querschnitt mit braunen Verfärbungen in Holzstrahlen und Parenchymzellen (Fotos: TUM Holzforschung).

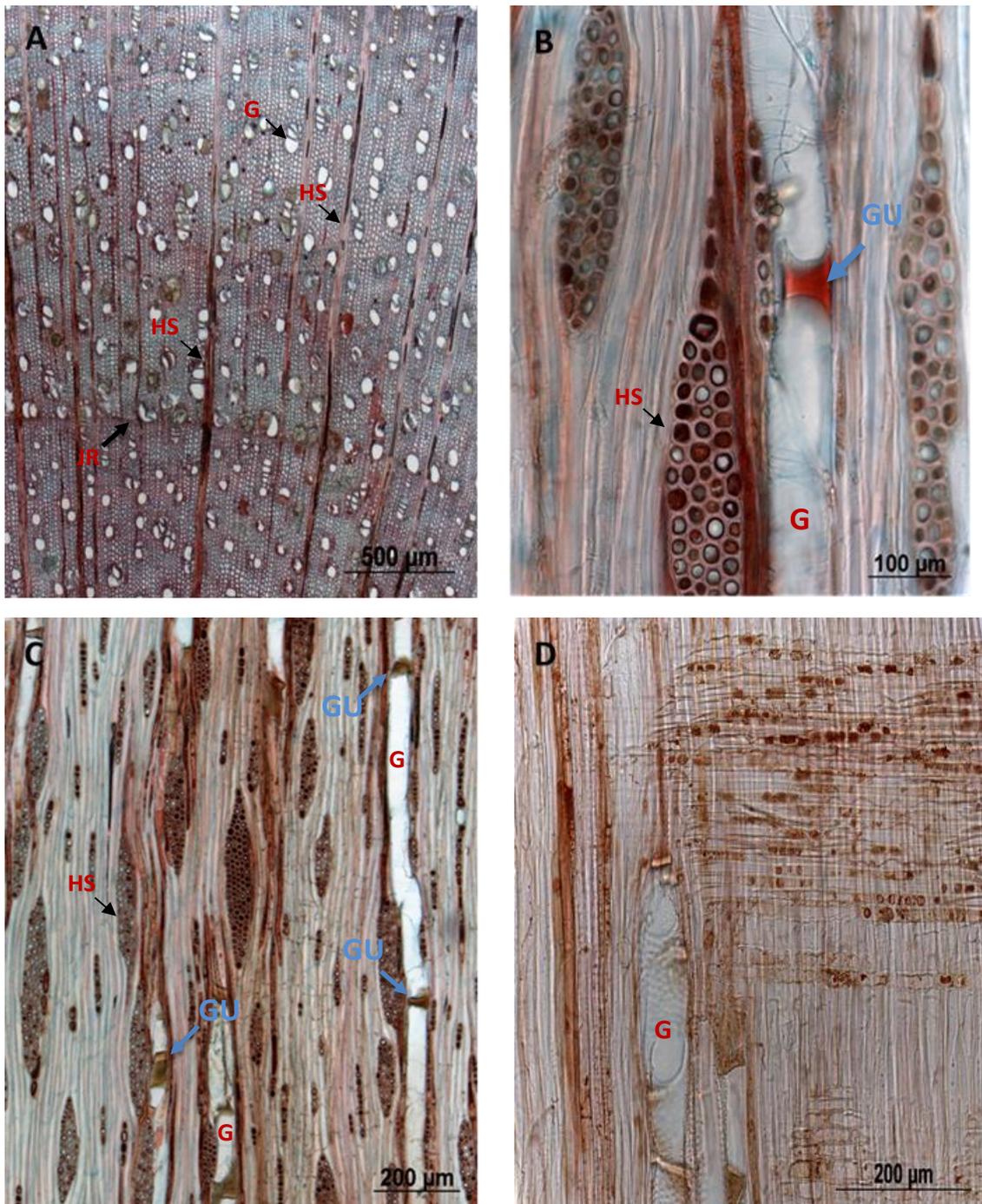


Abb. 27 A-D: Mikroskopische Aufnahmen von Mikrotomschnitten aus Stammnekrosen vom Bestand bei Mauern, Doppelfärbung (Safranin, Astrablau), A: Querschnitt von verfärbtem Gewebe mit Einlagerungen in Gefäßen (G) und Holzstrahlen (HS), Jahrringgrenze (JR), B: Tangentialschnitt mit Gummieinlagerung (GU) im Gefäß, vereinzelt feine blaue Hyphen, C: Tangentialschnitt mit Gummieinlagerungen in Gefäßen und Einlagerungen in Holzstrahlen, D: Radialschnitt mit Verfärbungen (Fotos: TUM Holzforschung).

3.1.1.4 Entwicklung der Stammnekrosen

In zehn Untersuchungsflächen wiesen im Mittel 33 % der Bergahorne Stammnekrosen auf. Die offenen Nekrosen, die zu Beginn der Untersuchungen bereits mehrere Jahre überwallten, waren durchschnittlich 68 cm lang und 4 cm breit. Bei einem Drittel dieser geschädigten Bergahorne war zudem eine zweite oder mehrere weitere Nekrosen oder Wundleisten zu beobachten. Im Zeitraum von Oktober 2012 bis Oktober 2014 war bei 73 % der Bergahorne ein voranschreitendes Überwallen der Nekrosen feststellbar. Im Mittel nahm die Ausdehnung in axialer Richtung um 2,9 cm (s. Abb. 28) und in tangentialer Richtung um 0,8 cm innerhalb der zwei Jahre ab (s. Abb. 29). Basierend auf der Datengrundlage von 2012 bis 2014 der Bäume mit überwallender Nekrose, wäre ein komplettes Schließen der Nekrosen in 8 bis 13 Jahren zu erwarten.

Bei 13 % der Bergahorne war über den Untersuchungszeitraum keine Veränderung hinsichtlich der Ausmaße der Stammrisse festzustellen. Bei 14 % der Bäume hatten sich die Nekrosen über den Untersuchungszeitraum vergrößert, auch wurden vereinzelt neue Stammrisse beobachtet.

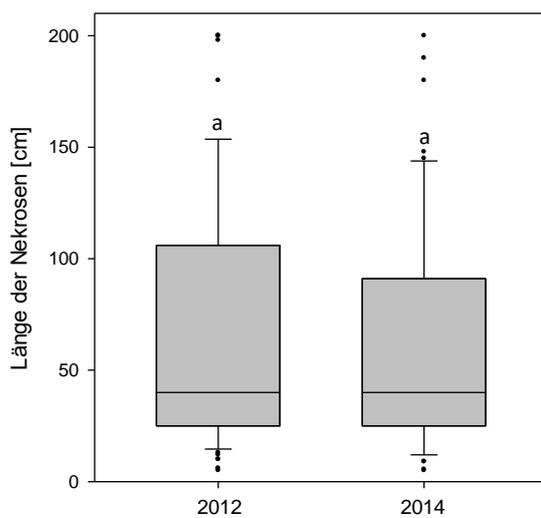


Abb. 28: Länge der Nekrosen der Bergahorne in zehn Beständen im Herbst 2012 und 2014. Statistik: T-Test.

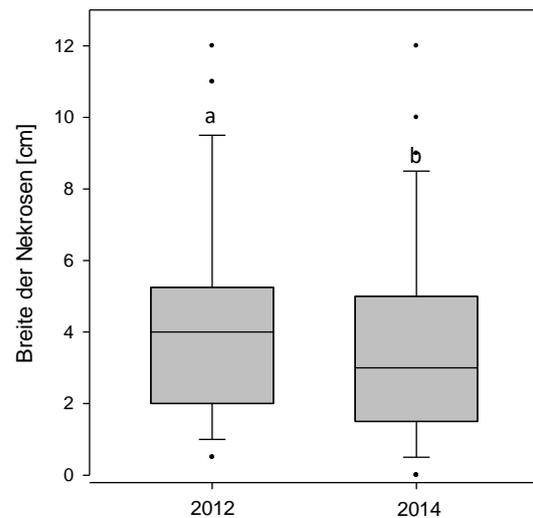


Abb. 29: Breite der Nekrosen der Bergahorne in zehn Beständen im Herbst 2012 und 2014. Statistik: T-Test.

3.1.1.5 Alter der Stammnekrosen

Für eine Feststellung der Entstehungsjahre der Stammrisse wurden bei 14 geschädigten Bergahornen die Jahrringe der Überwallungen ausgezählt. Die Entstehungsjahre der Stammrisse konnten auf die Jahre von 2001 bis 2010 datiert werden (s. Tab. 10).

Im Bestand Mauern wurde bei zwei Bergahornen ein Überwallungszeitraum von sieben Jahren bestimmt, wodurch die Entstehung auf das Jahr 2006 datiert wurde. Bei einem Ahorn in diesem Bestand war eine Nekrose im Jahr 2004 entstanden und ein Bergahorn wies eine Nekrose auf, deren Bildung auf das Jahr 2001 datiert wurde. Im Bestand Jägersdorf war bei zwei Ahornen die Stammnekrose im Jahr 2003 bzw. 2001 entstanden. Bei zwei weiteren Ahornen dieser Pflanzung, die Mehrfachinfektionen in verschiedenen Jahrringen aufwiesen, war die Bildung der Risse auf das Jahr 2008 datiert worden.

In drei weiteren Beständen nahe Drackenstein, Meitingen und Dachau, die für das *Next Generation Sequencing* beprobt wurden, war eine Ausbildung von Stammrissen bei drei Ahornen auf das Jahr 2004 datiert worden. Ein Bergahorn wies eine früher entstandene Nekrose aus dem Jahr 2001 und zwei Bergahorne wiesen eine später entstandene Nekrose aus den Jahren 2005 bzw. 2010 auf.

Tab. 10: Stammnekrosen bei 14 Bergahornen: Stammdurchmesser auf halber Länge der Nekrose, Länge und Breite der Nekrose, Jahrringe der Überwallung und Entstehungsjahr des Stammrisses; Mauern, Jägersdorf: Entnahme im Oktober 2013, Drackenstein, Meitingen, Dachau: Entnahme im Juli 2015 (* Bergahorne mit Mehrfachinfektion, Auszählung des jüngsten Jahrrings mit Verfärbung).

Baum Nr.	Standort	Durchmesser auf $\frac{1}{2}$ Länge [cm]	Länge Nekrose [cm]	Breite Nekrose [cm]	Jahrringe Überwallung	Entstehungsjahr
1	Mauern	9,7	52	4	7	2006
2	Mauern	6,5	38	3	7	2006
3	Mauern	7,2	47	2	9	2004
4	Mauern	9,2	67	3	12	2001
5	Jägersdorf	13,0	122	2	9	2004
6	Jägersdorf	10,9	131	5	12	2001
7	Jägersdorf	12,8	105	2	5*	2008
8	Jägersdorf	19,0	32	3	5*	2008
9	Drackenstein	17,9	116	8	11	2004
10	Drackenstein	16,7	104	6	11	2004
11	Meitingen	24,4	178	4	5	2010
12	Meitingen	17,1	172	2	10	2005
13	Dachau	19,9	216	8	14	2001
14	Dachau	16,7	265	2	11	2004
Mittelwert (\pm SD)		14,4 (\pm 5,1)	118 (\pm 68)	4 (\pm 2)	9 (\pm 3)	2005 (\pm 3)

3.1.2 Isolierung von *V. dahliae* aus Stammnekrosen

In zwei Bergahornbeständen in der Hallertau wurden im März und Oktober 2013 und in drei Beständen bei Regensburg, Augsburg und Dachau im Juli 2015 Stämme entnommen und Holzspäne aus verschiedenen Bereichen der Nekrose für den Erregernachweis auf Nährmedien aufgelegt. Aus den Stammnekrosen, deren Entstehung im Mittel neun Jahre zurücklag, konnte *V. dahliae* nicht isoliert werden. Auf Wasseragar und PDA (*Potato Dextrose Agar*) bildete sich kein typisches Myzel bzw. Dauerorgane der Mikrosklerotien aus (s. Anhang Tab. A3-A5).

Ein Nachweis mittels PCR mit artspezifischen Primern nach CARDER et al. (1994) und Inderbitzin et al. (2013) führte ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis bzw. Nachweis des Erregers des Verticillium-Welke.

3.1.3 Erregerdichte im Boden

Die Dauerorgane von *V. dahliae* wurden in Bodenmischproben der zehn Bergahornbestände nach der Methodik zur Bestimmung der Mikrosklerotiedichte von NEUBAUER & HEITMANN (2011) detektiert. In den Beständen der Hallertau konnten vergleichsweise hohe Anteile von Dauerorganen bestimmt werden. Insbesondere der Bestand Osselthausen, der eine deutliche Triebwelke aber keine Stammschäden zeigte, wies eine hohe Dichte von 133 Dauerorganen g⁻¹ Boden im Jahr 2012 auf (s. Abb. 30). Die Bergahornbestände nahe Regensburg (Drackenstein 1, 2, 3) und nahe Augsburg (Meitingen 1, 2) wiesen ebenfalls relativ hohe Werte auf. Auch war in den beiden Kontrollflächen Meitingen 1 und 2 eine extrem hohe Anzahl der Dauerorgane im Boden nachzuweisen. Im Gegensatz zu den anderen größtenteils mit Fichte bestockten Vergleichsflächen wurden hier Erstaufforstungsflächen mit Eichen und Linden beprobt. Im Jahr 2013 wurden insgesamt niedrigere Werte für die Dauerorgane in den zehn Bergahornbeständen als auch in den Vergleichsflächen bestimmt (s. Abb. 31). Die höchsten Dichten ergaben sich in den Beständen Osselthausen und Meitingen 2. Ein ähnlicher Trend setzt sich im Folgejahr fort (s. Abb. 32). Hier ergaben sich die signifikant höchsten Anteile im Bestand Meitingen 2 und in der Vergleichsfläche Meitingen 1.

Durch die Methodik war keine Differenzierung zwischen den nah verwandten Arten *V. dahliae* und *V. longisporum* möglich, und auch *V. tricorpus* bildet ähnliche Mikrosklerotien aus. Zudem werden durch andere Pilze ähnliche Dauerorgane wie Chlamydosporen ausgebildet. Dadurch besteht eine hohe Verwechslungsgefahr bei der morphologischen Differenzierung, weshalb nur eine Einschätzung der Erregerdichte vorgenommen werden konnte und die Werte kritisch zu betrachten sind.

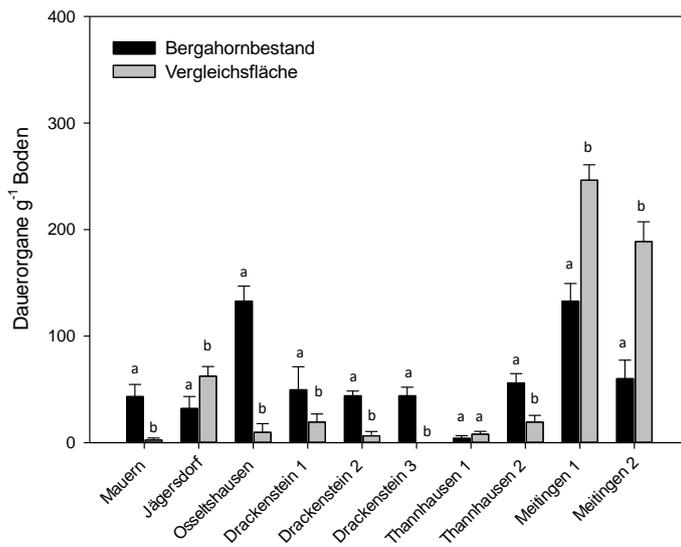


Abb. 30: Anzahl von Dauerorganen in zehn Bergahornbeständen und Vergleichsflächen ohne Wirtsbaumarten im Oktober 2012 (mit Standardabweichung), Statistik: T-Test (Bergahorn vs. Vergleichsfläche).

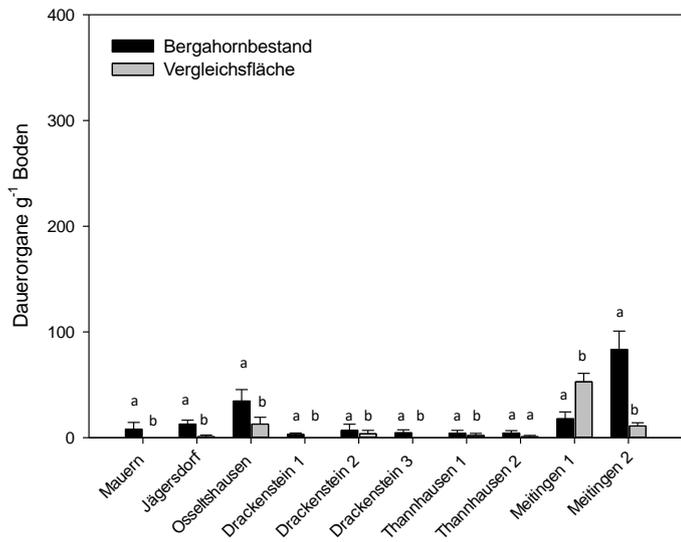


Abb. 31: Anzahl von Dauerorganen in zehn Bergahornbeständen und Vergleichsflächen ohne Wirtsbaumarten im Oktober 2013 (mit Standardabweichung), Statistik: T-Test (Bergahorn vs. Vergleichsfläche).

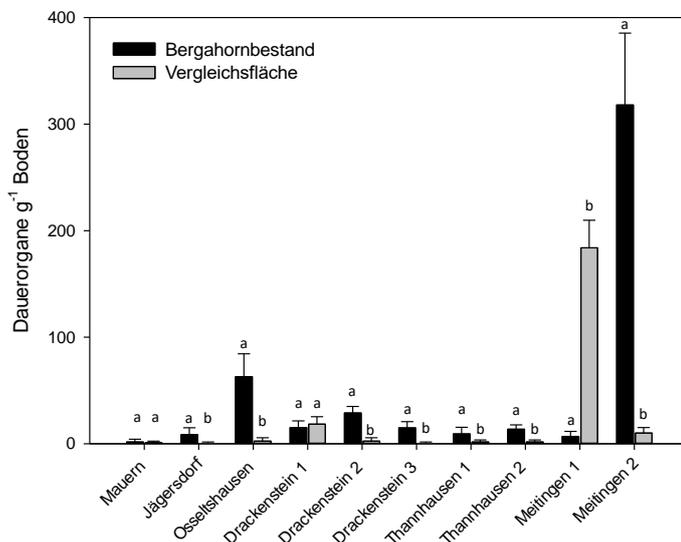


Abb. 32: Anzahl von Dauerorganen in zehn Bergahornbeständen und Vergleichsflächen ohne Wirtsbaumarten im Oktober 2014 (mit Standardabweichung), Statistik: T-Test (Bergahorn vs. Vergleichsfläche).

Bei der über zwei Jahre durchgeführten zweimonatigen Untersuchung der Erregerdichte in drei Beständen in der Hallertau, ergaben sich im Jahresverlauf teils starke Schwankungen (s. Abb. 33). In den Beständen nahe den Orten Mauern und Jägersdorf konnte im Winter 2012 und 2013 im Vergleich zu den wärmeren Monaten ein Anstieg der Dichte der Dauerorgane festgestellt werden. Im Bestand bei Osseltshausen wurde im Dezember 2012 und 2013 als auch Oktober 2014 eine erhöhte Erregerdichte detektiert. Im Bestand Mauern wurden im Dezember 2012 und Februar 2013 erhöhte Anteile bestimmt, im Bestand Jägersdorf wurde nur zu Beginn der Probenahmen im Winter 2012 eine höhere Anzahl an Dauerorganen bestimmt.

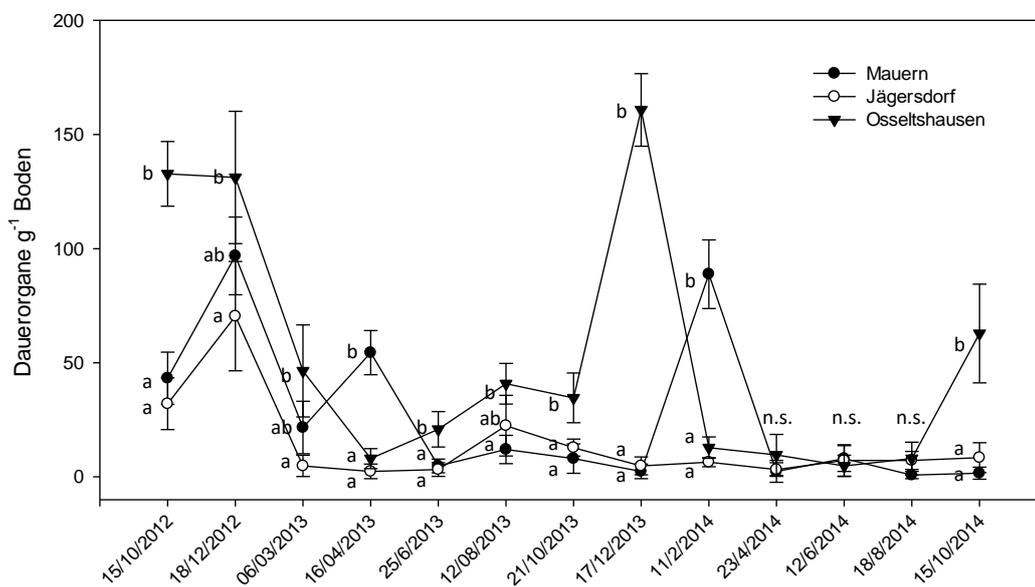


Abb. 33: Dichte der Dauerorgane in den Böden dreier Bergahornbestände in der Hallertau (Mauern, Jägersdorf, Osseltshausen) von Oktober 2012 bis 2014 (mit Standardabweichung). Statistik: Tukey-HSD (Bestände je Termin).

3.2 Einfluss von Trockenstress auf die Infektion mit *V. dahliae* bei Bergahorn

Es bestehen Hinweise, dass sommerlicher Trockenstress Welkesymptome und die Ausprägung vom Stammrissen und Stammnekrosen bei adulten Ahornen bei Befall mit dem Erreger der Verticillium-Welke verstärken bzw. auslösen kann. Daher wurde der Einfluss der Inokulation mit *V. dahliae* und von Trockenstress auf junge Bergahorne unter kontrollierten Bedingungen untersucht. Es wurden zwei aufeinander folgende Versuche in einer Vegetationshalle am Gewächshauslaborzentrum Dürnast der TU München durchgeführt. In beiden Trockenstressversuchen wurden jeweils 96 Bergahorne durch eine Wurzeltauch-Inokulation mit einem *V. dahliae*-Isolat infiziert, das von *A. pseudoplatanus* isoliert wurde. Im folgenden Sommer wurden je 32 Pflanzen (für 6 Wochen im ersten bzw. 8 Wochen im zweiten Versuch) unter 12 %, 17 % und 22 % volumetrischen Bodenwassergehalt gehalten. Als Kontrolle dienten 96 nicht-inokulierte Bergahorne unter dem gleichen Bodenwassergehaltsschema. Die je 192 Pflanzen wurden in beiden Versuchen über zwei Jahre in einer randomisierten Blockanlage untersucht.

3.2.1 Trockenstressversuch I

3.2.1.1 Welkesymptome

Der Welke-Index wurde von Boniturnote 1, was einer Pflanze ohne Welkesymptome entspricht, über ansteigende Stufen hinsichtlich des prozentualen Anteils welker Blätter bis zum Welke-Index 9 (s. Abb. 34 A, B, C), was einer abgestorbenen Pflanze entspricht, alle zwei Wochen bonitiert (Boniturskala s. Tab. 4, Kapitel 2.2.3.1).



Abb. 34: Welke bei 1 ½-jährigem Bergahorn bei Inokulation mit *V. dahliae*, Boniturnoten: A: Welke-Index 3, B: Welke-Index 6 und C: Welke-Index 9.

Welkesymptome im Trockenstressjahr

Bei den mit *V. dahliae* inokulierten Bergahornen war im Vergleich zu den Kontrollpflanzen in der Vegetationsperiode nach der Wurzeltauch-Inokulation eine frühzeitige Welke zu beobachten (s. Abb. 35 A, B). Bereits im Frühjahr und Frühsommer 2013 waren vor Beginn der Trockenstressphase bei den mit *V. dahliae* infizierten Pflanzen (VD-F, VD-M, VD-T) deutliche Welkesymptome ausgebildet. Die Kontrollpflanzen (K-F, K-M, K-T) wurden dem Welke-Index 1 bis 2 zugeordnet, es konnte keine Blattwelke beobachtet werden.

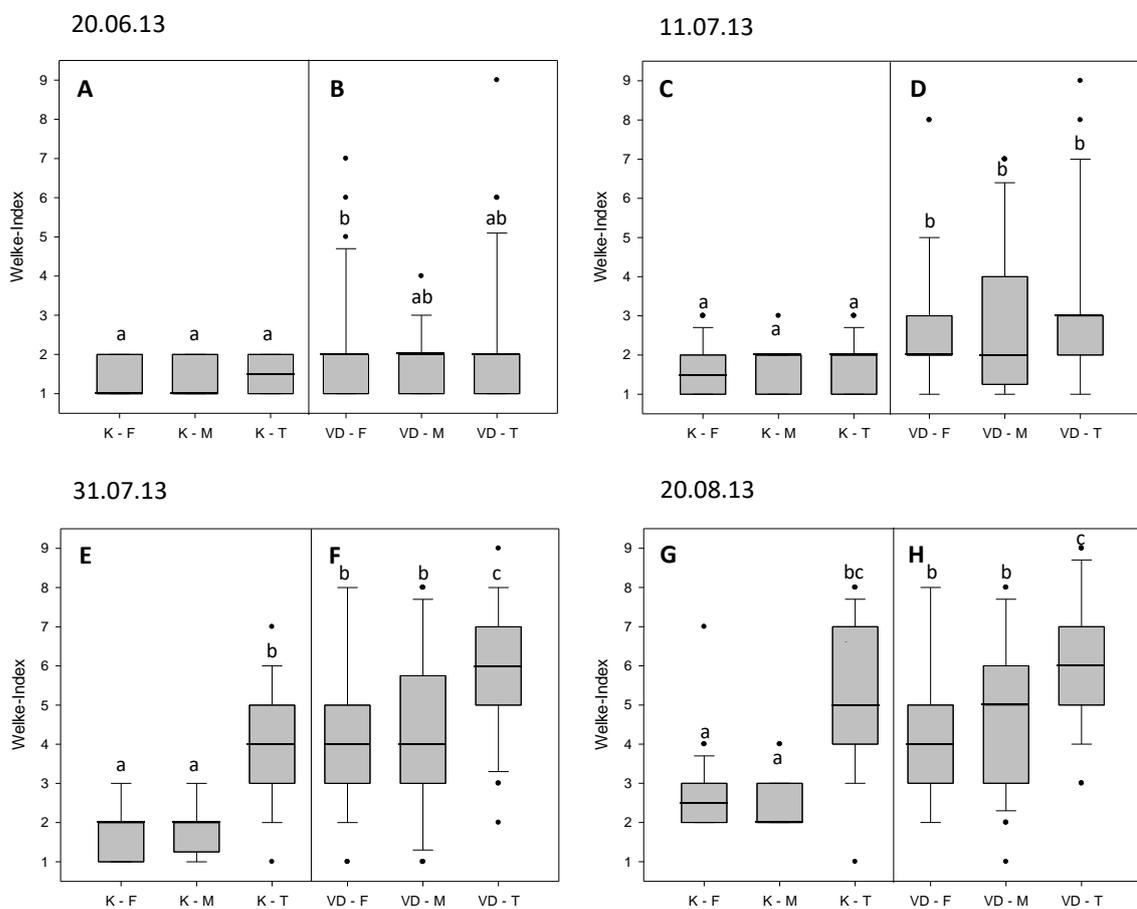


Abb. 35 A-H: Welke-Index der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* infizierten Bergahorne vor, bei und nach der Trockenstressphase vom 01.07. bis 12.08.13 unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt am 20.06.13 (A, B), 11.07.13 (C, D: 10 Tage Trockenstress), 31.07.13 (E, F: 30 Tage Trockenstress) und 20.08.13 (G, H), n=32, Statistik: Conover-Test. Boxplots mit Median, 25. und 75. Quartil, Whiskers mit 10. und 90. Perzentil und Ausreißern.

Abkürzungen: K-F: Kontrolle + Bodenwassergehalt (BWG) feucht, K-M: Kontrolle + BWG moderat, K-T: Kontrolle + BWG trocken, VD-F: *V. dahliae* + BWG feucht, VD-M: *V. dahliae* + BWG moderat, VD-T: *V. dahliae* + BWG trocken.

Die mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne zeigten bei beginnender Trockenstressphase bereits signifikant verstärkte Welkesymptome unabhängig vom feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalt (s. Abb. 35 D). Bei den infizierten gut bewässerten Bergahornen war im weiteren Verlauf im Vergleich zu den gut bewässerten Kontrollpflanzen nach vier Wochen Trockenstress eine signifikant verstärkte Ausprägung der Welkesymptome zu beobachten (s. Abb. 35 E, F). Nach vier Wochen Trockenstress waren auch in der Variante der Kontrollpflanzen mit niedrigem Bodenwassergehalt deutliche Welkesymptome zu sehen, was aber signifikant niedriger gegenüber den *V. dahliae*-infizierten Pflanzen unter Trockenstress ausfiel. Nach Abschluss des Trockenstresses waren alle drei Varianten der inokulierten Pflanzen in der Ausprägung der Welke gegenüber den Kontrollpflanzen mit entsprechendem Bodenwassergehalt erhöht (s. Abb. 35 G, H).

Nach zweifaktorieller ANOVA (*Analysis of Variance*) ergab sich zu allen Terminen ein signifikanter Einfluss durch den Haupteffekt der Infektion mit dem Pathogen (s. Tab. 11). Nach einem Monat Trockenstress übte auch der Faktor Bodenwassergehalt signifikanten Einfluss auf die Ausprägung einer verfrühten Seneszenz. Mit Ausnahme des letzten Termins waren keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen den Faktoren *V. dahliae*-Inokulation und Bodenwassergehalt feststellbar.

Tab. 11: Welke-Index 2013: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und des Bodenwassergehalts (BWG) während der Trockenstressphase vom 01.07. bis 12.08.13 und Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren nach einfaktorieller (20.06.13 n=96) bzw. zweifaktorieller ANOVA (ab 11.07.13 n=32) ($p > 0,05$: n.s.; $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***).

	Welke-Index 2013			
	20.06.13	11.07.13	31.07.13	20.08.13
<i>V. dahliae</i>	***	***	***	***
BWG	-	n.s.	***	***
<i>V. dahliae</i> × BWG	-	n.s.	n.s.	*

Zur Gewichtung der über die Vegetationsperiode hinweg erfassten Boniturdaten wurde ein AUWPC-Wert (*Area Under Wilt Progress Curve*), angelehnt an den AUDPC-Wert (*Area Under Disease Progress Curve*) nach SHANER & FINNEY (1977), ermittelt. Dieser Wert macht die signifikante Erhöhung der Welkesymptome bei den infizierten Varianten gegenüber den nicht-infizierten Bergahornen deutlich (s. Abb. 36). In den Kontrollpflanzen war der AUWPC-Wert der feuchten und moderaten Variante auf einem ähnlichen Niveau, der Wert der Trockenstressvariante war erhöht. Die AUWPC-Werte stiegen in den mit *V. dahliae* inokulierten Varianten mit abnehmendem Bodenwassergehalt an und lagen signifikant höher als bei den Kontrollpflanzen bei entsprechendem Bodenwassergehalt. Die Faktoren *V. dahliae*-Infektion sowie Trockenstress hatten einen signifikanten Effekt auf die Höhe des AUWPC-Werts. Interaktionen zwischen beiden Faktoren bestanden nicht.

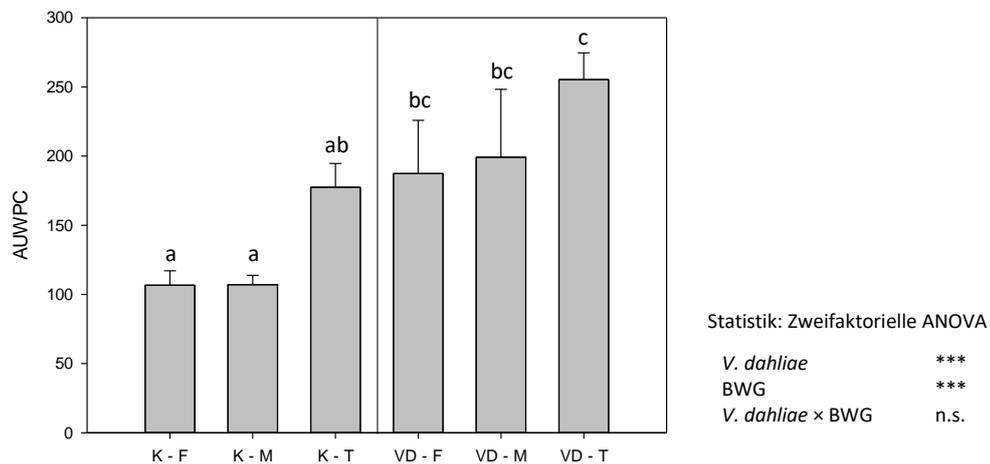


Abb. 36: AUWPC-Werte (*Area Under Wilt Progress Curve*) der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit *V. dahliae*-Infektion über die gesamte Vegetationsperiode einschließlich der Trockenstressphase vom 01.07. bis 12.08.13 mit feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten (mit Standardabweichung), Statistik: Tukey-HSD.

Welkesymptome im Folgejahr

Im Folgejahr unter fortlaufend guter Wasserversorgung der Pflanzen war bei Austrieb bei 15 % der mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne die Bildung eines neuen Terminaltriebs zu beobachten, der Haupttrieb war abgestorben bzw. stark geschädigt. Die mit dem Welke-Erreger inokulierten Bergahorne wiesen unter guten Bodenwassergehalten im Verlauf der Vegetationsperiode des Folgejahrs signifikant höhere Welkesymptome auf als die Kontrollpflanzen (s. Abb. 37). Im Juli verstärkte sich die frühzeitige Seneszenz, die als Folge der Infektion mit dem bodenbürtigen Pilz auftrat (s. Abb. 37 D, F).

An allen Terminen war durch die zweifaktorielle ANOVA ein signifikanter Einfluss der *V. dahliae*-Infektion auf die Welke-Intensität bestimmbar (s. Tab. 12). Der vorjährige Trockenstress übte keinen Einfluss aus. Interaktionen zwischen Infektion mit dem Pathogen und Bodenwassergehalt bestanden nicht.

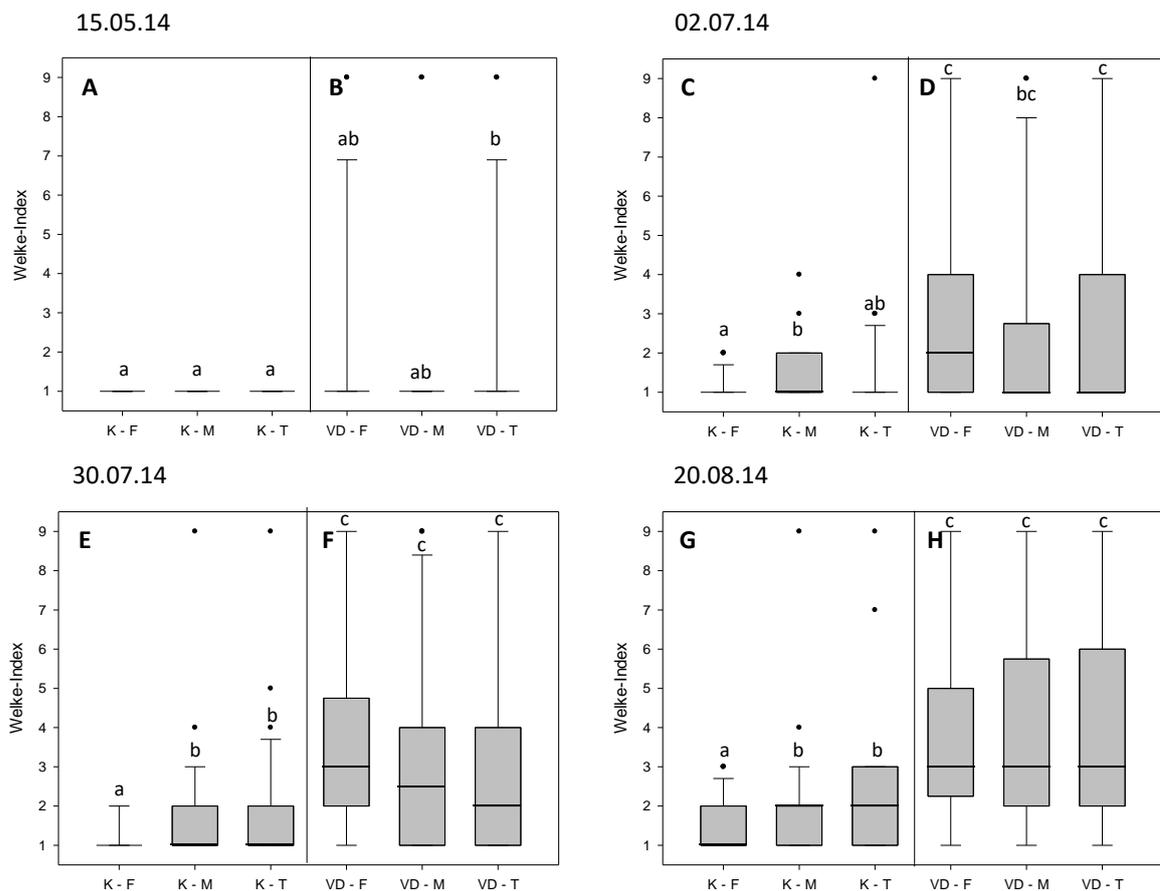


Abb. 37 A-H: Welke-Index im Folgejahr unter guten Bodenwassergehalten bei den mit *V. dahliae* inokulierten Bergahornen und Kontrollpflanzen am 15.05.14 (A, B), 02.07.14 (C, D), 30.07.14 (E, F) und 20.08.14 (G, H); die Angaben feucht, moderat und trocken beziehen sich auf die Bodenwassergehalte vom 01.07. bis 12.08.13, Statistik: Conover-Test.

Tab. 12: Welke-Index 2014: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und des Bodenwassergehalts (BWG) während der Trockenstressphase im Vorjahr 2013 und Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren nach zweifaktorieller ANOVA.

	Welke-Index 2014			
	15.05.14	02.07.14	30.07.14	20.08.14
<i>V. dahliae</i>	*	***	***	***
BWG	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Zur Gewichtung der Boniturdaten wurde der *Area Under Wilt Progress Curve*-Wert für das Folgejahr unter guten Bodenwassergehalten für die sechs Varianten ermittelt. Bei den Kontrollpflanzen war ein leichter Anstieg des A UWPC-Werts über die Feuchte- zur Trockenstress-Variante zu beobachten. Die mit *V. dahliae* inokulierten Varianten lagen auf einem insgesamt höheren Niveau, wobei sich der höchste Wert bei den Bergahornen, die im Vorjahr ohne Trockenstress wuchsen, ergab (s. Abb. 38). Nach zweifaktorieller ANOVA war die signifikante Erhöhung der Welkesymptome bei den mit *V. dahliae* infizierten Bergahornen gegenüber den Kontrollpflanzen im Folgejahr deutlich. Es war kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Bodenwassergehalte der vorausgehenden Vegetationsperiode in den infizierten als auch gesunden Pflanzen zu beobachten.

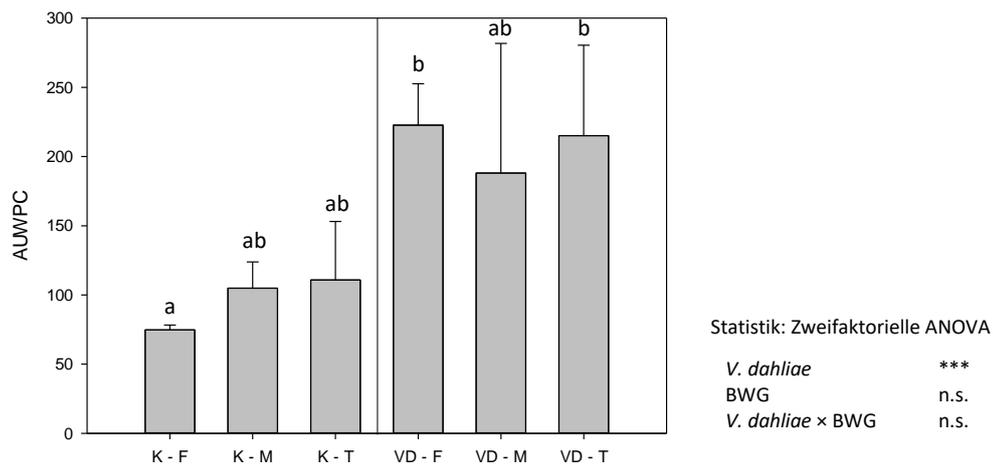


Abb. 38: A UWPC-Werte (*Area Under Wilt Progress Curve*) der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation im Folgejahr 2014 nach feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten im Sommer 2013 (mit Standardabweichung), Statistik: Tukey-HSD.

Bei den infizierten Bergahornen der Trockenstressvariante war gegen Ende der Vegetationsperiode 2013 bei 9 % der Pflanzen ein Absterben zu beobachten (s. Tab. 13). Der Welke-Index war bei diesen Ahornen im Mittel auf 6 angestiegen, was 50-75 % welker Blattmasse entspricht. In den mit *V. dahliae* inokulierten Varianten mit moderatem und gutem Bodenwassergehalt war im Laufe der Vegetationsperiode keine Mortalität zu beobachten.

Im Folgejahr 2014 waren intensive Welkesymptome mit einem mittleren Welke-Index von 4 in den *V. dahliae*-inokulierten Bergahornen in allen drei Varianten zu beobachten. Insbesondere waren insgesamt 13 % der mit *V. dahliae* inokulierten Pflanzen in der Vegetationsperiode 2014 abgestorben, wobei die höchste Mortalitätsrate bei den Bergahornen der vorjährigen Trockenstressvariante auftrat. Ein nachhaltiger Einfluss des Faktors Trockenstress war im Folgejahr bei den mit *V. dahliae* als auch bei den Kontrollpflanzen abgesehen von den leicht erhöhten Mortalitätsraten nicht sichtbar.

Tab. 13: Welke-Index (mit Standardabweichung) und Mortalität der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne unter verschiedenen Bodenwassergehalten nach Beendigung der Trockenstressphase 2013 und im Folgejahr 2014, n=29-32.

Variante	Trockenstressjahr 2013			Folgejahr 2014	
	vol. Bodenwassergehalt	Welke-Index 20.08.13	Mortalität 2013 [%]	Welke-Index 20.08.14	Mortalität 2014 [%]
Kontrolle feucht	22 %	2,7 ($\pm 1,0$)	0	1,4 ($\pm 0,7$)	0
Kontrolle moderat	17 %	2,5 ($\pm 0,6$)	0	2,0 ($\pm 1,5$)	0
Kontrolle trocken	12 %	5,2 ($\pm 1,8$)	0	2,2 ($\pm 1,7$)	3
VD feucht	22 %	4,4 ($\pm 1,9$)	0	4,0 ($\pm 2,5$)	13
VD moderat	17 %	4,6 ($\pm 1,8$)	0	4,0 ($\pm 2,7$)	6
VD trocken	12 %	6,3 ($\pm 1,6$)	9	4,0 ($\pm 2,8$)	19

Im Herbst 2014 wurden die Sprosse der Bergahorne durch Absägen des Stammes über dem Wurzelhals entnommen. Bei den mit dem Welke-Erreger *V. dahliae* infizierten Pflanzen konnten bei 19 % Verfärbungen eines Jahrrings beobachtet werden (s. Abb. 39 A, B). Eine Ausprägung von Stammrissen oder Wundleisten wurde bei Versuchsende, an dem die Pflanzen ein Alter von rund 2 ½ Jahren aufwiesen und die Infektion mit *V. dahliae* knapp zwei Jahre zurücklag, nicht festgestellt.



Abb. 39 A, B: Verfärbungen eines Jahrrings bei 2 ½-jährigem Bergahorn knapp zwei Jahre nach Wurzeltauch-Inokulation mit *V. dahliae*.

3.2.1.2 Gaswechsel

3.2.1.2.1 Photosyntheserate

Im ersten Trockenstressversuch wurden je Termin acht Pflanzen jeder Variante mit dem portablen LI-6400 gemessen. Zwei Wochen nach Beginn der Trockenstressphase war die Photosyntheserate der Varianten mit niedrigem gegenüber denen mit normalem und moderatem Bodenwassergehalt erniedrigt (s. Abb. 40 A, B). Es war keine Absenkung der Photosyntheserate bei den mit *V. dahliae* infizierten Varianten gegenüber den Kontrollpflanzen im Laufe der Trockenstressphase zu beobachten, jedoch wiesen die infizierten Bergahorne unter Trockenstress die niedrigste Photosyntheserate von etwa $1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf (s. Abb. 40 B, D).

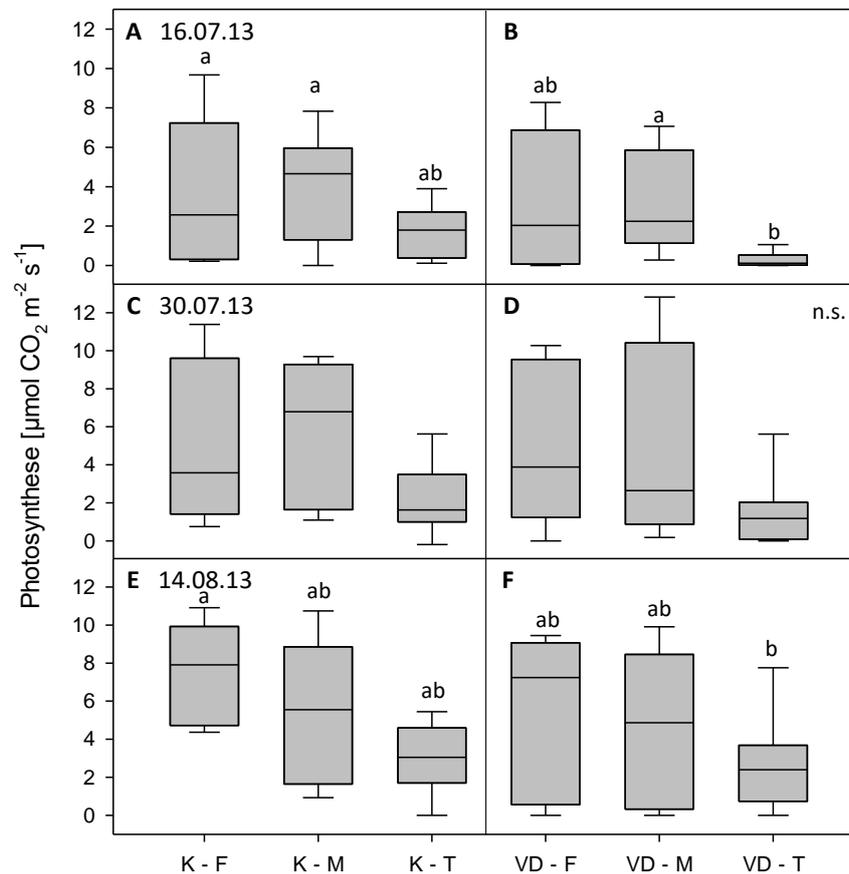


Abb. 40 A-F: Photosyntheserate der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* infizierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt am 16.07.13 (A, B: zwei Wochen nach Beginn der Trockenstressphase), 30.07.13 (C, D: vier Wochen nach Beginn der Trockenstressphase) und 14.08.13 (E, F: zwei Tage nach Abschluss der Trockenstressphase), $n=8$, Statistik: Tukey-HSD.

Abkürzungen: K-F: Kontrolle + Bodenwassergehalt (BWG) feucht, K-M: Kontrolle + BWG moderat, K-T: Kontrolle + BWG trocken, VD-F: *V. dahliae* + BWG feucht, VD-M: *V. dahliae* + BWG moderat, VD-T: *V. dahliae* + BWG trocken.

Nach Beendigung der sechswöchigen Trockenstressphase war bei den inokulierten Bergahornen und Kontrollpflanzen weiterhin eine leichte Abnahme der CO₂-Assimilationsrate von der feuchten über die moderate hin zur Trockenstressvariante zu beobachten (s. Abb. 40 E, F). Die Photosyntheserate war zu diesem Zeitpunkt bei den mit *V. dahliae* inokulierten Ahornen gegenüber den Kontrollpflanzen auf einem ähnlichen Niveau. Durch den Tukey-HSD *Post hoc*-Test konnten am ersten und letzten Termin signifikante Unterschiede zwischen den gut bewässerten Kontrollpflanzen und den mit *V. dahliae* inokulierten Bergahornen unter Trockenstress festgestellt werden (s. Abb. 40).

Zwischen den inokulierten Bergahornen und den Kontrollpflanzen bestanden an den drei Terminen nach der zweifaktoriellen ANOVA keine signifikanten Unterschiede, für den Haupteffekt Bodenwassergehalt ergab sich ein leicht signifikanter Einfluss (s. Tab. 14). Insgesamt wurden keine signifikanten Wechselwirkungen bzw. Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren an den drei Messterminen ermittelt.

Tab. 14: Photosyntheserate 2013: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und der Bodenwassergehalte (feucht, moderat, trocken während der Trockenstressphase vom 01.07. bis 12.08.2013) und Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren nach zweifaktorieller ANOVA ($p > 0,05$: n.s.; $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***).

	Photosyntheserate 2013		
	16.07.13	30.07.13	14.08.13
<i>V. dahliae</i>	n.s.	n.s.	n.s.
BWG	*	*	*
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	n.s.	n.s.

3.2.1.2.2 Stomatäre Leitfähigkeit

Im Laufe der Trockenstressphase nahm die stomatäre Leitfähigkeit mit abnehmendem Bodenwassergehalt bei den Bergahornen ab. Zwei Wochen nach Trockenstressbeginn wiesen die mit *V. dahliae* infizierten Bergahorne unter Trockenstress die niedrigste stomatäre Leitfähigkeit von $10,1 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf (s. Abb. 41 A, B). Vier Wochen nach Trockenstressbeginn wiesen die Bäume unter trockenem Bodenwassergehalt in den Kontrollen als auch in den *V. dahliae*-inokulierten Pflanzen die signifikant niedrigsten Leitfähigkeiten auf (s. Abb. 41 C, D). Zwischen infizierten Ahornen und Kontrollpflanzen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Kurz nach Beendigung des Trockenstresses war ein anhaltender Einfluss auf die stomatäre Leitfähigkeit bei den Pflanzen unter den vormals erniedrigten Bodenwassergehalten zu beobachten (s. Abb. 41 E, F).

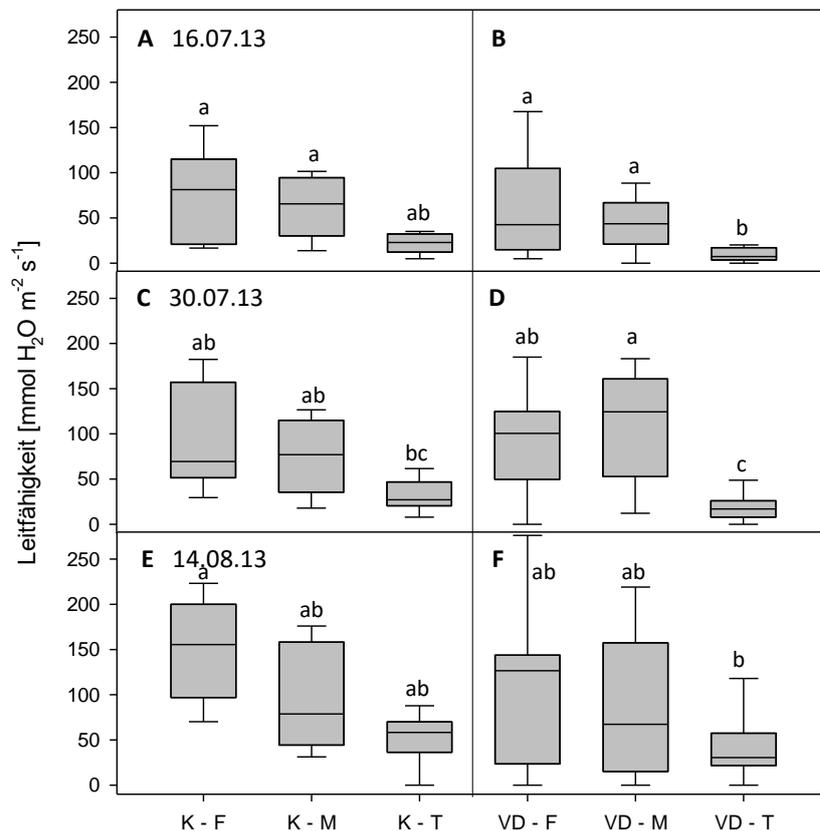


Abb. 41 A-F: Stomatäre Leitfähigkeit der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* infizierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt am 16.07.13 (A, B: zwei Wochen nach Beginn der Trockenstressphase), 30.07.13 (C, D: vier Wochen nach Beginn der Trockenstressphase) und 14.08.13 (E, F: zwei Tage nach Abschluss der Trockenstressphase), n=8, Statistik: Tukey-HSD.

Die Inokulation mit dem Welke-Erreger ergab im Vergleich zu den Kontrollpflanzen keinen signifikanten Einfluss auf die stomatäre Wasserleitfähigkeit an den drei Messterminen. Der Haupteffekt des Bodenwassergehalts wirkte sich nach zweifaktorieller ANOVA an allen Terminen signifikant auf die stomatäre Leitfähigkeit aus (s. Tab. 15). Insgesamt wurden keine Interaktionen zwischen Trockenstress und der Infektion mit *V. dahliae* festgestellt.

Tab. 15: Stomatäre Leitfähigkeit 2013: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und der Bodenwassergehalte (feucht, moderat, trocken während der Trockenstressphase vom 01.07. bis 12.08.2013) und Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren nach zweifaktorieller ANOVA.

	Stomatäre Leitfähigkeit		
	16.07.13	30.07.13	14.08.13
<i>V. dahliae</i>	n.s.	n.s.	n.s.
BWG	***	***	**
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	n.s.	n.s.

3.2.1.3 Hydraulische Leitfähigkeit

Bei Versuchsende im November 2014 wurden fünf Bergahorne je Variante für die Messung der hydraulischen Wasserleitfähigkeit entnommen. Die Messung wurde auf die Varianten unter feuchten und trockenem Bodenwassergehalt beschränkt. Die hydraulische Leitfähigkeit des Xylems war in den Kontrollpflanzen gegenüber den inokulierten Ahornen im Jahrestrieb 2012 erhöht (s. Abb. 42), wobei die gut bewässerten Bergahorne ohne Infektion die höchste Leitfähigkeit von durchschnittlich $1,1 \text{ kg MPa}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ aufwiesen. Die mit *V. dahliae* infizierten Bergahorne wiesen gegenüber den Kontrollpflanzen niedrigere Werte der Wasserleitfähigkeit auf. Insbesondere bei den Bergahornen der Trockenstressvariante war eine erniedrigte Wasserleitfähigkeit messbar, wobei allerdings kein signifikanter Effekt festgestellt wurde. Die Werte der hydraulischen Leitfähigkeiten der vier Bergahorn-Varianten wiesen eine hohe Varianz bei einer kleinen Grundgesamtheit auf.

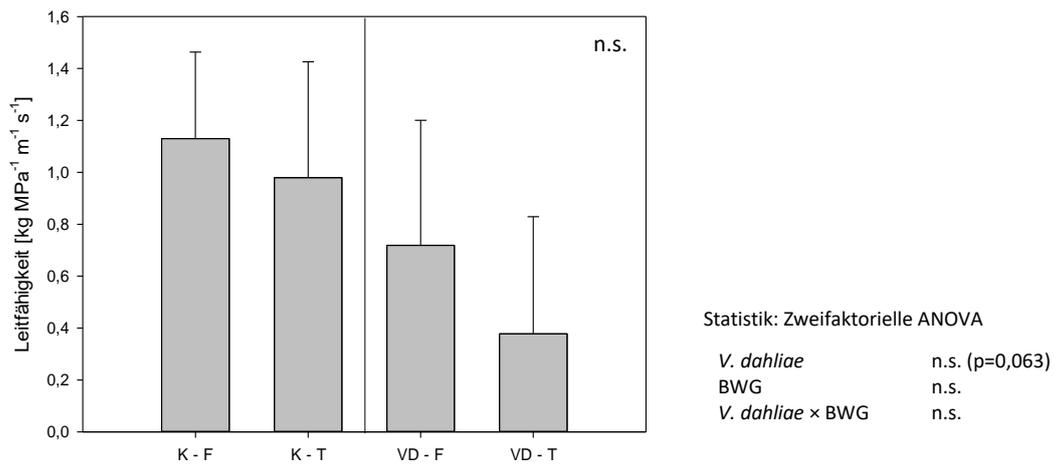


Abb. 42: Hydraulische Leitfähigkeit der Bergahorne (Stammabschnitt 2012) mit *V. dahliae*-Inokulation und der Kontrollpflanzen unter feuchtem und trockenem Bodenwassergehalt im Vorjahr, n=5 (mit Standardabweichung), Statistik: Tukey-HSD.

3.2.1.4 Wuchshöhe und Frischgewicht

Bei Versuchsende zeigten die Bergahorne, die im Vorjahr unter Trockenstress standen, eine leicht verminderte Wuchshöhe gegenüber den Bäumen der feuchten und moderaten Variante auf (s. Tab. 16). Zwischen den Kontrollpflanzen und den infizierten 2 ½-jährigen Bergahornen waren keine Unterschiede zu beobachten. Insgesamt war kein signifikanter Einfluss der Haupteffekte der Infektion mit dem Welke-Pathogen und des Bodenwassergehalts bzw. Interaktionen zwischen beiden Faktoren feststellbar.

Bei den Kontrollpflanzen konnte zu Versuchsende eine leichte Abnahme der Sprossfrischgewichte mit abnehmendem Bodenwassergehalt festgestellt werden. Bei den mit *V. dahliae* inkulierten Bergahornen war tendenziell eine leichte Zunahme der Frischgewichte mit abnehmendem Bodenwassergehalt erkennbar. Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten feststellbar.

Bei Versuchsende wiesen die Kontrollpflanzen der normal bewässerten Variante den höchsten Mittelwert für das Wurzelfrischgewicht auf (s. Tab. 16). Die Wurzelfrischmasse der gesunden Bergahorne unter Trockenstress war mit durchschnittlich 92 g um 38 % gegenüber der Feuchtvariante vermindert. Die mit *V. dahliae* infizierten Bergahorne wiesen in den drei Varianten vergleichsweise niedrigere Wurzelfrischgewichte von durchschnittlich 72 bis 77 g auf, doch ließ sich kein signifikanter Effekt bestimmen. Die hohen Standardabweichungen bei den sechs Varianten deuten auf eine hohe Varianz hin.

Tab. 16: Wuchshöhe und Sprossfrischgewicht mit n=26-32, Wurzelfrischgewicht mit n=8 bei Versuchsende am 12.11.2014 (mit Standardabweichung), Statistik: ANOVA, Tukey-HSD.

Variante	Wuchshöhe [cm]	Sprossfrischgewicht [g]	Wurzelfrischgewicht [g]
Kontrolle feucht	57,8 (±20,8) a	24,1 (±13,5) a	146,9 (±64,5) a
Kontrolle moderat	58,9 (±17,1) a	22,5 (±11,7) a	100,5 (±48,5) a
Kontrolle trocken	47,9 (±11,9) a	18,6 (±9,2) a	91,9 (±82,1) a
VD feucht	54,4 (±18,8) a	19,1 (±9,6) a	71,8 (±52,1) a
VD moderat	57,0 (±19,1) a	21,5 (±11,6) a	74,6 (±52,3) a
VD trocken	52,4 (±18,8) a	22,7 (±10,9) a	77,7 (±68,2) a

3.2.1.5 Reisolierung von *V. dahliae*

Aus den Stämmen der infizierten Bergahorne konnte *V. dahliae* durch Auflegen von Gewebe auf Nährmedien reisoliert werden, womit die Koch'schen Postulate als erfüllt gelten. Auf nährstoffarmen Wasseragar waren in den Agar eingelassene Mikrosklerotien, bestehend aus melanisierten Zellen, unter dem Binokular zu beobachten (s. Abb. 43 A). Die Sklerotien bildeten sich in konzentrischen Kreisen um den aufgelegten Holzspan. Unter dem Mikroskop waren bei 40-facher Vergrößerung die Mikrosklerotien erkennbar (s. Abb. 43 B).

Aus den infizierten Bergahornen konnte bei Versuchsende aus dem Jahrestrieb von 2012 bei 29 % der Bergahorne *V. dahliae* auf PDA reisoliert werden (s. Tab. 17). Auf nährstoffreichen PDA bildete sich schwarzes Myzel bzw. Dauerorgane mit weißem Luftmyzel. Auf Wasseragar wurde bei einem Anteil von 17 % *V. dahliae* reisoliert. Beim molekularbiologischen Nachweis mittels PCR mit den artspezifischen Primern DB19/DB22 nach CARDER et al. (1994) gelang bei 21 % der Nachweis. Unterschiede in den Anteilen der Reisolierung des Welke-Erregers zwischen den drei Varianten ergaben sich nicht. Aus den Kontrollpflanzen wurde *V. dahliae* nicht isoliert.

Tab. 17: Reisolierung von *V. dahliae* aus Bergahornstämmen auf Nährmedien (*Potato Dextrose Agar* und Wasseragar) und mittels PCR mit artspezifischen Primern DB19/DB22 bei Versuchsende.

Variante	PDA	WA	PCR-Nachweis
Kontrolle feucht	0 / 2	0 / 2	0 / 2
Kontrolle moderat	0 / 2	0 / 2	0 / 2
Kontrolle trocken	0 / 2	0 / 2	0 / 2
VD feucht	2 / 8	1 / 8	2 / 8
VD moderat	2 / 8	2 / 8	1 / 8
VD trocken	3 / 8	1 / 8	2 / 8

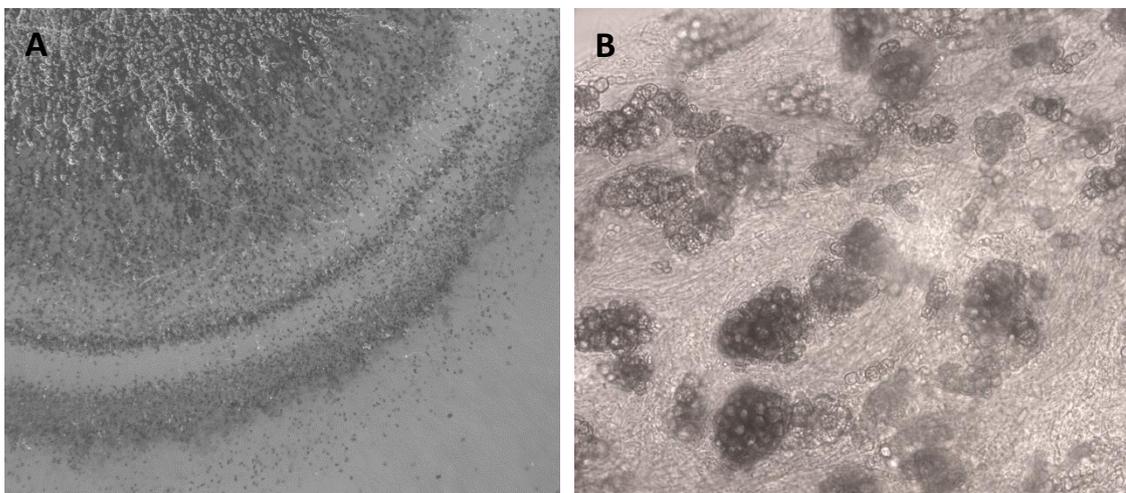


Abb. 43: Mikrosklerotien von *V. dahliae*, A: konzentrisches Wachstum auf Wasseragar, B: mikroskopische Vergrößerung der melanisierten Sklerotien (Fotos: N. Burgdorf).

3.2.2 Trockenstressversuch II

Der zweite Versuch zum Einfluss von Trockenstress bei Infektion von Bergahorn mit *V. dahliae* fand im Folgejahr unter annähernd gleichen Bedingungen in der Vegetationshalle statt (s. Abb. 44). Im zweiten Versuchsansatz wurde ein Mutterboden aus dem Raum Freising verwendet. Das verwendete Substrat war ein Tonschluff mit einem pH[H₂O]-Wert von 7.95. Der Boden war basischer im Vergleich zum verwendeten Substrat des ersten Versuchs, der einen pH[H₂O]-Wert von 4,73 aufwies. Das Versuchsdesign wurde ansonsten in allen Punkten gleichbleibend wiederholt. Jedoch korrelierten die artifiziiellen klimatischen Bedingungen während der Trockenstressphase ab Ende Juni 2014 weniger gut mit dem natürlichen Klima, da verstärkt Niederschläge auftraten (252 mm Niederschlag im Juli und August 2014).



Abb. 44: Zweiter Trockenstressversuch mit 1 ½-jährigem Bergahorn in randomisierter Blockanlage mit Magnetventilsteuerung für die verschiedenen Bewässerungsvarianten in der Vegetationshalle am Gewächshauslaborzentrum Dürnast der TU München (Foto: N. Burgdorf).

3.2.2.1 Welkesymptome

Welkesymptome im Trockenstressjahr

In den mit *V. dahliae* inokulierten Bergahornen trat in der Vegetationsperiode 2014 eine frühzeitige Seneszenz im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf (s. Abb. 45). In der Trockenstressphase ab Ende Juni wurde keine Verstärkung der Welkesymptome in den Varianten unter niedrigem Bodenwassergehalt beobachtet. In den mit *V. dahliae* infizierten Pflanzen verstärkte sich im Laufe der Vegetationsperiode der Welke-Index signifikant gegenüber den nicht-inokulierten Bergahornen (s. Abb. 45 D, F, H), jedoch waren innerhalb der drei Bewässerungsvarianten keine Unterschiede feststellbar.

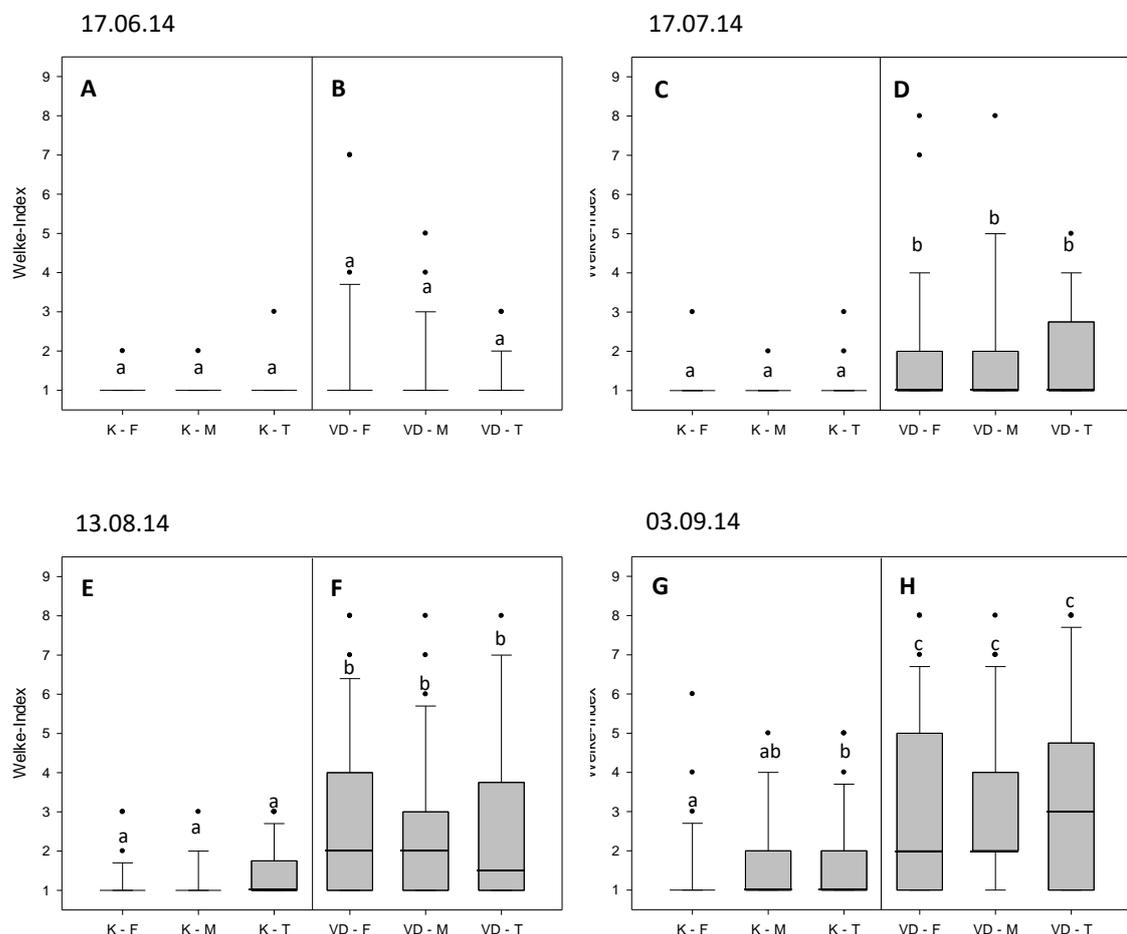


Abb. 45 A-H: Welke-Index der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne vor, bei und nach der Trockenstressphase vom 25.06. bis 25.08.14 am 17.06.14 (A, B), 17.07.14 (C, D, 22 Tage Trockenstress), 13.08.14 (E, F, 49 Tage Trockenstress) und 03.09.14 (G, H), n=32, Statistik: Conover-Test. Abkürzungen: K-F: Kontrolle + Bodenwassergehalt (BWG) feucht, K-M: Kontrolle + BWG moderat, K-T: Kontrolle + BWG trocken, VD-F: *V. dahliae* + BWG feucht, VD-M: *V. dahliae* + BWG moderat, VD-T: *V. dahliae* + BWG trocken.

Der Welke-Index der infizierten Ahorne unter Trockenstress war nach Abschluss der Trockenstressphase mit einem Mittelwert von 3,4 leicht gegenüber den gut bewässerten infizierten Pflanzen erhöht (s. Abb. 45 G, H). Die Trockenstressphase wurde mangels Ausprägung verstärkter Welke gegenüber dem Versuch im Vorjahr über zusätzliche zwei Wochen ausgedehnt. Im Juli 2014 fielen am Standort Weihenstephan über 140 mm Niederschlag (gegenüber 15 mm im Juli 2013), was durch die erhöhte relative Luftfeuchtigkeit Auswirkungen auf die Pflanzen geübt haben könnte (s. Anhang Tab. A7).

Nach zweifaktorieller ANOVA war an allen Terminen ein signifikanter Einfluss des Haupteffekts der Infektion mit dem Welke-Erreger im Vergleich zu den Kontrollpflanzen feststellbar (s. Tab. 18). Der Bodenwassergehalt übte im zweiten Trockenstressversuch keinen signifikanten Einfluss auf den Welke-Index. Auch Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren waren nicht feststellbar.

Tab. 18: Welke-Index 2014: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und der Bodenwassergehalte (feucht, moderat und trocken während der Trockenstressphase vom 25.06. bis 25.08.2014) und Interaktion zwischen beiden Faktoren nach ein- (17.06.14) bzw. zweifaktorieller ANOVA (ab 17.07.14).

	Welke-Index 2014			
	17.06.14	17.07.14	13.08.14	03.09.14
<i>V. dahliae</i>	*	***	***	***
BWG	-	n.s.	n.s.	n.s.
<i>V. dahliae</i> × BWG	-	n.s.	n.s.	n.s.

Die Bonituren der Welke-Indices ergaben für die Kontrollpflanzen unter den verschiedenen Bodenwassergehalten AUWPC-Werte auf einem ähnlichen Niveau (s. Abb. 46). Auch bei den mit *V. dahliae* inokulierten Bergahornen der drei Varianten lagen die AUWPC-Werte auf ähnlicher Höhe. Insgesamt waren die AUWPC-Werte der mit dem Welke-Erreger inokulierten Pflanzen signifikant gegenüber den Werten der Kontrollpflanzen erhöht.

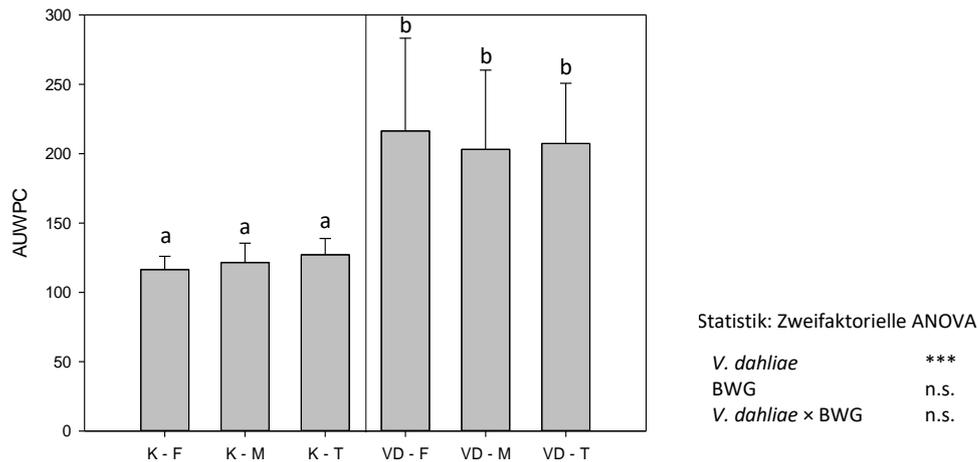


Abb. 46: AUWPC-Werte (*Area Under Wilt Progress Curve*) der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation über die gesamte Vegetationsperiode einschließlich der Trockenstressphase vom 25.06. bis 25.08.14 mit feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten (mit Standardabweichung), Statistik: Duncan-Test.

Welkesymptome im Folgejahr

Im Verlauf der Vegetationsperiode des Folgejahres 2015 wiesen die *V. dahliae*-infizierten Bergahorne verstärkt Welkesymptome auf. Bei den Kontrollpflanzen waren keine oder nur geringe Welkesymptome zu beobachten (s. Abb. 47). Die Welke-Indices der mit *V. dahliae* inokulierten Varianten waren ab Anfang Juni signifikant gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht (s. Abb. 47 C, D). Zwischen den Varianten unter guten, moderaten und niedrigen Bodenwassergehalten während der Vorjahres-Trockenstressperiode war im Folgejahr, wie bereits im ersten Versuch beobachtet wurde, kein bleibender Einfluss feststellbar. Durch die zweifaktorielle ANOVA wurde an allen Terminen ein signifikanter Einfluss des Haupteffekts der Infektion mit *V. dahliae* gegenüber den Kontrollpflanzen festgestellt (s. Tab. 19).

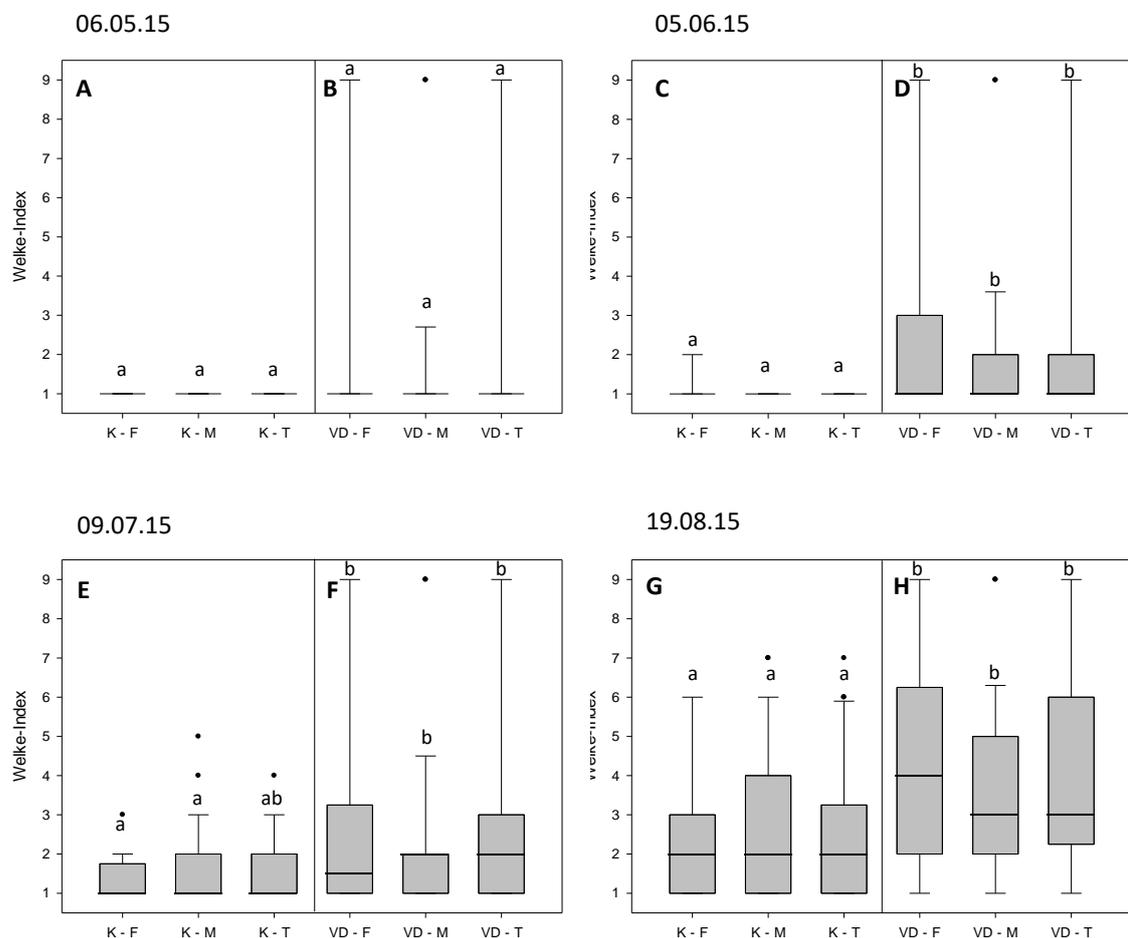


Abb. 47 A-H: Welke-Index im Folgejahr unter guten Bodenwassergehalten bei den Kontrollpflanzen und den mit *V. dahliae* inokulierten Bergahornen am 06.05.15 (A, B), 05.06.15 (C, D), 09.07.15 (E, F) und 19.08.15 (G, H); die Angaben feucht, moderat und trocken beziehen sich auf die Bodenwassergehalte vom 25.06. bis 25.08.14, Statistik: Conover-Test.

Tab. 19: Welke-Index 2015: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und der Bodenwassergehalte (feucht, moderat, trocken während der Trockenstressphase vom 25.06. bis 25.08.2014 des Vorjahres) und Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren nach zweifaktorieller ANOVA.

	Welke-Index 2015			
	06.05.15	05.06.15	09.07.15	19.08.15
<i>V. dahliae</i>	*	***	***	***
BWG	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die AUWPC-Werte lagen im Jahr nach der Trockenstressphase bei den Kontrollpflanzen auf einem ähnlichen Niveau, zwischen den Varianten mit verschiedenen Bodenwassergehalten im Vorjahr waren keine Unterschiede feststellbar (s. Abb. 48). Die AUWPC-Werte der mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne waren in den drei Varianten, wie bereits im ersten Trockenstressversuch, im Folgejahr signifikant gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht. Auch bei den infizierten Pflanzen war kein nachhaltiger Einfluss aus der vorjährigen Trockenstressphase zu erkennen.

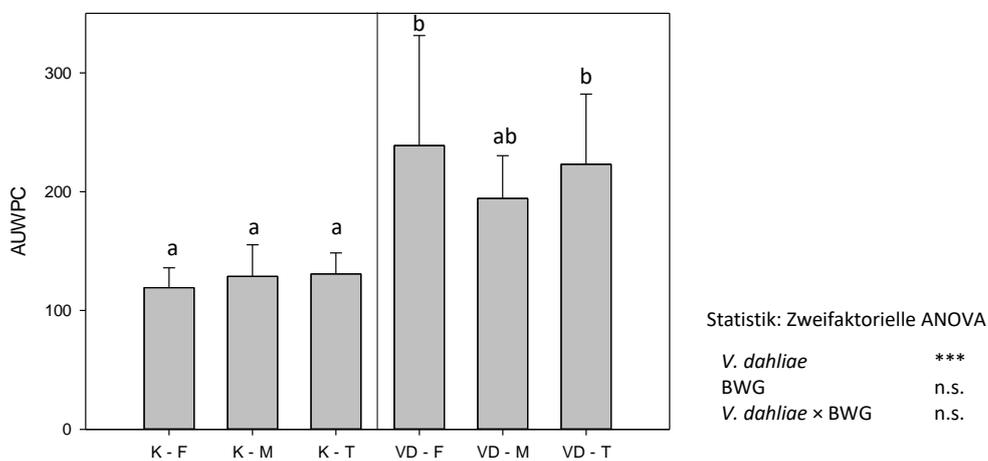


Abb. 48: AUWPC-Werte (*Area Under Wilt Progress Curve*) der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation im Folgejahr 2015 nach feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten im Sommer 2014 (mit Standardabweichung), Statistik: Duncan-Test.

Im zweiten Trockenstressversuch waren bei den infizierten Pflanzen in der Vegetationsperiode 2014 Welkesymptome sichtbar, jedoch trat keine Mortalität auf (s. Tab. 20). Im Jahr 2015 nach der Trockenstressphase war bereits im Frühjahr zu beobachten, dass 12 % der mit dem Welke-Erreger infizierten Bergahorne abgestorben waren. Die höchste Mortalitätsrate von 17 % trat bei den Pflanzen unter guter Wasserversorgung im Vorjahr auf. Bei einem kleinen Anteil der Bergahorne konnte bei Ernte der Pflanzen durch Absägen über dem Wurzelhals olivgrüne bis bräunliche Verfärbungen des vorjährigen Jahrrings festgestellt werden, die ausschließlich bei den mit *V. dahliae* infizierten Pflanzen auftraten.

Tab. 20: Welke-Index (mit Standardabweichung), Mortalität der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne unter verschiedenen Bodenwassergehalten nach Beendigung der Trockenstressphase 2014 und im Folgejahr 2015, n=32.

Variante	Trockenstressjahr 2014			Folgejahr 2015	
	vol. Bodenwassergehalt	Welke-Index 03.09.14	Mortalität 2014 [%]	Welke-Index 19.08.15	Mortalität 2015 [%]
Kontrolle feucht	22 %	1,4 ($\pm 1,1$)	0	2,5 ($\pm 1,6$)	0
Kontrolle moderat	17 %	1,8 ($\pm 1,2$)	0	2,8 ($\pm 2,0$)	0
Kontrolle trocken	12 %	1,8 ($\pm 1,1$)	0	2,5 ($\pm 1,8$)	0
VD feucht	22 %	3,1 ($\pm 2,2$)	0	4,4 ($\pm 2,8$)	17
VD moderat	17 %	2,9 ($\pm 2,0$)	0	3,7 ($\pm 2,1$)	7
VD trocken	12 %	3,4 ($\pm 2,3$)	0	4,1 ($\pm 2,5$)	11

3.2.2.2 Gaswechsel

3.2.2.2.1 Photosyntheserate

Die Gaswechselfparameter wurden im zweiten Trockenstressversuch zu jedem Termin bei 12 Pflanzen einer Variante bestimmt. Bei den mit *V. dahliae* infizierten Pflanzen als auch bei den Kontrollpflanzen war zu Beginn der Trockenstressphase kein Effekt durch die verminderten Bodenwassergehalte auf die Photosyntheserate zu beobachten (s. Abb. 49 A, B). Auch die Infektion mit dem Welke-Erreger hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Photosyntheserate. Am zweiten Termin nach drei Wochen Trockenstress war ein leichter Einfluss des Bodenwassergehalts erkennbar. Die CO₂-Assimilationsrate nahm in den Kontrollpflanzen und infizierten Ahornen von der Variante unter feuchtem Bodenwassergehalt zur Trockenstress-Variante hin leicht ab (s. Abb. 49 C, D).

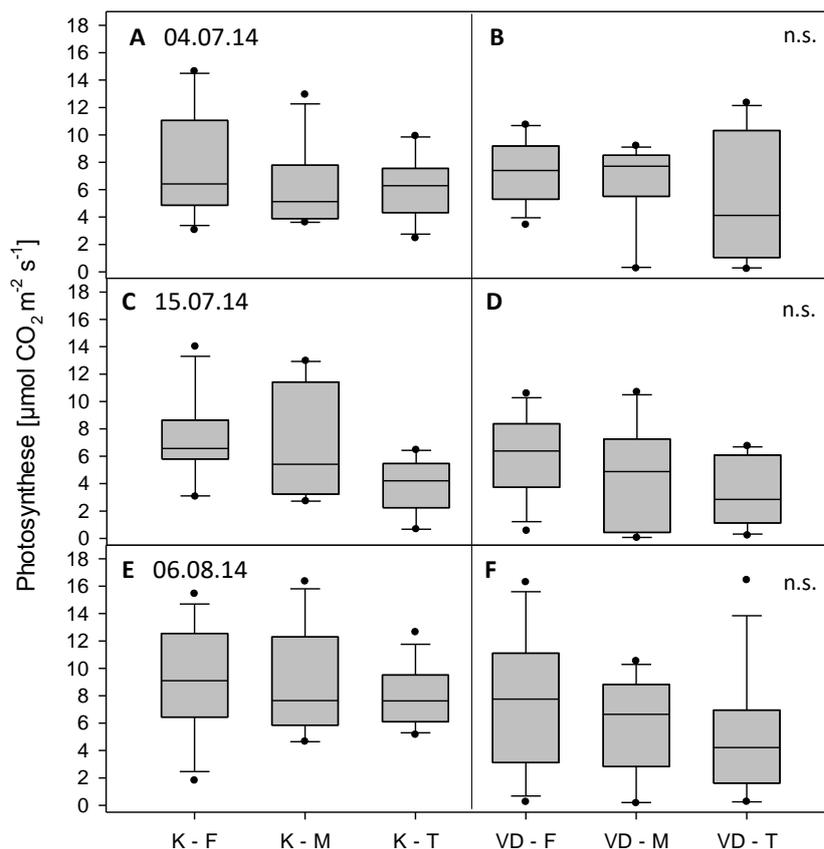


Abb. 49 A-F: Photosyntheserate der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt am 04.07.14 (A, B: 10 Tage nach Beginn der Trockenstressphase), 15.07.14 (C, D: drei Wochen nach Beginn) und 06.08.14 (E, F: sechs Wochen nach Beginn der Trockenstressphase), n = 12, Statistik: Tukey-HSD.

Abkürzungen: K-F: Kontrolle + Bodenwassergehalt (BWG) feucht, K-M: Kontrolle + BWG moderat, K-T: Kontrolle + BWG trocken, VD-F: *V. dahliae* + BWG feucht, VD-M: *V. dahliae* + BWG moderat, VD-T: *V. dahliae* + BWG trocken.

Nach sechs Wochen Trockenstress wiesen die Kontrollpflanzen der drei Versuchsvarianten eine hohe Photosyntheserate auf einem ähnlichen Niveau auf (s. Abb. 49 E, F). Bei den mit dem Pathogen infizierten Ahornen war eine leichte Abnahme der CO₂-Assimilationsrate mit abnehmenden Bodenwassergehalt zu erkennen. Zu diesem Termin ergab sich nach zweifaktorieller ANOVA ein leicht signifikanter Haupteffekt durch die Infektion mit dem Welke-Erreger (s. Tab. 21). An allen Terminen wiesen die mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne unter Trockenstress die geringste Photosyntheserate auf. Insgesamt wurden beim zweiten Trockenstressversuch höhere Assimilationsraten im Vergleich zum ersten Versuch bestimmt.

Tab. 21: Photosyntheserate 2014: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und der Bodenwassergehalte (feucht, moderat, trocken) während der Trockenstressphase vom 25.06. bis 25.08.2014 und Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren nach zweifaktorieller ANOVA ($p > 0,05$: n.s.; $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***).

	Photosyntheserate		
	04.07.14	15.07.14	06.08.14
<i>V. dahliae</i>	n.s.	n.s.	*
BWG	n.s.	**	n.s.
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	n.s.	n.s.

3.2.2.2 Stomatäre Leitfähigkeit

Zehn Tage nach Beginn der Trockenstressphase lagen die Werte für die stomatären Leitfähigkeiten der Kontrollpflanzen auf einem ähnlichen Niveau (s. Abb. 50 A). Bei den mit dem Welke-Erreger infizierten Bergahornen wurde bei der Variante unter Trockenstress der niedrigste Wert bestimmt, ein signifikanter Effekt war nicht feststellbar. Drei Wochen nach Trockenstressbeginn nahm die stomatäre Leitfähigkeit in den Kontrollpflanzen und infizierten Ahornen von der Feucht- über die Moderat zur Trocken-Variante hin ab (s. Abb. 50 C, D). Die infizierten Bergahorne unter Trockenstress wiesen an diesem Termin die niedrigste stomatäre Leitfähigkeit von $42,9 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ auf. Nach sechs Wochen unter abnehmenden Bodenwassergehalten war bei den Kontrollpflanzen kein Effekt auf die Stomata-Leitfähigkeit zu beobachten (s. Abb. 50 E). Bei den inokulierten Bergahornen ergab sich ein vergleichsweise niedrigerer Wert für die stomatäre Leitfähigkeit unter moderatem Bodenwassergehalt und Trockenstress (s. Abb. 50 F).

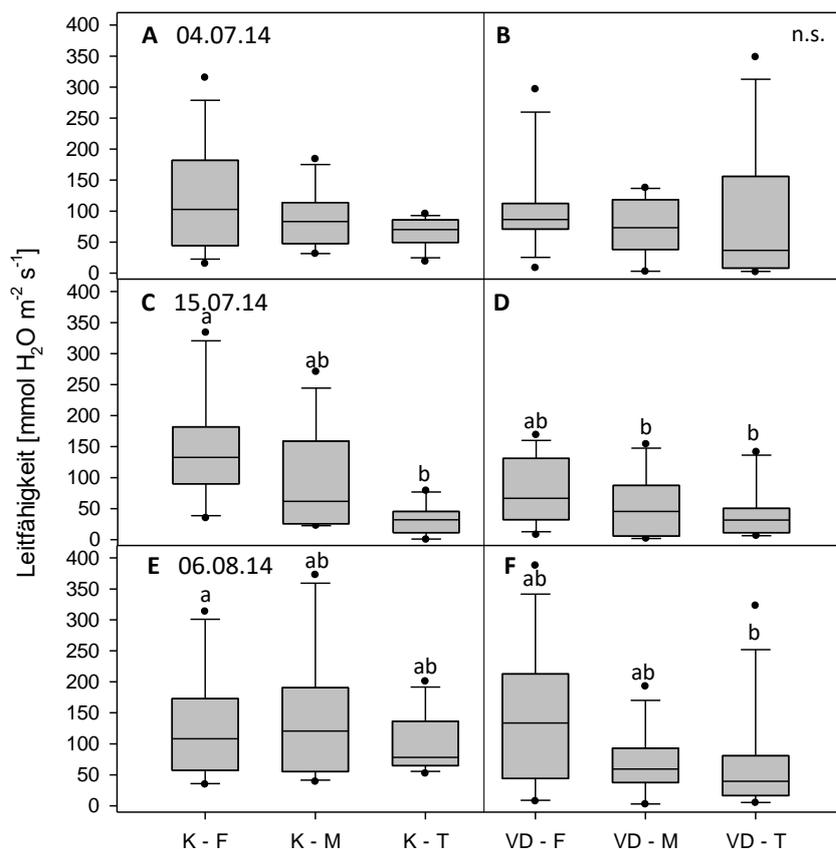


Abb. 50 A-F: Stomatäre Leitfähigkeit der Kontrollpflanzen und der mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt am 04.07.14 (A, B: 10 Tage nach Beginn der Trockenstressphase), 15.07.14 (C, D: drei Wochen nach Beginn) und 06.08.14 (E, F: sechs Wochen nach Beginn der Trockenstressphase), n = 12, Statistik: Tukey-HSD.

Am mittleren und letzten Messtermin ergab sich ein signifikanter Haupteffekt von *V. dahliae*-Infektion und Bodenwassergehalt, aber keine Interaktion zwischen beiden Faktoren (s. Tab. 22).

Tab. 22: Stomatäre Leitfähigkeit 2014: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und der Bodenwassergehalte (feucht, moderat, trocken) während der Trockenstressphase vom 25.06. bis 25.08.2014 und Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren nach zweifaktorieller ANOVA.

	Stomatäre Leitfähigkeit		
	04.07.14	15.07.14	06.08.14
<i>V. dahliae</i>	n.s.	*	**
BWG	n.s.	***	*
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	n.s.	n.s.

3.2.2.3 Hydraulische Leitfähigkeit

Im Sommer 2015 wurden Bergahorne für die Bestimmung der hydraulischen Wasserleitfähigkeit entnommen, wobei die Varianten unter guten und trockenen Bodenwassergehalten der Kontrollpflanzen und der *V. dahliae*-inokulierten Pflanzen gemessen wurden. Die hydraulische Wasserleitfähigkeit des Xylems vom Jahrestrieb 2013 war in den Kontrollpflanzen höher als in den mit dem Welke-Erreger infizierten Bergahornen, wobei die gut bewässerten Pflanzen die höchste Leitfähigkeit von durchschnittlich $1,78 \text{ kg MPa}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zeigten (s. Abb. 51). Die mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne wiesen niedrigere Werte mit einer höheren Varianz für die hydraulische Wasserleitfähigkeit auf, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

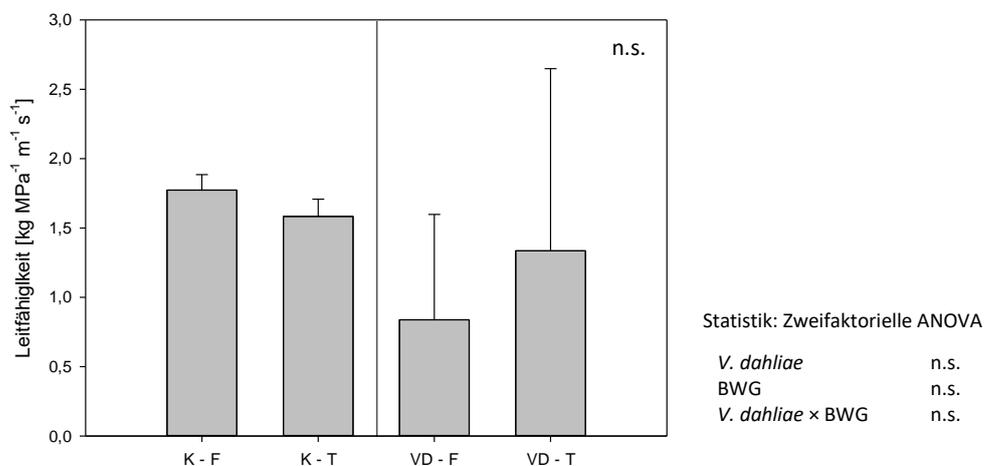


Abb. 51: Hydraulische Leitfähigkeit der Bergahorne (Stammabschnitt 2013) mit *V. dahliae*-Inokulation und der Kontrollpflanzen unter feuchtem und trockenem Bodenwassergehalt im Vorjahr, n=5 (mit Standardabweichung), Statistik: Tukey-HSD.

3.2.2.4 Wuchshöhe und Frischgewicht

Bei den 2 ½-jährigen Bergahornen wurden zu Versuchsende die Wuchshöhen und die Frischgewichte des Sprosses bestimmt. Die Kontrollpflanzen unter durchgängig guten Bodenwassergehalten wiesen den höchsten Wert von einer mittleren Höhe von 92 cm auf (s. Tab. 23). Die Wuchshöhen der mit *V. dahliae* infizierten Bergahorne waren gegenüber den Kontrollpflanzen signifikant niedriger, wobei die Pflanzen der Variante unter anhaltend feuchten Bodenwassergehalten die höchsten Wuchshöhen von durchschnittlich 65 cm erreichten.

Bei den Sprossfrischgewichten wurden die höchsten Werte bei den Kontrollpflanzen in der Trockenstress-Variante bestimmt. Die mit dem Pathogen inokulierten Ahorne wiesen gegenüber den Kontrollpflanzen signifikant verminderte Sprossfrischgewichte auf. Der Bodenwassergehalt übte auf die Wuchshöhe als auch auf Sprossfrischgewichte der gesunden und mit dem Welke-Erreger infizierten Pflanzen keinen Einfluss.

Tab. 23: Wuchshöhe und Sprossfrischgewicht zu Versuchsende am 15.10.2015, n=26-32 (mit Standardabweichung). Statistik: ANOVA, Tukey-HSD.

Variante	Wuchshöhe [cm]	Sprossfrischgewicht [g]
Kontrolle feucht	91,7 (±17,7) a	34,9 (±7,7) a
Kontrolle moderat	80,8 (±25,8) ab	31,0 (±5,9) ab
Kontrolle trocken	84,5 (±21,0) a	36,1 (±13,4) a
VD feucht	64,8 (±25,0) bc	24,8 (±11,4) b
VD moderat	56,4 (±23,2) c	28,7 (±11,0) ab
VD trocken	59,1 (±18,8) c	25,5 (±8,5) b

3.2.2.5 Reisolierung von *V. dahliae*

Aus den inokulierten Bergahornen konnte *V. dahliae* aus dem Jahrestrieb 2013 bei 38 % der Pflanzen auf PDA und bei 50 % auf Wasseragar reisoliert werden (s. Tab. 24). Mittels PCR-Nachweis mit den Primern Df/Dr nach Inderbitzin et al. (2013) wurde bei 38 % der Pflanzen *V. dahliae* nachgewiesen (s. Abb. 52). Zwischen den Varianten unter verschiedenen Bodenwassergehalten ergaben sich keine Unterschiede in den Anteilen der Reisolierung des Welke-Erregers. Aus den Proben der Kontrollpflanzen wurde *V. dahliae* nicht isoliert.

Tab. 24: Reisolierung von *V. dahliae* aus Bergahorn auf Nährmedien (*Potato Dextrose Agar* und *Wasser Agar*) und Nachweis mittels PCR mit artspezifischen Primern Df/Dr bei Versuchsende.

Variante	PDA	WA	PCR-Nachweis
Kontrolle feucht	0 / 2	0 / 2	0 / 2
Kontrolle moderat	0 / 1	0 / 1	0 / 1
Kontrolle trocken	0 / 1	0 / 1	0 / 1
VD feucht	2 / 5	3 / 5	2 / 5
VD moderat	1 / 5	2 / 5	1 / 5
VD trocken	3 / 6	3 / 6	3 / 6

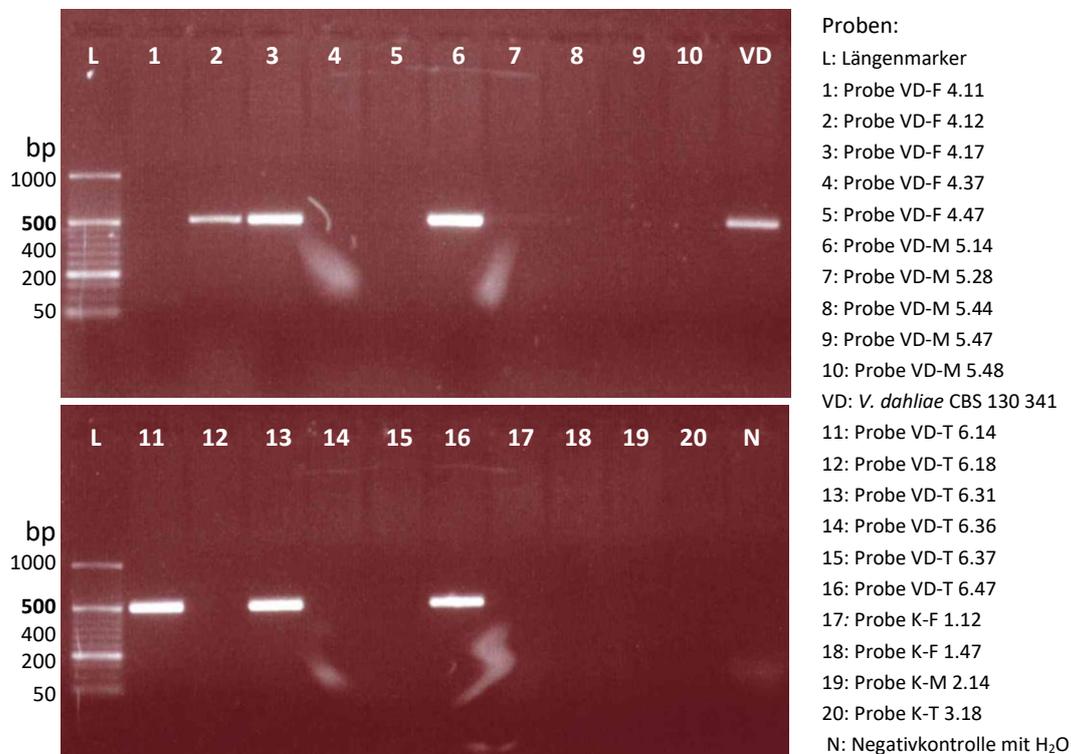


Abb. 52: DNA-Banden von Amplikons mit 490 Basenpaaren (bp) nach Gelelektrophorese und PCR mit dem Primerpaar Df/Dr nach Inderbitzin et al. (2013) für *V. dahliae*, DNA extrahiert aus Stammgewebe VD-inokulierter und nicht-inokulierter 2 ½-jähriger Bergahorne im Jahr 2015.

3.3 Inokulation von Bergahorn mit *V. dahliae* und *F. solani*

3.3.1 Wurzeltauch-Inokulation von Bergahornsämlingen

3.3.1.1 Welkesymptome

Bergahornsämlinge wurden durch Wurzeltauchen mit *V. dahliae* und *F. solani* inokuliert und im Vergleich zu Kontrollpflanzen im Klimakammerversuch hinsichtlich der Entwicklung von Blattwelke untersucht. Die mit *V. dahliae* inokulierten Pflanzen entwickelten nach drei Wochen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen deutliche Welkesymptome. Nach ca. sechs Wochen stieg die Welke bei den mit *V. dahliae* infizierten gegenüber den Kontrollpflanzen als auch gegenüber den mit *F. solani* infizierten Sämlingen signifikant an und erreichte einen Welke-Index von 4 (s. Abb. 53). Bei den mit *F. solani* infizierten Sämlingen waren über den Versuchszeitraum nur leichte Welkesymptome im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ausgeprägt und fielen gegenüber den mit *V. dahliae* inokulierten Pflanzen signifikant niedriger aus.

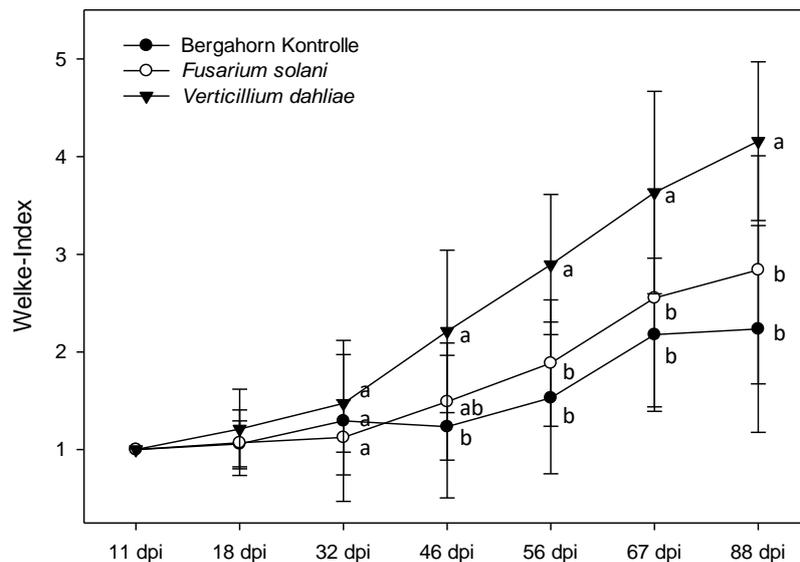


Abb. 53: Welke-Index von Kontrollpflanzen und Bergahornen inokuliert mit *V. dahliae* und *F. solani* 11 bis 88 dpi (*days past inoculation*), n=20 (mit Standardabweichung). Statistik: Kruskal-Wallis-Test.

3.3.1.2 Wuchshöhe

Über den Versuchszeitraum verzeichneten die Kontrollpflanzen einen Zuwachs von 125 % und die mit *F. solani* inokulierten Sämlinge einen Zuwachs von 113 % (s. Tab. 25). Bei den gesunden Sämlingen und den mit *F. solani* infizierten Pflanzen war somit mehr als eine Verdoppelung der Wuchshöhe zu beobachten. Bei den mit *V. dahliae* inokulierten Pflanzen war der signifikant niedrigste Zuwachs der Sprosswuchshöhe mit 31 % zu beobachten. Die Ausprägung von Welkesymptomen (s. Abb. 53) korrelierte bei den mit *V. dahliae* infizierten Bergahornsämlingen mit einer verminderten Wuchshöhe.

Tab. 25: Wuchshöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende und Zuwachs (%) über den Versuchszeitraum von 62 Tagen bei Kontrollpflanzen und Bergahornsämlingen inokuliert mit *V. dahliae* und *F. solani*, n=20 (mit Standardabweichung). Statistik: Tukey-HSD.

Variante	Wuchshöhe 30.06.14 [cm]	Wuchshöhe 01.09.14 [cm]	Zuwachs 62 dpi [%]
Kontrolle	4,5 ($\pm 1,4$) a	10,1 ($\pm 3,9$) a	125,2 a
<i>F. solani</i>	4,6 ($\pm 1,0$) a	9,9 ($\pm 6,5$) a	112,8 a
<i>V. dahliae</i>	4,7 ($\pm 1,1$) a	6,2 ($\pm 0,8$) b	31,3 b

3.3.1.3 Gaswechsel

Die Kontrollpflanzen wiesen mit einer Assimilationsrate von $3,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ die höchste CO_2 -Fixierung auf, die mit *F. solani* infizierten Ahorne waren mit $2,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ gegenüber den Kontrollen leicht abgesenkt (s. Abb. 54). Sechs Wochen nach Inokulation waren die Photosyntheseraten bei den mit *V. dahliae* infizierten Bergahornsämlingen signifikant erniedrigt, der Mittelwert lag bei $0,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Die stomatäre Leitfähigkeit war bei den Kontrollpflanzen mit $43,0 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ am höchsten, leicht abgesenkt bei den mit *F. solani* infizierten Ahornen und am signifikant niedrigsten bei den mit *V. dahliae* inokulierten Sämlingen mit $9,0 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (s. Abb. 55).

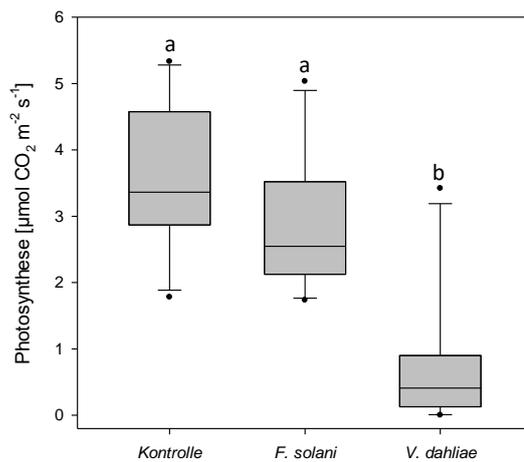


Abb. 54: Photosyntheserate von Kontrollpflanzen und Bergahornsämlingen inokuliert mit *V. dahliae* und *F. solani* (42 dpi), n=10. Statistik: Tukey-HSD.

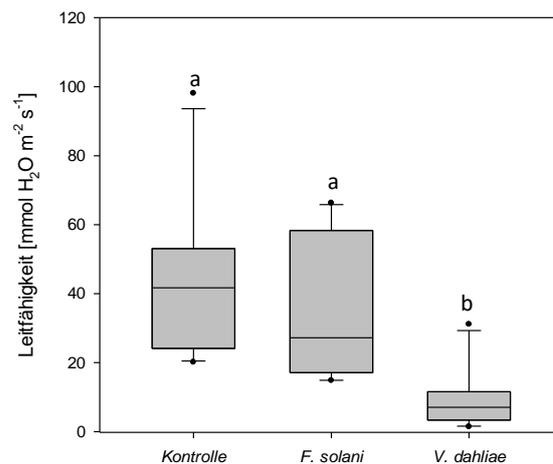


Abb. 55: Stomatäre Leitfähigkeit von Kontrollpflanzen und Bergahornsämlingen inokuliert mit *V. dahliae* und *F. solani* (42 dpi), n=10. Statistik: Tukey-HSD.

3.3.2 Stamm-Inokulation von Bergahornen

3.3.2.1 Welkesymptome

Im Vegetationshallenversuch wurden Bergahorne mittels Rindenverletzung und Aufsetzen eines Agarstücks mit *V. dahliae* und *F. solani* inokuliert. Bei den infizierten Bergahornen waren, wie auch in den Kontrollpflanzen, über den gesamten Versuchszeitraum von einem Jahr keine Welkesymptome zu beobachten.

3.3.2.2 Wuchshöhe und Gefäßverfärbungen

Ein Jahr nach der Stamm-Inokulation von Bergahornen mit *V. dahliae* bzw. *F. solani* konnten keine Effekte auf die Wuchshöhen bestimmt werden (s. Tab. 26). Zwischen den drei Varianten wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

In Folge der Inokulation mit *V. dahliae* war bei 90 % der Bergahorne eine deutliche Verfärbung des Jahrrings zu beobachten, nach der Inokulation mit *F. solani* waren 40 % und bei den Kontrollpflanzen 60 % der Bergahorne mit starken Verfärbungen der Jahrringe sichtbar. Die stark ausgeprägten Diskolorationen des Splintholzes zogen sich teils bis einen halben Meter im Gewebe hoch.

Tab. 26: Bergahorne mit Verfärbungen des Jahrrings, Länge der Verfärbung innerhalb des Stamms und Wuchshöhe der Kontrollpflanzen und Bergahorne mit *V. dahliae*- und *F. solani*-Inokulation, n=10 (mit Standardabweichung). Statistik: Tukey-HSD.

Variante	Bergahorn mit Verfärbungen	Länge der Verfärbung [cm]	Wuchshöhe [cm]
Kontrolle	6 / 10	29,5 ($\pm 6,6$) a	95,1 ($\pm 29,1$) a
<i>V. dahliae</i>	9 / 10	44,0 ($\pm 15,8$) a	100,7 ($\pm 23,9$) a
<i>F. solani</i>	4 / 10	53,5 ($\pm 18,1$) a	99,7 ($\pm 18,4$) a

3.3.2.3 Reisolierung

Eine Reisolierung von *V. dahliae* und *F. solani* durch Auflegen von verfärbten Gewebeschnitzen oberhalb der beigefügten Wunde auf Nährmedien gelang nicht. Aus den Kontrollpflanzen, die ebenfalls zu 60 % Verfärbungen des Jahrrings aufwiesen, wurde ebenfalls keiner der Erreger isoliert.

3.4 Molekularbiologischer Nachweis mittels *Next Generation Sequencing*

Da ein Nachweis von *V. dahliae* mittels PCR mit artspezifischen Primern bei jüngeren Ahornen mit frischen Infektionen funktionierte, nicht aber bei 20-jährigen und älteren Bäumen, wurden zwei Illumina-MiSeq-Sequenzierungen mit anschließender NGS-Pipeline nach BÁLINT et al. (2014) durchgeführt. Die Sanger-Sequenzierung ist nur bei Reisolaten möglich und schließt sich daher im Rahmen dieser Untersuchungen aus. Mit der neuen Technologie des *Next Generation Sequencing* lässt sich durch die Verwendung des Primerpaars ITS 1F/ITS 2 der ITS 1-Bereich mit einer Größe von ca. 190 Basenpaaren aller in der jeweiligen Probe befindlichen Ascomyceten und Basidiomyceten sequenzieren. Damit lassen sich insbesondere Mischinfektionen als auch Mikroorganismen, die nicht kultivierbar sind, nachweisen oder Einblicke in die pilzliche Artzusammensetzung von Umweltproben gewinnen.

In der ersten Sequenzierung wurden in 37 Proben insgesamt 1484 verschiedene OTUs detektiert, die mehr als insgesamt 10 *Reads* aufwiesen bzw. 633 OTUs mit mehr als 100 *Reads*. In der zweiten Sequenzierung wurden in 52 Proben 1593 OTUs generiert, die mit mehr als 10 *Reads* vertreten waren bzw. 603 OTUs mit mehr als 100 *Reads*. OTUs mit weniger als 10 *Reads* innerhalb einer Probe wurden verworfen, um mögliche Artefakte und Chimären auszuschließen.

Im Verlauf der Auswertung ergab sich die Schwierigkeit, dass bei einer geforderten Sequenzhomologie von 98 % für die Zuordnung einer OTU über die Gendatenbank UNITE, die Arten *V. dahliae* und *V. longisporum* nicht differenziert werden konnten, weshalb im Folgenden stets *V. dahliae/longisporum* angegeben wird. *V. longisporum* wurde jedoch bislang ausschließlich bei der Familie der Kreuzblütler und bei *Beta vulgaris* nachgewiesen, weshalb nach Inderbitzin & Subbarao (2014) das Pathogen bei anderen Pflanzenarten auszuschließen ist.

3.4.1 Laborkontrollen

Für eine Qualitätsabsicherung der MiSeq-Sequenzierung wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt, um eine Beurteilung von Methode und Software-Auswertung der Daten zu erlauben. Als Positivkontrolle fand eine Mischung der sechs Arten *V. dahliae*, *V. tricorpus*, *Trichoderma asperellum*, *T. virens*, *F. solani* und *Mortierella elongata* mit gleichen DNA-Anteilen Verwendung. Nach einer vorausgehenden PCR mit den durch spezifische Erkennungssequenzen markierten Primern, wurden im Laufe der MiSeq-Sequenzierung zwei weitere PCR-Schritte durchgeführt. Somit konnte nach dem Einsatz definierter DNA-Gehalte der Amplikons der sechs Arten Aufschluss darüber gewonnen werden, wie gut eine quantitative Einschätzung nach der Hochdurchsatz-Sequenzierung möglich ist.

In den Laborkontrollen 1, 2 und 3 wurden alle sechs Arten mittels Illumina-Amplikon-Sequenzierung detektiert. In der Kontrolle 1 der sechs Spezies mit gleichen DNA-Gehalten konnten nach der Sequenzierung Anteile von 4506 *Reads* für *F. solani* bis 18067 *Reads* für *V. dahliae/longisporum* nach der Software-Analyse den jeweiligen OTUs zugeordnet werden (s. Tab. 27). In der Kontrolle 2 wurden insgesamt weniger gelesene Sequenzen generiert, doch kam es mit 5471 bis 9163 *Reads* für eine OTU zu weniger großer Schwankungen. In Laborkontrolle 3 wurden zwischen 3489 bis 14031 *Reads* der unterschiedlichen OTUs generiert. Die Varianz der jeweiligen Anzahl der *Reads* der generierten *Operational Taxonomic Units* in den Kontrollen zeigt auf, dass das Verfahren im Rahmen dieser Untersuchungen eher als semiquantitativ zu bewerten ist.

Tab. 27: Anzahl und Prozent der *Reads* von *V. dahliae*, *V. tricornis*, *T. virens*, *T. asperellum*, *F. solani*, *M. elongata* in drei Laborkontrollen mit jeweils gleichen eingesetzten DNA-Gehalten vor der NGS (*in den Laborkontrollen wurde DNA des Referenzisolats *V. dahliae* CBS 130 341 verwendet).

OTU Taxon	Laborkontrolle 1		Laborkontrolle 2		Laborkontrolle 3	
	Anzahl <i>Reads</i>	Prozent <i>Reads</i>	Anzahl <i>Reads</i>	Prozent <i>Reads</i>	Anzahl <i>Reads</i>	Prozent <i>Reads</i>
<i>V. dahliae/longisporum</i> *	18067	27,8	7881	16,3	14031	25,4
<i>V. tricornis</i>	16234	25,0	8830	18,3	13454	24,4
<i>Trichoderma virens</i>	6480	10,0	7715	16,0	6206	11,2
<i>T. asperellum</i>	11291	17,4	9163	18,9	7435	13,5
<i>Fusarium solani</i>	4506	6,9	5471	11,3	3489	6,3
<i>Mortierella elongata</i>	8413	12,9	9296	19,2	10595	19,2
gesamt	64991	100,0	48356	100,0	55210	100,0

In der ersten Illumina-MiSeq-Sequenzierung wurden zwei weitere Positivproben mit DNA aus einem Stamm eines mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorns der Trockenstressversuche sowie dem zugehörigen Boden der Pflanze sequenziert. Dabei wurden neben OTUs anderer Pilze im Boden 14,7 % und im Stamm 6,3 % der *Reads* den OTUs von *V. dahliae/longisporum* zugeordnet. In der zweiten MiSeq-Sequenzierung wurde DNA von *Verticillium*-Referenzisolaten vom *Fungal Biodiversity Centre* CBS verwendet. Dabei wurden 98139 *Reads* von *V. dahliae/longisporum* bei Einsatz von *V. longisporum* (CBS 110233) detektiert und 19805 *Reads* von *V. tricornis* bei Einsatz von *V. tricornis* (CBS 447.54) nachgewiesen, was jeweils 99,9 % der *Reads* der generierten OTUs entspricht.

Als Negativkontrolle wurde in beiden NGS DNA von *Fusarium circinatum* verwendet. In der ersten Sequenzierung wurden 38679 *Reads* generiert, die *F. circinatum* zugeordnet werden konnten, was 99,2 % der *Reads* der OTUs dieser Probe entsprach. In der zweiten Sequenzierung wurden 62940 *Reads* generiert, die dem Pilz zugeordnet werden konnten, was 98,8 % der generierten *Reads* der OTUs entsprach. Zur Qualitätsabsicherung wurde bei den häufig generierten OTUs

ein weiterer Abgleich der Sequenzen über die Nukleotid-Sequenzdatenbanken GenBank und UNITE mittels BLAST Search (*Basic Local Alignment Search Tool*) durchgeführt.

3.4.2 Nachweis im Boden

Durch die Sequenzierung der ITS 1-Region der pilzlichen DNA konnte *V. dahliae/longisporum* in Boden- und Mikrosklerotien-Proben nachgewiesen werden. Bei den Bodenproben wurde vor der DNA-Extraktion das Verfahren des Einfrierens in Flüssigstickstoff und Erhitzens auf 70°C für jeweils 2 min in dreifacher Wiederholung angewandt, was bei den Dauerorganen aus den Nährmedien nicht durchgeführt wurde.

In den Bodenproben aus vier Bergahornbeständen, wurden Anteile von *V. dahliae/longisporum* zwischen 4,7 und 9,5 % der Gesamtsequenzen bestimmt (s. Tab. 28). Im Boden des Bergahornbestands bei Mauern mit einem Anteil von 49 % Bergahornen mit Stammnekrose wurden 4,7 % der pilzlichen DNA *V. dahliae/longisporum* zugeordnet. Im Bestand Jägersdorf mit 24 % geschädigten Bergahornen waren 7,0 % *V. dahliae/longisporum* zuzuweisen und im Bestand Osseltshausen, der ausschließlich Symptome der Verticillium-Welke aufwies, wurden 5,5 % der Sequenzen der OTUs von *V. dahliae/longisporum* zugeordnet.

Da hinsichtlich der Dauerorgane auf den semiselektiven Nährmedien Unsicherheiten bestanden, welcher Art diese morphologisch zuzuordnen waren, wurde mit DNA aus diesen Proben ebenfalls eine MiSeq-Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurde *V. dahliae/longisporum* mit einem Anteil von 2,2 bis 23,8 % bestimmt. Insgesamt war der Anteil der OTUs, die *V. dahliae/longisporum* zugeordnet wurden, sehr niedrig.

Tab. 28: Gesamtzahl Reads/Sequenzen in der Probe, Anzahl und prozentualer Anteil der Reads von OTUs von *V. dahliae/longisporum* von Bodenproben und aus Mikrosklerotien-Agarplatten (MS).

Probe	Gesamtzahl Reads	Anzahl Reads <i>V. dahliae/longisporum</i>	Prozent Reads <i>V. dahliae/longisporum</i>
Mau Boden	56925	2649	4,7
Jäg Boden	94795	6613	7,0
Oss Boden	49168	2706	5,5
Mei Boden	81093	7712	9,5
Mau MS	129982	4174	3,2
Jäg MS	94293	2112	2,2
Oss MS	112195	26658	23,8
Mei MS	34551	1147	3,3

3.4.3 Nachweis in Zweig- und Blattmaterial

In den Proben von Zweigen und Blättern aus dem Kronenbereich der Bestände bei Mauern und Jägersdorf konnten keine bzw. nur in sehr geringem Umfang OTUs der Gattung *Verticillium* zugeordnet werden (s. Tab. 29).

Tab. 29: Gesamtzahl *Reads*/Sequenzen, Anzahl und prozentualer Anteil der *Reads* von OTUs von *V. dahliae/longisporum* in Blatt- und Zweigproben von den Beständen bei Mauern (Mau) und Jägersdorf (Jäg) in der Hallertau.

Probe	Material	Gesamtzahl <i>Reads</i>	Anzahl <i>Reads</i> <i>V. dahliae/longisporum</i>	Prozent <i>Reads</i> <i>V. dahliae/longisporum</i>
Mau Zweig	Zweig	45876	19	0
Mau Blatt	Blatt	15298	2	0
Jäg Zweig	Zweig	45396	11	0
Jäg Blatt	Blatt	39477	0	0

3.4.4 Nachweis in Stammnekrosen

Bergahornbestände Hallertau

Im Rahmen der ersten MiSeq-Sequenzierung konnten in vier Stammnekrosen OTUs, die *V. dahliae/longisporum* zugeordnet wurden, nachgewiesen werden. In den Stammnekrosen aus den Bergahornbeständen bei Mauern und Jägersdorf wurde das Pathogen in verschiedenen Höhen detektiert (A: unterhalb der Nekrose, B: im unteren Bereich, C: in der Mitte, D: im oberen Bereich und E: oberhalb der Nekrose (s. Abb. 7, Kapitel 2.1.1.4)).

In der Stammnekrose von Bergahorn Mau 1 konnten OTUs von *V. dahliae/longisporum* nur in relativ geringer Häufigkeit von 0,1 bis 0,6 % der *Reads* in den verschiedenen Bereichen bestimmt werden (s. Tab. 30). Aus der Probe Mau 1E konnte keine PCR-fähige DNA extrahiert werden. Im zweiten Stamm wurden verhältnismäßig hohe Abundanzen von 11,9 % im mittleren Bereich bis 15,0 % unterhalb der Nekrose an OTUs, die *V. dahliae/longisporum* zugeordnet wurden, detektiert.

Tab. 30: Gesamtzahl der *Reads*, Anzahl und prozentualer Anteil der *Reads* von OTUs von *V. dahliae/longisporum* in vier Stämmen mit Nekrose aus den Beständen bei Mauern (Mau) und Jägersdorf (Jäg) in unterschiedlichen Höhenbereichen der Nekrose; grau hinterlegt: Proben aus Gewebe mit Verfärbungen (*aus Probe Mau 1E konnte keine DNA extrahiert werden).

Probe	Lage in Nekrose	Gesamtzahl <i>Reads</i>	Anzahl <i>Reads</i> <i>V. dahliae/longisporum</i>	Prozent <i>Reads</i> <i>V. dahliae/longisporum</i>
Mau 1A	unterhalb	109664	539	0,5
Mau 1B	unteres Ende	31189	189	0,6
Mau 1C	Mitte	170111	441	0,3
Mau 1D	oberes Ende	21441	25	0,1
Mau 1E*	oberhalb	-	-	-
Mau 2A	unterhalb	44984	6738	15,0
Mau 2B	unteres Ende	76211	8011	10,5
Mau 2C	Mitte	128557	15239	11,9
Mau 2D	oberes Ende	32982	961	2,9
Mau 2E	oberhalb	82629	1295	1,6
Jäg 1A	unterhalb	50287	1116	2,2
Jäg 1B	unteres Ende	20531	939	4,6
Jäg 1C	Mitte	20709	120	0,6
Jäg 1D	oberes Ende	133788	4808	3,6
Jäg 1E	oberhalb	88364	25710	29,1
Jäg 2A	unterhalb	5842	509	8,7
Jäg 2B	unteres Ende	66087	121	0,2
Jäg 2C	Mitte	146809	3349	2,3
Jäg 2D	oberes Ende	131387	283	0,2
Jäg 2E	oberhalb	85089	11147	13,1

Im zweiten Bergahornbestand in der Hallertau konnte bei Bergahorn Jäg 1 von 0,6 bis 29,1 % der OTUs *V. dahliae/longisporum* zugeordnet werden. Für die Proben von Jäg 2 ergaben sich Anteile der *Reads* von 0,2 bis 13,1 % der OTUs, die *V. dahliae/longisporum* zugeordnet wurden. Bei beiden Nekrosen wurden oberhalb des Stammschadens die höchsten Abundanzen von *Verticillium* sp. nachgewiesen. In einigen Holzproben aus Bergahornen in der Hallertau waren ebenfalls Sequenzen von OTUs der als apathogen beschriebenen Art *V. tricorpus* zu finden (s. Tab. 30). Auch ließen sich in den Holzproben OTUs nachweisen, die der Gattung *Fusarium* spp. zugeordnet wurden.

Anhand der Artenzusammensetzung in den verschiedenen Höhenstufen der Nekrosen war erkennbar, dass in einigen Abschnitten vornehmlich eine Art dominant auftrat, wie z. B. der Holzersetzer *Oxyporus populinus* im Stammteil Jäg 1C (s. Tab. 31). In anderen Bereichen der Nekrosen wurden wiederum viele verschiedene Arten nachgewiesen, wie in den Bereichen der Nekrose von Mau 2. Da die Entstehung der Stammrisse etwa neun Jahre zurücklag, waren vornehmlich holzersetzende Pilze als dominante Spezies zu finden. In den unterschiedlichen Höhenstufen der vier Nekrosen konnten in allen Bereichen OTUs den Arten *V. dahliae/longisporum* zugeordnet werden.

Tab. 31: Anzahl der Reads der 20 häufigsten OTUs in den Bereichen unterhalb (A), im mittleren Bereich (C) und oberhalb der Stammnekrose (E) bei vier Stämmen aus Berghornbeständen bei Mauern (Mau) und Jägersdorf (Jäg), mit Angabe des E-Values.

OTU Taxon	E-Value	Mau 1A	Mau 1C	Mau 2A	Mau 2C	Mau 2E	Jäg 1A	Jäg 1C	Jäg 1E	Jäg 2A	Jäg 2C	Jaeg 2E
<i>Oxyporus populinus</i>	5E-75	295	239	12849	40446	2214	879	20109	16931	0	100043	32237
<i>Verticillium dahliae/longisp.</i>	6E-60	539	441	6738	15239	1295	1116	120	25710	509	3349	11147
<i>Verticillium tricorpus</i>	2E-59	180	428	2315	4449	404	640	48	8585	467	5216	3711
<i>Cladosporium sp.</i>	2E-74	3	87	380	534	21	22179	3	661	0	120	631
<i>Saitozyma podzolica</i>	1E-48	149	44	1569	3760	287	2128	27	5874	0	2091	3405
<i>Diadymella fabae</i>	7E-66	113	100	708	2513	110	718	9	5621	0	1300	665
<i>Neurospora terricola</i>	3E-77	0	0	44	47	0	3	1	30	64	7358	0
<i>Penicillium cairnsense</i>	3E-77	0	31	17	22	0	5652	0	82	0	0	0
<i>Diadymella pinodella</i>	2E-65	29	19	613	7203	166	1989	3	840	0	575	2095
<i>Fusarium sp.</i>	8E-72	14	12	310	1072	57	121	2	693	0	3502	817
<i>Epicoccum nigrum</i>	2E-67	18	82	71	492	27	2632	2	447	0	567	330
<i>Exophiala brunnea</i>	8E-80	1370	108	618	338	10	127	1	738	0	1997	309
<i>Fungi</i>	2E-74	0	0	15	64	2	5	0	54	0	2818	0
<i>Rhytisma acerinum</i>	1E-55	11	20	189	468	40	15	7	487	0	703	1589
<i>Ilyonectria mars-panacis</i>	1E-62	3	4	1	97	6	11	1	146	0	2417	107
<i>Capnodiales</i>	2E-48	10	0	8	0	287	0	0	0	0	0	2488
<i>Cosmospora viridescens</i>	2E-73	0	10	8689	5050	276	10	0	330	1484	223	349
<i>Cadophora novi-eboraci</i>	4E-76	105598	1335	856	732	44	93	262	1346	0	49	385
<i>Mortierella rishiksha</i>	1E-69	49	3	302	481	30	215	1	1037	0	108	503
<i>Trichoderma yunnanense</i>	1E-89	12	116	184	521	5	46	1	628	0	425	490
Gesamtzahl Reads aller OTUs		109664	170111	44984	128557	82629	50287	20709	89173	5842	147361	85089

Berghornbestände Drackenstein, Meitingen, Dachau

Im Rahmen der zweiten Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde DNA aus sechs Stämmen von drei Standorten bei Drackenstein, Meitingen und Dachau untersucht. Dabei wurden Proben in fünf Querschnittsbereichen des mittleren Teils der Nekrose sequenziert (C1: Jahrring der Stammrisszone, C2: gesunder Jahrring fortlaufend vom Jahrring, von dem der Riss ausging, C3: Übergangsbereich in der radialen Verfärbung von gesundem zu nekrotischem Gewebe, C4: nekrotisches Gewebe innerhalb des verfärbten Bereichs, C5: gesundes Überwallungsgewebe (s. Abb. 13, Kapitel 2.4.1)). Zudem wurden wie in der ersten Sequenzierung Proben aus Bereichen ober- (E) und unterhalb der Nekrosen (A) sequenziert. Des Weiteren wurden Sequenzierungen der ITS 1-Region von DNA aus Holzgewebe in 5 m Höhe sowie aus einem weiteren Berghorn je Bestand, der keine Stammnekrose aufwies, vorgenommen.

Bei den Stämmen am Standort Drackenstein wurden im Bereich unterhalb der Nekrose über dem Stammfuß hohe relative Häufigkeiten von 13,3 und 61,6 % der OTUs von *V. dahliae/longisporum* detektiert (s. Tab. 32). Innerhalb des Jahrrings des nekrotischen und gesunden Bereichs konnte *V. dahliae/longisporum* ebenfalls in großer Häufigkeit bestimmt werden.

Tab. 32: Gesamtzahl der *Reads*, Anzahl und prozentualer Anteil der *Reads* von OTUs von *V. dahliae/longisporum* in Gewebeprobe aus verschiedenen Bereichen von zwei Stammnekrosen und einem Berghorn ohne Stammschaden aus dem Bestand bei Drackenstein (Dra); grau hinterlegt: Proben aus Gewebe mit Verfärbungen.

Probe	Lage in Nekrose	Gesamtzahl <i>Reads</i>	<i>Reads</i>	
			<i>V. dahliae/longisporum</i>	Prozent <i>Reads</i> <i>V. dahliae/longisporum</i>
Dra 1 A	unterhalb	4766	633	13,3
Dra 1 C2	Jahrring gesund	7185	1034	14,4
Dra 1 C1	Jahrring Nekrose	17535	1062	6,1
Dra 1 C3	Übergang radial	4111	258	6,3
Dra 1 C4	Mitte der Nekrose	11654	57	0,5
Dra 1 C5	Überwallungsgewebe	7928	749	9,4
Dra 1 E	oberhalb	6197	633	10,2
Dra 1 F	5 m Höhe	6749	106	1,6
Dra 2 A	unterhalb	17174	10585	61,6
Dra 2 C2	Jahrring gesund	12465	389	3,1
Dra 2 C1	Jahrring Nekrose	16147	1910	11,8
Dra 2 C3	Übergang radial	10323	14	0,1
Dra 2 C4	Mitte der Nekrose	104243	1457	1,4
Dra 2 C5	Überwallungsgewebe	3761	747	19,9
Dra 2 E	oberhalb	11537	0	0,0
Dra 2 F	5 m Höhe	3970	776	19,5
Dra 3 A	Kontrolle 0,5 m	9774	2332	23,9
Dra 3 B	Kontrolle 1 m	5819	1308	22,5

Im Bereich des mittleren nekrotischen Gewebes wurden hingegen verhältnismäßig wenige *Reads* mit 0,5 und 1,4 % detektiert. Erwartungsgemäß befanden sich in abgestorbenem Gewebe dominierende saprophytische Holzersetzer, wobei sich häufig eine Art durchzusetzen vermag (s. Tab. 35). Im überwallenden Gewebe beider Bergahorne wurden wiederum hohe Anzahlen an OTUs, die *V. dahliae/longisporum* zugeordnet wurden, nachgewiesen. In den Proben aus dem asymptomatischen Stamm Dra 3 konnten ebenfalls mehr als 20 % der OTUs von *V. dahliae/longisporum* zugeordnet werden.

Bei der Sequenzierung der DNA aus Stammnekrosen des Standorts Meitingen wurden in allen Proben OTUs detektiert, die *V. dahliae/longisporum* zugewiesen wurden (s. Tab. 33). In den Stammproben des Standorts Meitingen konnte ein Großteil der detektierten OTUs aus dem mittleren Bereich der Nekrose *V. dahliae/longisporum* zugeordnet werden. Insbesondere im mittleren verfärbten Bereich des Gewebes waren relativ große Häufigkeiten in beiden Stämmen mit 20,8 und 23,2 % für *V. dahliae/longisporum* detektiert worden. Die Stammmrisse in diesen Beständen waren verhältnismäßig jung, *V. dahliae* war insgesamt stärker etabliert und der Anteil von Sekundärerregern und holzersetzenen Pilzen geringer (s. Tab. 35). Auch im Überwallungsgewebe beider Nekrosen fanden sich verhältnismäßig hohe relative Anteile an OTUs von *V. dahliae/longisporum*. In den Proben des gesunden Bergahornstamms und der Probe Mei 2E oberhalb der Nekrose konnte keine PCR-fähige DNA gewonnen werden.

Tab. 33: Gesamtzahl der *Reads*, Anzahl und prozentualer Anteil der *Reads* von OTUs von *V. dahliae/longisporum* in Gewebeprobe aus verschiedenen Bereichen von zwei Stammnekrosen und einem Bergahorn ohne Stammschaden aus dem Bestand bei Meitingen (Mei); grau hinterlegt: Proben aus Gewebe mit Verfärbungen (* bei 3 Proben konnte keine DNA extrahiert werden).

Probe	Lage in Nekrose	Gesamtzahl <i>Reads</i>	<i>Reads</i>	
			<i>V. dahliae/longisporum</i>	Prozent <i>Reads</i> <i>V. dahliae/longisporum</i>
Mei 1 A	unterhalb	19799	39	0,2
Mei 1 C2	Jahrring gesund	1910	108	5,7
Mei 1 C1	Jahrring Nekrose	11791	429	3,6
Mei 1 C3	Übergang radial	6141	1055	17,2
Mei 1 C4	Mitte der Nekrose	7497	1559	20,8
Mei 1 C5	Überwallungsgewebe	8171	1296	15,9
Mei 1 E	oberhalb	35736	86	0,2
Mei 1 F	5 m Höhe	5405	835	15,4
Mei 2 A	unterhalb	10431	895	8,6
Mei 2 C2	Jahrring gesund	3557	808	22,7
Mei 2 C1	Jahrring Nekrose	3675	572	15,6
Mei 2 C3	Übergang radial	13867	215	1,6
Mei 2 C4	Mitte der Nekrose	6232	1444	23,2
Mei 2 C5	Überwallungsgewebe	7623	1259	16,5
Mei 2 E*	oberhalb	-	-	-
Mei 2 F	5 m Höhe	28036	1599	5,7
Mei 3 A*	Kontrolle 0,5 m	-	-	-
Mei 3 B*	Kontrolle 1 m	-	-	-

Bei der Illumina-Amplikon-Sequenzierung von Stammnekrosen des Bestandes nahe Dachau wurden in allen Proben aus verschiedenen Bereichen OTUs von *V. dahliae/longisporum* nachgewiesen. Die höchsten Abundanzen wurden in den weiterführenden Bereichen der Jahrringe ohne Verfärbungen detektiert, von denen ursprünglich der Stammriss ausging. In den Proben dieser Bereiche fanden sich OTUs des Erregers der Verticillium-Welke mit einem Anteil von 11,6 und 11,3 % (s. Tab. 34). In den mittleren stark nekrotischen Bereichen waren, wie auch bei den Proben vom Standort Drackenstein, sehr niedrige Anteile der OTUs von *V. dahliae/longisporum* nachweisbar. In der Probe aus dem asymptomatischen Bergahorn, fand sich die relative Häufigkeit von 19,9 % an OTUs von *V. dahliae/longisporum*. Bei insgesamt fünf Proben konnte nach mehrmaligen Extraktionen keine DNA für die Sequenzierung gewonnen werden.

Tab. 34: Gesamtzahl der *Reads*, Anzahl und prozentualer Anteil der *Reads* von OTUs von *V. dahliae/longisporum* in Gewebeproben aus verschiedenen Bereichen von zwei Stammnekrosen und einem Bergahorn ohne Stammschaden aus einem stark geschädigten Bergahorn-Eschen-Bestand bei Dachau (Dch); grau hinterlegt: Proben aus Gewebe mit Verfärbungen (* bei 5 Proben konnte keine DNA extrahiert werden).

Probe	Lage in Nekrose	Gesamtzahl <i>Reads</i>	<i>Reads</i>	
			<i>V. dahliae/longisporum</i>	Prozent <i>Reads</i> <i>V. dahliae/longisporum</i>
Dch 1 A	unterhalb	21309	19	0,1
Dch 1 C2	Jahrring gesund	37344	4320	11,6
Dch 1 C1*	Jahrring Nekrose	-	-	-
Dch 1 C3	Übergang radial	33493	4455	13,3
Dch 1 C4	Mitte der Nekrose	15314	70	0,5
Dch 1 C5*	Überwallungsgewebe	-	-	-
Dch 1 E*	oberhalb	-	-	-
Dch 1 F	5 m Höhe	20272	2236	11,0
Dch 2 A	unterhalb	16444	1316	8,0
Dch 2 C2	Jahrring gesund	27131	3055	11,3
Dch 2 C1	Jahrring Nekrose	35086	25	0,1
Dch 2 C3	Übergang radial	3803	102	2,7
Dch 2 C4	Mitte der Nekrose	36765	189	0,5
Dch 2 C5	Überwallungsgewebe	22771	1225	5,4
Dch 2 E	oberhalb	13153	240	1,8
Dch 2 F*	5 m Höhe	-	-	-
Dch 3 A	Kontrolle 0,5 m	186	37	19,9
Dch 3 B*	Kontrolle 1 m	-	-	-

Tab. 35: Anzahl der Reads der 20 häufigsten OTUs in den Bereichen unterhalb (A), im mittleren Bereich (C) und oberhalb der Stammekrose (E) bei sechs Stämmen aus Bergahornbeständen bei Drackenstein (Dra), Meitingen (Mei) und Dachau (Dch), mit Angabe des E-Values.

OTU Taxon	E-Value			Dra			Dra			Dra			Mei			Dch			
	1A	1C	1E	1A	1C	1E	2A	2C	2E	3A	1A	1C	1E	2A	2C	1A	2A	2C	
<i>Bjerkandera adusta</i>	6	3	18	0	4	0	4	0	0	28	0	51	32985	39	24	0	6	0	53
<i>Verticillium dahliae/longisp.</i>	633	1062	633	10585	1910	0	2332	39	429	86	895	572	19	1316	25	19	1316	25	240
<i>Neonectria</i> sp.	27	0	10	0	5	0	28	14267	9810	0	27	11	92	65	1	92	65	1	6
<i>Peyronellaea pinodes</i>	30	0	34	0	2	0	44	38	0	0	55	55	0	144	13428	0	144	13428	0
<i>Fungi</i>	4	0	13	2908	83	0	27	164	0	6	2081	23	6308	44	25	6308	44	25	0
<i>Exophiala brunnea</i>	3	3500	0	0	8	0	17	0	0	0	693	8	7130	1	4	7130	1	4	9
<i>Cadophora</i> sp.	4	0	15	18	106	10773	52	15	2	0	4	1	0	30	59	0	30	59	0
<i>Phialophora geniculata</i>	122	343	258	33	2356	0	1198	35	28	97	571	387	24	1477	288	24	1477	288	17
<i>Vishniacozyma carnescens</i>	3	2	7	3	1	0	12	101	9	38	10	10	0	19	6505	0	19	6505	0
<i>Pyrenochaeta cava</i>	46	2	20	0	4221	0	140	24	9	90	75	50	5	1904	15	5	1904	15	0
<i>Fungi</i>	1	0	9	28	1531	0	16	0	0	10	644	27	3656	438	0	3656	438	0	0
<i>Sarocladium kiliense</i>	1006	7	2295	1	16	0	1292	17	4	23	514	423	2	403	25	2	403	25	0
<i>Microascus</i> sp.	4	3691	0	1788	25	0	3	0	0	0	3	0	0	26	0	0	26	0	0
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	3	9	39	0	3379	0	143	0	23	59	57	46	11	1622	19	11	1622	19	0
<i>Vishniacozyma</i> sp.	10	0	17	1	1	0	7	2092	0	16	100	5	323	5	1523	323	5	1523	104
<i>Verticillium tricorpus</i>	653	0	461	7	30	0	992	20	7	0	844	434	0	260	270	0	260	270	31
<i>Pleurotheciella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	30	0	200	0	0	200	0	0	3687
<i>Cryptococcus</i> sp.	10	12	42	8	19	0	157	454	25	757	76	24	94	269	4449	94	269	4449	1103
<i>Cosmospora viridescens</i>	0	0	0	0	1	0	9	24	0	190	48	15	25	0	66	25	0	66	2495
<i>Cosmospora cupularis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	2732
Gesamtzahl Reads aller OTUs	4766	17535	6197	17174	16147	11537	9774	19799	11791	35736	10431	3675	21309	16444	35086	21309	16444	35086	13153

3.4.5 Anteile von *V. dahliae* in Nekrosenbereichen

In zehn Stammnekrosen wurde mittels DNA-Extraktion und anschließender Hochdurchsatz-Sequenzierung der pilzlichen ITS 1-Region *Operational Taxonomic Units* von *V. dahliae/longisporum* nachgewiesen. Die Anteile der *Reads* von *V. dahliae/longisporum* unterhalb (A), im mittleren Bereich (C) und oberhalb (E) der Nekrosen jeder Nekrose wurden in Relation gesetzt. Dabei waren unterschiedliche Verteilungen in den Stämmen der fünf Bergahornbestände zu erkennen. Im prozentualen Verhältnis der detektierten OTUs von *V. dahliae/longisporum* bestanden bei zwei Stämmen von jedem Bestand ähnliche Tendenzen (s. Abb. 56).

In den Stämmen vom Bestand Mauern waren unterhalb der Nekrose die verhältnismäßig höchsten Anteile der OTUs des Pathogens zu finden. Auch im Jahrring, von dem der Stammriss ausging, wurden hohe Anteile der OTUs von *V. dahliae/longisporum* detektiert. Bei den Nekrosen von Drackenstein und Dachau waren im Stammfußbereich bzw. unterhalb der Nekrose die verhältnismäßig höchsten Anteile zu finden. Bei den Sequenzierungen der beiden Stammnekrosen von Jägersdorf fanden sich oberhalb der Nekrose die höchsten relativen Anteile des Welke-Erregers. In den Proben aus den Nekrosen des Standortes Meitingen zeigten sich wiederum die höchsten prozentualen Anteile von *V. dahliae/longisporum* im Bereich des Jahrrings der Stammrisszone.

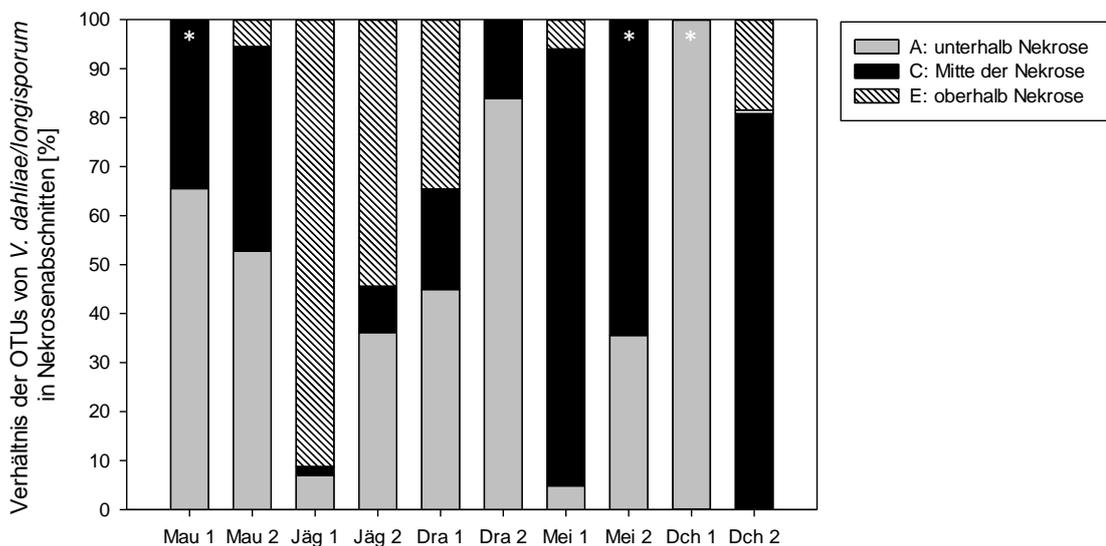


Abb. 56: Verhältnis der OTUs von *V. dahliae/longisporum* vom Bereich unterhalb, dem mittleren am stärksten zersetzten Bereich und oberhalb der Nekrose von zehn Bergahornstämmen (*Proben Mau 1E, Mei 2E, Dch 1C, Dch 1E keine Angabe, da keine Amplikons gewonnen werden konnten).

4 Diskussion

4.1 Stammnekrosen und Tracheomykosen bei Bergahorn

In den Jahren vor dem Untersuchungszeitraum wurde ein verstärktes Auftreten von Stammnekrosen an Bergahorn bayernweit beobachtet. Die Schäden traten vornehmlich innerhalb geschlossener Bestände auf, die im Rahmen von Erst- oder Wiederaufforstungen nach großen Sturmereignissen Anfang der 1990er Jahre gepflanzt wurden. Als Ursache der Nekrosen wurde bei einem Großteil geschädigter Bergahorne ein Befall mit *V. dahliae* festgestellt (SIEMONSMEIER et al. 2012). Der bodenbürtige Pilz *V. dahliae* dringt über Hyphen in Wurzelspitzenbereiche oder über Wurzelverletzungen in die Wirtspflanze ein und bildet bei der Besiedelung des Gewebes Sporen bzw. Konidien, die sich mit dem Transpirationsstrom im Gefäßsystem ausbreiten. Bei Gehölzen steigen die Konidien bis ans Ende der Gefäße auf, wo diese keimen und die Hyphen in das angrenzende Xylem eindringen und wiederum Sporen ausbilden (PERRY & EVERT 1983, PEGG 1985). Die Konidien von *V. dahliae* können eine über einen Meter hohe Pflanze innerhalb von 24 Stunden besiedeln (PRESLEY 1966) und bei Bäumen bis in die Kronenbereiche aufsteigen. Auch sind verschiedene Pathogenitätsgene für *Verticillium* sp. bekannt (EYNCK et al. 2007, LUO et al. 2014, TRAN et al. 2014), die mit dem Vermögen der Wirtsbesiedelung in Verbindung stehen.

Bei ausdauernden Pflanzen greifen bei Pathogenbefall Mechanismen, die im Xylem anatomische und chemische Veränderungen auslösen, um eine Pathogenabwehr zu induzieren (TIPPETT & SHIGO 1981, SHIGO 1984, BONSEN et al. 1985). Der Bergahorn reagiert bei Erkennung des Pilzes, neben noch nicht näher charakterisierten Signaltransduktionen, mit der Ausbildung von „Gummielagerungen“ im Xylem, um das befallene Gewebe abzuschotten und einer Ausbreitung entgegenzuwirken (SHIGO 1984, BONSEN 1991). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Reaktion bei fünf Bergahornen mit Stammnekrose anhand lichtmikroskopischer Untersuchungen bestätigt werden. Es wurden vielfach gummiartige Strukturen in den Gefäßen beobachtet, die das spezifische Gefäßverschlusskonzept des Ahorns (BONSEN & KUČERA 1990, BONSEN 1991) als Reaktion auf das Eindringen des Pathogens darstellen (s. Abb. 26, 27). Somit könnte *V. dahliae* bei der Ausbildung von Blockaden im Xylem und daraus resultierender Tracheomykosen beteiligt sein. Durch die mikroskopischen Aufnahmen von nekrotischem Gewebe wurden zudem Einlagerungen in den Holzstrahlen und Parenchymzellen beobachtet. PEGG & BRADY (2002) beschrieben für den Erreger der Verticillium-Welke eine Beschränkung auf die Xylemgefäße, die erst mit dem Absterben des Gewebes oder des Wirtes auf das umgebende Parenchym übergreift.

Das Gewebe von Bergahorn ist zerstreutporig mit relativ kleinen Durchmessern der Wasserleitbahnen von weniger als 100 μm . STÖHR (2003) fand bei Messungen an Bergahorn einen mittleren Durchmesser von 72 (± 18) μm für Tracheen und 12 (± 3) μm für Tracheiden. Die Jahrringe bleiben bei dieser Baumart über mehrere Jahre hinweg aktiv, so dass Schäden im Xylem, wie bei einer Blockade durch eine Pathogenabwehr, nachhaltige Auswirkungen haben (TIPPETT & SHIGO 1981). Bislang ist über die genauen Ursachen der Entstehung der Risse an den Stämmen wenig bekannt. SHORTLE et al. (1996) beschrieben beispielsweise basale Stammrisse als externe Indikatoren für Zersetzungen im Stamm aufgrund der Ausbreitung von Wurzelfäule-Erregern. GRABNER et al. (2006) fanden bei Untersuchungen an Schwarzkiefern, dass bei anhaltender Sommertrockenheit die Saugspannung der Tracheiden die Belastbarkeitsgrenze des Holzgefüges überschritt, was zu radialen Rissen innerhalb eines Jahrrings führte. Eine mögliche Erklärung für die Schädigung der Bergahorne durch die Besiedelung mit *V. dahliae* wäre, dass aufgrund der Abschottungsreaktionen des Baumes Volumenänderungen erzeugt wurden und durch die anschließenden Wassermangel Spannungen im Holz entstanden, aus denen die Risse hervorgingen. Als Ursache für die durch den Befall mit *V. dahliae* entstandenen Stammrisse wird daher die Austrocknung des Splints infolge der Gefäßverschlüsse angenommen. Dies könnte insbesondere bei zusätzlichem Wassermangel durch Trockenheit zu einer verstärkten Ausprägung führen. Zudem können die langlebigen und englumigen Gefäße der Gattung *Acer* zu der hohen Anfälligkeit beitragen und die Prädisposition von Bergahorn für eine Ausprägung von Verticillium-Welke und Stammnekrosen erhöhen.

Für eine differenzierte Analyse der Holzeigenschaften von Bergahorn bei Befall mit dem Pathogen wurden erstmalig computertomographische Aufnahmen (CT) im Bereich der durch *V. dahliae* verursachten Stammrisse bzw. Stammnekrosen angefertigt. Anhand der CT-Aufnahmen konnten bei acht Bergahornen spezifische Gewebeverfärbungen innerhalb der Stämme im Bereich der Nekrosen sichtbar gemacht werden. Es waren sowohl vor als auch nach der Trocknung der Stammscheiben im CT helle Färbungen der Jahrringbereiche sichtbar (s. Abb. 21, 22), die optisch olivgrün gefärbt erschienen. Die Entstehung der Verfärbungen wurde auf die lichtmikroskopisch nachgewiesenen Einlagerungen und Verdichtungen im Gewebe zurückgeführt. Dabei ist die von SHIGO (1984) und BONSEN (1991) beschriebene Abschottungsreaktion des Baumes durch Gummibildung als Ursache anzusehen. Die Verfärbungen gingen zumeist deutlich in axialer Richtung über den Bereich des Stammschadens hinaus.

Bei zwei Nekrosen war zu beobachten, dass mehrere Jahrringe im CT hell schienen, nach außen hin aber nur eine Nekrose bzw. Wundleiste ausgeprägt wurde (s. Abb. 21 C, D). Dies deutet auf Mehrfachinfektionen mit *V. dahliae* hin. Da das Splintholz bei *A. pseudoplatanus* mehrere

Jahrringe umfasst, könnte eine Infektion mit dem Erreger in unterschiedlichen Jahren oder auch innerhalb eines Jahres in verschiedenen Jahrringen stattgefunden haben.

In zehn von 2012 bis 2015 untersuchten Bergahornbeständen wurden bei 33 Prozent der Bäume Stammnekrosen im unteren Stammbereich festgestellt. In zwei Beständen konnte zudem eine ausgeprägte Welke einzelner Kronenteile oder der gesamten Krone beobachtet werden. Die Ausmaße der über dem Stammfuß auftretenden Nekrosen umfassten im Mittel 68 cm in der Länge und 4 cm in der Breite. Bei rund einem Drittel der geschädigten Ahorne traten zwei oder mehrere offene Nekrosen oder Wundleisten auf, die als Folge endogener Risse ausgebildet wurden. Der Zeitpunkt der Entstehung lag bereits 5 bis 12 Jahre zurück. Bei 74 % der geschädigten Bergahorne war im Untersuchungszeitraum ein voranschreitendes Überwallen der Risse zu beobachten. Dies war insbesondere beim Schließen der Nekrosen in tangentialer Richtung mit durchschnittlich 4 mm pro Jahr zu sehen. Die Überwallungsgeschwindigkeit war somit langsamer als bei anderen festgestellten Wundverschlussraten von Bäumen. So konnten DUJESIEFKEN et al. (2004) in ihren Studien etwa 5 mm für Buche und Roteiche sowie 9 mm jährliche Überwallung bei Weißeiche bestimmen. LOBIS (2007) hatte an Edelkastanie bei künstlich erzeugten Rindenverletzungen Verschlussraten von 4 bis 9 mm pro Jahr festgestellt. DUJESIEFKEN et al. (1991) beobachteten auch, dass die Wundreaktion bei Ahorn im Vergleich zu anderen Baumarten eher schleppend einsetzte. WARGO (1977) beschrieb für Zuckerahorn eine verlangsamte Wundheilung bei verminderten Zuwachsraten nach künstlicher Entlaubung. Diese Erkenntnisse könnten Hinweise darauf geben, dass bei der Schwächung von Bergahorn durch den Welke-Erreger *V. dahliae* physiologische Prozesse, die für die Überwallung der Stammrisse notwendig sind, verlangsamt sind.

Bei den untersuchten Bergahornen der zehn Bestände war trotz relativ langsam voranschreitender Überwallung ein hohes Revitalisierungspotential zu beobachten. Dies wurde anhand der Überwallungsleistung insbesondere bei Bäumen, bei denen teils mehr als die Hälfte des Splintholzes Verfärbungen bzw. nekrotisches Gewebe aufwies, deutlich (s. Abb. 18 B-D). Auch wurde in den Beständen nur vereinzelt Mortalität von *A. pseudoplatanus* beobachtet, was wahrscheinlich auf das vorangeschrittene Alter der Bäume zurückzuführen war. In mehreren Studien konnte bereits bei verschiedenen Wirtsbaumarten eine Revitalisierung einer vorangegangenen Infektion mit *V. dahliae* festgestellt werden (HIEMSTRA & HARRIS 1998, GOUD & TERMORSHUIZEN 2002, LÓPEZ-ESCUADERO & BLANCO-LÓPEZ 2005, MARKAKIS et al. 2009). Bei Eschen, die ebenfalls als sehr anfällig gegenüber dem Erreger der Verticillium-Welke gelten, wurde bei Untersuchungen von HIEMSTRA (1995) oftmals ein Ausheilen erkrankter Bäume beobachtet.

Als wichtiger Einflussfaktor bei der Ausbildung der Stammrisse gilt bei einem Befall mit *V. dahliae* insbesondere Trockenstress. Ein direkter Zusammenhang mit den Trockenstressjahren 2003

oder 2007 konnte im Rahmen der durchgeführten Freilandstudien jedoch nicht bestätigt werden. Bei 14 Stämmen wurden anhand des Jahrrings der Stammrisszone Entstehungsjahre von 2001 bis 2010 datiert. Da bei *A. pseudoplatanus* mehrere Jahrringe mit dem Pathogen besiedelt werden können und die Jahrringgrenzen des zerstreutporigen Splints teils schwer erkennbar sind (ROLOFF et al. 2010), war eine exakte Datierung des Befalls durch *V. dahliae* äußerst schwierig. SIEMONSMEIER et al. (2012) kamen bei der Auszählung der Jahrringe in den Überwallungen der Stammnekrosen von einem Bestand bei Freising zu dem Ergebnis, dass die Risse in Folge des Trockensommers 2003 auftraten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studien zeigen, dass die Ausbildung der Risse im unteren Stammbereich der Ahorne von fünf Beständen in mehreren Jahren einsetzte. Dennoch könnte der Medianwert mit dem Jahr 2004 Hinweis auf einen Zusammenhang mit dem Trockensommer 2003 hindeuten, so dass ein Großteil der Nekrosen im Folgejahr nach dem Trockenstress ausgebildet wurde. Bergahorne fortgeschrittenen Alters können im Gegensatz zu Jungpflanzen eine Infektion mit *V. dahliae* wahrscheinlich eher überleben, was jedoch mit Stammschäden und einer Holzentwertung einhergeht.

Für eine quantitative Einschätzung von *V. dahliae* im Boden der geschädigten Bergahornbestände wurde nach der Methodik von NEUBAUER & HEITMANN (2011) die Dichte von Mikrosklerotien ermittelt. HARRIS et al. (1993) beschrieben eine sehr heterogene Verbreitung der Dauerorgane des Erregers im Boden. Deshalb wurden nach einem definierten Raster an 16 Einschlagstellen in jedem Bestand Proben entnommen und zu einer Mischprobe vereinigt. Die Bodenproben wurden nach Trocknung und Nasssiebung auf einem semiselektiven Nährmedium ausgebracht, inkubiert und die Auszählung wurde unter dem Binokular vorgenommen.

Die Einschätzung der Erregerdichte ist mit Unsicherheiten behaftet, da ähnliche Dauerorgane bildende Arten häufig schwer eine Differenzierung erlauben (GOUD et al. 2003, KABIR et al. 2004, FRADIN & THOMMA 2006). Mehrere Arten der Gattung *Verticillium* spp. bilden Mikrosklerotien aus, die morphologisch schwer zu trennen sind. Daher war anhand der Methodik keine Differenzierung zwischen *V. dahliae* und *V. longisporum* möglich. Da die an Kreuzblütlern auftretende Art *V. longisporum* in Waldböden sehr wahrscheinlich auszuschließen ist (INDERBITZIN et al. 2013), kann angenommen werden, dass aus Böden von Waldbeständen isolierte Mikrosklerotien mit hoher Wahrscheinlichkeit *V. dahliae* zugeordnet werden können, sofern keine Erstaufforstungsflächen nach agrarwirtschaftlicher Nutzung mit Brassicaceen untersucht werden. Allerdings können auch die vergleichsweise größeren Mikrosklerotien der als apathogen beschriebenen Art *V. tricorpus* falsch interpretiert werden. Des Weiteren bilden verschiedene Arten, wie z.B. *Gibellulopsis nigrescens* (ZARE et al. 2007), ähnliche Dauerorgane in Form von Chlamydosporen mit melanisierten Zellen.

Bei Ringuntersuchungen von TERMORSHUIZEN et al. (1998) waren Ergebnisse verschiedener Labore hinsichtlich der Mikrosklerotiendichte von *V. dahliae* in Böden inkonsistent und schlecht reproduzierbar. Insbesondere das Ausplattierungsverfahren mittels Trocken- oder Nassplattierung beeinflusste die Ergebnisse. Zudem wurde die Unterscheidung zwischen *V. dahliae* und *V. tricorpus* von TERMORSHUIZEN et al. (1998) neben weiteren methodischen Aspekten als problematisch erkannt. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass in der Literatur benannte Mikrosklerotiendichten als schwer interpretierbar eingeschätzt werden müssen (TERMORSHUIZEN et al. 1998). Nach Untersuchungen von HEALE & ISAAC (1965) war die Ausbildung der Dauerorgane neben den spezifischen Nährmedien auch abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren. Bei einem ersten Versuchsansatz im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Petrischalen mit den Bodenproben mit Parafilm verschlossen (Daten nicht dargestellt), was im Vergleich zur Wiederholung der Studie ohne Verschluss der Petrischalen (s. Abb. 30) eine verminderte Ausbildung der Mikrosklerotien zur Folge hatte.

In den zehn Bergahornbeständen wurden innerhalb der drei Jahre schwankende und in einigen Beständen relativ hohe Erregerdichten detektiert, wobei wahrscheinlich ähnliche Dauerorgane anderer Pilze miterfasst wurden. Im Oktober des Jahres 2012 lagen die Werte bei 4 bis 133 Mikrosklerotien (MS), im Oktober 2013 bei 3 bis 83 MS und im Oktober 2014 bei 2 bis 318 MS pro Gramm Boden, wobei die Tendenzen der Häufigkeiten einzelner Bestände gleichblieben (s. Abb. 30-32). Die hohen Mikrosklerotiendichten, die im Laufe der dreijährigen Untersuchungszeit in den zehn Bergahornbeständen ermittelt worden sind, waren nach den Ergebnissen des *Next Generation Sequencing* aus Boden- und Mikrosklerotien-Agarplatten jedoch kritisch zu sehen (s. Kapitel 3.4.2). In den Böden von vier Bergahornbeständen lagen die Anteile sequenzierter DNA von *V. dahliae* bei durchschnittlich 7 %. Bei der Sequenzierung von DNA aus den Mikrosklerotienplatten lagen die Anteile von *V. dahliae* ebenfalls bei durchschnittlich 7 %, was aufzeigt, dass neben *V. dahliae* in hohen Anteilen Mikrosklerotien und Chlamydosporen ähnlicher Dauerorgane anderer Pilze mitgezählt worden sind.

In verschiedenen Studien bei einjährigen Kulturpflanzen konnten oft hohe Erregerdichten in den Böden nachgewiesen werden. PAPLOMATAS et al. (1992) fanden bis 62 MS in Baumwollfeldern, KOIKE et al. (1994) bestimmten bis 93 MS und XIAO et al. (1997) bis zu 394 MS g⁻¹ beim Anbau von Blumenkohl. BILODEAU et al. (2012) berichten von bis zu 622 MS g⁻¹ in natürlich infizierten Salatplantagen in Kalifornien. Bei Untersuchungen von einjährigen Kulturpflanzen konnte häufig ein Zusammenhang zwischen Erregerdichte und dem Auftreten der Verticillium-Welke festgestellt werden (NICOT & ROUSE 1987, PAPLOMATAS et al. 1992, HARRIS & YANG 1996, XIAO & SUBBARAO 1998, LÓPEZ-ESCUADERO & BLANCO-LÓPEZ 2007). GOUD et al. (2011) ermittelten bei 5 % von Spitzahornen in einer Baumschule eine Ausprägung der Verticillium-Welke bei nur 1 Mikrosklerotie g⁻¹ Boden.

Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit konnten keine Korrelationen zwischen der kritisch zu betrachtenden Dichte der Dauerorgane in den Böden und dem prozentualen Anteil geschädigter Ahorne festgestellt werden. Allerdings lag die Pflanzung der Bergahorne in den untersuchten Beständen teils über 20 Jahre zurück, weshalb keine Informationen über den ursprünglichen Zustand des Bodens hinsichtlich der Erregerdichte mit *V. dahliae* vorlagen.

Die Untersuchungen in drei Beständen, die im Rahmen dieser Studien regelmäßig alle zwei Monate beprobt wurden, zeigten extreme Schwankungen (s. Abb. 33). In den Wintermonaten war ein deutlicher Anstieg der Dauerorgane in den Beständen in der Hallertau zu beobachten, wobei rückblickend nicht beurteilt werden kann, in welchem Anteil Mikrosklerotien von *V. dahliae* korrekt bestimmt wurden. Da Mikrosklerotien auch ohne Wirtspflanzen weit über zehn Jahre im Boden überleben können (WILHELM 1955, SCHNATHORST 1981), wären hinsichtlich der Dichte innerhalb eines Jahresverlaufs eher weniger starke Schwankungen zu erwarten. Für das Überwinden der Dormanz gilt die Absonderung von spezifischen Wurzelexsudaten der Wirtspflanzen als notwendig. Wahrscheinlich ist auch ein Einfluss klimatischer Faktoren, die ein Auskeimen der Mikrosklerotien begünstigen bzw. unterdrücken. BERBEGAL et al. (2007) beschrieben, dass hinsichtlich der saisonalen Schwankungen der Inokulumdichte von *V. dahliae* wenig bekannt ist. Doch fanden WHEELER et al. (2000) bei Untersuchungen in Kartoffeläckern in Ohio eine höhere Mikrosklerotiendichte im Herbst im Vergleich zu Untersuchungen im Frühjahr. EVANS et al. (1967) bestimmten ebenfalls eine erhöhte Dichte der Dauerorgane von *V. dahliae* in Baumwollfeldern nach der Ernte gegen Ende der Vegetationsperiode, wobei wahrscheinlich der Eintrag aus organischem Material Einfluss ausübte. Die Ergebnisse zeigen, dass generell starke Schwankungen bei der Auszählung der Dauerorgane von *Verticillium* sp. auftreten können, für die es unterschiedliche Gründe gibt.

4.2 Einfluss von Trockenstress auf die Infektion mit *V. dahliae* bei Bergahorn

Um den Einfluss von Trockenstress auf die Infektion von Bergahorn mit *V. dahliae* zu untersuchen, wurden zwei Versuche in der halboffenen Vegetationshalle durchgeführt. Mit *V. dahliae* inokulierte und nicht-inokulierte Bergahorne wurden (für sechs Wochen im ersten und acht Wochen im zweiten Versuch) unter feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten während des Sommers nach der Inokulation untersucht. Die Pflanzen wurden insgesamt über zwei Jahre in der Versuchsanordnung der randomisierten Blockanlage beobachtet. Da der Versuchsansatz unter kontrollierten Bedingungen möglichst naturnah durchgeführt werden sollte, wurde im ersten Versuch Oberboden aus einem Waldbestand bei Freising abgetragen, der aus schluffig-lehmigen Sand bestand. Um eine Infektion mit bodenbürtigen Pilzen auszuschließen, wurde die Erde zwei Tage bei 80°C gedämpft. Beim zweiten Versuch wurde unter Beibehaltung des Versuchsschemas ein Mutterboden bestehend aus Tonschluff als Substrat genutzt. In den Versuchsjahren 2013 und 2014 variierten die Witterungsbedingungen insbesondere während der Trockenstressphase im Juli und August. Im ersten Versuch korrelierte das natürliche Klima mit hohen Temperaturen und wenig Niederschlägen gut mit der künstlichen Trockenstressphase. Im zweiten Versuch fiel während des Trockenstresszeitraums relativ viel Niederschlag, was durch die hohe Luftfeuchtigkeit in der halboffenen Vegetationshalle wahrscheinlich Einfluss auf die Bergahorne übte.

Die Inokulation der Ahorne mit *V. dahliae* führte im ersten Versuch bereits nach dem Austrieb bei 15 % der Pflanzen zu intensiven Welkesymptomen. Vor und während der Trockenstressphase ab Anfang Juli 2013 war bei den infizierten gegenüber den nicht-infizierten Ahornen eine signifikante Zunahme der Welkesymptome zu beobachten (s. Abb. 35). Auch bei den Trockenstress ausgesetzten Kontrollpflanzen waren ab Ende Juli Welkesymptome zu beobachten, die im Gegensatz zu den mit *V. dahliae* infizierten Pflanzen später und milder auftraten. Vor und im Laufe der sechswöchigen Trockenstressphase wurde ein durchgängig signifikanter Einfluss der Inokulation mit dem Welke-Erreger festgestellt. Der Bodenwassergehalt übte erst nach einem Monat Trockenstress signifikanten Einfluss auf die Pflanzen aus. Es bestanden zumeist keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Trockenstress und *V. dahliae*-Inokulation, was auf additive Effekte beider Faktoren schließen lässt. Erst nach Abschluss des Trockenstresses Ende August wurde eine leicht signifikante Interaktion zwischen beiden Faktoren festgestellt. Zu ähnlichen Ergebnissen führten bereits mehrere Studien. SCHREIBER & MAYER (1992) fanden nach Inokulation mit *V. dahliae* bei Spitz- und Silberahorn zu verschiedenen Zeitpunkten der Vegetationsperiode eine signifikant verstärkte Welke-Intensität und Häufigkeit. CAROSELLI (1957)

konnte den Effekt einer verstärkten *Verticillium*-Welke bei Ahorn durch verminderte Bodenwassergehalte beobachten.

Im Folgejahr nach dem Trockenstress, in dem die Pflanzen unter guten Bodenwassergehalten in der Vegetationshalle regenerieren konnten, blieb die nachhaltige Schädigung der Infektion mit *V. dahliae* sichtbar. Die mit dem Pathogen infizierten Bäume zeigten in den drei Varianten eine frühzeitige Seneszenz (s. Abb. 37). Die Infektion mit dem Erreger hatte an allen Terminen einen hoch signifikanten Effekt auf die Ausbildung der Welke. Insgesamt waren im Folgejahr 11 % der inokulierten Bergahorne abgestorben, wobei keine Korrelationen mit den vorjährigen Bodenwassergehalten zu beobachten waren.

Im zweiten Versuch waren bei den mit *V. dahliae* inokulierten Bergahornen wiederum signifikant erhöhte Welke-Indices im Jahr des Trockenstresses sichtbar. Jedoch ergab sich über die Vegetationsperiode kein Einfluss der Bodenwassergehalte bei den inokulierten als auch den gesunden Bergahornen. Die Kontrollpflanzen und die mit dem Pathogen inokulierten Pflanzen wiesen innerhalb der jeweils drei Varianten einen ähnlichen Welke-Index auf. Wahrscheinlich übten die hohen Niederschläge und die hohe Luftfeuchtigkeit und damit das geringe Wasserdampfsättigungsdefizit in Juli und August 2014 (s. Anhang Tab. A7) Einfluss auf die Pflanzen in der halboffenen Vegetationshalle aus. Als Folge fiel der Trockenstress hinsichtlich des Auslösens von Welkesymptomen insgesamt mäßiger aus, bzw. konnte sogar annähernd kompensiert werden. Im Folgejahr unter guter Wasserversorgung aller Pflanzen war, wie bereits im ersten Versuch, ein bleibender Einfluss durch den Erreger der *Verticillium*-Welke sichtbar (s. Abb. 47). Insgesamt war über die gesamte Vegetationsperiode 2015 eine signifikant erhöhte Ausprägung von Welkesymptomen bei den inokulierten gegenüber den Kontrollpflanzen zu beobachten. Ein Anteil von 12 % der Ahorne war im Herbst 2015 abgestorben.

Eine mögliche Erklärung für den nachhaltigen Effekt der Infektion mit dem Welkepathogen ist die von TIPPETT & SHIGO (1981) beschriebene Ausbildung von Barrieren im axialen Parenchym bei Gehölzen als Abschottungsreaktion bei Pathogenbefall. Nach Begrenzung der vertikalen Ausdehnung des Pilzes durch Thyllen oder gummiartige Einlagerungen, ist die Bildung von zusätzlichen lateralen Abschottungen für ausdauernde Pflanzen notwendig, um das angrenzende Kambium zu schützen (TIPPETT & SHIGO 1981). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Abschottungsreaktion der jungen Bergahorne mittels Ausbildung bleibender „Gummieinlagerungen“, möglicherweise auch in Kombination mit der Besiedelung des Xylems durch *V. dahliae*, für Welke und Mortalität im Folgejahr verantwortlich war. Eine Vermutung wäre, dass durch die Abschottungen, ähnlich wie bei der Reaktion auf Trockenstress, eingeschlossene Gasembolien im Wassertransportsystem erzeugt wurden. Dies könnte die Fähigkeit der Pflanzen verringern, Wasser

für den photosynthetischen Gasaustausch in die Blätter zu liefern, was letztendlich zu Austrocknung und Mortalität führt (CHOAT et al. 2012).

Aufgrund des mehrere Jahrringe umfassenden Splintholzes des Bergahorns wirken sich physikalische Blockaden im Xylem höchstwahrscheinlich nachhaltig negativ auf die Wasserversorgung der Pflanzen aus. Die verhältnismäßig kleinen Durchmesser der zerstreutporigen Gefäße sind in diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung. Bei jungem Ahorn sind Blockaden innerhalb eines Jahrrings womöglich schädigender für das komplette Wasserleitsystem als bei älteren Pflanzen, da weniger Leitgewebe für eine Kompensation zu Verfügung steht, was letztlich schneller zu Mortalität führen könnte. Die Bildung von spezifischen Toxinen, die Welke- und Absterbe-Erscheinungen induzieren können, wird von vielen Autoren kritisch gesehen (COOPER 2000, PEGG & BRADY 2002) und daher eher ausgeschlossen.

Bei den Gaswechselfmessungen während und nach der Trockenstressphase waren im ersten Versuch signifikante Effekte der Bodenwassergehalte auf die Photosyntheserate und stomatäre Leitfähigkeit feststellbar (s. Abb. 40, 41). Mit abnehmendem Bodenwassergehalt nahmen CO₂-Assimilation als auch stomatäre Leitfähigkeit in den mit *V. dahliae* inokulierten sowie den Kontrollpflanzen von der feuchten zur trockenen Variante hin ab. Zwischen den infizierten Pflanzen und Kontrollen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden. Doch wiesen die mit *V. dahliae* inokulierten Pflanzen unter Trockenstress an allen Terminen die niedrigsten Raten beider Gaswechselfparameter auf. Es wurden keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Bodenwassergehalt und *V. dahliae*-Inokulation auf Photosynthese und Leitfähigkeit festgestellt.

Im zweiten Versuch waren nach drei Wochen unter dem Bewässerungsschema signifikante Effekte des Bodenwassergehalts auf die Photosyntheserate und auf die Leitfähigkeit der Stomata messbar. Die mit *V. dahliae* inokulierten Pflanzen der Trockenstress-Variante wiesen, wie bereits im ersten Versuch, die niedrigsten CO₂-Assimilationsraten und Leitfähigkeiten auf. Es konnten keine signifikanten Interaktionen zwischen beiden Faktoren auf die Gaswechselfparameter bestimmt werden.

In anderen Studien zeichnete sich, bezüglich des Effektes von *V. dahliae* auf die Gaswechselfparameter infizierter Wirtspflanzen, kein einheitliches Bild ab. In Untersuchungen an *V. dahliae*-infizierten Kartoffeln konnten BOWDEN et al. (1990) und BOWDEN & ROUSE (1991) beispielsweise eine Reduktion der stomatären Leitfähigkeit und Photosyntheserate nachweisen. In den meisten Studien wurde jedoch festgestellt, dass eine Infektion mit *V. dahliae* die Gaswechselfparameter der Wirtspflanzen nicht signifikant beeinflusste. Beispielsweise fanden SAEED et al. (1987) keinen Einfluss auf die Assimilationsrate bei *V. dahliae*-infizierten Kartoffelpflanzen. Auch PASQUAL et al. (2010) fanden bei der Infektion von Paprika mit *V. dahliae* unter Wasserstress lediglich

einen Effekt durch den erniedrigten Bodenwassergehalt auf die Gaswechselfparameter. SADRAS et al. (2000) stellten bei Untersuchungen von Sonnenblumen mit *V. dahliae*-Infektion die Auswirkung einer verminderten Blattfläche fest, jedoch keinen Effekt auf die Photosyntheserate. LOPISSE et al. (2017) fanden auch bei Infektionsversuchen mit der nahverwandten Art *V. longisporum* an Raps keinen Einfluss auf Transpirationsrate, Leitfähigkeit, Photosyntheserate und Wassernutzungseffizienz.

Die Ergebnisse der Trockenstressversuche legen den Schluss nahe, dass die Pflanze bei einer Inokulation mit *V. dahliae* Effekte auf Gaswechselfparameter möglicherweise teilweise zu kompensieren vermag. Auch wurde an jeder Pflanze nur ein Blatt gemessen, das dem jüngsten voll ausgebildeten Blattpaar angehörte und nicht als repräsentativ für die gesamte Pflanze gelten kann. Zudem bildet die Messung der Gaswechselfparameter vergleichsweise weniger Pflanzen (Versuch I: n= 8, Versuch II: n=12) nur eine Momentaufnahme ab, die im Gegensatz zu den alle zwei Wochen aufgenommenen Welke-Indices aller 192 Bergahorne kein deutliches Bild der Pathogenese durch *V. dahliae* aufzeigen kann.

Im ersten Versuch war bei den mit *V. dahliae* infizierten Bergahornen die hydraulische Wasserleitfähigkeit bei Versuchsende deutlich gegenüber den Kontrollpflanzen abgesenkt. Im zweiten Trockenstressversuch konnten ebenfalls verminderte Wasserleitfähigkeiten bei den *V. dahliae*-inokulierten Stämmen festgestellt werden. Durch die kleine Datengrundlage bei Messung der hydraulischen Leitfähigkeit mit n = 5 wurden bei vorliegender Datenvarianz keine signifikanten Unterschiede ermittelt. In mehreren Studien konnten Effekte der Inokulation mit *V. dahliae* auf die hydraulische Leitfähigkeit bei verschiedenen Wirtspflanzen beobachtet werden. So fanden NEWBANKS & TATTAR (1982) nach künstlicher *V. dahliae*-Infektion an Rotahorn mit zunehmender Besiedlung des Stammes eine Abnahme der Wasserleitfähigkeit des Xylems. Auch SCHNATHORST (1981) beschrieb als Folge der Inokulation mit *V. dahliae* eine verminderte hydraulische Leitfähigkeit von Pflanzen. XIAO & SUBBARAO (2000) fanden bei Untersuchungen mit *V. dahliae*-Infektion an Blumenkohl einen Einfluss auf physiologische Prozesse, die mit der hydraulischen Leitfähigkeit verbunden sind, jedoch keinen Effekt auf Spross- und Wurzelwachstum.

Bei den Parametern Sprossfrischgewicht und Wuchshöhe konnten im ersten Versuch keine signifikanten Einflüsse durch die Inokulation mit *V. dahliae* oder Trockenstress bestimmt werden. Bei den Wurzelfrischgewichten waren Effekte eines verminderten Frischgewichts bei den infizierten Bergahornen feststellbar (s. Tab. 16). Beim zweiten Versuch ergaben sich hingegen signifikante Effekte. Die mit *V. dahliae* inokulierten Bergahorne wiesen gegenüber den Kontrollpflanzen erniedrigte Sprossfrischgewichte als auch Wuchshöhen auf. Auch in Studien von BIREM et al. (2016) konnte eine Reduktion des vegetativen Wachstums bei Infektion mit *V. dahliae* bei

toleranten und anfälligen Oliven Kultivaren festgestellt werden. Eine mögliche Hypothese für den signifikanten Einfluss des Erregers auf Wuchshöhe und Sprossfrischgewichte im zweiten Versuch wäre, dass ein eher chronischer Befall zu Wuchsdepressionen und weniger zu Welke-Erscheinungen führen könnte.

Durch die Reisolierung auf Nährmedien und durch DNA-Extraktion und PCR mit artspezifischen Primern nach CARDER et al. (1994) und INDERBITZIN et al. (2013) konnte *V. dahliae* aus dem Gewebe von Stämmen der infizierten Ahorne knapp zwei Jahre nach der Wurzeltauch-Inokulation in beiden Versuchen nachgewiesen werden. Damit gelten die Koch'schen Postulate als erfüllt. Aus gesunden Kontrollpflanzen wurde der Erreger nicht isoliert.

Bei 19 Prozent der Bergahorne war im ersten Versuch nach der Ernte an der Stammbasis eine Verfärbung des Splintholzes zu beobachten, was in den Kontrollpflanzen nicht auftrat. Die Verfärbungen der Jahrringe konnten somit der Besiedelung des Gewebes mit dem Welke-Erreger bzw. der Reaktion des Ahorns durch Gefäßverschluss mittels „Gummieinlagerungen“ zugeschrieben werden. Für *A. pseudoplatanus* gilt nicht die bei vielen Gehölzen verbreitete Thyllenbildung, sondern die Bildung gummiartiger Einlagerungen (BONSEN 1991). Auch XIAO & SUBBARAO (1998) konnten bei künstlich infiziertem Blumenkohl teils extreme Verfärbungen des Gewebes feststellen.

Eine Ausbildung von Stammrissen oder Stammschäden wurde bei keinem der zu Versuchsende 2 ½-jährigen Bergahorne beobachtet. Wahrscheinlich ist für die Ausbildung der Stammrisse ein längerer Zeitraum notwendig. EPSTEIN et al. (2004) konnten bei Untersuchungen an Pistazien erst nach etwa zehnjähriger Dauer seit Inokulation mit *V. dahliae* bei einem Teil der Bäume Stammrisse feststellen.

4.3 Infektion von Bergahorn mit *V. dahliae* und *F. solani*

Neben dem Erreger der Verticillium-Welke können auch Arten der Gattung *Fusarium* spp. bei vielen Pflanzenarten Welke und Mortalität verursachen (THOMAS 1949, BAKER et al. 1981, SINGH et al. 1999, FRADIN & THOMMA 2006, HUANG et al. 2017, TRABELSI et al. 2017). Aus diesem Grund wurde untersucht, inwiefern der von *Acer* isolierte Erreger *Fusarium solani* im Vergleich zu *V. dahliae* zu Symptomen wie Blattwelken und Chlorosen bei Bergahorn führen kann. Im Klimakammerversuch wurden Bergahornsämlinge durch Wurzeltauch-Inokulation mit *F. solani* bzw. *V. dahliae* infiziert. Im Vegetationshallenversuch fand eine Inokulation 1½-jähriger Bergahorne mit beiden Erregern über eine mechanische Stammverletzung statt.

Beim Versuch in der Klimakammer führte die Infektion der Bergahornsämlinge mit *F. solani* wie bei den Kontrollpflanzen nicht zur Ausbildung von Welkesymptomen. Auch waren keine Effekte auf die Wuchshöhe und die Photosyntheserate sechs Wochen nach der Inokulation mit *F. solani* an den Sämlingen zu beobachten. Bei der Infektion mit *V. dahliae* durch Tauchinokulation der Wurzeln führte dies im Vergleich zu den Kontrollpflanzen und den mit *F. solani* inokulierten Pflanzen hingegen zu signifikant verstärkten Welkesymptomen. Zudem war sechs Wochen nach der Inokulation mit *V. dahliae* bei den Bergahornsämlingen ein signifikant verminderter Zuwachs und eine verminderte Photosyntheserate festzustellen (s. Abb. 54). *F. solani* verursachte im Vergleich zum Erreger der Verticillium-Welke im Rahmen dieser Studie keine Blattwelke und war somit nicht pathogen an *A. pseudoplatanus*.

Die Stamminokulation fand neben der Wurzeltauchmethode bei Versuchen mit *Verticillium* sp. bereits vielfach Verwendung (ZENTMEYER et al. 1955, RESENDE et al. 1995). LÓPEZ-ESCUADERO et al. (2007) verwendeten diesen Weg der Inokulation, um Resistenzen bei Oliven nachzuweisen. Die Infektion von Bergahorn gelang im Rahmen der Studien der vorliegenden Arbeit mit dieser Methodik nicht. Bei der Inokulation mit beiden Erregern an Bergahornen mittels Rindenverletzung und Aufsetzen myzelbewachsener Agarstücke wurden im Versuchszeitraum weder Welke, Chlorosen oder Wuchsverminderungen beobachtet. Nach einem Jahr waren keine Beeinträchtigungen der Vitalität zu beobachten. Eine Reisolierung der Pathogene aus Bereichen des verfärbten Gewebes gelang nicht. Ob die Infektion des Bergahorns mittels mechanischer Rindenverletzung nicht funktionierte oder keinem effektiven Infektionsweg entsprach, kann abschließend nicht beurteilt werden.

Die Inokulation mit *V. dahliae* über den naturnahen Infektionsweg der Wurzeltauchmethode war somit für die Untersuchungen innerhalb dieser Studien als effektiver anzusehen. Auch bei Infektionsversuchen mit *V. dahliae* an Oliven von CIRULLI et al. (2008) wurde die

Wurzeltauchmethode als effektiver angesehen, da eine Beimpfung des Stamms mit Inokulum dort ebenfalls zu keinerlei Welkesymptomen führte.

In den mittels Rindenverletzungen beigefügten Inokulationen mit *V. dahliae* und *F. solani* bei jungen Bergahornen waren deutliche Verfärbungen des Splintholzes zu beobachten, die sich teilweise bis zu einem halben Meter im Stamm hinaufzogen. Da die Verfärbungen auch in den verletzten Kontrollpflanzen auftraten, ist davon auszugehen, dass diese eine Folge der mechanischen Verletzung von Rinde und Kambium darstellten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen verschiedene Studien. LEBEN (1985) fand durch künstlich erzeugte Verletzungen bei Rotahorn axial nach unten und oben verlaufende Verfärbungen bei gleichzeitigem Wundverschluss. In Untersuchungen von CIRULLI et al. (2008) mit *V. dahliae* an Oliven wurde nach Beifügen einer Wunde am Stamm und Beimpfen mit Inokulum keinerlei Welke beobachtet. Allerdings wurden auch in dieser Studie deutliche Verfärbungen im Leitgewebe der Pflanzen festgestellt. NEWBANKS & TATTAR (1982) wiederum fanden bei künstlicher Infektion an *Acer rubrum* eine positive Korrelation zwischen der Verfärbung des Gewebes und der Reisolierung des Pathogens. *V. dahliae* konnte in dieser Studie aus den Gewebebereichen isoliert werden, die Gewebeverfärbungen aufwiesen.

Untersuchungen von ASH (2000) an Laubbäumen und PERNEZNY et al. (2003) an Paprika führten ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Verfärbungen des Gewebes nicht für eine ausreichende Diagnose von holzbesiedelnden Schaderregern herangezogen werden können. EPSTEIN et al. (2004) fanden bei Untersuchungen mit *V. dahliae* an Pistazien über einen Zeitraum von zehn Jahren jährliche Neuinfektionen der Jahrringe und schlossen, dass die Verfärbungen eher als eine Resistenzantwort zu beurteilen sind, die keinen Einfluss auf Zuwachs und Ertrag der Pflanzen hatten. Auch BIREM et al. (2016) folgerten nach Untersuchungen mit *V. dahliae* bei toleranten und anfälligen Oliven Kultivaren, dass Verfärbungen des Gewebes wahrscheinlich eine Folge des Gefäßverschlusses der Pflanzen darstellen. Eine mögliche Hypothese für die Entstehung der Verfärbungen im Xylem der Bergahorne wäre demzufolge, dass durch die Verletzungen Unterbrechungen des Transpirationsstroms erzeugt wurden, wodurch Embolien entstanden, durch welche die Verfärbungen als Folge der Abschottungsreaktionen des Baumes induziert wurden. Verfärbungen im Splintholz können daher insbesondere bei einem mechanischen Schaden nicht als Symptom gedeutet werden, das auf einen Befall mit einem Pathogen hindeutet.

4.4 Molekularbiologischer Nachweis

Der Nachweis von *V. dahliae* mittels PCR mit den artspezifischen Primern DB19/DB22 (CARDER et al. 1994) und Df/Dr (INDERBITZIN et al. 2013) gelang aus Holzmaterial der Bergahorne der Trockenstressversuche, bei denen die Infektion knapp zwei Jahre zurücklag. Im Rahmen der Freilandstudien konnte der Erreger durch DNA-Extraktion und PCR mit artspezifischen Primern im Gewebe von Stammnekrosen junger Ahorne nachgewiesen werden, bei denen eine Infektion wenige Jahre zurücklag. Bei den Bergahornen der zehn Bestände, die bereits 20 Jahre und älter waren und die Nekrosen mit einem Alter von 5 bis 12 Jahren aufwiesen, gelang der Nachweis von *V. dahliae* durch PCR mit den artspezifischen Primern DB19/DB22 und Df/Dr nicht.

Aus diesem Grund wurde die neue Technologie des *Next Generation Sequencing* (NGS) mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung durchgeführt. Diese Methodik bietet den Vorteil gegenüber klassischen PCR-Nachweisverfahren, bei denen die Primer nur gezielt eine Gattung, Spezies etc. nachweisen, dass eine umfassende Analyse der pilzlichen Artenzusammensetzung ermöglicht wird. Anhand der verwendeten ITS-Primer kann die DNA-Barcode-Region aller in der jeweiligen Probe befindlichen Ascomyceten und Basidiomyceten durch NGS parallel amplifiziert werden. Damit können pathogene Pilze und Sekundärerreger detektiert werden, insbesondere wenn unbekannt ist, welche Erreger beteiligt sind und diese nicht kultivierbar sind. Nach Untersuchungen von SCHMIDT et al. (2013) war die Technologie der Illumina-MiSeq-Sequenzierung im Vergleich zur 454 Pyrosequenzierung für eine Metagenomanalyse von pilzlichen Artenzusammensetzung in Bodenproben sehr gut geeignet.

Im Rahmen der durchgeführten Illumina-Amplikon-Sequenzierungen konnte *Verticillium* sp. in verschiedenen Bereichen von zehn Stammnekrosen nachgewiesen werden. Der Erreger der Verticillium-Welke wurde zudem im Holz unter- und oberhalb der Stammnekrosen, dem Überwallungsgewebe, zwei asymptomatischen Bergahornen sowie in den Böden von vier geschädigten Bergahornbeständen detektiert.

PCR-Nachweis mit artspezifischen Primern:

Die Primerpaare DB19/DB22 und Df/Dr lieferten in den Trockenstressversuchen für den Nachweis von *V. dahliae* aus Holzgewebe und Blattmaterial im Rahmen der vorliegenden Studien replizierbare Ergebnisse. Nach Untersuchungen von ALJAWASIM & VINCELLI (2015), in denen artspezifische Primer für die Detektion von *V. dahliae* bei Gehölzen verglichen wurden, führte die Verwendung des Primerpaars DB19/DB22 nur bei einigen *V. dahliae*-Isolaten zum Nachweis. Auch weitere Primer führten in den Studien von ALJAWASIM & VINCELLI (2015) nicht zum PCR-Nachweis von *V. dahliae* bei Gehölzen, wie beispielsweise das Primerpaar Vd-F929/Vd-R1076 nach BILODEAU et al. (2012). Doch wurden in den Studien von ALJAWASIM & VINCELLI (2015) mit

dem Primerpaar VertBt-R/VertBt-F nach ATTALAH et al. (2007) gute Ergebnisse erzielt, was wiederum in den PCR-Nachweisen im Rahmen der Trockenstressversuche dieser Arbeit keine reproduzierbaren Amplikons generierte. Die Anwendung artspezifischer Primer für einen Nachweis von *V. dahliae* in Gehölzen mittels PCR scheint folglich inkonsistent zu sein.

BUTIN (2011) beschrieb für pathogene *Verticillium* Spezies bei Bäumen eine Ausbildung von wirtsspezifischen Rassen, was sich möglicherweise auch in einer genetischen Anpassung des Pilzes an seinen Wirt manifestiert haben könnte. SHORT et al. (2015) fanden nach DNA-Analysen von 1100 *V. dahliae*-Isolaten von unterschiedlichen Pflanzenarten mit globaler Verbreitung insgesamt sieben evolutionäre Linien, die weder geographisch eingrenzbar waren, noch einen spezifischen Wirtspflanzenkreis aufwiesen. Auch BERBEGAL et al. (2011) stellten nach genetischen Untersuchungen von *V. dahliae* an Artischocke und Kartoffel die Hypothese auf, dass sich Isolate im Laufe der Jahre an den Wirt adaptieren konnten und somit eine genetische Variabilität auftrat. Da der ITS-Bereich, in dem das Primerpaar Df/Dr ansetzt, nicht codiert und hochkonserviert ist, ist eine genetische Veränderung jedoch eher unwahrscheinlich. Die Primer nach ATTALAH et al. (2007) und DEBODE et al. (2011) codieren bei dem in phylogenetischen Untersuchungen häufig verwendeten Genlocus für β -Tubulin, welcher ebenfalls als konserviert gilt (KEELING 2003).

Da ein PCR-Nachweis von *V. dahliae* mit den Primerpaaren Df/Dr und DB19/DB22 in den Stammnekrosen nicht gelang, müssen mehrere mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden. Wahrscheinlich ging mit dem zunehmenden Zeitintervall seit der Infektion im nekrotischen Gewebe der Ahorne eine Vitalitätsabnahme von *V. dahliae* einher, insofern keine Neuinfektionen stattfanden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in den Jahren nach Ausbildung der Stammnekrosen eine natürliche Zersetzung von Myzel, Konidien und somit DNA stattfand. Im Rahmen der Trockenstressversuche dieser Arbeit ließ sich das Pathogen mittels PCR mit artspezifischen Primern ein bis zwei Jahre nach der Infektion in Holz- und Blattmaterial nachweisen, was Hinweis darauf geben könnte, dass das Gelingen eines molekularbiologischen Nachweises an die Vitalität und die Bildung von Myzel und Konidien gebunden war oder dadurch vereinfacht wurde. Zudem verdrängten in den Stammnekrosen Sekundärerreger wie holzzersetzende Pilze den primären Verursacher, was einen Nachweis zunehmend erschweren könnte. Ähnliche Probleme traten auch bei SINCLAIR et al. (1981) auf, die bei Untersuchungen an *A. platanooides*, *A. rubrum* und *A. saccharum* den Erreger *V. dahliae* durch Isolierungsmethoden auf Nährmedien nur bis maximal drei Jahre nach Infektion nachweisen konnten.

Ein weiteres Problem für den Erregernachweis im Rahmen der Freilanduntersuchungen stellte die DNA-Extraktion aus den melanisierten Dauerorganen von *V. dahliae* dar. Der Pilz bildet in seiner saprophytischen Lebensweise Mikrosklerotien in Form bräunlicher, verdickter Zellen, welche für eine langfristige Überdauerung gebildet werden. Bei Melaninen handelt es sich um

Farbpigmente, die der Schutzfunktion gegenüber Strahlung dienen und die als unlöslich gelten (BANERJEE et al. 2014). Möglicherweise konnten diese Strukturen durch die angewandten Verfahren nicht oder nur geringfügig aufgeschlossen werden. Folglich gelang es nicht, die DNA zu amplifizieren, was den Nachweis aus Mikrosklerotien als auch Bodenproben erschwerte bzw. unmöglich machte. BILODEAU et al. (2012) berichteten ebenfalls von Schwierigkeiten, *V. dahliae* im Boden mittels PCR nachzuweisen, da einerseits die melanisierten Zellstrukturen aufgebrochen werden müssen und andererseits in Böden Huminsäuren vorkommen, die die PCR unterdrücken (BRAID et al. 2003, SCHRADER et al. 2012) und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen können. Zudem besitzt Holz phenolische Komponenten und Polysaccharide, welche die *Taq*-Polymerase bei der PCR inhibieren können (DEMEKE & ADAMS 1992, OSMAN & ROWHANI 2006, BESSETTI 2007).

Doch konnte beim Großteil der Proben durch Verwendung des Primerpaars ITS 1F/ITS 2, das universal für Ascomyceten und Basidiomyceten codiert, ein Amplikon generiert werden, was eine Voraussetzung für die Durchführung der Hochdurchsatz-Sequenzierung mittels NGS darstellt. Die ITS-Region, eine Nukleotidsequenz zwischen den ribosomalen DNA-Genen, findet in der Phylogenetik vielfach Verwendung als Barcode-Region der Pilze. Das Primerpaar ITS 1F (GARDIES & BRUNS 1993) und ITS 2 (WHITE et al. 1990) fand in beiden NGS Studien im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich Anwendung.

Nachweis durch *Next Generation Sequencing*:

V. dahliae konnte mittels PCR mit artspezifischen Primern in den teils über zehn Jahre alten Stammnekrosen nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. Daher wurde die neue Technologie des *Next Generation Sequencing* angewandt. Bei der Illumina-Amplikon-Sequenzierung mit den Primern ITS 1F/ITS 2 für die ITS 1-Region wurden DNA-Sequenzen von Ascomyceten und Basidiomyceten amplifiziert, um die pilzliche Artenzusammensetzung in verschiedenen Bereichen der Stammnekrosen zu analysieren. Durch Abgleich der Basenabfolgen über die Sequenzdatenbank UNITE wurden *Operational Taxonomic Units* bestimmten Pilzarten oder Gattungen zugeordnet, worüber der Nachweis erfolgte.

Anhand des *Next Generation Sequencing* gelang der Nachweis von *Operational Taxonomic Units* (OTUs), die *V. dahliae/longisporum* zugeordnet werden konnten, in verschiedenen Bereichen aus dem Holz von zehn Stammnekrosen. Es ist anzunehmen, dass das Verfahren sensitiver als klassische PCR-Verfahren mit artspezifischen Primern ist. Daher können durch die hohe Anzahl detektierter OTUs mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr Arten in einer Probe nachgewiesen werden. Insgesamt wurden bei der Illumina-Amplikon-Sequenzierung drei PCR-Schritte durchgeführt und intensive Aufreinigungen der Amplikons vorgenommen, was die Sensitivität der

Methode erhöhen könnte, so dass der Nachweis von *Verticillium* sp. neben anderen pilzlichen Spezies gelang. Das Verfahren ist jedoch hinsichtlich der Häufigkeiten der OTUs eher als semi-quantitativ anzusehen und eine Beurteilung der Häufigkeiten bestimmter Spezies somit eher als Trend oder relative Schätzung zu beurteilen.

Nach Anwendung der NGS-Auswertungs-Pipeline nach BÁLINT et al. (2014) ergab sich die Schwierigkeit, dass *V. dahliae* und *V. longisporum* über eine Sequenzierung der ITS 1-Region bei einer 98 %igen Sequenzhomologie für die Zuordnung zu einer OTU nicht zu unterscheiden waren (s. Anhang Abb. A7). Bei der generierten Amplikonlänge von etwa 190 Basenpaaren macht dies einen Unterschied von mindestens vier Basenpaaren aus, die notwendig sind, um verschiedene OTUs zu differenzieren. Die nah verwandten Arten *V. dahliae* und *V. longisporum* besitzen neben morphologisch identischen Mikrosklerotien die gleiche ITS-Region (INDERBITZIN et al. 2011b) und sind daher durch die Sequenzierung dieser Genregion nicht zu unterscheiden. Für eine eindeutige phylogenetische Differenzierung beider Arten müsste mindestens ein weiterer Genlokus, wie beispielsweise der Translationselongationsfaktor 1α , sequenziert werden, was aus Zeit- und Kostengründen im Rahmen dieser Studien nicht durchgeführt werden konnte.

V. longisporum ist als Hybride beschrieben, bei der drei Linien bekannt sind (COLLINS et al. 2003), von denen bei zwei Linien *V. dahliae* als einer der Vorfahren gilt (INDERBITZIN et al. 2011b). Das Pathogen ist insbesondere im Rapsanbau in Europa von Bedeutung (HEALE 2000). Da *V. longisporum* einen sehr engen Wirtspflanzenkreis von Kreuzblütlern aufweist und bislang außerhalb dieser Pflanzenfamilie nur bei *Beta vulgaris* nachgewiesen wurde, ist eine Verwechslung nach INDERBITZIN & SUBBARAO (2014) bei Isolierung aus *V. dahliae*-spezifischen Wirtspflanzen als unwahrscheinlich einzuschätzen. Daher ist eine Besiedelung des Pathogens *V. longisporum* bei *A. pseudoplatanus* und in Waldböden vermutlich auszuschließen. Bei Böden von Erstaufforstungsflächen nach ackerbaulicher Nutzung muss *V. longisporum* hingegen in Betracht gezogen werden. Auch HIEMSTRA (2014) sieht es für einen molekularbiologischen Nachweis von *V. dahliae* bei Bäumen als ausreichend an, mit Gattungsspezifischen Primern zu arbeiten, da Bäume für andere Arten von *Verticillium* sp. keine Wirtspflanzen darstellen. Somit kann gefolgert werden, dass die im Rahmen der Illumina-Amplikon-Sequenzierung generierten OTUs von *V. dahliae/longisporum* aus verschiedenen Bereichen der Stammnekrosen der Spezies *V. dahliae* entstammten.

In zehn Stammnekrosen konnten mittels *Next Generation Sequencing* OTUs von *V. dahliae/longisporum*, die mit hoher Wahrscheinlichkeit *V. dahliae* entstammen, in Bereichen innerhalb als auch oberhalb und unterhalb der Nekrosen detektiert werden (s. Tab. 30, 32-34). Die höchsten Anteile an OTUs von *V. dahliae/longisporum* wurden bei 50 Prozent der Nekrosen im unteren Bereich über dem Stammfuß detektiert, was auf mögliche Neuinfektionen hindeuten oder in der

endophytischen Lebensweise des Pathogens begründet sein könnte. Beim Großteil der Nekrosen wurden in den am stärksten zersetzten mittleren Bereichen verhältnismäßig wenige OTUs von *V. dahliae/longisporum* nachgewiesen, was wahrscheinlich an natürliche Zersetzungsprozesse im Laufe der Jahre gekoppelt ist. In den Bergahornstämmen vom Standort Meitingen wurden auf mittlerer Höhe der Nekrose verhältnismäßig hohe Anteile detektiert, was auf das vergleichsweise junge Alter der Nekrosen zurückgeführt wurde, die weniger starken Zersetzungsprozessen unterlagen. Auch PURAHONG et al. (2018) konnten in Untersuchungen mittels NGS-Amplikon-Sequenzierung Pathogene der Gattung *Verticillium* spp. neben anderen Spezies in drei Jahre verrotteten Stämmen von Eschen und Linden nachweisen, die einer natürlichen pilzlichen Besiedelung unterlagen.

Da die Entstehung der Stammrisse auf die Jahre von 2001 bis 2010 datiert wurde und die Risse bereits überwallten, wurden in Rahmen der Amplikon-Sequenzierungen dieser Arbeit vornehmlich holzzersetzende Sekundärerreger, wie beispielsweise *Oxyporus populinus* und *Bjerkandera adusta*, als dominante Spezies bestimmt.

In Mischproben aus Böden von vier geschädigten Bergahornbeständen wurden Anteile von 4,7 bis 9,5 % an OTUs von *V. dahliae/longisporum* nachgewiesen. Auch MIRMAJLESSI et al. (2018) fanden bei der Illumina-Sequenzierung von fünf Böden mit gartenbaulicher Erdbeerkultivierung in Estland durchschnittlich 6,9 % an OTUs, die *V. dahliae* zuzuordnen waren. Bei der Sequenzierung der DNA aus den Dauerorganen aus den semiselektiven Nährmedien von vier Beständen wurden verhältnismäßig wenige OTUs von *V. dahliae/longisporum* nachgewiesen. Die Dauerorgane wurden von unsterilen Agarplatten entnommen und eine Vorbehandlung mittels Gefrieren und Erhitzen hatte im Gegensatz zu den Bodenproben nicht stattgefunden. Dennoch relativieren die Ergebnisse von 2,2 bis 23,8 % an Reads von *V. dahliae/longisporum* die bestimmten Erregerdichten der zehn Bergahornbestände.

In Zweigmaterial aus den Kronenbereichen zweier Bergahornbestände war *V. dahliae/longisporum* bei der Amplikon-Sequenzierung nur in extrem geringem Umfang und in Blattmaterial nicht nachzuweisen (s. Tab. 29). Dies könnte damit zusammenhängen, dass das Pathogen im Jahr der Probenahme nicht vital war, keine Neuinfektionen stattgefunden hatten oder *V. dahliae* nicht bis in Zweige und Blätter vorgedrungen war. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von BUBICI & CIRULLI (2014) beschrieben, die bei Untersuchungen an Oliven zeigten, dass *V. dahliae* häufiger in Stamm- und Astbereichen als in jüngeren Zweigen zu finden war. Auch MERCADO-BLANCO et al. (2003) fanden bei quantitativen Untersuchungen von *V. dahliae*-Infektionen an Olivenbäumen im Gewebe von Wurzel und Stamm die höchsten DNA-Gehalte des Pathogens.

Der Nachweis von *V. dahliae/longisporum* in Stammnekrosen gelang durch das neue Verfahren des *Next Generation Sequencing*, da die parallele Hochdurchsatz-Sequenzierung im Vergleich zu den klassischen PCR-Verfahren mit artspezifischen Primern mit hoher Wahrscheinlichkeit als sensitiver einzustufen ist. Insgesamt wurden während des NGS drei PCR- bzw. PCR-ähnliche Schritte sowie intensive Aufreinigungen der Amplikons durchgeführt, so dass auch die Amplifikation von pilzlichen Arten gelang, deren DNA nur in verhältnismäßig geringen Anteilen in den Nekrosen vorhanden war. Als weiteren Vorteil bietet NGS die Möglichkeit, Mischinfektionen und Sekundärerreger zu bestimmen sowie umfangreiche umweltanalytische Biodiversitätsstudien durchzuführen (THÜRMER 2014). Da die NGS-Technologie immer effizienter und kostengünstiger wird, sind vielfältige Innovationen zukünftiger Anwendungen zu erwarten. Die Aufbereitung der umfangreichen Datensätze stellt allerdings eine Herausforderung dar, die eine sachverständige Anwendung von bioinformatischer Software notwendig macht und bislang keiner einheitlichen Handhabung unterliegt.

Bei Gewinnung eines Reinisolats durch Isolierung des verantwortlichen Pathogens aus seiner Wirtspflanze besteht als weitere molekularbiologische Methode die Möglichkeit, die Sanger-Sequenzierung durchzuführen (SANGER et al. 1977). Für umfangreiche taxonomische Studien werden damit häufig mehrere genomische Bereiche einer Art sequenziert. Dies wird insbesondere dann notwendig bzw. angewandt, wenn nah verwandte Arten, wie beispielsweise *V. dahliae* und *V. longisporum*, viele DNA-Abschnitte mit Sequenzhomologien aufweisen. So sequenzierten INDERBITZIN et al. (2011a) für die Differenzierung der zehn pathogenen *Verticillium* Spezies insgesamt fünf Genloki.

Die meist genutzte Methode stellt in den Laboren derzeit vermutlich das klassische Nachweisverfahren der PCR mit artspezifischen Primern dar. Dies führt bei funktionalen Amplifikationen schnell zu einem Nachweis des Erregers. Seit der Erfindung der PCR in den 1980er Jahren (MULLIS et al. 1986) sind für viele Arten von Lebewesen spezifische DNA-Sonden bzw. Primer beschrieben, die einen taxonomischen Nachweis ermöglichen. Dieser PCR-Nachweis stellt im Bereich der Phytopathologie, neben der morphologischen Zuordnung des Pathogens durch mikroskopische Verfahren, bislang die Methode der Wahl dar. Im Hinblick auf die zunehmende Aufsplittung einzelner Spezies ist bei der Diagnostik von phytopathogenen Schaderregern eine weitere Zunahme molekularbiologischer Nachweisverfahren wahrscheinlich.

5 Zusammenfassung

In Bergahornbeständen Bayerns wurden in den vergangenen Jahren verstärkt Stammnekrosen und Triebwelken beobachtet, für die der bodenbürtige Pilz *Verticillium dahliae* (KLEBAHN 1913) verantwortlich gemacht wird. Der Erreger der Verticillium-Welke hat sich durch den großen Wirtspflanzenkreis und langlebige Dauerorgane in den Böden etablieren können und profitiert von Klimabedingungen mit erhöhten Temperaturen. Über die Verbreitung des Pathogens ist in Forst und Waldökosystemen bislang wenig bekannt (INDERBITZIN & SUBBARAO 2014).

Aus diesem Grund wurden Studien bezüglich der Epidemiologie von *V. dahliae* in Bergahornbeständen durchgeführt. In den Beständen wies ein Drittel der Bergahorne Stammnekrosen im unteren Stammbereich auf. Die Größe der offenen Nekrosen betrug durchschnittlich 68 cm in der Länge und 4 cm in der Breite. Bei 73 Prozent der Bäume war ein jährliches Überwallen von 4 mm in tangentialer Richtung zu beobachten. Anhand von computertomographischen Aufnahmen konnten erstmalig im Holzkörper im Bereich der Stammnekrosen ausgedehnte Verfärbungen sichtbar gemacht werden, die in Folge der Infektion mit *V. dahliae* auftreten. Durch mikroskopische Untersuchungen von Mikrotomschnitten aus Übergangsbereichen von gesundem zu verfärbtem Gewebe wurden vielfach die für *Acer* typischen gummiartigen Verschlüsse in Gefäßen sowie Einlagerungen in Holzstrahlen und Parenchymzellen nachgewiesen. Diese Symptomatik wurde auf die von SHIGO (1984) und BONSEN (1991) beschriebene Kompartimierung und Abschottungsreaktion der Bäume zur Pathogenabwehr zurückgeführt. Die Entstehung der Stammrisse wurde bei den untersuchten Bergahornen auf die Jahre von 2001 bis 2010 datiert. Daher hatten Sekundärerreger *V. dahliae* in den Nekrosen bereits größtenteils verdrängt. In den Böden der Bergahornbestände wurden pilzliche Dauerorgane mit teilweise sehr hohen Erregerdichten nachgewiesen, wobei aufgrund der Ähnlichkeit der Mikrosklerotien von *V. dahliae* mit anderen Pilzen keine sichere morphologische Zuordnung möglich war.

Im Rahmen von zwei Versuchen unter kontrollierten Bedingungen wurde der Einfluss von Trockenstress bei Infektion mit *V. dahliae* an jungen Bergahornen untersucht. Bei den mit *V. dahliae* inokulierten Ahornen war eine signifikant verstärkte frühzeitige Seneszenz im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zu beobachten. Auch im Folgejahr der Regeneration trat in beiden Versuchen eine frühzeitige Welke und Mortalität bei 12 Prozent der infizierten Bäume auf. Über den additiven Effekt der Faktoren von *V. dahliae*-Inokulation und Trockenstress hinaus konnten keine Interaktionen nachgewiesen werden. Bei zunehmender Sommertrockenheit könnte es jedoch auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse bei bestehender Infektion durch den additiven Effekt von *V. dahliae*-Inokulation und Trockenstress auf den Wasserhaushalt bei Ahorn zu erhöhter Mortalität kommen.

Der Einfluss der Infektion mit *V. dahliae* auf die Gaswechselfparameter während der Trockenstressphase war relativ inkonsistent. Bei sommerlichem Trockenstress wurde in beiden Versuchen eine Abnahme von Photosyntheserate und der stomatären Leitfähigkeit der Bäume festgestellt, doch war kein signifikanter Effekt durch die Infektion mit dem Pathogen nachweisbar.

In verschiedenen Studien wurde beobachtet, dass auch Pathogene der Gattung *Fusarium* spp., wie der Erreger *Fusarium solani*, Symptome wie Triebwelken und Nekrosen an Bergahorn verursachen können. Bei Keimlingsinokulation mit *F. solani* war im Gegensatz zu *V. dahliae* kein Auftreten von Welke oder ein Einfluss auf die Gaswechselfparameter feststellbar. Bei den mit *V. dahliae* infizierten Sämlingen waren intensive Welkesymptome als auch signifikant verminderte Photosyntheseraten und stomatäre Leitfähigkeiten messbar.

In zehn Stammnekrosen konnte anhand der neuen Technologie des *Next Generation Sequencing* mittels Illumina-MiSeq-Sequenzierung *Verticillium* sp. neben dominierenden Sekundärerregern nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der pilzlichen DNA-Barcode-Region des ITS1-Bereichs ermöglichte jedoch keine Differenzierung zwischen *V. dahliae* und *V. longisporum*. Da die an Kreuzblütlern pathogene Art *V. longisporum* nach Inderbitzin & Subbarao (2014) bei Isolierung aus *V. dahliae*-spezifischen Wirtspflanzen auszuschließen ist, wurden die in der Sequenzierung generierten *Operational Taxonomic Units* (OTUs) von *V. dahliae/longisporum* dem Pathogen *V. dahliae* zugeordnet. Die höchsten Anteile an OTUs von *V. dahliae* wurden beim Großteil der Nekrosen unterhalb des Stammschadens über dem Stammfuß detektiert. Auch bei Proben oberhalb der Stammnekrosen, aus dem Überwallungsgewebe sowie aus zwei asymptomatischen Bergahornen fanden sich hohe Anteile an OTUs von *V. dahliae*. Die Ergebnisse könnten auf Neuinfektionen hindeuten oder in der endophytischen Lebensweise des Pilzes begründet sein. Im mittleren Bereich der Stammnekrosen wurden wenige OTUs von *V. dahliae* nachgewiesen, da Sekundärerreger, wie holzersetzende Pilze, die dominanten Spezies darstellten. In Blatt- und Zweigmaterial aus zwei Bergahornbeständen wurde der Welke-Erreger nicht nachgewiesen. Auch in den Böden vier geschädigter Bergahornbestände konnte durch die Illumina-Amplikon-Sequenzierung ein Anteil von 4,7 bis 9,5 % an OTUs von *V. dahliae* nachgewiesen werden.

6 Summary

In recent years an increasing occurrence of stem necrosis and wilt caused by the soil-borne fungus *Verticillium dahliae* (KLEBAHN 1913) has been observed in sycamore maple stands in Bavaria. The pathogen of Verticillium wilt has been able to establish in soil by the long-living resting structures and a large number of host plants and benefits from climatic conditions with elevated temperatures. Little is known about the distribution of the pathogen in forestry and forest ecosystems (INDERBITZIN & SUBBARAO 2014).

For this reason, studies were conducted about the epidemiology of *V. dahliae* in sycamore maple stands. In maple stands, one-third of the trees showed stem necrosis in the lower stem area. The dimensions of the open necrosis averaged 68 cm in length and 4 cm in width. In 73 percent of the trees an annual overgrowth of 4 mm was observed in tangential direction. For the first time, computer tomographic images revealed extensive discolorations in the wood of the stem necrosis region, which occurred after the infection with *V. dahliae*. Microscopic examinations of microtome sections from transitional areas of healthy to discoloured tissue, have frequently demonstrated the typical rubbery vessel occlusions for *Acer* as well as deposits in ray and parenchyma cells. These symptoms were attributed to the compartmentalization and barrier zone formation for pathogen defense in trees described by SHIGO (1984) and BONSEN (1991). The formation of the cracks in sycamores was dated in the years of 2001 to 2010. As a result, secondary pathogens had mostly displaced *V. dahliae*. In soils of sycamore maple stands fungal resting structures, sometimes with very high densities, were detected, whereby due to the risk of confusion for the resting structures of *V. dahliae* with other fungi, no reliable morphological assignment was possible.

In two experiments under controlled conditions, the influence of drought stress on infestation with *V. dahliae* was studied in young sycamores. Maples inoculated with *V. dahliae* showed significantly increased early senescence compared to control plants. In both experiments in the following year of recovery, early wilting as well as mortality in 12 percent of the infected trees occurred. Furthermore, to the additive effect of the factors of *V. dahliae* inoculation and drought stress, no interactions could be determined. According to these results, as summer drought increases, mortality may increase in naturally infested maples due to the additive effect of both factors on tree water balance.

The influence of drought stress on the infection with *V. dahliae* on gas exchange parameters was relatively inconsistent. Whilst drought, a decrease of photosynthesis rate and stomatal conductivity of trees was observed in both experiments, but no significant effect was detected by the infestation with the pathogen.

In several studies it has been found that fungi of the genus *Fusarium* spp., like the pathogen *Fusarium solani*, can induce symptoms like wilt and necrosis in sycamore maple. In a greenhouse experiment with seedlings inoculated with *F. solani* no wilting or influence on gas exchange parameters was detected. Whereas in seedlings infected with *V. dahliae*, intensive wilt symptoms as well as significantly reduced photosynthesis rates and stomatal water conductivities were measured.

By the new technology of *Next Generation Sequencing* done by the Illumina-Miseq platform in ten stem necrosis *Verticillium* sp. was detected in addition to dominant secondary pathogens. However, sequencing of the fungal DNA barcode region of the ITS1-region did not allow differentiation between *V. dahliae* and *V. longisporum*. According to INDERBITZIN & SUBBARAO (2014) *V. longisporum*, which is pathogen in cruciferous species, can be excluded from *V. dahliae*-specific host plants. Therefore, the operational taxonomic units (OTUs) of *V. dahliae/longisporum* were assigned to *V. dahliae*. The highest amounts of *V. dahliae* OTUs were detected below stem necrosis above the trunk. Moreover, high levels of OTUs of *V. dahliae* were found in samples above stem necrosis, from overgrowing tissue, and from asymptomatic sycamores. The results could indicate new infections or could have been caused by the endophytic lifestyle of the fungus. In the mid-area of stem necrosis relatively few OTUs of *V. dahliae* were detected, as secondary pathogens such as wood-decomposing fungi were the dominant species. In leaf and branch material from two sycamore maple stands, the wilt pathogen was not detected. In the soil of four sycamore maple forests with stem necrosis, a proportion of 4.7 to 9.5 % of *V. dahliae* OTUs was detected by Illumina amplicon sequencing.

7 Literaturverzeichnis

Aljawasim, B., Vincelli, P. (2015): Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Methods for Rapid, Accurate Detection and Monitoring of *V. dahliae* in Woody Hosts by Real-Time PCR. *Plant Disease* 99, S. 866-873.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, S. 403-410.

Ash, C.L.R. (2000): The Ecology of *Verticillium dahliae* in *Fraxinus* and *Acer* species. University of Minnesota, Dissertation.

Atallah, Z.K., Bae, J., Jansky, S.H., Rouse, D.I., Stevenson, W.R. (2007): Multiplex Real-Time Quantitative PCR to Detect and Quantify *V. dahliae* Colonization in Potato Lines that Differ in Response to *Verticillium* Wilt. *Phytopathology* 97, S. 865-872.

Baker, R.A., Tatum, J.H., Nemeč Jr, S. (1981): Toxin production by *Fusarium solani* from fibrous roots of blight-diseased citrus. *Phytopathology* 71, S. 951-954.

Banerjee, A., Supakar, S., Banerjee, R. (2014): Melanin from the Nitrogen-Fixing Bacterium *Azotobacter chroococcum*: A Spectroscopic Characterization. *PLoS ONE* 9: e84574.

Barbara, D.J., Clewes, E. (2003): Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology* 4, S. 297-305.

Ben-Yephet, Y., Pinkas, Y. (1977): Germination of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytoparasitica* 5, S. 159-166.

Berbegal, M., Garzón, C.D., Ortega, A., Armengol, J., Jiménez-Díaz, R.M., Jiménez-Gasco, M.M. (2011): Development and application of new molecular markers for analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations. *Plant Pathology* 60, S. 866-877.

Berbegal, M., Ortega, A., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2007): Inoculum density-disease development relationship in *Verticillium* wilt of artichoke caused by *V. dahliae*. *Plant Disease* 91, S. 1131-1136.

Bell, A.A., Wheeler, M.H. (1986): Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24, S. 411-451.

Bessetti, J. (2007): An introduction to PCR inhibitors. *Promega Profiles in DNA* 10, S. 9-10.

Bhat, R.G., Smith, R.F., Koike, S.T., Wu, B.M., Subbarao, K.V. (2003): Characterization of *V. dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Disease* 87, S. 789-797.

Bhat, R.G., Subbarao, K.V. (1999): Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89, S. 1218-1225.

- Bilodeau, G.J., Koike, S.T., Uribe, P., Martin, F.N. (2012): Development of an assay for rapid detection and quantification of *V. dahliae* in soil. *Phytopathology* 102, S. 331-343.
- Birem, F., Alcántara-Vara, E., López-Escudero, F.J. (2016): Water Consumption and Vegetative Growth Progress in Resistant and Susceptible Olive Cultivars Infected by *Verticillium dahliae*. *Agricultural Sciences* 7, S. 230-238.
- Bonsen, K.J.M. (1991): Gefäßverschluss-Mechanismen in Laubbäumen. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* 136, S. 13-50.
- Bonsen, K.J.M., Kučera, L.J. (1990): Vessel occlusion in plants: morphological, functional and evolutionary aspects. *IAWA Bulletin Vol. 11*, S. 393-399.
- Bonsen, K.J.M., Scheffer, R.J., Elgersma, D.M. (1985): Barrier zone formation as a resistance mechanism of elms to Dutch elm disease. *International Association of Wood Anatomists Bulletin* 6, S. 71-77.
- Bowden, R.L., Rouse, D.I. (1991): Effects of *Verticillium dahliae* on gas exchange of potato. *Phytopathology* 81, S. 293-301.
- Bowden, R.L., Rouse, D.I., Sharkey, T.D. (1990): Mechanisms of photosynthesis decrease by *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Physiology* 94, S. 1048-1055.
- Bowers, J.H., Nameth, S.T., Riedel, R.M., Rowe, R.C. (1996): Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopathology* 86, S. 614-621.
- Braid, M.D., Daniels, L.M., Kitts, C.L. (2003): Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *Journal of Microbiological Methods* 52, S. 389-393.
- Bubici, G., Cirulli, M. (2014): Natural recovery from *Verticillium* wilt in olive: can it be exploited in a control strategy? *Plant and Soil* 381, S. 85-94.
- Burgdorf, N., Zimmerer, V., Blaschke, M. (2015): Entwicklung von Stammnekrosen verursacht durch *Verticillium dahliae* bei Bergahorn. *Jahrbuch der Baumpflege*, S. 251-257.
- Butin, H. (1981): Die Weißfleckigkeit des Bergahorns – eine neue Blattkrankheit. *AFZ Der Wald* 14, S. 327-328.
- Butin, H. (2011): *Krankheiten der Wald- und Parkbäume*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 318 S.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. (1990): *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons, New York, 532 S.
- Carder, J.H., Morton, A., Tabrett, A.M., Barbara, D.J. (1994): Detection and differentiation by PCR of sub-specific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. In: Schots, A., Dewey, F.M., Oliver, R. (Hrsg.) *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification*. CAB International, Wallingford, UK, S. 91-97.

- Caroselli, N.E. (1957): Verticillium wilt of maples. Bulletin Rhode Island Agricultural Experiment Station 335, S. 1-84.
- Cech, T.L., Schwanda, K., Klosterhuber, M., Straßer, L., Kirisits, T. (2016): Eutypella canker of maple: first report from Germany and situation in Austria. Forest Pathology 46, S. 336-340.
- Chen, W.D. (1994): Vegetative compatibility groups of Verticillium dahliae from ornamental woody plants. Phytopathology 84, S. 214-219.
- Choat, B., Jansen, S., Brodribb, T. J., Cochard, H., Delzon, S., Bhaskar, R., Bucci, S.J., Feild, T.S., Gleason, S.M., Hacke, U.G., Jacobsen, A.L., Lens, F., Maherali, H., Martínez-Vilalta, J., Mayr, S., Mencuccini, M., Mitchell, P.J., Nardini, A., Pittermann, J., Pratt, R.B., Sperry, J.S., Westoby, M., Wright, I.J., Zanne, A.E. (2012): Global convergence in the vulnerability of forests to drought. Nature 491, S. 752.
- Cirulli, M., Colella, C., D'Amico, M., Amenduni, M., Bubici, G. (2008): Comparison of Screening Methods for the Evaluation of Olive Resistance to Verticillium dahliae Kleb. Journal of Plant Pathology 90, S. 7-14.
- Collins, A., Okoli, C.A.N., Morton, A., Parry, D., Edwards, S.G., Barbara, D.J. (2003): Isolates of Verticillium dahliae pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types. Phytopathology 93, S. 364-376.
- Conover, W.J., Iman, R.L. (1981): Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. The American Statistician 35 (3), S. 124-129.
- Cooper, R.M. (2000): Verticillium-host interactions: past achievements and future molecular prospects. In: Tjamos, E., Rowe, R., Heale, J., Fravel, D. (Hrsg.) Advances in Verticillium Research and Disease Management. APS Press, Saint Paul, Minnesota, S. 144-150.
- Debode, J., Van Pouke, K., Franca, S.C., Maes, M., Höfte, M., Heungens, K. (2011): Detection of Multiple Verticillium Species in Soil Using Density Flotation and Real-Time Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 95, S. 1571-1580.
- Demeke, T., Adams, R.P. (1992): The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. Biotechniques 12, S. 332-334.
- Deutscher Wetterdienst (2013): Agrarmeteorologischer Monatsbericht Südbayern 01/13-12/13.
- Deutscher Wetterdienst (2014): Agrarmeteorologischer Monatsbericht Südbayern 01/14-12/14.
- Desprez-Loustau, M.L., Marcais, B., Nageleisen, L.M., Piou, D., Vannini, A. (2006): Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. Annuals of Forest Science 63, S. 597-612.
- Dujesiefken, D., Peylo, A., Liese, W. (1991): Einfluß der Verletzungszeit auf die Wundreaktionen verschiedener Laubbäume und der Fichte. Forstwissenschaftliches Centralblatt 110, S. 371-380.
- Dujesiefken, D., Liese, W., Shortle, W., Minocha, R. (2004): Response of beech and oaks to wounds made at different times of the year. European Journal of Forest Research 124, S. 113-117.

- Duncan, D.B. (1955): Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, S. 1-42.
- Ellenberg, H. (1996): *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1096 S.
- Engelhard, A.W. (1957): Host index of *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth. (including *Verticillium dahliae* Kleb.). *Plant Disease Reporter Supplement* 244, S. 23-49.
- Epstein, L., Beede, R., Kaur, S., Ferguson, L. (2004): Rootstock effects on pistachio trees grown in *Verticillium dahliae*-infested soil. *Phytopathology* 94, S. 388-395.
- Evans, G., Wilhelm, S., Snyder, W.C. (1967): Quantitative studies by plate counts of propagules of *Verticillium wilt* fungus in cotton field soils. *Phytopathology* 57, S. 1250.
- Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoecker, G., Karlovsky, P., von Tiedemann, A. (2007): Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* 118, S. 259-274.
- Fradin, E.F., Thomma, B.P.H.J. (2006): Physiology and molecular aspects of *Verticillium wilt* diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7, S. 71-86.
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993): ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, S. 113-118.
- Goud, J.C. (2003): *Verticillium Wilt in Trees. Detection, Prediction and Disease Management*. Universität Wageningen, Dissertation.
- Goud, J.C., Termorshuizen, A.J. (2002): Pathogenicity and virulence of the two Dutch VCGs of *V. dahliae* to woody ornamentals. *European Journal of Plant Pathology* 108, S. 771-782.
- Goud, J.C., Termorshuizen, A.J. (2003): Quality of methods to quantify microsclerotia of *V. dahliae* in soil. *European Journal of Plant Pathology* 109, S. 523-534.
- Goud, J.C., Termorshuizen, A.J., Gams, W. (2003): Morphology of *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus* on semi-selective media used for the detection of *V. dahliae* in soil. *Mycological Research* 107, S. 822-830.
- Goud, J.C., Termorshuizen, A.J., van Bruggen, A.H.C. (2011): *Verticillium wilt* in nursery trees: damage thresholds, spatial and temporal aspects. *European Journal of Plant Pathology* 131, S. 451-465.
- Grabner, M., Cherubini, P., Rozenberg, P., Hannrup, B. (2006): Summer drought and low earlywood density induce intra-annual radial cracks in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research* 21, S. 151-157.
- Harris, D.C., Yang, J.R. (1996): The relationship between the amount of *V. dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction. *Plant Pathology* 45, S. 106-114.
- Harris, D.C., Yang, J.R., Ridout, M.S. (1993): The detection and estimation of *V. dahliae* in naturally infested soil. *Plant Pathology* 42, S. 238-250.

- Heale, J.B. (2000): Diversification and speciation in *Verticillium* - an overview. In: Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel, D.R. (Hrsg.) *Advances in Verticillium research and disease management. Proceedings of the Seventh International Verticillium Symposium, Cape Sounion, Athens, Greece*. APS Press, Saint Paul Minnesota, S. 1-14.
- Heale, J.B., Isaac, I. (1965): Environmental factors in the production of dark resting structures in *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *Transactions of the British Mycological Society* 48, S. 39-50.
- Hiemstra, J.A. (1995): Recovery of *Verticillium*-infected ash trees. *Phytoparasitica* 23, S. 64-65.
- Hiemstra, J.A. (2014): Der schnelle Nachweis von *Verticillium*. *Jahrbuch der Baumpflege*, S. 108-120.
- Hiemstra, J.A., Harris, D.C. (1998): *A Compendium of Verticillium Wilts in Tree Species*. Ponsen & Looijen, Wageningen, Niederlande, 80 S.
- Himelick, E.B. (1969): Tree and shrub hosts of *Verticillium albo-atrum*. *Biological Notes* 66, S. 3-6.
- Hu, D., Wang, C., Tao, F., Cui, Q., Xu, X., Shang, W., Hu, X. (2014): Whole Genome Wide Expression Profiles on Germination of *Verticillium dahliae* Microsclerotia. *PLoS ONE* 9: e100046.
- Huang, S.P., Li, Z.L., Wei, J.G., Mo, J.Y., Li, Q.L., Guo, T.X., Luo, J.T., Yang, X.H., Tan, X.F., Yang, X. B. (2017): First Report of Stem Canker Caused by *Fusarium solani* on *Tectona grandis* in China. *Plant Disease* 101, S. 2148.
- Huisman, O.C. (1982): Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual Review of Phytopathology* 20, S. 303-327.
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, R.M., Usami, T., Platt, H.W., Subbarao, K.V. (2011a): Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE* 6: e28341.
- Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., Richard, M., Subbarao, K.V. (2013): Identification and Differentiation of *Verticillium* Species and *V. longisporum* Lineages by Simplex and Multiplex PCR Assays. *PLoS ONE* 8: e65990.
- Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., Subbarao, K.V. (2011b): The Ascomycete *V. longisporum* is a Hybrid and a Plant Pathogen with an Expanded Host Range. *PLoS ONE* 6: e18260.
- Inderbitzin, P., Subbarao, K.V. (2014): *Verticillium* systematics and evolution: How confusion impedes *Verticillium* wilt management and how to resolve it. *Phytopathology* 104, S. 564-574.
- Jiménez-Díaz, R.M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Collado-Romero, M., Bejarano-Alcázar, J., Rodríguez-Jurado, D., Giménez-Jaime, A., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2006): Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. *Phytopathology* 96, S. 288-298.
- Kabir, Z., Bhat, R.G., Subbarao, K.V. (2004): Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. *Plant Disease* 88, S. 49-55.

- Karapapa, V.K., Bainbridge, B.W., Heale, J.B. (1997): Morphological and molecular characterization of *V. longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research* 101, S. 1281-1294.
- Keeling, P.J. (2003): Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genetics and Biology* 38, S. 298-309.
- Keykhasaber, M., Thomma, B.P.H.J., Hiemstra, J.A. (2017a): Distribution and persistence of *Verticillium dahliae* in the xylem of Norway maple and European ash trees. *European Journal of Plant Pathology* 150, S. 323-339.
- Kirisits, T. (2007): Die Petrakia-Blattbräune des Bergahorns. *Forstschutz Aktuell* 40, S. 28-31.
- Klebahn, H. (1913): Beiträge zur Kenntnis der Fungi imperfecti. Eine *Verticillium*-Krankheit auf Dahlien. *Mycologisches Centralblatt* 3, S. 49-66.
- Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., Subbarao, K.V. (2009): Diversity, Pathogenicity and Management of *Verticillium* Species. *Annual Review of Phytopathology* 47, S. 39-62.
- Koike, S.T., Subbarao, K.V., Davis, R.M., Gordon, T.R., Hubbard, J.C. (1994): *Verticillium* wilt of cauliflower in California. *Plant Disease* 78, S. 1116-1121.
- Kruskal, W.H., Wallis, A. (1952): Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47, S. 583-621.
- Langer, G., Bressemer, U., Habermann, M. (2013): Vermehrt Pilzkrankheiten an Bergahorn in Nordwestdeutschland. *AFZ Der Wald* 6, S. 22-26.
- La Porta, N., Capretti, P., Thomsen, I.M., Kasanen, R., Hietala, A.M., Von Weissenberg, K. (2008): Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30, S. 177-195.
- Leben, C. (1985): Wound occlusion and discoloration columns in red maple. *New Phytologist* 99, S. 485-490.
- Lemoine, D., Peltier, J.-P., Marigo, G. (2001): Comparative studies of the water relations and the hydraulic characteristics in *Fraxinus excelsior*, *Acer pseudoplatanus* and *A. opalus* trees under soil water contrasted conditions. *Annals of Forest Science* 58, S. 723-731.
- Lobis, V. (2007): Holzbiologische Untersuchungen zur Optimierung des Sanierungszeitpunktes bei der Edelkastanie. *Jahrbuch der Baumpflege*, S. 319-325.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. (2005): Recovery of young olive trees from *V. dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 113, S. 367-375.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. (2007): Relationship between the inoculum density of *V. dahliae* and the progress of *Verticillium* wilt of olive. *Plant Disease* 91, S. 1372-1378.

- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A., Del Río Rincón, C., Caballero Reig, J.M. (2007): Response of Olive Cultivars to Stem Puncture Inoculation with a Defoliating Pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* 42, S. 294-298.
- Lopisso, D.T., Knüfer, J., Koopmann, B., von Tiedemann, A. (2017): The Vascular Pathogen *Verticillium longisporum* Does Not Affect Water Relations and Plant Responses to Drought Stress of Its Host, *Brassica napus*. *Phytopathology* 107, S. 444-454.
- Luo, X., Xie, C., Dong, J., Yang, X., Sui, A. (2014): Interactions between *Verticillium dahliae* and its host: vegetative growth, pathogenicity, plant immunity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, S. 6921-6932.
- Malcolm, G.M., Kulda, G.A., Gugino, B.K., Jiménez-Gasco, M.M. (2013): Hidden host plant associations of soilborne fungal pathogens: An ecological perspective. *Phytopathology* 103, S. 538-544.
- Markakis, E.A., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Paplomatas, E.J., Tjamos, E.C. (2009): Symptom development, pathogen isolation and Real-Time qPCR quantification as factors for evaluating the resistance of olive cultivars to *Verticillium* pathotypes. *European Journal of Plant Pathology* 124, S. 603-611.
- Matyssek, R., Fromm, J., Rennenberg, H., Roloff, A. (2010): *Biologie der Bäume*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 349 S.
- Mayer, H. (1992): *Waldbau auf soziologisch-ökologischer Grundlage*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 539 S.
- Mercado-Blanco, J., Collado-Romero, M., Parrilla-Araujo, S., Rodríguez-Jurado, D., Jiménez-Díaz, R.M. (2003): Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63, S. 91-105.
- Metzler, B. (2006): *Cryptostroma corticale* an Berg-Ahorn nach dem Trockenjahr 2003. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 400, S. 161-162.
- Mirmajlessi, S.M., Bahram, M., Mänd, M., Najdabbasi, N., Mansouripour, S., Loit, E. (2018): Survey of Soil Fungal Communities in Strawberry Fields by Illumina Amplicon Sequencing. *Eurasian Soil Science* 51, S. 682-691.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R.K., Horn, G.T., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, S. 263-273.
- Nagtzaam, M.P.M., Termorshuizen, A.J., Bollen, G.J. (1997): The relationship between soil inoculum density and plant infection as a basis for a quantitative bioassay of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 103, S. 597-605.
- Neubauer, C., Heitmann, B. (2011): Quantitativer Nachweis von *V. dahliae* als Grundlage der Flächenauswahl im Gartenbau. *Journal für Kulturpflanzen* 63, S. 1-8.

Neubauer, C., Heitmann, B., Schacht, H. (2007a): Verticillium in Baumschulen. Deutsche Baumschule 11, S. 38-41.

Neubauer, C., Schacht, H., Heitmann, B. (2007b): Untersuchungen zu Auftreten und Bekämpfung der Verticillium-Welke in Baumschulen. Fachhochschule Osnabrück, AGIP-Abschlussbericht, 60 S.

Newbanks, D., Tattar, T.A. (1982): Electrical resistance and stem water relations in Verticillium-infected red maple. European Journal of Forest Pathology 12, S. 113-123.

Nicot, P.C., Rouse, D.I. (1987): Relationship between soil inoculum density of *V. dahliae* and systemic colonization of potato stems in commercial fields over time. Phytopathology 77, S. 1346-1355.

Osman, F., Rowhani, A. (2006): Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). Journal of Virological Methods 133, S. 130-136.

Paplomatas, E.J., Bassett, D.M., Broome, J.C., DeVay, J.E. (1992): Incidence of Verticillium wilt and yield losses of cotton cultivars (*Gossypium hirsutum*) based on soil inoculum density of *V. dahliae*. Phytopathology 82, S. 1417-1420.

Pascual, I., Azcon, I., Morales, F., Aguirreolea, J., Sánchez-Díaz, M. (2010): Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by Verticillium dahliae and soil water deficit. Journal of Plant Physiology 167, S. 701-708.

Pegg, G.F. (1985): Life in a black hole - the micro-environment of the vascular pathogen. Transactions of the British Mycological Society 85, S. 1-20.

Pegg, G.F., Brady, B.L. (2002): Verticillium Wilts. CABI Publishing, Wallingford UK, 552 S.

Pernezny, K., Roberts, P.D., Murphy, J.F., Goldberg, N. (2003): Compendium of pepper Diseases. American Phytopathological Society. APS Press, Saint Paul Minnesota, 63 S.

Perry, J.W., Evert, R.F. (1983): The effect of colonization by Verticillium dahliae on the root tips of Russet Burbank potatoes. Canadian Journal of Botany 61, S. 3422-3429.

Phillips, D.H., Burdekin, D.A. (1982): Diseases of sycamore and maple (*Acer* spp.). Diseases of Forest and Ornamental Trees, Palgrave Macmillan UK, S. 315-328.

Presley, J.T. (1966): Current status of breeding for disease resistance in cotton in the United States. In Proceedings, Seminar on Cotton Production Research, Lima, Peru, S. 1-6.

Purahong, W., Wubet, T., Krüger, D., Buscot, F. (2018): Molecular evidence strongly supports deadwood-inhabiting fungi exhibiting unexpected tree species preferences in temperate forests. The ISME Journal 12, S. 289-295.

Rankin, W.H. (1914): Thrombotic disease of maple. Phytopathology 4, S. 395-396.

Reinke, J., Berthold, G. (1879): Die Kräuselkrankheit der Kartoffel. Untersuchungen aus dem Botanischen Laboratorium der Universität Göttingen 1, S. 67-96.

Resende, M.V.L., Flood, J., Cooper, R.M. (1995): Effect of methods of inoculation, inoculum density and seedling age at inoculation on the expression of resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Pathology* 43, S. 104-111.

Robeck, P., Heinrich, R., Schumacher, J., Feindt, R., Kehr, R. (2008): Status der Rußrindenkrankheit des Ahorns in Deutschland. *Jahrbuch der Baumpflege*, S. 238-245.

Roloff, A., Weisberger, H., Lang, U.M., Stimm, B. (2010): Bäume Mitteleuropas – Von Aspe bis Zirbelkiefer. Verlag Wiley-VCH, Weinheim, 490 S.

Rudolph, B. (1931): *Verticillium hadromycosis*. *California Agriculture* 5, S. 197-361.

Sadras, V.O., Quiroz, F., Echarte, L., Escande, A., Pereyra, V.R. (2000): Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. *Annals of Botany* 86, S. 1007-1015.

Saeed, I.A.M., MacGuidwin, A.E., Rouse, D.I. (1987): Synergism of *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* manifested by reduced gas exchange in potato. *Phytopathology* 77, S. 435-439.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences* 74, S. 5463-5467.

Schmidt, O., Roloff, A. (2009): *Acer pseudoplatanus*. *Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie*, S. 1-26.

Schmidt, P.A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J., Schmitt, I. (2013): Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 65, S. 128-132.

Schnathorst, W.C. (1963): Theoretical Relationships between Inoculum Potential and Disease Severity based on a Study of Variation in Virulence among Isolates of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 53, S. 888.

Schnathorst, W.C. (1981): Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. (Hrsg.) *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, S. 81-111.

Schneidewind, A. (2005): Untersuchungen zur Standorteignung von *Acer pseudoplatanus* L. als Straßenbaum in Mitteldeutschland unter besonderer Berücksichtigung abiotischer und biotischer Stressfaktoren. Humboldt-Universität Berlin, Dissertation.

Schneidewind, A. (2006): Untersuchungen von Ursachen von Stammschäden an jüngeren Bergahorn-Bäumen in Sachsen-Anhalt. *Jahrbuch der Baumpflege*, S. 66-80.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., and Fungal Barcoding Consortium (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109, S. 6241-6246.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. (2012): PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113, S. 1014-1026.

Schreiber, L.R., Mayer, J.S. (1992): Seasonal variations in susceptibility and in internal inoculum densities in maple species inoculated with *Verticillium dahliae*. *Plant Disease* 76, S. 184-187.

Schumacher, J. (2012): Auftreten und Ausbreitung neuartiger Baumkrankheiten in Mitteleuropa unter Berücksichtigung klimatischer Aspekte. *Forstwissenschaftliche Beiträge Tharandt* 33, Eugen Ulmer Verlag, Habilitationsschrift.

Shaner, G., Finney, R.E. (1977): The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, S. 1051-1056.

Shigo, A.L. (1984): Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how tree grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22, S. 189-214.

Short, D.P., Gurung, S., Gladieux, P., Inderbitzin, P., Atallah, Z.K., Nigro, F., Li, G., Benlioglu, S., Subbarao, K.V. (2015): Globally invading populations of the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae* are dominated by multiple divergent lineages. *Environmental microbiology* 17, S. 2824-2840.

Shortle, W.C., Smith, K.T., Dudzik, K.R. (1996): Decay diseases of stemwood: detection, diagnosis, and management. In: Raychaudhuri, S.P., Maramorosch, K., (Hrsg.) *Forest Trees and Palms*. New Delhi, India, Oxford & IBH Publishing, S. 95-109.

Siemonsmeier, A., Nannig, A., Kühn, A., Blaschke, M. (2012): Spatial patterns of microsclerotia from *V. dahliae* Kleb. in soils of Bavarian maple stands. *Journal für Kulturpflanzen* 94, S. 348-353.

Sinclair, W.A., Lyon, H.H., Johnson, W.T. (1987): *Diseases of Trees and Shrubs*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, 576 S.

Sinclair, W.A., Smith, K.L., Larsen, A.O. (1981): *Verticillium* wilt of maples: Symptoms related to movement of the pathogen in stems. *Phytopathology* 71, S. 340-345.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., Chung, Y.R. (1999): Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89, S. 92-99.

Slawson, D.D. (1987): Occurrence of *Verticillium dahliae* on various woody ornamental hosts. *Plant Pathology* 36, S. 606-608.

Smith, L.D. (1979): *Verticillium* wilt of landscape trees. *Journal of Arboriculture* 5, S. 193-197.

Stark, C. (1961): Das Auftreten der *Verticillium*-Tracheomykosen in Hamburger Gartenbaukulturen: Ein Beitrag zur Kenntnis ihrer Erreger. *Die Gartenbauwissenschaft*, S. 493-528.

Stöhr, Andreas (2003): Der Wasserhaushalt von *Fraxinus excelsior* und *Acer pseudoplatanus* in einem Eschen-Ahorn-Schluchtwald. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation.

Subbarao, K.V., Chassot, A., Gordon, T.R., Hubbard, J.C., Bonello, P., Mullin, R., Okamoto, D., Davis, R.M., Koike, S.T. (1995): Genetic relationships and cross pathogenicities of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops. *Phytopathology* 85, S. 1105-1112.

Termorshuizen, A.J., Davis, J.R., Gort, G., Harris, D.C., Huisman, O.C., Lazarovits, G., Locke, T., Vara, J.M.M., Mol, L., Paplomatas, E.J., Platt, H.W., Powelson, M., Rouse, D.I., Rowe, R.C., Tsror, L. (1998): Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Applied Environmental Microbiology* 64, S. 3846-3853.

Thomas, C.A. (1949): A wilt-inducing polysaccharide from *Fusarium solani* f. *eumartii*. *Phytopathology* 39, S. 572-579.

Thürmer, A. (2014): Next Generation Sequencing in der mikrobiellen (Meta) Genomforschung. *BIOspektrum* 20, S. 168-171.

Tippett, J.T., Shigo, A.L. (1981): Barrier zone formation: A mechanism of tree defense against vascular pathogens. *IAWA Journal* 2, S. 163-168.

Tjamos, E.C. (2000): Strategies in developing methods and applying techniques for the biological control of *Verticillium dahliae*. In: Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel, D.R. (Hrsg.) *Advances in Verticillium research and disease management*. American Phytopathological Society, Saint Paul Minnesota, S. 249-252.

Townsend, A.M., Schreiber, L.R., Hall, T.J., Bentz, S.E. (1990): Variation in response of Norway Maple Cultivars to *Verticillium dahliae*. *Plant Disease* 74, S. 44-46.

Trabelsi, R., Sellami, H., Gharbi, Y., Krid, S., Cheffi, M., Kammoun, S., Dammak, M., Mseddi, A., Gdoura, R., Triki, M.A. (2017): Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *3 Biotech* 7, 28.

Tran, V.T., Braus-Stromeier, S.A., Kusch, H., Reusche, M., Kaefer, A., Kühn, A., Valerius, O., Landesfeind, M., Aßhauer, K., Tech, M., Hoff, K., Pena-Centeno, T., Stanke, M., Lipka, V., Braus, G.H. (2014). *Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots. *New Phytologist* 202, S. 565-581.

Usami, T., Itoh, M., Amemiya, Y. (2009): Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic. *Journal of General Plant Pathology* 75, S. 422-427.

Wargo, P.M. (1977): Wound closure in sugar maple: adverse effects of defoliation. *Canadian Journal of Forest Research* 7, S. 410-414.

Werres, S. (1997): *Verticillium*-Erkrankungen an Gehölzen. *Jahrbuch der Baumpflege*, S. 98-107.

Wheeler, T.A., Madden, L.V., Rowe, R.C., Riedel, R.M. (2000): Effects of quadrat size and time of year for sampling of *Verticillium dahliae* and lesion nematodes in potato fields. *Plant Disease* 84, S. 961-966.

- Wilhelm, S. (1955): Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45, S. 180-181.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Hrsg.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., S. 315-322.
- Wollenweber, H.W. (1929): Die Wirtelpilz-Welkekrankheit (*Verticilliose*) von Ulme, Ahorn und Linde usw. *Arbeiten aus der Biologische Reichsanstalt für Land-und Forstwirtschaft* 17, S. 273-299.
- Wulf, A. (1989): Blattkrankheiten an Ahorn. *Gesunde Pflanzen* 41, S. 218-223.
- Wulf, A. (1994): Pilzbedingte Blattkrankheiten an Ahorn unter besonderer Berücksichtigung des Bergahorns (*Acer pseudoplatanus* L.). *Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt* 116, S. 46-58.
- Xiao, C.L., Hao, J.J., Subbarao, K.V. (1997): Spatial patterns of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil and *Verticillium* wilt of cauliflower. *Phytopathology* 87, S. 325-331.
- Xiao, C.L., Subbarao, K.V. (1998): Relationships between *V. dahliae* inoculum density and wilt incidence, severity, and growth of cauliflower. *Phytopathology* 88, S. 1108-1115.
- Xiao, C.L., Subbarao, K.V. (2000): Effects of Irrigation and *V. dahliae* on Cauliflower Root and Shoot Growth Dynamics. *Phytopathology* 90, S. 995-1004.
- Zare, R., Gams, W., Starink-Willemse, M., Summerbell, R.C. (2007): *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musciillum*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85, S. 463-489.
- Zare, R., Gams, W., Schroers, H.-J. (2004): The type species of *Verticillium* is not congeneric with the plant-pathogenic species placed in *Verticillium* and it is not the anamorph of 'Nectria' inventa. *Mycological Research* 108, S. 576-582.
- Zentmeyer, G.A., Halma, F.F., Wilhelm, S. (1955): Relative susceptibility of Guatemalan and Mexican avocado rootstocks to *Verticillium* wilt. *Phytopathology* 45, S. 635-636.
- Zimm, L.A. (1918): A wilt disease of maples. *Phytopathology* 8, S. 80-81.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

	S.
Abb. 1: Stammnekrosen im unteren Stammabschnitt bei Bergahorn, geschädigter Bergahorn mit Überwallungen, Stammnekrose mit Wundleiste im Querschnitt mit olivgrünen Verfärbungen.	2
Abb. 2: Infektionszyklus von <i>V. dahliae</i> an Bergahorn.	5
Abb. 3: Verticillium-Welke bei <i>A. pseudoplatanus</i> mit Ausbildung von Wasserreisern und Welke mit frühzeitigem Blattfall und Stammnekrose.	6
Abb. 4: <i>Acer pseudoplatanus</i> auf dem Großen Ahornboden im Karwendelgebirge.	8
Abb. 5: Lage der zehn Untersuchungsflächen in Bayern: Bergahornbestände mit Verticillium-Welke und Stammnekrosen.	11
Abb. 6: Computertomograph CT.Log an der Forstlichen Versuchsanstalt Freiburg.	13
Abb. 7: Entnahmestellen der Stammscheiben für mikroskopische Untersuchungen von Stammnekrosen der TUM Holzforschung.	14
Abb. 8: Bergahorne mit Bewässerungsanlage in der Vegetationshalle am Gewächshauslaborzentrum der TU München.	18
Abb. 9: Klimadiagramm 2013 mit Durchschnittstemperatur und Niederschlag in Weihenstephan.	21
Abb. 10: Klimadiagramm 2014 mit Durchschnittstemperatur und Niederschlag in Weihenstephan.	21
Abb. 11: Gaswechselformung mit LI-6400 an Bergahorn.	23
Abb. 12: <i>V. dahliae</i> auf <i>Potato Dextrose Agar</i> .	24
Abb. 13: Probeschema für die zweite Amplikon-Sequenzierung bei sechs Stammnekrosen.	29
Abb. 14: ITS-Region der ribosomalen DNA von Eukaryonten mit Bindungsstellen der Primer.	33
Abb. 15: Amplikons der Proben nach PCR für Illumina-MiSeq-Sequenzierung.	33
Abb. 16: Auswertungspipeline für NGS-Proben mit Angabe zur Software.	35
Abb. 17: Bergahorne im Querschnitt, Bestand Jägersdorf.	41
Abb. 18: Bergahorne im Querschnitt, Bestand Mauern.	42
Abb. 19: Prozentuale Anteile der Exposition der Nekrosen.	43
Abb. 20: Computertomographische Aufnahme eines Bergahorns mit Stammnekrose.	44
Abb. 21: Bergahorne im Querschnitt, CT-Scan, Bestand Jägersdorf.	45
Abb. 22: Bergahorne im Querschnitt, CT-Scan, Bestand Mauern.	46
Abb. 23: Bergahorne im Querschnitt mit Einteilung für Mikrotomschnitte.	47

Abb. 24: Querschnitt von zerstreutporigem Bergahorn, Bestand Jägersdorf.	48
Abb. 25: Tangentialschnitt von Bergahorn, Bestand Jägersdorf.	48
Abb. 26: Mikroskopische Aufnahmen von Mikrotomschnitten, Bestand Jägersdorf.	50
Abb. 27: Mikroskopische Aufnahmen von Mikrotomschnitten, Bestand Mauern.	51
Abb. 28: Länge der Nekrosen der Bergahorne in zehn Beständen im Herbst 2012 und 2014.	52
Abb. 29: Breite der Nekrosen der Bergahorne in zehn Beständen im Herbst 2012 und 2014.	52
Abb. 30: Anzahl von Dauerorganen in zehn Bergahornbeständen im Oktober 2012.	55
Abb. 31: Anzahl von Dauerorganen in zehn Bergahornbeständen im Oktober 2013.	55
Abb. 32: Anzahl von Dauerorganen in zehn Bergahornbeständen im Oktober 2014.	55
Abb. 33: Entwicklung der Dichte der Dauerorgane in Böden dreier Bergahornbestände in der Hallertau von Oktober 2012 bis 2014.	56
Abb. 34: Welke bei 1 ½-jährigem Bergahorn bei Infektion mit <i>V. dahliae</i> .	57
Abb. 35: Welke-Index der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> infizierten Bergahorne vor, bei und nach der Trockenstressphase unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt	58
Abb. 36: AUWPC-Werte der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit <i>V. dahliae</i> -Infektion über die gesamte Vegetationsperiode.	60
Abb. 37: Welke-Index im Folgejahr unter guten Bodenwassergehalten bei den mit <i>V. dahliae</i> inokulierten Bergahornen.	61
Abb. 38: AUWPC-Werte der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit <i>V. dahliae</i> -Inokulation im Folgejahr 2014.	62
Abb. 39: Verfärbungen eines Jahrrings bei 2 ½-jährigem Bergahorn knapp zwei Jahre nach Wurzeltauch-Inokulation mit <i>V. dahliae</i> .	64
Abb. 40: Photosyntheserate der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> infizierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt.	65
Abb. 41: Stomatäre Leitfähigkeit der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> infizierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt.	67
Abb. 42: Hydraulische Leitfähigkeit der Bergahornstämme mit <i>V. dahliae</i> -Inokulation und der Kontrollpflanzen.	69
Abb. 43: Mikrosklerotien von <i>V. dahliae</i> .	71
Abb. 44: Zweiter Trockenstressversuch mit 1 ½-jährigem Bergahorn in der Vegetationshalle am Gewächshauslaborzentrum Dürnast der TU München.	72
Abb. 45: Welke-Index der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> inokulierten Bergahorne vor, bei und nach der Trockenstressphase.	73
Abb. 46: AUWPC-Werte der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit <i>V. dahliae</i> -Inokulation über die gesamte Vegetationsperiode.	75

Abb. 47: Welke-Index im Folgejahr unter guten Bodenwassergehalten bei den mit <i>V. dahliae</i> inokulierten und gesunden Bergahornen.	76
Abb. 48: AUWPC-Werte der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit <i>V. dahliae</i> -Inokulation im Folgejahr 2015.	77
Abb. 49: Photosyntheserate der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> inokulierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt.	79
Abb. 50: Stomatäre Leitfähigkeit der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> inokulierten Bergahorne unter feuchtem, moderatem und trockenem Bodenwassergehalt.	81
Abb. 51: Hydraulische Leitfähigkeit der Bergahorne mit <i>V. dahliae</i> -Inokulation und der Kontrollpflanzen.	82
Abb. 52: DNA-Banden von Amplikons mit 490 Basenpaaren nach Gelelektrophorese und PCR mit dem Primerpaar Df/Dr.	84
Abb. 53: Welke-Index von Kontrollpflanzen und Bergahornen inokuliert mit <i>V. dahliae</i> und <i>F. solani</i> .	85
Abb. 54: Photosyntheserate von Kontrollpflanzen und Bergahornsämlingen inokuliert mit <i>V. dahliae</i> und <i>F. solani</i> .	87
Abb. 55: Stomatäre Leitfähigkeit von Kontrollpflanzen und Bergahornsämlingen inokuliert mit <i>V. dahliae</i> und <i>F. solani</i> .	87
Abb. 56: Verhältnis der OTUs von <i>V. dahliae/longisporum</i> von zehn Bergahornstämmen.	101

Tabellenverzeichnis

	S.
Tab. 1: Lage, Bestandesalter und Aufforstungsform der Bergahorne mit Stammnekrosen in den zehn Untersuchungsflächen.	12
Tab. 2: Bodenverseuchungsgrad mit <i>V. dahliae</i> nach Mikrosklerotiendichte.	17
Tab. 3: Versuchsvarianten: Kontrollpflanzen und mit <i>V. dahliae</i> inokulierte Bergahorne unter verschiedenen Bodenwassergehalten.	19
Tab. 4: Boniturskala der Welkesymptome.	22
Tab. 5: Boniturskala der Welkesymptome für Bergahornsämlinge.	27
Tab. 6: Primerpaare für <i>V. dahliae</i> mit Sequenzangabe in 5'-3'-Richtung, Genlokus, Größe des Amplikons und Literaturreferenz.	32
Tab. 7: Probenpool A für die erste Amplikon-Sequenzierung der ITS 1-Region von DNA aus Holzmaterial von Stammnekrosen der Standorte Mauern und Jägersdorf, Zweig- und Blattmaterial, Proben aus Boden und Mikrosklerotien-Agarplatten und Laborkontrollen.	36
Tab. 8: Probenpool B für die zweite Amplikon-Sequenzierung der ITS 1-Region von DNA aus Holzmaterial von Stammnekrosen der Standorte Drackenstein, Meitingen und Dachau und Laborkontrollen.	37
Tab. 9: Bestandesalter, Anzahl der Bergahorne, prozentualer Anteil der Bergahorne mit Stammnekrose und Anzahl anderer Bäume in den zehn Untersuchungsflächen.	40
Tab. 10: Stammnekrosen bei 14 Bergahornen: Stammdurchmesser auf halber Länge der Nekrose, Länge und Breite der Nekrose, Jahrringe der Überwallung und Entstehungsjahr des Stammrisses.	53
Tab. 11: Welke-Index 2013: Signifikanz der Haupteffekte.	59
Tab. 12: Welke-Index 2014: Signifikanz der Haupteffekte.	62
Tab. 13: Welke-Index und Mortalität der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> inokulierten Bergahorne nach Beendigung der Trockenstressphase 2013 und im Folgejahr 2014.	63
Tab. 14: Photosyntheserate 2013: Signifikanz der Haupteffekte.	66
Tab. 15: Stomatäre Leitfähigkeit 2013: Signifikanz der Haupteffekte.	68
Tab. 16: Wuchshöhe, Sprossfrischgewicht und Wurzelfrischgewicht.	70
Tab. 17: Reisolierung von <i>V. dahliae</i> aus Bergahornstämmen auf Nährmedien und mittels PCR mit artspezifischen Primern.	71
Tab. 18: Welke-Index 2014: Signifikanz der Haupteffekte.	74
Tab. 19: Welke-Index 2015: Signifikanz der Haupteffekte.	77
Tab. 20: Welke-Index, Mortalität der Kontrollpflanzen und der mit <i>V. dahliae</i> inokulierten Bergahorne nach Beendigung der Trockenstressphase 2014 und im Folgejahr 2015.	78
Tab. 21: Photosyntheserate 2014: Signifikanz der Haupteffekte.	80
Tab. 22: Stomatäre Leitfähigkeit 2014: Signifikanz der Haupteffekte.	82

Tab. 23: Wuchshöhe und Sprossfrischgewicht zu Versuchsende.	83
Tab. 24: Reisolierung von <i>V. dahliae</i> aus Bergahorn auf Nährmedien und Nachweis mittels PCR mit artspezifischen Primern.	84
Tab. 25: Wuchshöhe und Zuwachs bei Kontrollpflanzen und Bergahornsämlingen inokuliert mit <i>V. dahliae</i> und <i>F. solani</i> .	86
Tab. 26: Bergahorne mit Verfärbungen des Jahrrings, Länge der Verfärbung innerhalb des Stamms und Wuchshöhe der Kontrollpflanzen und Bergahorne mit <i>V. dahliae</i> - und <i>F. solani</i> -Inokulation.	88
Tab. 27: Anzahl <i>Reads</i> der ITS 1-Region von Kontrollprobe 1 und 2.	90
Tab. 28: Gesamtzahl <i>Reads</i> in der Probe, Anzahl und prozentualer Anteil der <i>Reads</i> von OTUs von <i>V. dahliae/longisporum</i> von Bodenproben und aus Mikrosklerotien-Agarplatten	91
Tab. 29: Anzahl und prozentualer Anteil der <i>Reads</i> von OTUs von <i>V. dahliae/longisporum</i> in Blatt- und Zweigproben, Bestände Mauern und Jägersdorf.	92
Tab. 30: Anzahl der <i>Reads</i> von <i>V. dahliae/longisporum</i> und prozentualer Anteil der Sequenzen von <i>V. dahliae/longisporum</i> in vier Stämmen mit Nekrose, Bestände Mauern und Jägersdorf.	93
Tab. 31: Anzahl der <i>Reads</i> der 20 häufigsten OTUs in den Bereichen unterhalb, im mittleren Bereich und oberhalb der Stammnekrose bei vier Stämmen, Mauern und Jägersdorf.	95
Tab. 32: Anzahl und prozentualer Anteil der <i>Reads</i> von OTUs von <i>V. dahliae/longisporum</i> in Gewebeproben aus zwei Stammnekrosen und einem Bergahorn ohne Stammschaden, Drackenstein.	96
Tab. 33: Anzahl und prozentualer Anteil der <i>Reads</i> von OTUs von <i>V. dahliae/longisporum</i> in Gewebeproben aus zwei Stammnekrosen, Meitingen.	98
Tab. 34: Anzahl und prozentualer Anteil der <i>Reads</i> von OTUs von <i>V. dahliae/longisporum</i> in Gewebeproben aus zwei Stammnekrosen und einem Bergahorn ohne Stammschaden, Dachau.	99
Tab. 35: Anzahl der <i>Reads</i> der 20 häufigsten OTUs in den Bereichen unterhalb, im mittleren Bereich und oberhalb der Stammnekrose bei sechs Stämmen aus Bergahornbeständen bei Drackenstein, Meitingen und Dachau.	100

9 Anhang

Tab. A1: Lage der zehn Bergahorn-Untersuchungsflächen mit Gauß-Krüger-Koordinaten und Lage über Normalnull.

Ort	Region	Rechtswert	Hochwert	m ü NN
Mauern	Oberbayern	4493010	5379060	498
Jägersdorf	Oberbayern	4476949	5370377	495
Osseltshausen	Oberbayern	4477199	5376423	481
Drackenstein 1	Oberpfalz	4513625	5447981	495
Drackenstein 2	Oberpfalz	4513327	5446547	506
Drackenstein 3	Oberpfalz	4513300	5446543	508
Thannhausen 1	Mittelfranken	4418293	5441253	512
Thannhausen 2	Mittelfranken	4418112	5441098	516
Meitingen 1	Schwaben	4418277	5380810	445
Meitingen 2	Schwaben	4418291	5380867	434

Tab. A2: Dichte der Dauerorgane g^{-1} Boden in den Untersuchungsflächen und der im Umkreis von ca. 50 m angelegten Kontrollflächen ohne Wirtsbaumarten von *V. dahliae* in den Untersuchungsjahren im Oktober (mit Standardabweichung).

Fläche	Baumart	Nekrosen [%]	Dauerorgane g^{-1}		
			2012	2013	2014
Mauern	Bergahorn	49	43 (± 11)	8 (± 6)	2 (± 3)
Jägersdorf	Bergahorn	24	32 (± 11)	13 (± 4)	8 (± 7)
Osseltshausen	Bergahorn	0	133 (± 14)	35 (± 11)	63 (± 22)
Drackenstein 1	Bergahorn	27	50 (± 22)	3 (± 1)	15 (± 6)
Drackenstein 2	Bergahorn	35	44 (± 4)	7 (± 6)	29 (± 6)
Drackenstein 3	Bergahorn	24	44 (± 8)	5 (± 3)	15 (± 6)
Thannhausen 1	Bergahorn	57	4 (± 3)	4 (± 3)	9 (± 6)
Thannhausen 2	Bergahorn	36	56 (± 9)	4 (± 2)	14 (± 4)
Meitingen 1	Bergahorn	33	133 (± 16)	18 (± 7)	7 (± 5)
Meitingen 2	Bergahorn	41	60 (± 17)	83 (± 17)	318 (± 68)
Mauern	Fichte	-	2 (± 2)	0 (± 0)	1 (± 2)
Jägersdorf	Fichte	-	62 (± 9)	1 (± 2)	0 (± 1)
Osseltshausen	Fichte	-	10 (± 8)	13 (± 6)	2 (± 3)
Drackenstein 1	Fichte	-	19 (± 8)	4 (± 2)	18 (± 7)
Drackenstein 2	Fichte	-	6 (± 4)	4 (± 3)	2 (± 3)
Drackenstein 3	Fichte	-	13 (± 4)	3 (± 2)	0 (± 1)
Thannhausen 1	Buche, Eiche	-	8 (± 3)	2 (± 2)	2 (± 2)
Thannhausen 2	Buche, Eiche	-	19 (± 6)	1 (± 1)	2 (± 2)
Meitingen 1	Eiche, Linde	-	246 (± 14)	53 (± 8)	184 (± 26)
Meitingen 2	Eiche, Linde	-	189 (± 18)	11 (± 3)	10 (± 5)

Tab. A3: Isolierung von *V. dahliae* aus Holz aus verschiedenen Bereichen der Stammnekrosen von den Bergahornbeständen bei Mauern und Jägersdorf auf PDA (*Potato Dextrose Agar*) und WA (Wasseragar).

Nr.	Standort	Probe	Lage in Nekrose	Entnahme	PDA	WA
1	Mauern	Stamm 1 A	unterhalb	28.10.13	-	-
2	Mauern	Stamm 1 B	unteres Ende	28.10.13	-	-
3	Mauern	Stamm 1 C	Mitte	28.10.13	-	-
4	Mauern	Stamm 1 D	oberes Ende	28.10.13	-	-
5	Mauern	Stamm 1 E	oberhalb	28.10.13	-	-
6	Mauern	Stamm 2 A	unterhalb	28.10.13	-	-
7	Mauern	Stamm 2 B	unteres Ende	28.10.13	-	-
8	Mauern	Stamm 2 C	Mitte	28.10.13	-	-
9	Mauern	Stamm 2 D	oberes Ende	28.10.13	-	-
10	Mauern	Stamm 2 E	oberhalb	28.10.13	-	-
11	Jägersdorf	Stamm 1 A	unterhalb	28.10.13	-	-
12	Jägersdorf	Stamm 1 B	unteres Ende	28.10.13	-	-
13	Jägersdorf	Stamm 1 C	Mitte	28.10.13	-	-
14	Jägersdorf	Stamm 1 D	oberes Ende	28.10.13	-	-
15	Jägersdorf	Stamm 1 E	oberhalb	28.10.13	-	-
16	Jägersdorf	Stamm 2 A	unterhalb	28.10.13	-	-
17	Jägersdorf	Stamm 2 B	unteres Ende	28.10.13	-	-
18	Jägersdorf	Stamm 2 C	Mitte	28.10.13	-	-
19	Jägersdorf	Stamm 2 D	oberes Ende	28.10.13	-	-
20	Jägersdorf	Stamm 2 E	oberhalb	28.10.13	-	-

Tab. A4: Isolierung von *V. dahliae* aus Zweigmaterial der Krone aus drei Beständen in der Hallertau auf PDA (*Potato Dextrose Agar*) und WA (Wasseragar).

Nr.	Standort	Material	Entnahme	PDA	WA
1	Mauern	Zweig 1	04.08.14	-	-
2	Mauern	Zweig 2	04.08.14	-	-
3	Jägersdorf	Zweig 1	04.08.14	-	-
4	Jägersdorf	Zweig 2	04.08.14	-	-
5	Osseltshausen	Zweig 1	04.08.14	-	-
6	Osseltshausen	Zweig 2	04.08.14	-	-

Tab. A5: Isolierung von *V. dahliae* aus Holz von verschiedenen Bereichen der Stammnekrosen aus den Beständen bei Drackenstein, Meitingen und Dachau auf PDA (*Potato Dextrose Agar*) und WA (Wasseragar).

Nr.	Standort	Probe	Lage in Nekrose	Entnahme	PDA	WA
1	Drackenstein	Stamm 1 A	unterhalb	30.06.15	-	-
2	Drackenstein	Stamm 1 B	unteres Ende	30.06.15	-	-
3	Drackenstein	Stamm 1 C	Mitte	30.06.15	-	-
4	Drackenstein	Stamm 1 D	oberes Ende	30.06.15	-	-
5	Drackenstein	Stamm 1 E	oberhalb	30.06.15	-	-
6	Drackenstein	Stamm 2 A	unterhalb	30.06.15	-	-
7	Drackenstein	Stamm 2 B	unteres Ende	30.06.15	-	-
8	Drackenstein	Stamm 2 C	Mitte	30.06.15	-	-
9	Drackenstein	Stamm 2 D	oberes Ende	30.06.15	-	-
10	Drackenstein	Stamm 2 E	oberhalb	30.06.15	-	-
11	Meitingen	Stamm 1 A	unterhalb	30.06.15	-	-
12	Meitingen	Stamm 1 B	unteres Ende	30.06.15	-	-
13	Meitingen	Stamm 1 C	Mitte	30.06.15	-	-
14	Meitingen	Stamm 1 D	oberes Ende	30.06.15	-	-
15	Meitingen	Stamm 1 E	oberhalb	30.06.15	-	-
16	Meitingen	Stamm 2 A	unterhalb	30.06.15	-	-
17	Meitingen	Stamm 2 B	unteres Ende	30.06.15	-	-
18	Meitingen	Stamm 2 C	Mitte	30.06.15	-	-
19	Meitingen	Stamm 2 D	oberes Ende	30.06.15	-	-
20	Meitingen	Stamm 2 E	oberhalb	30.06.15	-	-
21	Dachau	Stamm 1 A	unterhalb	30.06.15	-	-
22	Dachau	Stamm 1 B	unteres Ende	30.06.15	-	-
23	Dachau	Stamm 1 C	Mitte	30.06.15	-	-
24	Dachau	Stamm 1 D	oberes Ende	30.06.15	-	-
25	Dachau	Stamm 1 E	oberhalb	30.06.15	-	-
26	Dachau	Stamm 2 A	unterhalb	30.06.15	-	-
27	Dachau	Stamm 2 B	unteres Ende	30.06.15	-	-
28	Dachau	Stamm 2 C	Mitte	30.06.15	-	-
29	Dachau	Stamm 2 D	oberes Ende	30.06.15	-	-
30	Dachau	Stamm 2 E	oberhalb	30.06.15	-	-

Tab. A6: Klimadaten Freising-Weihenstephan im Jahr 2013 (Quelle: Deutscher Wetterdienst 2013).

Monat	Lufttemperatur 2 m [°C]	Niederschlag [mm]	Rel. Luftfeuch- tigkeit [%]	Sättigungsdefi- zit [hPa]	PAR-Strahlung [J cm ⁻²]
Januar	-0,3	55,4	89	1,3	2742
Februar	-1,8	60,9	88	1,3	4579
März	1,1	30,0	79	3,2	8536
April	8,6	32,1	77	6,8	10766
Mai	11,4	117,8	82	5,8	13082
Juni	15,4	155,3	80	10,7	16508
Juli	20,0	14,6	66	19,1	22420
August	18,0	82,7	74	15,8	17173
September	13,2	92,9	84	7,1	9850
Oktober	9,5	67,0	89	4,3	5970
November	3,8	49,6	91	1,8	2815
Dezember	1,1	7,8	92	1,4	3161

Tab. A7: Klimadaten Freising-Weihenstephan im Jahr 2014 (Quelle: Deutscher Wetterdienst 2014).

Monat	Lufttemperatur 2 m [°C]	Niederschlag [mm]	Rel. Luftfeuch- tigkeit [%]	Sättigungsdefi- zit [hPa]	PAR-Strahlung [J cm ⁻²]
Januar	1,6	49,1	93	1,2	2846
Februar	3,0	9,6	82	3,9	5396
März	6,8	18,4	71	7,9	11069
April	10,2	28,6	74	7,8	12198
Mai	12,1	127,6	76	8,7	15198
Juni	16,8	44,0	65	15,7	21184
Juli	18,3	145,7	76	12,3	17321
August	16,1	106,1	78	11,1	14731
September	14,1	62,8	86	7,1	9271
Oktober	11,0	99,8	90	4,8	5831
November	5,5	38,6	93	2,1	2904
Dezember	2,5	41,0	86	1,8	2082

Tab. A8: Trockenstressversuch 1: Frischgewichte der Stammabschnitte bei Ernte der Kontrollpflanzen und Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation unter verschiedenen Bodenwassergehaltsschemata und dem Verhältnis des Sprossfrischgewichts 2014 zu 2013 (MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung). Statistik: ANOVA, Tukey-HSD (n.s., nicht signifikant).

Variante	Sprossfrischgewicht [g]			Ratio
	2012	2013	2014	2014/2013
Kontrolle feucht	14,0 (±7,1)	5,3 (±4,0)	4,7 (±3,8)	0,9
Kontrolle moderat	11,1 (±5,1)	5,7 (±3,9)	5,6 (±5,9)	1,0
Kontrolle trocken	11,9 (±6,0)	3,8 (±2,3)	2,9 (±4,6)	0,8
VD feucht	11,8 (±5,9)	4,0 (±2,4)	3,3 (±3,2)	0,9
VD moderat	13,1 (±6,1)	5,0 (±4,3)	3,4 (±3,1)	0,7
VD trocken	14,5 (±7,4)	5,6 (±3,2)	2,7 (±2,2)	0,5

Tab. A9: Trockenstressversuch 2: Frischgewichte der Stammabschnitte bei Ernte der Kontrollpflanzen und Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation unter verschiedenen Bodenwassergehaltsschemata und Verhältnis des Sprossfrischgewichts 2015 zu 2014 (MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung). Statistik: ANOVA, Tukey-HSD.

Variante	Sprossfrischgewicht [g]			Ratio
	2013	2014	2015	2015/2014
Kontrolle feucht	20,8 (±6,7) ab	10,1 (±4,6) a	4,0 (±3,0) a	0,4
Kontrolle moderat	19,4 (±4,7) abc	7,6 (±3,7) ab	3,5 (±2,1) a	0,5
Kontrolle trocken	20,9 (±6,0) a	9,9 (±5,6) a	5,4 (±4,9) a	0,5
VD feucht	15,5 (±6,4) c	5,5 (±3,6) b	4,0 (±4,1) a	0,7
VD moderat	15,9 (±5,0) bc	7,1 (±4,3) ab	5,9 (±5,0) a	0,8
VD trocken	16,2 (±5,4) abc	6,1 (±3,4) b	3,2 (±2,2) a	0,5

Tab. A10: Trockenstressversuch 1: Zuwachs von Wuchshöhe und Wurzelhalsdurchmesser (WHD) vom 19.03.13 bis 14.05.14 der Kontrollpflanzen und Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation unter verschiedenen Bodenwassergehaltsschemata (mit Standardabweichung). Statistik: ANOVA, Tukey-HSD.

Variante	Zuwachs Wuchshöhe [cm]	Zuwachs WHD [mm]
Kontrolle feucht	29,6 ($\pm 17,8$) a	4,2 ($\pm 1,3$) a
Kontrolle moderat	30,0 ($\pm 18,2$) a	3,8 ($\pm 1,2$) a
Kontrolle trocken	18,4 ($\pm 8,6$) ab	3,5 ($\pm 0,9$) a
VD feucht	21,2 ($\pm 17,0$) ab	3,9 ($\pm 1,6$) a
VD moderat	23,6 ($\pm 22,2$) ab	3,7 ($\pm 2,3$) a
VD trocken	15,3 ($\pm 21,2$) b	3,6 ($\pm 0,8$) a

Tab. A11: Trockenstressversuch 2: Zuwachs von Wuchshöhe und Wurzelhalsdurchmesser (WHD) vom 15.05.14 bis 06.05.15 der Kontrollpflanzen und Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation unter abnehmenden Bodenwassergehaltsschemata (mit Standardabweichung). Statistik: ANOVA, Tukey-HSD.

Variante	Zuwachs Wuchshöhe [cm]	Zuwachs WHD [mm]
Kontrolle feucht	48,6 ($\pm 19,3$) a	4,7 ($\pm 1,3$) a
Kontrolle moderat	36,3 ($\pm 23,9$) ab	4,4 ($\pm 1,5$) a
Kontrolle trocken	43,8 ($\pm 18,6$) a	5,3 ($\pm 1,5$) a
VD feucht	22,4 ($\pm 24,0$) bc	4,5 ($\pm 2,2$) a
VD moderat	18,4 ($\pm 23,9$) c	4,0 ($\pm 2,7$) a
VD trocken	20,4 ($\pm 18,2$) bc	4,2 ($\pm 0,9$) a

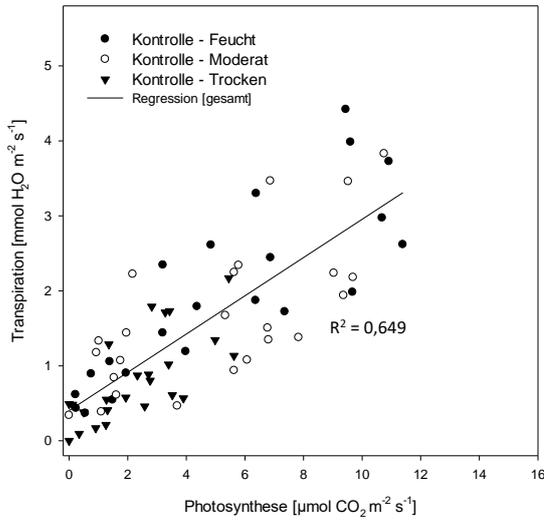


Abb. A1: Trockenstressversuch 1: Transpiration gegenüber Photosyntheserate der Kontrollpflanzen unter feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten im Sommer 2013, Regressionsgerade mit Bestimmtheitsmaß R^2 über alle Pflanzen ($n = 24$).

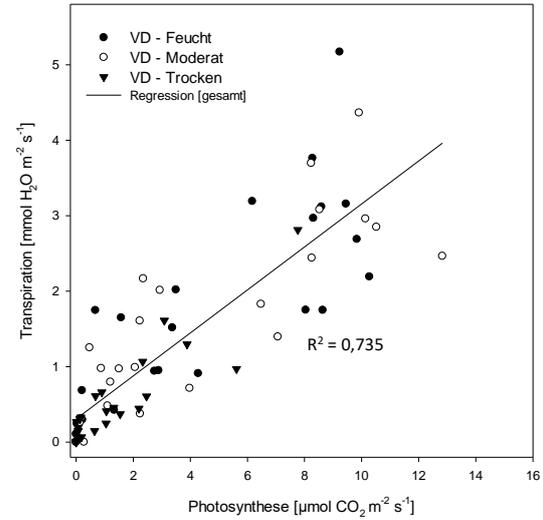


Abb. A2: Trockenstressversuch 1: Transpiration gegenüber Photosyntheserate der inokulierten Bergahorne unter feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten 2013, Regressionsgerade mit Bestimmtheitsmaß ($n = 24$).

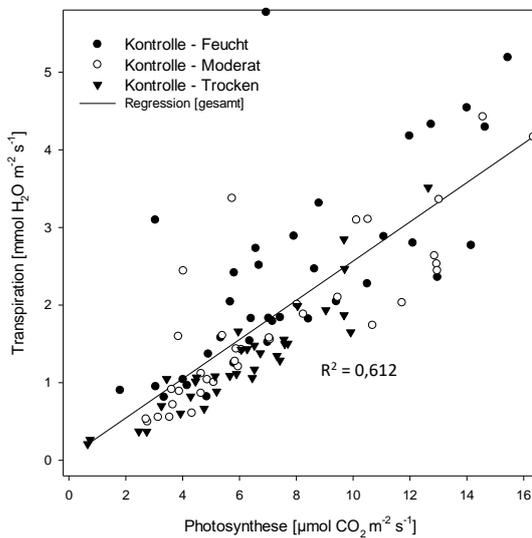


Abb. A3: Trockenstressversuch 2: Transpiration gegenüber Photosyntheserate der Kontrollpflanzen unter feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten im Sommer 2014, Regressionsgerade mit Bestimmtheitsmaß ($n = 36$).

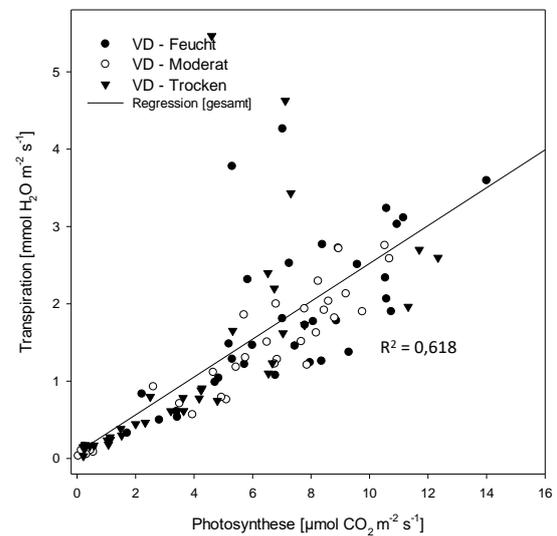


Abb. A4: Trockenstressversuch 2: Transpiration gegenüber Photosyntheserate der inokulierten Bergahorne unter feuchten, moderaten und trockenen Bodenwassergehalten 2014, Regressionsgerade mit Bestimmtheitsmaß ($n = 36$).

Tab. A12: Trockenstressversuch 1: Wassernutzungseffizienz der Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation und der Kontrollpflanzen unter verschiedenen Bodenwassergehalten am 16.07., 30.07., 14.08.2013 und im Folgejahr am 25.07.2014 (Trockenstressphase vom 01.07. bis 12.08.13). Statistik: ANOVA (n.s.).

	Wassernutzungseffizienz [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$]			
	16.07.13	30.07.13	14.08.13	25.07.14
Kontrolle feucht	2,2 ($\pm 1,6$)	2,7 ($\pm 1,1$)	2,3 ($\pm 0,4$)	4,0 ($\pm 1,2$)
Kontrolle moderat	3,7 ($\pm 2,8$)	3,7 ($\pm 1,1$)	2,1 ($\pm 0,8$)	2,6 ($\pm 1,3$)
Kontrolle trocken	3,7 ($\pm 2,2$)	3,5 ($\pm 1,9$)	2,0 ($\pm 1,1$)	2,8 ($\pm 0,8$)
VD feucht	1,9 ($\pm 1,6$)	2,9 ($\pm 1,8$)	1,7 ($\pm 1,0$)	2,3 ($\pm 1,6$)
VD moderat	2,7 ($\pm 3,0$)	2,2 ($\pm 1,6$)	1,7 ($\pm 1,1$)	3,3 ($\pm 0,9$)
VD trocken	1,4 ($\pm 1,5$)	2,9 ($\pm 2,1$)	2,0 ($\pm 1,2$)	3,3 ($\pm 1,5$)

Tab. A13: Trockenstressversuch 2: Wassernutzungseffizienz der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit *V. dahliae*-Inokulation unter verschiedenen Bodenwassergehalten am 04.07., 15.07. und 06.08.14 und im Folgejahr am 11.06.15 (Trockenstressphase 25.06. bis 25.08.14). Statistik: ANOVA (n.s.).

	Wassernutzungseffizienz [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$]			
	04.07.14	15.07.14	06.08.14	11.06.15
Kontrolle feucht	3,9 ($\pm 0,9$)	3,2 ($\pm 1,3$)	3,5 ($\pm 1,0$)	2,3 ($\pm 0,6$)
Kontrolle moderat	4,4 ($\pm 1,5$)	4,8 ($\pm 1,3$)	4,2 ($\pm 0,6$)	3,8 ($\pm 0,8$)
Kontrolle trocken	5,1 ($\pm 0,9$)	5,2 ($\pm 1,6$)	4,4 ($\pm 0,7$)	3,3 ($\pm 0,8$)
VD feucht	4,7 ($\pm 1,5$)	4,7 ($\pm 1,2$)	3,4 ($\pm 1,2$)	2,9 ($\pm 0,4$)
VD moderat	4,6 ($\pm 0,9$)	4,4 ($\pm 1,7$)	4,3 ($\pm 1,5$)	2,2 ($\pm 1,6$)
VD trocken	4,2 ($\pm 1,9$)	4,2 ($\pm 1,5$)	4,0 ($\pm 1,2$)	2,8 ($\pm 1,4$)

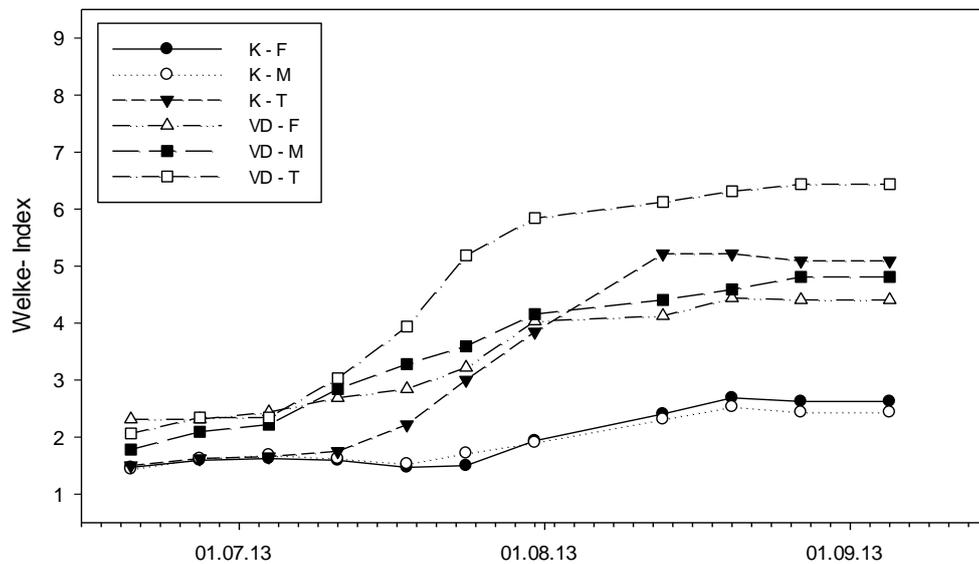


Abb. A5: Trockenstressversuch 1: Welke-Index der Bergahorne mit Inokulation mit *V. dahliae* und Kontrollpflanzen unter verschiedenen Bodenwassergehaltsschemata im Vegetationshallenversuch vor, bei und nach der Trockenstressphase (01.07. bis 12.08.13) während der Vegetationsperiode 2013.

Abkürzungen: K-F: Kontrolle + Bodenwassergehalt (BWG) feucht, K-M: Kontrolle + BWG moderat, K-T: Kontrolle + BWG trocken, VD-F: *V. dahliae* + BWG feucht, VD-M: *V. dahliae* + BWG moderat, VD-T: *V. dahliae* + BWG trocken.

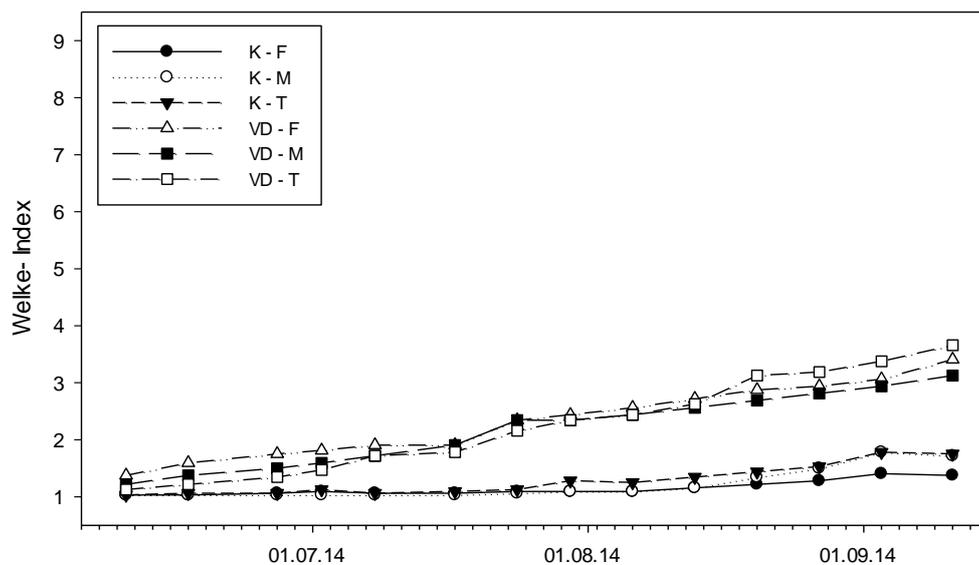


Abb. A6: Trockenstressversuch 2: Welke-Index der Kontrollpflanzen und der Bergahorne mit Inokulation mit *V. dahliae* unter verschiedenen Bodenwassergehaltsschemata im Vegetationshallenversuch vor, bei und nach der Trockenstressphase (25.06. bis 25.08.14) während der Vegetationsperiode 2014.

Tab. A14: Welke-Index: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und des Bodenwassergehalts (BWG), Wechselwirkungen der Faktoren beider Trockenstressversuche nach faktorieller ANOVA, n=32 ($p > 0,05$: n.s.; $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **, $p \leq 0,001$: ***).

	Welke-Index			
	Versuch 1 2013	Versuch 1 2014	Versuch 2 2014	Versuch 2 2015
<i>V. dahliae</i>	***	***	***	***
BWG	***	n.s.	n.s.	n.s.
Tag	***	***	***	***
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	***	n.s.	n.s.
<i>V. dahliae</i> × Tag	***	***	***	n.s.
BWG × Tag	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>V. dahliae</i> × BWG × Tag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. A15: Gaswechsel: Signifikanz der Haupteffekte der Infektion mit *V. dahliae* und des Bodenwassergehalts (BWG), Wechselwirkungen der Faktoren beider Trockenstressversuche nach faktorieller ANOVA, Versuch I: n=8, Versuch II: n=12.

	Gaswechsel			
	Versuch 1 2013	Versuch 1 2013	Versuch 2 2014	Versuch 2 2014
	Photosynthese	St. Leitfähigkeit	Photosynthese	St. Leitfähigkeit
<i>V. dahliae</i>	**	**	***	**
BWG	**	***	***	***
Tag	n.s.	***	n.s.	**
<i>V. dahliae</i> × BWG	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>V. dahliae</i> × Tag	n.s.	n.s.	**	n.s.
BWG × Tag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>V. dahliae</i> × BWG × Tag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. A16: PCR-Protokolle für den Thermocycler (Denaturierung, Annealing und Elongation mit Angabe der Temperatur, Dauer und Wiederholung) nach verwendetem Primerpaar, mit Amplikongröße in bp (Basenpaare) und Literaturangabe.

Primerpaar	Temperatur	Dauer	Wdh.	Amplikon	Referenz
Df / Dr	94°C	2 min	35 ×	490 bp	INDERBITZIN et al. (2013)
	94°C	10 sec			
	64°C	20 sec			
	72°C	60 sec			
	72°C	7 min			
DB 19 / DB 22	94°C	4 min	30 ×	580 bp	CARDER et al. (1994)
	94°C	45 sec			
	54°C	30 sec			
	72°C	60 sec			
	72°C	5 min			
VD Tub F2 / VD Tub R4	95°C	10 min	40 ×	82 bp	DEBODE et al. (2011)
	95°C	15 sec			
	60°C	60 sec			
	72°C	60 sec			
	72°C	5 min			
Vert Bt-R / Vert Bt-F	95°C	5 min	40 ×	115 bp	ATTALAH et al. (2007)
	95°C	10 sec			
	65°C	35 sec			
	72°C	25 sec			
	72°C	3 min			
ITS 1F / ITS 2	95°C	5 min	35 ×	200 - 300 bp	GARDES & BRUNS (1993)
	95°C	30 sec			
	58°C	15 sec			
	72°C	30 sec			
	72°C	10 min			
ITS 1 / ITS 4	95°C	15 min	40 ×	600 - 800 bp	WHITE et al. (1990)
	94°C	25 sec			
	55°C	30 sec			
	72°C	50 sec			
	72°C	10 min			

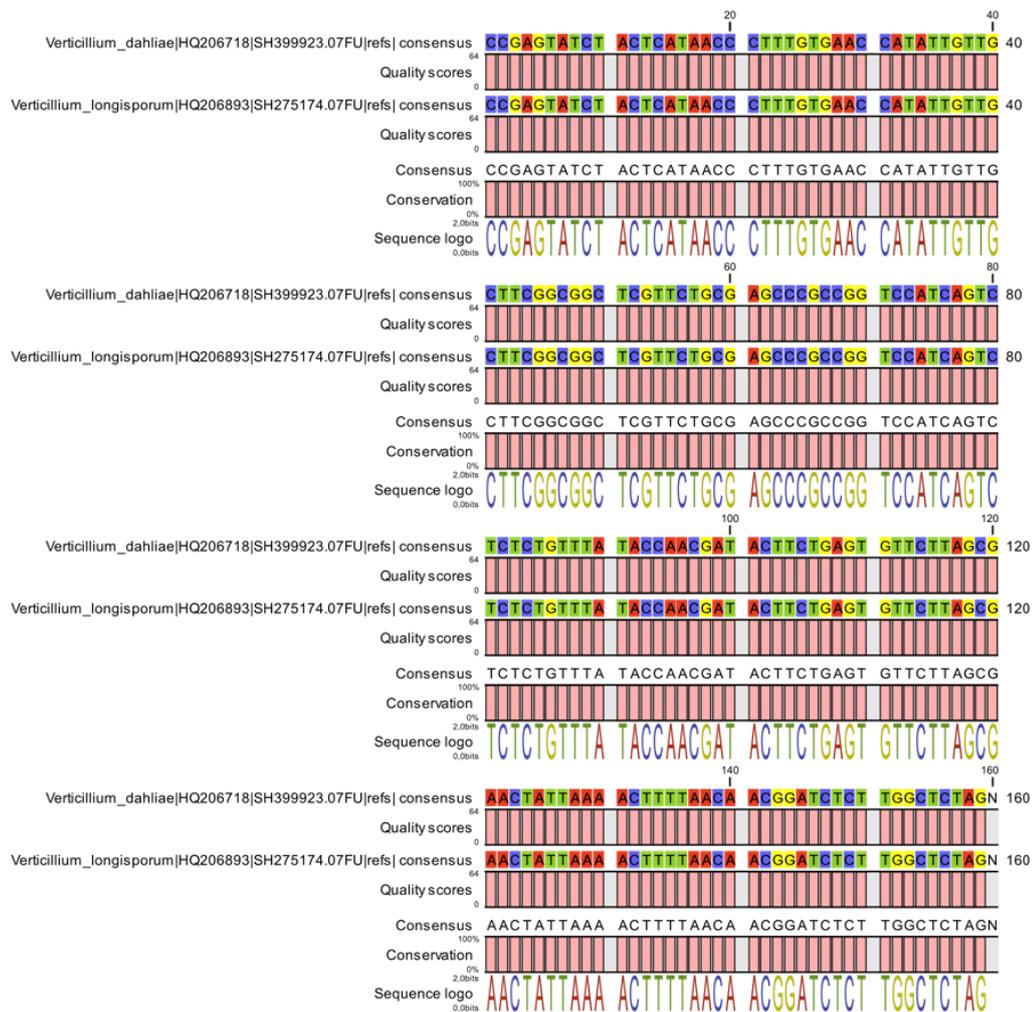


Abb. A7: DNA-Sequenz des ITS 1-Bereichs der OTUs von *V. dahliae* und *V. longisporum* und der Konsensus-Sequenz, erstellt mit CLC Genomics.

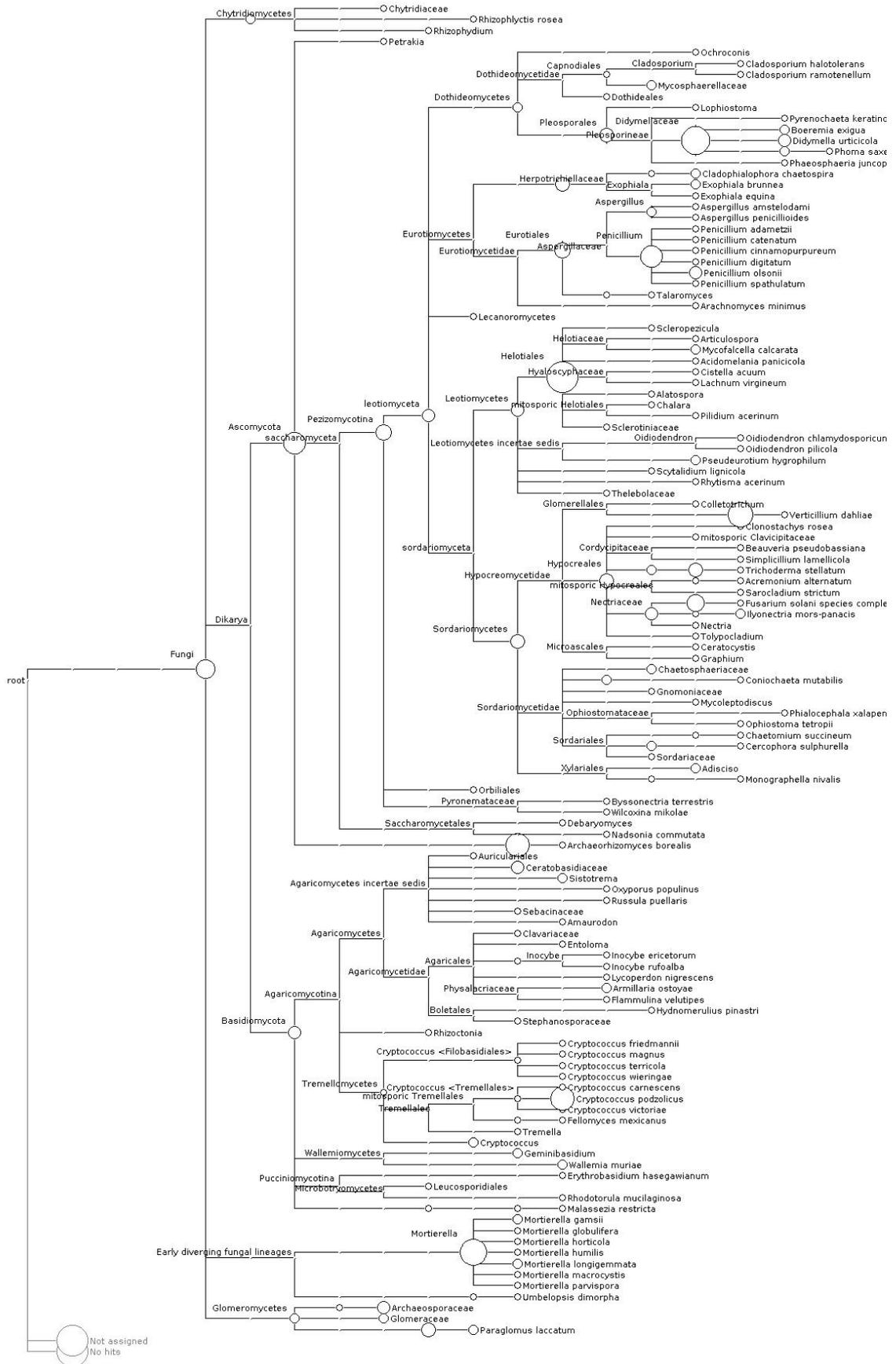


Abb. A8: Phylogenetischer Stammbaum der OTUs des Stamms Jäg 2.

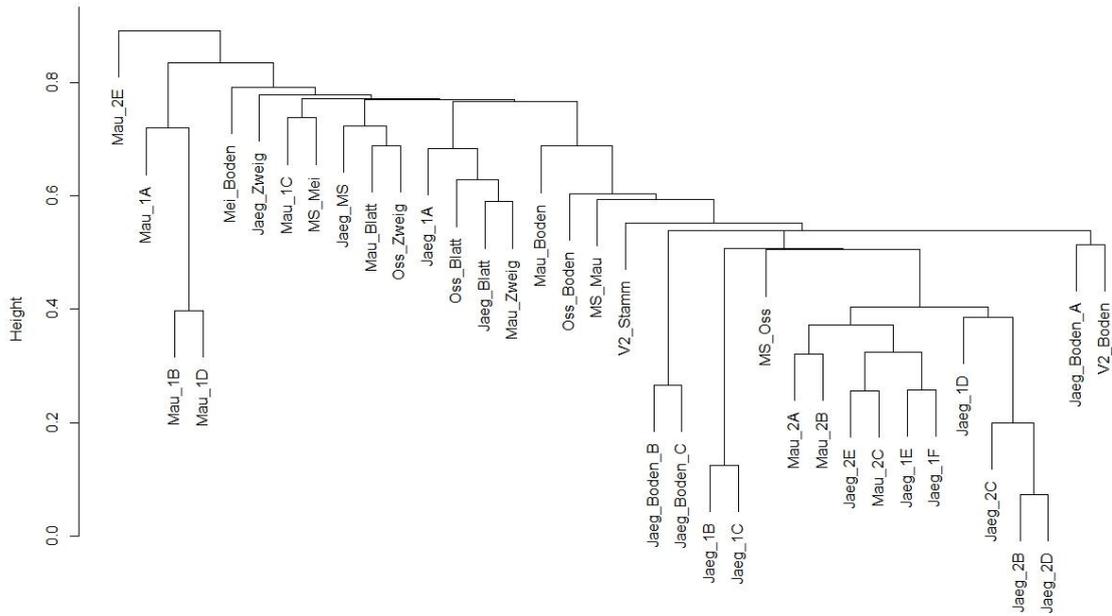


Abb. A9: NGS-Sequenzierung I: Cluster-Dendrogramm der in verschiedenen Bereichen von vier Stammnekrosen und in Boden-, Mikrosklerotien (MS), Zweig- und Blattproben detektierten OTUs aus den Bergahornbeständen bei Mauern und Jägersdorf (Graphik: M. Blaschke).

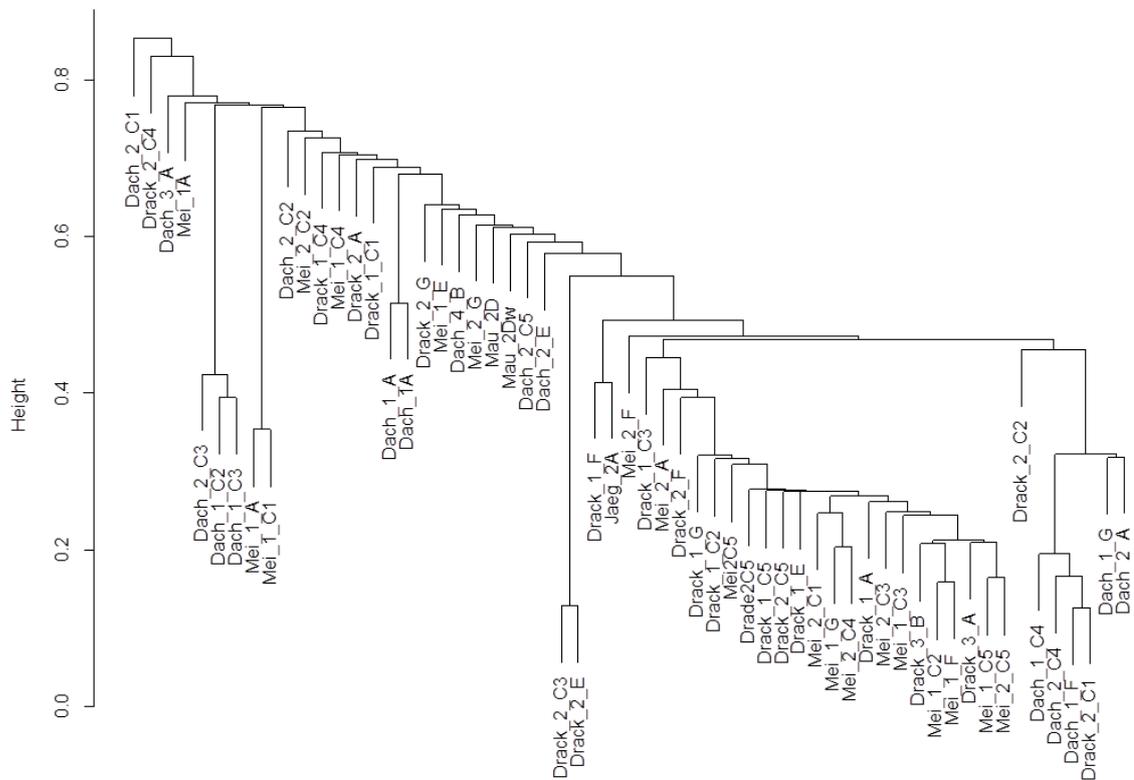


Abb. A10: NGS-Sequenzierung II: Cluster-Dendrogramm der in verschiedenen Bereichen von sechs Stammnekrosen detektierten OTUs aus den Bergahornbeständen bei Drackenstein, Meitingen und Dachau (Graphik: M. Blaschke).

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Oßwald für die gute Betreuung und Unterstützung und das gewährte Vertrauen während der gesamten Arbeit. Prof. Dr. Hardy Pfanz und Prof. Dr. Philipp Benz danke ich für die Übernahme des Korreferats. Markus Blaschke danke ich für die Idee zu dem spannenden Thema und die engagierte Unterstützung über die gesamte Projektlaufzeit. Dr. Frank Fleischmann sei gedankt für die gute Betreuung, insbesondere für die Konstruktion der Bewässerungsanlagen-Steuerung als auch die famose Idee, *V. dahliae* mittels *Next Generation Sequencing* nachzuweisen. Dr. Ralf Petercord danke ich für die Unterstützung seitens des gesamten Waldschutzes und die gewährten Freiheiten bei der Forschung.

Ein dickes Dankeschön geht zudem an Alexandra Nannig, Günter Wallerer, Conny Reichert, Ludwig Straßer und die ganze restliche Abteilung Waldschutz der Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft für die ambitionierte und tatkräftige Unterstützung in Wald und Labor und das schöne Arbeitsklima.

Dr. Carmen Morales Rodriguez von der TUM Pathologie der Waldbäume sei gedankt für die Expertise und Unterstützung bei der Durchführung des *Next Generation Sequencing*. Tina Schmidt, Peter Kuba und Martina Harnisch-Bethke vielen Dank für die Hilfe in praktischen und administrativen Angelegenheiten. Ein besonderer Dank geht an Benjamin Hafner von der TUM Ökophysiologie der Pflanze, der in Kooperation die statistische Analyse der zweifaktoriellen, ordinalskalierten, varianzheterogenen Daten der Welke-Indices übernahm.

Vielen Dank möchte ich auch an Gabriele Ehmcke und Michael Risse von der TUM Holzforschung richten, die in Kooperation die Anfertigung und Dokumentation der Mikrotomschnitte der Stammnekrosen übernahmen. Dr. Franka Brüchert von der FVA Freiburg möchte ich danken für die Kooperation zur erstmaligen Erstellung von CT-Aufnahmen der *Verticillium*-Stammnekrosen. Auch den Bacheloranden Veronika Zimmerer und Marius Höhnle sei gedankt für Messungen der hydraulischen Leitfähigkeiten und kräftige Pürckhauereinschläge im Wald sowie Bettina Schröttle für viele geduldige Gaswechselfmessungen in der Vegetationshalle.

Ein weiteres Dankeschön für Konstruktion und Aufbau der Bewässerungsanlage sei gerichtet an Ivonne Jüttner, Florian Steinbacher und Udo Ehlers vom Team des GH L Dürnast der TU München, ohne deren technische Erfahrung die Durchführung der Trockenstressversuche schwer möglich gewesen wäre. Des Weiteren sei gedankt Benedikt Heitmann von der FH Osnabrück für das *V. dahliae*-Isolat, Dr. Gitta Langer von der FVA Göttingen für das *F. solani*-Isolat und Andreas Ludwig vom Pflanzgarten Laufen der BaySF für die Bergahornsämlinge.

Zu guter Letzt möchte ich auch gerne meinen Eltern, meiner Freundin Maria Wiens und meinem Partner Johannes Herding ein dickes Dankeschön für die offenen Ohren und passionierten Korrekturlesungen aussprechen.