

Lehrstuhl für Phythopathologie
der Technischen Universität München

**Untersuchungen zur Biologie und Epidemiologie
der Blattbräune an Süßkirschen
(*Gnomonia erythrostoma* Pers. Auerswald)**

Dieter Hecht

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 Agrarwissenschaften (Dr.agr.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. W. Huber

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. V. Zinkernagel
2. Univ.-Prof. Dr. D. Treutter

Die Dissertation wurde am 12. Februar 2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19. April.2002 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Literaturübersicht	2
3	Symptomatik	9
4	Material und Methoden	15
4.1	Isolierung und Kultur von <i>Gnomonia erythrostoma</i>	15
4.1.1	Isolierung	15
4.1.1.1	Ascosporen	15
4.1.1.2	Bestimmung der Keimrate	15
4.1.1.3	Konidien	16
4.1.1.4	Gewebe	17
4.1.2	Kultur	17
4.2	Epidemiologische Untersuchungen	19
4.2.1	Standorte	19
4.2.1.1	Oberrüsselbach	19
4.2.1.2	Hiltpoltstein	20
4.2.2	Erfassung der Wetterdaten	20
4.2.3	Erfassung des Ascosporenfluges	21
4.2.4	Auswertung des Ascosporenfluges	21
4.2.5	Sporenflugbeginn	22
4.2.6	Sortenanfälligkeit	22
4.2.6.1	Blattbefall	22
4.2.6.2	Belaubung	23
4.3	Bekämpfung	24
4.3.1	Spritzversuch 2000	24
4.3.1.1	Fungizide	24
4.3.1.2	Spritzplan	25
4.3.1.3	Spritztermine	26

4.3.2	Spritzversuch 2001	27
4.3.2.1	Fungizide	27
4.3.2.2	Spritzplan	28
4.3.2.3	Spritztermine	28
4.3.3	Bonitur des Blatt- und Fruchtbefalls	29
4.3.4	Wirkungsgrad der Fungizide	29
4.3.5	Belaubung der Sorte "Burlat"	30
4.3.6	Bonitur der Fruchtkörper	30
4.4	Histologische Untersuchungen	31
4.4.1	Pflanzenmaterial	31
4.4.2	Präparation des Pflanzenmaterials	31
4.4.3	Färbemethoden	32
4.4.3.1	2 µm Schnitte	32
4.4.3.2	8 µm Schnitte	33
4.4.3.3	Zellkernanfärbung	34
4.4.3.4	Proteinnachweis	34
4.5	REM	35
4.5.1	Wirtspflanzen	35
4.5.2	Detached-leaf-Methode	35
4.5.3	Inokulum	36
4.5.4	Inkubationsbedingungen	36
4.5.5	Probenuntersuchungen im ESEM	36
4.6	RAPD-PCR	37
4.6.1	Extraktion der DNA	37
4.6.1.1	DNA der Kirsche	37
4.6.1.2	DNA von <i>Gnomonia erythrostoma</i>	37
4.6.1.3	DNA der isolierten Pilze	38
4.6.1.4	DNA von befallenen Blättern und Früchten	38
4.6.1.5	Überprüfung des DNA-Gehalts	38
4.6.2	DNA-Vervielfältigung	39
4.6.2.1	PCR-Komponenten	39
4.6.2.2	Thermocycler	39
4.6.3	DNA-Auftrennung	40
4.6.4	Primer-Screening	40

4.6.5	Nachweis von <i>Gnomonia erythrostoma</i> DNA in befallenen Pflanzen	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Isolierung und Kultur von <i>Gnomonia erythrostoma</i>	42
5.1.1	Isolierung	42
5.1.1.1	Ascosporen und Konidien	42
5.1.1.2	Bestimmung der Keimrate	42
5.1.1.3	Gewebe	43
5.1.2	Kultur	43
5.1.3	Fruchtkörperbildung	46
5.2	Epidemiologische Untersuchungen	47
5.2.1	Untersuchungsjahr 1998	47
5.2.1.1	Sporenflug am Standort Oberrüsselbach	47
5.2.1.2	Sporenflug am Standort Hiltpoltstein	50
5.2.2	Untersuchungsjahr 1999	53
5.2.2.1	Sporenflug am Standort Oberrüsselbach	53
5.2.2.2	Sporenflug am Standort Hiltpoltstein	56
5.2.3	Untersuchungsjahr 2000	59
5.2.3.1	Sporenflug am Standort Oberrüsselbach	59
5.2.3.2	Sporenflug am Standort Hiltpoltstein	62
5.2.4	Beginn des Sporenfluges	65
5.2.5	Sortenanfälligkeit	66
5.2.5.1	Blattbefall	66
5.2.5.2	Belaubung	67
5.2.5.2.1	März 1999	67
5.2.5.2.2	März 2000	67
5.2.5.2.3	März 2001	68
5.3	Bekämpfung	69
5.3.1	Blatt- und Fruchtbonitur	69
5.3.1.1	Spritzversuch 2000	69
5.3.1.1.1	Sorte "Burlat" + "Regina"	69
5.3.1.1.2	Sorte "Burlat"	70
5.3.1.1.3	Sorte "Regina"	71

5.3.1.2	Spritzversuch 2001	72
5.3.1.2.1	Sorte "Burlat" + "Regina"	72
5.3.1.2.2	Sorte "Burlat" und "Regina"	73
5.3.2	Wirkungsgrad	75
5.3.2.1	Spritzversuch 2000	76
5.3.2.2	Spritzversuch 2001	78
5.3.3	Belaubung der Sorte "Burlat"	80
5.3.4	Fruchtkörperbonitur	81
5.4	Histologische Untersuchungen	82
5.5	REM	92
5.6	RAPD-PCR	96
5.6.1	Extraktion der DNA	96
5.6.2	DNA-Gehalt	96
5.6.3	Primer-Screening	97
5.6.4	Nachweis von <i>Gnomonia erythrostoma</i> DNA in infizierten Pflanzen	99
5.6.5	Identifizierung der isolierten Pilze	99
6	Diskussion	100
7	Zusammenfassung	116
8	Anhang	119
9	Literaturverzeichnis	130
10	Abkürzungsverzeichnis	135

1 Einleitung und Problemstellung

Gegen Ende des Jahrzehntes 1870 tritt eine bis dahin wenig bekannte Kirschkrankheit im Alten Land auf. Die Epidemie, die acht Jahre in diesem Gebiet andauert, führt fast zur völligen Vernichtung der Kirschproduktion. Ebenso plötzlich wie die Krankheit aufgetreten ist, verschwindet sie wieder. Ob die polizeilich verordneten Hygienemaßnahmen, eine veränderte Witterung oder andere Gründe für dieses Ereignis in Frage kommen, bleibt ungeklärt. Aber nicht nur der Norden Deutschlands ist betroffen. Bis 1891 sind nahezu alle Kirschanbaugebiete in Deutschland, sowie Gebiete in Österreich und in der Schweiz befallen. Mit einem letzten massiven Auftreten der Krankheit im Jahre 1913 in der Schweiz endet der erste Seuchenzug des Erregers.

Die vereinzelt Befallsmeldungen in den folgenden Jahrzehnten werden kaum zur Kenntnis genommen, so daß die Bedeutung der Krankheit abnimmt, obwohl die einschlägigen Lehrbücher sie immer wieder erwähnen.

Mit Beginn der 90er Jahre ändert sich das schlagartig. Vom unteren Rheingraben breitet sich die Krankheit bis 1994 über Baden-Württemberg, Rheinhessen, Rheingau und Franken epidemisch aus. Der zweite Seuchenzug hat begonnen. In den folgenden Jahren nimmt der Befall an Intensität zu.

Mit dem sporadischen Auftreten des Erregers befaßte sich nur FRANK (1886, 1887a und b) während der ersten Epidemie Ende des 19. Jahrhunderts. Er erkannte, daß die Krankheit, die eine vorzeitige Verbräunung des Laubes bewirkt, durch den früher bereits beschriebenen Pilz *Gnomonia erythrostoma* Fuckel verursacht wird. Auf Empfehlung von FRANK (1886) wurde 1886 eine Polizeiverordnung erlassen, der die Obsthofbesitzer im Kreis Jork verpflichtete, das abgestorbene Laub, daß typischerweise an den Bäumen verbleibt und den Erreger als Inokulumquelle enthält, während des Winters zu entfernen und zu verbrennen. Die rigorose Durchsetzung dieser Verordnung führte wohl zum Abklingen der Epidemie im Alten Land.

Da heute eine solche Bekämpfungsmaßnahme nicht mehr durchzusetzen ist, muß auf chemische Mittel zurückgegriffen werden.

Die Entwicklung eines Prognosemodells zum effektiven Einsatz von Fungiziden läßt sich nur durch genaue Kenntnisse der Biologie, der Epidemiologie und der Pathogenese des Erregers verwirklichen. Da aus bereits erwähnten Gründen Untersuchungen auf diesen Gebieten bisher nicht oder nur in geringen Maßen stattgefunden haben, soll die vorliegende Arbeit diese Lücken füllen und als Grundlage für weitere Untersuchungen zur Bekämpfung der Blattbräune dienen.

2 Literaturübersicht

Erreger:

Die Blattbräune wird durch einen parasitären Pilz verursacht, der taxonomisch als *Gnomonia erythrostoma* (Pers.) Auerswald bezeichnet wird. Synonyme für den Erreger sind *Apiognomonia erythrostoma* (Pers.) v. Höhnel und *Sphaeria erythrostoma* Pers. (SPAAR et. al., 1990). Sehr uneinig ist man sich bei der Klassifizierung der Nebenfruchtform. So bezeichnen SORAUER (1928) und VUKOVITS (1980) die Nebenfruchtform als *Cylindrosporium pruni cerasi* C. Massalongo. BOVEY (1967) und OGAWA et al. (1995) dagegen sprechen von *Libertina stipata* (Lib.) v. Höhn bzw. *Phomopsis stipata* (Lib.) Sutton.

Nach HOFFMANN (1994) nimmt der Pilz folgende Stellung in der Systematik ein:

Abteilung:	Eumycota
Unterabteilung:	Ascomycotina
Klasse:	Pyrenomycetes
Ordnung:	Diaporthales
Gattung:	Gnomonia
Art:	<i>Gnomonia erythrostoma</i>

Welchen Wirtskreis *Gnomonia erythrostoma* hat, ist noch nicht sicher geklärt. Laut VUKOVITS (1980) werden vorzugsweise Süßkirschen und Vogelkirschen befallen, während der Befall von Sauerkirschen sehr selten ist. Von einem verstärkten Auftreten der Krankheit an Sauerkirschen in der Türkei berichtet SORAN (1978). Die ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY (2000) weitet den Wirtskreis auf alle Prunus-Arten aus. Insbesondere sind aber die Wildkirschen, Aprikosen (*P. armeniaca*) und Traubenkirschen (*P. padus*) betroffen. Da noch keine Infektionen von der Aprikose auf die Kirsche und umgekehrt beobachtet wurden (VUKOVITS und WITTMANN 1990), geht BONDAR (1976) davon aus, daß *Apiognomonia erythrostoma* in zwei biologischen Formen vorkommt: Als "forma *armeniaca*" an der Aprikose (Marille) und als "forma *erythrostoma*" an der Kirsche.

Als Verbreitungsgebiet der Blattbräune nennt OGAWA (1995) Frankreich, Österreich, Slowakei, Tschechische Republik, Ukraine, Italien und die Balkanhalbinsel. Die ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY (2000) berichtet von einer verstärkten Zunahme der Krankheit in den letzten Jahren in Südengland.

Nach KOTTE (1958) tritt die Blattbräune alljährlich in gleichbleibender Stärke an den Brennkirschen und Wildkirschen in höheren Gebirgslagen auf. In niederen, klimatisch günstigeren Lagen erscheint die Krankheit dagegen sporadisch, meist über mehrere Jahre mit bedrohli-

cher Stärke, um dann, auch ohne Bekämpfungsmaßnahmen, nahezu zu verschwinden. Als Ursache für diesen Umstand nennt KOTTE (1958) die Witterungsbedingungen. Regnerische Sommer bzw. eine Folge von solchen führen zu einem starken *Gnomonia*-Befall. Ob solche Witterungsbedingungen auch der Auslöser für den Ausbruch der "Blattseuche" gegen Ende des 19. Jahrhunderts waren, kann heute nicht mehr geprüft werden.

1878 bricht im Alten Land die Krankheit aus und breitet sich bis 1891 auf nahezu alle Kirschanbaugebiete Deutschlands aus (Thüringen, Sachsen, Rheingau, im Württembergischen, in Schleswig-Holstein und in der Mark Brandenburg). Aber auch Gebiete im angrenzenden Ausland, wie dem schweizerischen Teil des Bodensees, sowie einige Anbaugebiete Österreichs und Oberitaliens sind betroffen (NIKUSCH 1994a und b, RÜEGG 1994). 1913 tritt die Krankheit massiv in der Schweiz am Vierwaldstätter See und am Zürichsee auf (MÜLLER-THURGAU 1913 und 1915, RÜEGG 1994)). In Oberbaden und Rheinpfalz (Ramberger Tal) kommt es 1925 und 1926 nochmals zu einem verheerenden Auftreten der Krankheit (HAASE 1925 und 1931, von TUBEUF 1926). Danach wird erst wieder 1953 von einem wirtschaftlich bedeutenden Befall in Südhessen (Kreis Usingen) berichtet (FREYER 1953). Mit dem Jahr 1978 beginnt die zweite und bis jetzt (2001) andauernde Epidemie. Waren 1978 nur einige Kirschbäume in etwa 400 m Höhe im Ortenaukreis in Mittelbaden befallen, nistet sich die Krankheit in den folgenden Jahren in mehreren höher gelegenen Brennkirschanlagen im mittleren Schwarzwald ein (NIKUSCH 1994b). 1989 werden erste Symptome der Blattbräune in Hausgärten im Raum Bingen beobachtet. Ein Jahr später sind nahezu alle wildwachsenden Vogelkirschen im gesamtem Rheinhessen befallen (HOLIGHAUS 1999). Von nun an breitet sich die Krankheit rasch über große Landstriche aus. Bis Ende 1994 wird massiver Befall aus dem Südschwarzwald, aus Gebieten vom Oberrhein und Hochrhein, vom nordwestlichem Bodenseegebiet, aus Gebieten um Heilbronn und dem hessischen Hinterland bei Biedenkopf, sowie aus Umgebungen von Wiesbaden und Würzburg gemeldet (NIKUSCH 1994a und b). In diesem Jahr wird auch zum erstenmal ein Befall im Landkreis Forchheim (Oberfranken) festgestellt (HASYN 1996). In Rheinhessen sind 1996 erste Ertragsanlagen vollständig befallen (HOLIGHAUS 1999). Zwei Jahre später, 1998, wird nach rund 85 Jahren wieder *Gnomonia erythrostoma* in der Schweiz (Wittenau) nachgewiesen (BÜNTER Pflanzenschutzmitteilung). Im Jahr 2001 verursacht *Gnomonia erythrostoma* im Landkreis Forchheim (Oberfranken) einen 80%igen Ernteausfall (HUBMANN: persönliche Mitteilung).

Mit *Gnomonia erythrostoma* befallene Kirschbäume sind vor allem im Winter sofort zu erkennen. Hängt ein Baum in dieser Zeit voll mit abgestorbenem Laub, so ist dieser mit der Blattbräune infiziert. KOTTE (1958) beschreibt dies so: "Am auffälligsten ist das Krankheitsbild im Winter. Die Bäume verlieren ihr Laub nicht; ein großer Teil der Blätter bleibt vertrocknet mit hakenförmig eingekrümmten Stielen an den Zweigen hängen. Im Frühjahr erscheinen die Blüten zwischen den dünnen Blättern des letzten Jahres. Erst im Laufe des Sommers zerfal-

len die vorjährigen Blätter durch Regen und Wind."

Als Ursache des Nichtabwerfens befallener Blätter nennen KOTTE (1958), HEINZE (1978), VUKOVITS (1980) und HOLIGHAUS (1999) das Wachstum des Pilzes in den Blattstiel, das zu einem vorzeitigen Absterben des Blattstiels führt. Hierdurch wird die Ausbildung des Trenngewebes unterdrückt. Zusätzlich zur Verhinderung der Trennschichtausbildung führt NIKUSCH (1994) eine Verankerung des Blattstiels durch fädige Hyphen an.

Alle genannten Autoren sind sich darin einig, daß der Pilz nicht über die Blattnarbe in den Zweig eindringen kann. FRANK (1887a) ist der Ansicht, daß der Pilz auch nicht in den Blattstiel wächst.

Typisch für die Krankheit ist auch, daß die braunen Blätter meist vom Rand nach innen eingerollt sind (HEINZE 1978), d.h. die morphologische Oberseite nach innen zeigt (FRANK 1887a).

Schaut man sich ein solches braunes, am Zweig hängengebliebenes Blatt genauer an, so kann man auf der Blattunterseite kleine, dunkle Pünktchen erkennen, die sich meist über das ganze Blatt verteilen. Hierbei handelt es sich um die Hauptfruchtform des Pilzes, die Perithezien. Nach FRANK (1887a) haben sie eine flaschenförmige Gestalt mit einem fast kugelrunden Bauch und einem kurzen zylinderförmigen, am oberen Ende abgestumpften Hals. Der Bauch ist als leichte Erhebung auf der Blattoberseite zu erkennen, während die Hälse als "schnabelartige" Mündungen (VUKOVITS 1980) auf der Blattunterseite herausragen. Die Höhe der "Flasche" beträgt ungefähr 0,3 mm, der Radius des Bauches zirka 0,24 mm (FRANK 1887a).

In den Perithezien werden schlauchförmige Asci angelegt, in denen sich je Ascus 8 Ascosporen bilden.

Bei den Asci handelt es sich um keulenförmige Zellen, die sich nach unten in einen langen allmählich fein verdünnten Stiel fortsetzen und eine Länge von 60 bis 72 μm besitzen (FRANK 1887a). VUKOVITS (1980) beschreibt sie als fast sitzend mit einem chitinösen Apikalring im Scheitel und einer Größe von 70 bis 80 x 11 bis 12 μm .

Die Ascosporen haben eine ellipsoide bis eiförmige Gestalt (FRANK 1887a). Sie sind hyalin, inaequal zweizellig (VUKOVITS 1980) mit zwei größeren rundlichen Strukturen in der größeren Zelle, die FRANK (1887a) als Öltröpfchen identifiziert hat. Die Angaben über die Größe der Ascosporen reichen von 14 bis 16 x 4,8 μm (FRANK 1887a), über 16 bis 18 x 5 bis 6 μm (VUKOVITS 1980) bis zu 17 bis 20 x 6 μm (SORAUER 1928).

Über den Reifezeitpunkt der Perithezien bzw. der Asci und Ascosporen gibt es unterschiedliche Meinungen. FRANK (1887a) schreibt, daß die Asci in den Perithezien schon im Herbst angelegt werden, allerdings noch ohne Sporen. Eine Reifung der Sporen findet erst im Frühjahr mit steigenden Temperaturen statt. SORAUER (1928) geht davon aus, daß die Reifung über den Winter fortschreitet, bis im April und Mai die Sporen zur völligen Reife ge-

langen. Laut NIKUSCH (1994b) bilden sich die Perithezien erst im zeitigen Frühjahr und reifen im April und Mai heran.

Die Ascosporen werden im April und Mai bei niederschlagsreichem Wetter aus den reifen Perithezien entlassen, durch den Wind verbreitet, und sie infizieren das neu gebildete Laub (VUKOVITS 1980). Neben der Nässe benötigen die Ascosporen laut HOLIGHAUS (1999) eine Mindesttemperatur, um freigesetzt zu werden.

Der Prozeß der Ascosporenfreisetzung beginnt, wenn die Blätter durchfeuchtet sind und die Luftfeuchte sinkt (FRANK 1886). FRANK (1887a) spricht von einer Infektionsperiode von Ende April bis in den Juli, wobei Infektionen nach jedem Regenfall und starkem Tau erfolgen. Auch HEINZE (1978) und KOTTE (1958) schreiben, daß die Ascosporen zur Keimung Feuchtigkeit benötigen.

Die ersten Symptome für eine Infektion der Blätter sind im Frühsommer undeutliche, bleiche Flecke, die sich etwa im Juli gelb und etwas später braun färben (SORAUER 1928). FRANK (1887a) gibt als Zeitpunkt für das Sichtbarwerden der ersten Symptome Anfang Juni an. Zu diesem Termin entstehen auf infizierten Blättern große unscharfe, gelbgrüne Flecke. Diese Symptome verändern sich über eine längere Periode nur sehr gering, bis im Juli und August die Blätter ganz vergilben und nekrotisieren. Neben diesen größeren Flecken entstehen auch viele kleine, braune Flecke mit einem Durchmesser von wenigen Millimetern (FRANK 1887a, SORAUER 1928, VUKOVITS 1980, FRIEDRICH und RHODE 1984, BRAUN und RIEHM 1996). NIKUSCH (1994) gibt an, daß der Neubefall ab Ende Juni zu erkennen ist. Dieser zeigt sich auch bei starkem Befallsdruck an den jungen Früchten. Die Symptome äußern sich in Verkrüppelungen, Fleckigkeit und Rissen. Die Früchte trocknen ein und verfaulen. In einigen Fachbüchern wird auch von einem "Kleinbleiben" befallener Früchte gesprochen (SORAUER 1928, BRAUN und RIEHM 1957, VUKOVITS 1980).

Wenn das infizierte Blatt abzusterben beginnt, entwickeln sich auf den nekrotischen Stellen blattunterseits, gleichmäßig verteilt, kugelförmige bzw. schwach flachgedrückte Gebilde (FRANK 1887). SORAUER (1928) bezeichnet sie, die sich meist im Juli und August bilden, als pyknidienähnliche Sporenlager. BRAUN und RIEHM (1957), HEINZE (1978) und HOLIGHAUS (1999) sprechen von Pyknidien, VUKOVITS (1980) und NIKUSCH (1994) von Acervuli. Einig ist man sich, daß in diesen Sporenlagern fadenförmige, meist gekrümmte Sommersporen oder Konidien gebildet werden.

Über die Funktion dieser Sporen ist man geteilter Meinung. Nach NIKUSCH (1994), können die Konidien bei einem nassen Spätsommer massive Infektionen auf gesundem Laub hervorrufen. Diese Infektionen sind nach HOLIGHAUS (1999) bis Anfang Oktober möglich. Für HEINZE (1978) und FRIEDRICH und RHODE (1996) sind die Sommersporen ohne Bedeutung für Neuinfektionen.

Eine ganz andere Auffassung über die "Nebenfruchtform" hat FRANK (1887a). Für ihn han-

delt es sich um Spermogonien mit Spermastien. Diese Spermastien werden durch Wasser freigesetzt und kopulieren mit Empfängnishyphen, die aus den Spaltöffnungen wachsen. Das Ergebnis sind Perithezien, die ab Herbst auf den braunen Blättern zu sehen sind. SORAUER (1928) und VUKOVITS (1980) schreiben, daß fast gleichzeitig mit der Konidienbildung, im Blattinneren die Entwicklung der Perithezien beginnt. Ab Oktober sind die Fruchtkörper auf den abgestorbenen, hängengebliebenen Blättern zu erkennen.

Mit der Indikationszulassung, die im neuen Pflanzenschutzgesetz vom 1. Juli 1998 verankert ist, steht gegenwärtig kein Fungizid für die Bekämpfung der Blattbräune zur Verfügung. Die LANDESANSTALT FÜR PFLANZENSCHUTZ zusammen mit den REGIERUNGS-PRÄSIDIEN (2001) von Baden Württemberg empfehlen, die Nebenwirkungen des teil-systemischen Fungizids Systhane 6W (Wirkstoff: Myclobutanil; zugelassen gegen Monilia) und des Belagfungizids Delan SC 750 (Wirkstoff: Dithianon; zugelassen gegen Sprühfleckkrankheit und Schrotschuß an Kirschen) auszunutzen. Längere Nässeperioden mit Beginn der Laubentfaltung stellen günstige Infektionsbedingungen dar und sollten vor oder nach Eintritt dieser Witterung mit den beschriebenen Mitteln abgedeckt werden. Bei hohem Infektionsdruck sollten zusätzlich ein bis zwei Nacherntebehandlungen mit Systhane 6W durchgeführt werden.

Die in älterer Literatur empfohlenen Gelbspritzmittel, Kupfer- und Harnstoffbehandlungen (KOTTE 1958, HEINZE 1978, VUKOVITS 1980 und FRIEDRICH und RHODE 1996) besitzen laut FREYER (1953) und NIKUSCH (1994b) keine ausreichende Wirkung, um die Krankheit in ausreichendem Maße zu verringern.

Die Kreisfachberatung Obstbau (LANDRATSAMT FORCHHEIM 2000), empfiehlt zusätzlich durch eine ausgeglichene Düngung nach einer Bodenuntersuchung die Pflanzenhygiene zu verbessern, zur Vermeidung eines Feuchtigkeitsstaus ein regelmäßiges, Mulchen, vor allem im Frühjahr und Frühsommer, durchzuführen und durch gute Erziehung und verstärktes Auslichten offene Kronen zu erzielen.

Bei der Wahl der Standorte rät von TUBEUF (1926) nebelreiche Talsohlen und Standorte mit hoher Luftfeuchte zu vermeiden. MÜLLER-THURGAU (1915) sieht Waldränder und Monokulturen als Gefahrenquellen und schlägt vor, Kirschen mit anderen Obstarten als Mischkultur anzubauen.

Als heute nicht mehr durchführbare Maßnahme muß das restlose Entfernen der an den Bäumen verbliebenen Blätter mit anschließender Verbrennung gesehen werden (FRANK 1887b und SORAUER 1928).

Wirte:

Eine korrekte systematische Einteilung der Kirsche ist sehr schwierig, da es keine ausreichenden Kenntnisse über den Ursprung und die Entwicklung gibt. Erste Beschreibungen stammten von Theophrastus aus dem 3. Jahrhundert vor Christus. Als Ursprungsgegend der Süßkirsche vermutet man das südwestliche Asien um das Kaspische und Schwarze Meer (OGAWA 1995). Kleinfrüchtige Vogelkirschen scheinen bereits in prähistorischer Zeit in der Schweiz verbreitet gewesen zu sein. Funde bei den Pfahlbauten der Schweizer Seen deuten darauf hin. Großfrüchtige Sorten soll der römische Feldherr Lucullus im Jahr 74 v. Chr. aus Kleinasien nach Rom gebracht haben (MÜHR 1998).

In Deutschland bzw. Zentraleuropa ist der Handel mit Kirschen bis in das 14. Jahrhundert zurück zu verfolgen. Von einer Kultur von Süß- und Sauerkirschen wird erstmals im 15. Jahrhundert berichtet (WEBSTER 1996). Im 16. Jahrhundert ist die Süßkirsche in Europa weit verbreitet, wobei Deutschland hier an erster Stelle zu nennen ist (OGAWA 1995).

In den folgenden Jahrhunderten steigt die Zahl der Sorten durch Selektionen dermaßen an, daß eine neue Klassifizierung notwendig wird. Baron von Truchseß-Heim von Battenbourg bestimmt zu Beginn des 19. Jahrhunderts 75 Sorten, die in kurzer Zeit auf 100 steigen. Die Klassifizierungsarbeiten werden von Oberdieck fortgesetzt, der zwischen 1855 und 1866 149 Sorten unterteilt (OBERDIECK und LUCAS 1875).

1877 sind in einem deutschen Katalog 232 Sorten festgehalten. Diese Zahl steigt sogar noch bis 1945 an.

Da insbesondere in Deutschland an vielen Orten selektiert wurde, erhielten genetisch gleiche Sorten unterschiedliche Namen. Um das Durcheinander an Sortennamen zu entflechten, führte Heilmann in Halle (Diemitz) Vergleichspflanzungen mit vielen Sorten von unterschiedlichen Produktionsstandorten durch. Groh, Krümmel und Sante führten die Arbeit von Heilmann fort und gründeten die Steinobstsektion Deutscher Obstsorten (WEBSTER 1996).

Heute gibt es alleine bei den Süßkirschen weltweit über 200 Sorten. Die führenden Länder in der Süßkirschenproduktion sind die ehemalige UDSSR (32,1 %), USA (15,1 %), Türkei (9,6 %), Deutschland (8,9 %) und das ehemalige Jugoslawien (4,9 %) (OGAWA 1995).

Die meisten taxonomischen Einteilungen der Kirsche erfolgten größtenteils nach augenscheinlichen Ähnlichkeiten oder Unterschieden in der Pflanzenmorphologie oder –anatomie. Diese Systematiken sind vor allem als ein Kommunikationsmittel zu sehen. Die meisten Botaniker klassifizieren heute die Kirsche als Gattung *Prunus*, während in der chinesischen Literatur *Cerasus* als Gattung für die Kirsche bevorzugt wird (WEBSTER 1996).

In den meisten Systematiken nimmt heute die Kirsche folgende Stellung ein:

Ordnung:	Rosales
Familie:	Rosaceae
Gattung:	Prunus
Art:	Prunus avium (Süßkirsche)
	Prunus cerasus (Sauerkirsche)

3 Symptomatik

Wie der deutsche Name der Krankheit sagt, kommt es beim Befall mit *Gnomonia erythrostroma* zu Verbräunungen des Laubes. Aber nicht nur die Blätter können befallen werden, sondern auch die Früchte.

Das Erkennen der Symptome, insbesondere der Anfangssymptome, während der Vegetationsperiode ist schwierig. Dagegen lassen sich während des Winters schon aus großer Entfernung befallene Bäume ausmachen (Abbildung 1).



Abbildung 1: Symptombild während des Winter; links die anfällige Sorte "Burlat", rechts die wenig anfällige Sorte "Regina"

Die meisten während der Vegetationsperiode (Frühjahr/Sommer) mit *Gnomonia erythrostroma* infizierten Blätter bleiben über den Winter bis teilweise in den Frühsommer an den Bäumen hängen. Dabei rollen sie sich nach völliger Nekrotisierung, mit der Blattoberseite nach innen, röhrenförmig zusammen und verbleiben mit hakenförmig nach unten gekrümmtem Blattstielen an den Ästen (Abbildung 2).

Ab Oktober ist auf diesen Blättern die Hauptfruchtform (Perithezien) des Pilzes zu sehen. Es sind diese als kleine dunkelbraune bis schwarze Ausbuchtungen (Punkte) auf der Blattober- und Blattunterseite zu erkennen (Abbildung 3).



Abbildung 2: Röhrenförmig eingerolltes Blatt mit hakenförmigen Stiel

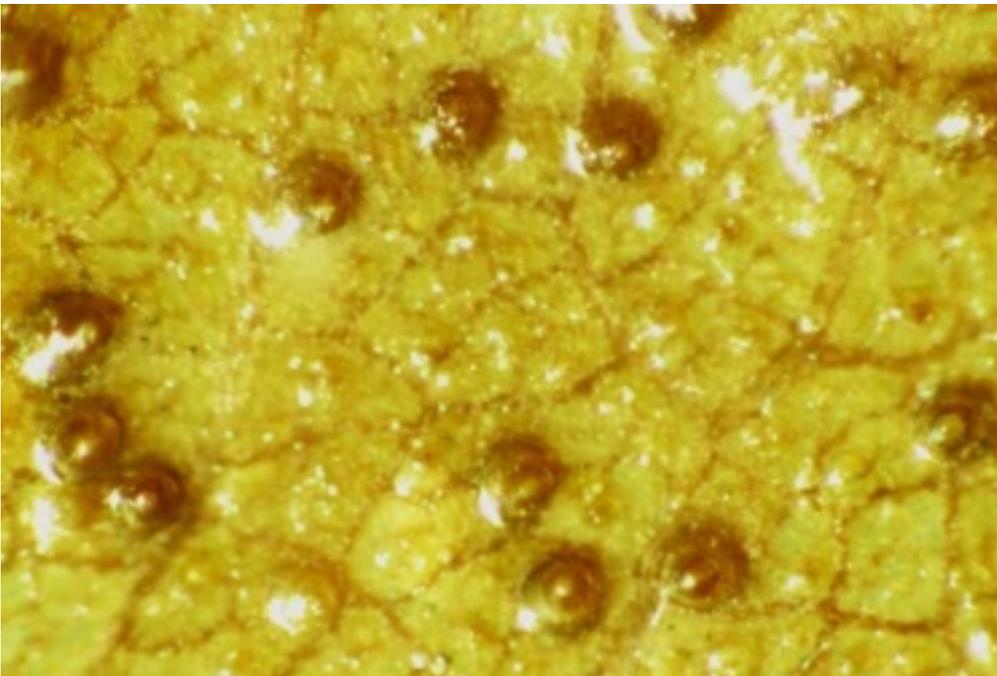


Abbildung 3: Mit Perithechien besetztes Blatt (32-fache Vergrößerung: Blattunterseite)

Über den Winter bis ins Frühjahr reifen in den Perithezien Asci mit Ascosporen heran. Diese Ascosporen werden im Frühjahr nach ausreichenden Niederschlägen ausgeschleudert und können bei entsprechender Witterung die Blätter und Früchte infizieren. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Wochen sind die ersten Symptome als verwaschene, grünlichgelbe Verfärbungen auf der Blattoberseite zu erkennen (Abbildung 4).



Abbildung 4: Anfangssymptome bei Blattbefall

Die Symptome verändern sich in den nächsten 4 - 6 Wochen nur sehr langsam, wobei die Flecken sich vergrößern und chlorotisch werden (Abbildung 5). Meist Ende Juli kommt es zur Nekrotisierung der Flecken, wobei die Verbräunung häufig in der Mitte der Flecken einsetzt (Abbildung 6). Fast zeitgleich bilden sich Pyknidien, die Nebenfruchtform des Pilzes. Diese sind als winzige, kleine, bräunliche Punkte innerhalb der nekrotischen Stellen auf der Blattunterseite zu erkennen (Abbildung 7). In ihnen bilden sich fadenförmige Konidien, die durch Wasser ausgeschwemmt werden. Schließlich verbräunt das gesamte Blatt (Abbildung 8) und es beginnt wieder die Entwicklung der Perithezien.



Abbildung 5: Chlorotische Blätter



Abbildung 6: Beginnende Nekrotisierung

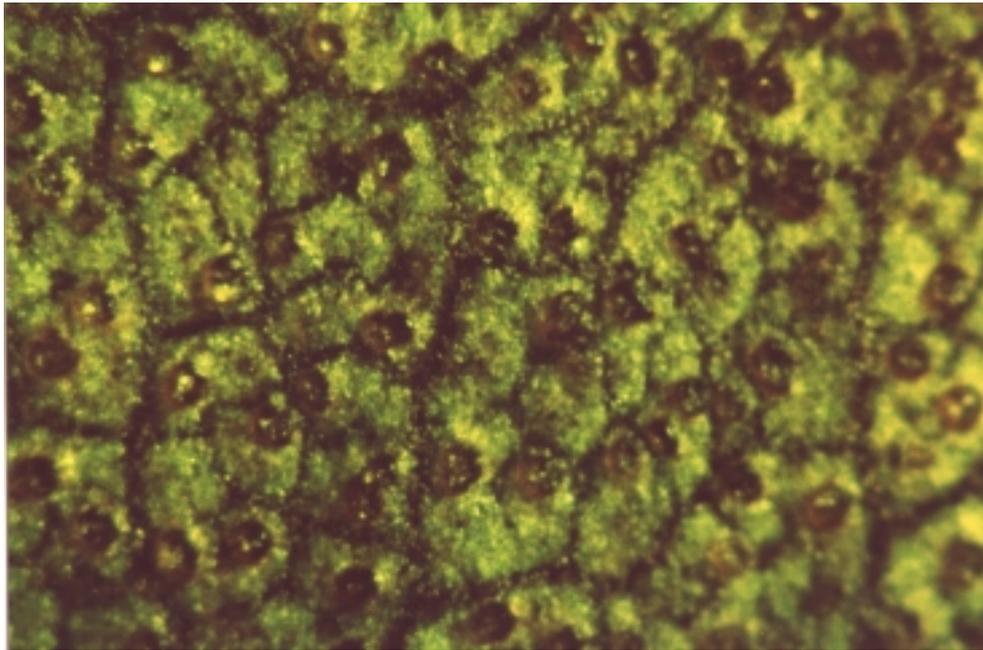


Abbildung 7: Pyknidien auf Blattunterseite (32-fache Vergrößerung)



Abbildung 8: Nekrotisches Blatt

Zu Fruchtfektionen kommt es nur bei einem hohen Befallsdruck. Die ersten Symptome äußern sich dabei als Verfärbungen, die sich bei unreifen Früchten als frühzeitige Rotfärbungen (Abbildung 9) an den Infektionsstellen bemerkbar machen und im Laufe der Fruchtreifung einen dunkelvioletten bis schwarzen Farbton annehmen. Oft wächst an den Infektionsstellen das Gewebe nicht weiter, so daß die Frucht unförmig, d.h. mißgestaltet wirkt (Abbildung 10). In manchen Fällen kommt es auch zum Platzen der Frucht, dem eine Fäulnis folgt.



Abbildung 9: Rotfärbung von jungen, infizierten Früchten

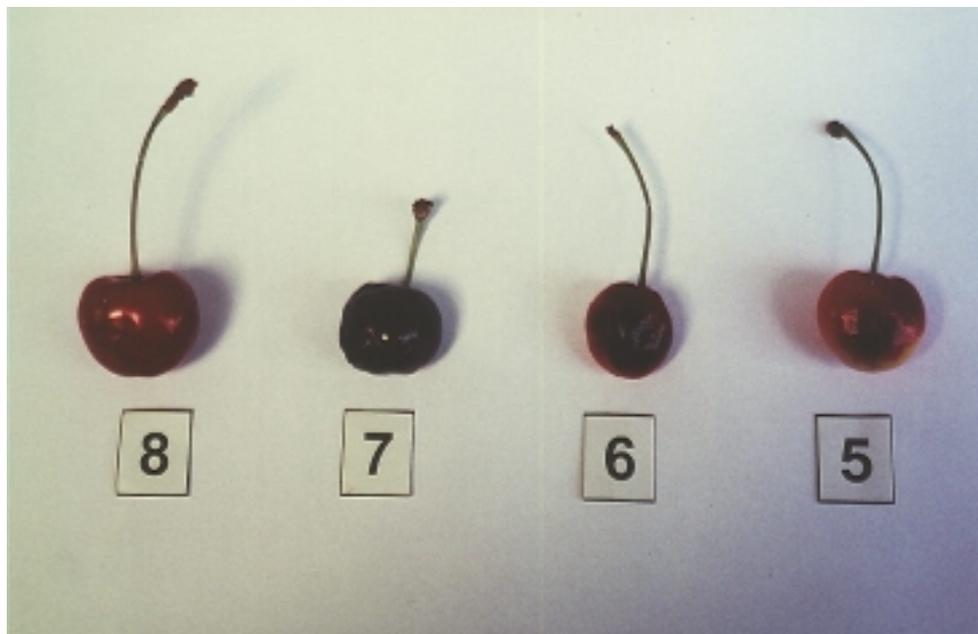


Abbildung 10: Befallene Früchte; Nr. 8: gesunde Frucht, Nr. 5 - 7: zunehmende Verformung befallener Früchte

4 Material und Methoden

4.1 Isolierung und Kultur von *Gnomonia erythrostoma*

4.1.1 Isolierung

Zur Isolierung von *Gnomonia erythrostoma* wurden Ascosporen, Konidien und mit Myzel durchwachsenes Gewebe von Blättern und Früchten verwendet.

4.1.1.1 Ascosporen

Braune, abgestorbene Kirschblätter mit reifen Perithezien wurden in einer 2 %igen Natriumhypochloridlösung für 2 min desinfiziert. Um eine ausreichende Durchnässung zu erhalten, wurden die Blätter nach zweimaligen Waschen mit sterilem Wasser für ca. 20 min in destilliertem Wasser eingelegt. Anschließend wurden die Blätter an Deckeln von Kunststoffpetrischalen mit Tesafilm fixiert, so daß die Ascosporen in Petrischalen mit verschiedenen Nährmedien (Tabelle 1) oder in leere Petrischalen ausgeschleudert wurden. Die Inkubation erfolgte unter UV-Licht bei 18 °C.

Zur Herstellung von Einzelsporenisolaten wurden einzelne, auf Wasseragar gekeimte Sporen unter sterilen Bedingungen auf nährstoffreiche Nährböden (Tabelle 1) übertragen.

Die in die leeren Petrischalen ausgeschleuderten Sporen wurden mit einem Gummischaber und destilliertem Wasser vom Boden gelöst. Je 5 Tropfen dieser Suspension mit einer Konzentration von ca. 50.000 Sporen pro ml wurden auf die verschiedenen Nährmedien (Tabelle 1) gebracht.

4.1.1.2 Bestimmung der Keimrate

Zur Bestimmung der Keimrate der Ascosporen wurden erneut Sporen in mit Wasseragar befüllte Petrischalen geschleudert und sofort nach Verschuß mit Parafilm im Dunkeln bei Temperaturen von 5 °C, 10 °C, 15 °C und 20 °C inkubiert. Nach 4, 6, 12, 24, 36 und 48 h wurden jeweils 100 Sporen von drei Petrischalen, die zufällig im Sichtfeld des Lichtmikroskops (400-fache Vergrößerung) erschienen, gezählt. Die Keimrate ergab sich dann als Mittelwert der drei Wiederholungen. Die Bestätigung der Keimrate auf Kirschblättern, erfolgte mit der Elektronenmikroskopie (siehe 4.5 und 5.5).

Tabelle 1: Nährmedien 1

Nährmedien	Zusammensetzung
Biomalzagar (nährstoffreich)	30 g Biomalz 20 g Agar 1000 ml H ₂ O (dest.)
Czapek-Dox-Agar	48 g Czapek-Dox-Agar 1000 ml H ₂ O (dest.)
Möhrensaftagar (nährstoffreich)	200 ml Möhrensaft 20 g Agar 800 ml H ₂ O (dest.)
PDA (nährstoffreich)	39 g Kartoffelglucoseagar 1000 ml H ₂ O (dest.)
V8-Agar (nährstoffreich)	200 ml Gemüsesaft 3 g CaCO ₃ 20 g Agar 800 ml H ₂ O (dest.)
Wasseragar	20 g Agar 1000 ml H ₂ O (dest.)

Sämtlich Nährmedien wurden nach Zusammenmischen bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

4.1.1.3 Konidien

Aus nekrotischen Kirschblättern wurden pyknidienbehaftete Befallsstellen ausgeschnitten und, wie unter Punkt "4.1.1.1 Ascosporen" beschrieben, mit Natriumhypochlorid (2 %) oberflächendesinfiziert. Nach zweimaliger Spülung mit sterilem Wasser wurden die Blattstücke in destilliertes Wasser gegeben, bis alle Blattstücke bedeckt waren. Zur besseren Ausschwemmung der Konidien wurde während der 30 minütigen Durchnässungszeit geschüttelt. Anschließend wurde mit einer Thomakammer und Mikroskop die Konzentration der Suspension bestimmt und einzelne Tropfen in Petrischalen mit Wasseragar und verschiedenen Nährmedien (Tabelle 1) geträufelt. Zur Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchte (> 90 %) wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei einem Licht/Dunkelwechsel von 12 Stunden in ein mit 18 °C temperierten Lichtthermostaten gestellt.

4.1.1.4 Gewebe

Nach Oberflächendesinfektion von Blättern und Früchten mit typischen Blattbräunesymptomen (grünlichgelbe Blattstellen und rote bis dunkelviolette Fruchtstellen) wurden diese mit sterilem Wasser zweimal gespült. Mit einer sterilen Schere bzw. Skalpell wurden Symptomstellen aus den Blättern und Früchten herausgeschnitten und unter der Sterilbank in Petrischalen mit verschiedenen Nährmedien (Tabelle 1) gelegt. Die Inkubation erfolgte bei 18 °C in einem Lichtthermostat mit einem Licht/Dunkelrhythmus von 12 h.

4.1.2 Kultur

Zur Kultivierung von *Gnomonia erythrostoma* wurden aus bewachsenen Petrischalen mit einem Korkbohrer ($\varnothing = 0,5$ cm) runde Myzelstücke ausgestanzt und auf verschiedene, nährstoffreiche Nährmedien (Tabelle 1) übertragen. Die Inkubation erfolgte bei 18 °C in Dunkelheit.

Nachdem sich der Möhrensaftagar als wachstumsstärkstes Nährmedium erwies, wurden die Wachstumsbedingungen optimiert. Die Optimierung erfolgte über die Variation der Inkubationsbedingungen Temperatur, Licht und pH-Wert. Dazu wurden Myzelbereiche aus den Möhrensaftagarplatten gestanzt und auf neue Agarplatten (mit gleichem Nährmedium) übertragen.

Zur Ermittlung einer Licht- und/oder Temperaturabhängigkeit wurde Dauerlicht, Dauerdunkelheit, UV-Licht und ein Licht/Dunkelrhythmus (12 h) sowie Temperaturen von 2 °C, 5 °C, 8 °C, 10 °C, 13 °C, 15 °C, 18 °C, 20 °C, 22 °C, 25 °C und 28 °C gegeben. Die Inkubation des Temperaturversuches erfolgte bei Dunkelheit.

Die Einstellung der pH-Werte bei den Nährmedien (pH: 3-9) erfolgte für den sauren Bereich mit konzentrierter Salzsäure (32 %), für den basischen Bereich mit Natriumhydroxid.

Darauf erfolgte noch einmal ein Nährbodenscreening (Tabelle 2).

Tabelle 2: Nährmedien 2

Nährmedien	Zusammensetzung
Kirschlaubagar (abgestorbenes Laub)	8 g püriertes, abgestorbenes Kirschlaub 20 g Agar 1000 ml H ₂ O (dest.)
Kirschlaubagar (grünes Laub)	8 g püriertes, grünes Kirschlaub 20 g Agar 1000 ml H ₂ O (dest.)
Malzextraktagar (1 %)	10 g Malzextrakt 20 g Agar 1000 ml H ₂ O (dest.)
M1-Medium	30 g Glucose 2 g L-Asparagin 1 mg FeSO ₄ x 7 H ₂ O 10 mg CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,1 mg MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,47 g KH ₂ PO ₄ 0,26 g K ₂ HPO ₄ 1 mg Thiaminhydrochlorid 1 mg ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 0,02 mg CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,02 mg Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 0,02 mg MnCl ₄ x 4 H ₂ O 1000 ml H ₂ O (dest.)
Möhrensaft-Cola-Agar	120 ml Möhrensaft 80 ml Coca Cola 2 g CaCO ₃ 20 g Agar 800 ml H ₂ O (dest.)
YDC-Agar	10 g Hefeextrakt 15 g CaCO ₃ 20 g Glucose 15 g Agar 1000 ml H ₂ O (dest.)
Zwiebelagar	2 pürierte Zwiebeln 20 g Agar mit H ₂ O (dest.) auf 1000 ml aufgefüllt

4.2 Epidemiologische Untersuchungen

Für eine effektive Bekämpfung der Blattbräune sind Kenntnisse über die Epidemiologie des Erregers von immenser Bedeutung. Zu diesem Zweck wurden in den Jahren 1998 bis 2000 an zwei Standorten in Oberfranken mit Hilfe von Sporenfallen und Wetterstationen epidemiologische Untersuchungen durchgeführt.

4.2.1 Standorte

Beide Standorte befinden sich im Obstanbaugebiet "Forchheim-Fränkische Schweiz", das als eines der größten geschlossenen Süßkirschenanbaugebiete Deutschlands bekannt ist (Karte siehe Anhang S. 119). Der Anbau erfolgt im Unterland auf einer Höhe von 280 bis 400 m an den frostfreien Hängen der Täler und im Oberland in einer Höhe von 400 bis 550 m auf den ebenen Hochflächen des Jura (FEUCHT und VOGEL et al. 2001).

Das Klima ist auf Grund der geologischen Lage – die "Fränkische Schweiz" gehört zur nördlichen Frankenalb – in diesem Gebiet sehr unterschiedlich. Die Jahresdurchschnittstemperaturen liegen je nach Höhenlage bei +7,4 bis +8,2 °C, die durchschnittliche Niederschlagsmenge beträgt zwischen 650 und 900 mm pro Jahr. Durch die verschiedenen Höhenlagen ergibt sich eine Blüte- und Reifeverzögerung von ca. 10 – 14 Tagen (FEUCHT und VOGEL et al. 2001).

Im Landkreis Forchheim stehen etwa 20 % aller Kirschbäume Bayerns, was einer Baumzahl von ca. 210.000 Süßkirschen entspricht. Die Produktionsleistung des Gebietes beträgt bei der Süßkirsche wegen der witterungsbedingten Anfälligkeit zwischen 1.000 und 8.000 Tonnen.

4.2.1.1 Oberrüsselbach

Der Gemeindeteil Oberrüsselbach (ca. 500 m über N.N.) gehört zur Gemeinde Igensdorf, Landkreis Forchheim. Die Kirschanlage ist eine Gemeinschaftspflanzung mit einer Gesamtfläche von ungefähr 73.000 m². Die Anlage ist aufgeteilt in eine ca. 46.000 m² große, leicht von Westen nach Osten ansteigenden Fläche mit ca. 650 Halbstämmen und einer ca. 27.000 m² großen, ebenen Fläche mit ca. 1000 Büschen. Die Halbstämme wurden 1978 im Gerüst auf F12/1 veredelt, die junge Buschanlage auf den Wurzelhals (Weiroot 10, 13 und 14). Der Pflanzabstand beträgt 8 x 8 m zwischen den Halbstämmen und 6 x 4 m zwischen den Büschen. Im Befallsgrad unterscheiden sich die Bäume der beiden Flächen sehr deutlich. Während nahezu alle Halbstämme von der Krankheit befallen sind, zeigen bisher

nur vereinzelte Büsche leichte Symptome. Auf dieser Anlage stehen 13 verschiedene Sorten (Plan und Sorten der Anlage siehe Anhang S. 120 und 121).

4.2.1.2 Hiltpoltstein

Hiltpoltstein ist ein Markt und gehört zum Landkreis Forchheim. Die Anlage ist ungefähr 5 km Luftlinie vom Standort Oberrüsselbach entfernt, im nördlichen Teil von Hiltpoltstein auf einer Höhe von ca. 550 m. Es handelt sich um eine Kleinanlage mit einem leichten Anstieg von Nord nach Süd. Ca. 100 Halbstämme (Gerüstveredelung auf F12/1) mit einem Pflanzabstand von 8 x 8 m befinden sich auf einer Fläche von ca. 11.000 m². Auf dieser alten Anlage sind nur wenige Sorten vertreten (Plan und Sorten der Anlage siehe Anhang S. 122). Der Befall mit *Gnomonia erythrostoma* ist im Vergleich zu den Halbstämmen in Oberrüsselbach weniger deutlich ausgeprägt.

4.2.2 Erfassung der Wetterdaten

Zur Erfassung der Wetterdaten an den Standorten wurden mobile Wetterstationen der Firma Thies Clima (System "Weihofen"/Göttingen) verwendet. Gemessen wurden die Parameter Niederschlagsmenge (mm), Temperatur (°C) in 2 m Bestandeshöhe, relative Luftfeuchte (%) in 2 m Bestandeshöhe und Blattnässe (%).

Die Bestimmung der Blattnässe erfolgte in den Jahren 1999 und 2000 mit Benetzungsfühlern nach Häckel. Hierzu wurden drei Benetzungsfühler auf einer Höhe von 1,5 m, gleichmäßig um einen Baum verteilt, an Blätter angebracht. Zur Verrechnung der erhaltenen Daten wurden diese in Blattnässestunden umgerechnet.

Alle Parameter wurden im 10 min-Rhythmus aufgezeichnet und als Stundenmittelwerte auf Speichereinheiten, sogenannten "Eproms", gespeichert. Nach Entnahme der Eproms aus den Wetterstationen erfolgte mit Hilfe eines Eprom-Lesegerätes die Verarbeitung der Daten mit dem Programm EXEL am Computer.

Neben der mobilen Wetterstation stand am Standort Hiltpoltstein in einer Entfernung von ca. 200 Metern eine stationäre Wetterstation des agrarmeteorologischen Messnetzes Bayerns zur Verfügung. Gemessen wurden die Temperatur (°C) in 2 m Bestandeshöhe, die Niederschlagsmenge (mm), die relative Luftfeuchte (%) in 2 m Bestandeshöhe, die Blattnässe (%) mittels eines simulierten Blattes, die Windgeschwindigkeit (m/s) und die Lichtintensität (W/m²). Die Daten konnten über die Internetadresse www.lbp.bayern.de abgerufen und weiter verarbeitet werden. Mit dieser zusätzlichen Wetterstation war es möglich, zumindest am Standort Hiltpoltstein, Meßwerte für die Blattnässe für das Jahr 1998 zu erhalten.

4.2.3 Erfassung des Ascosporenfluges

Die Überwachung des Ascosporenfluges von *Gnomonia erythrostoma* erfolgte mit Hilfe von batteriebetriebenen "7-Tage-Sporenfallen" der Firma Burkard Manufacturing Co Ltd. Um auch die kleinsten Ascosporenausstoßungen registrieren zu können, wurde in den Jahren 1999 und 2000 ein Sporendepot um die Sporenfallen angelegt. Bei diesem Typ von Sporenfalle wird über eine Vakuumpumpe, die nach dem "Turbinenprinzip" arbeitet, Luft (10 l/min) über eine Öffnung auf eine Trommel gesaugt, um die eine mit Vaseline beschichtete Kunststoffolie gewickelt ist. Auf ihr bleiben Partikel, wie Sporen, Insekten, Pollen und Schmutz, hängen. Die Trommel ist mit einer Uhr gekoppelt. Trommel und Folie sind so ausgelegt, daß bei einer vollen Drehung (360°) genau sieben Tage überwacht werden. Spätestens nach Ablauf dieser Zeit muß die Trommel gegen eine neue (mit frisch beschichteter Folie) ausgetauscht werden. Die mit der Uhr gekoppelte Trommel bewegt sich pro Stunde 2 mm, so daß ein 48 mm langer Abschnitt auf der Folie 24 h entspricht.

4.2.4 Auswertung des Sporenfluges

Zur Auswertung wurde die Folie von der Trommel entfernt und in 48 mm lange Abschnitte geschnitten. Natürlich wurde beim Einsetzen und Entfernen der Trommel (in/aus der Sporenfalle) die Zeit notiert, so daß ein eventueller Sporenflug zeitlich genau nachvollzogen werden konnte. Mit Hilfe von flüssigem Gelvatol (ein Kunststoff) wurden die Abschnitte auf Objektträger mit Deckgläsern fixiert und haltbargemacht. Die Auswertung erfolgte unter einem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 400 x. Da sich die Auszählung der Ascosporen aufgrund ihrer hyalinen Struktur als sehr schwierig erwies, wurde 1999 versucht, mit verschiedenen Farbstoffen (z.B. Baumwollblaulösung, Säurefuchsinrot, Lactophenolblau, Coomassie Brilliant Blue), die Ascosporen vor der Fixierung anzufärben. Dabei erwies sich die Baumwollblaulösung als geeignetster Farbstoff.

Zusammensetzung des Gelvatols:	35 g	Gelvatol (Granulat)
	100 ml	H ₂ O (dest.)
	50 ml	Glycerin
	2 g	Phenol

Zusammensetzung der Baumwollblaulösung:

87,5 ml	Milchsäure
6,3 ml	Glycerin
6,2 ml	H ₂ O (dest.)
0,1 g	Baumwollblau

Bei der Auszählung wurden 10 Streifen eines 48 mm langen Abschnittes horizontal ausgewertet. Dazu wurde ein Objektträger auf dem Objektisch eines Mikroskops eingespannt. Die genauen Positionen der Ascosporen wurden mit den horizontalen und vertikalen Skalen des Mikroskops ermittelt und auf einem Sporenprotokoll (siehe Anhang S. 123) festgehalten. Nach dem Auszählen der 10 Streifen wurden die Sporen stundenweise zusammengezählt und auf einem Kubikmeter Luft hochgerechnet (10 l Luft pro min entsprechen 0,6 m³ Luft pro h).

4.2.5 Sporenflugbeginn

Zur Erstellung einer Prognose für den Beginn der Sporenflüge wurden die Wetterdaten der Jahre 1997/98, 1998/99, 1999/00 und 2000/01 von der stationären Wetterstation in Hiltpoltstein herangezogen. Verglichen wurde der Zeitraum vom Sichtbarwerden der Perithezien (Oktober) bis Ende März (meist Beginn des Sporenfluges).

4.2.6 Sortenanfälligkeit

Um Anhaltspunkte über die Resistenz der verschiedenen Sorten gegen *Gnomonia erythrostoma* zu erhalten, wurde der Blattbefall und der verbleibende Laubbehang über den Winter bonitiert.

4.2.6.1 Blattbefall

Die Bonitur des Blattes erfolgte im Jahr 2000 von Mitte Mai bis Ende September. Bis Ende Juli wurde wöchentlich bonitiert, danach unregelmäßig alle 2 bis 4 Wochen. Hierzu wurde jedem Baum eine Note nach dem Befall (Chlorosen und Nekrosen) gegeben (Tabelle 3).

Auf die Ermittlung der Befallsstärke wurde vorerst verzichtet, da die Befallssymptome der Blattbräune oft mit Symptomen von anderen Erregern oder auch physiologischen Störungen verwechselt werden können.

Tabelle 3: Boniturschema Blattbefall

Note	Befall
0	Kein Befall
1	Sehr schwacher Befall
2	Schwacher Befall
3	Mittlerer Befall
4	Starker Befall
5	Sehr starker Befall

4.2.6.2 Belaubung

Da bei der Blattbräune infizierte Blätter über den Winter bis ins Frühjahr, teilweise sogar bis in den Sommer hängen bleiben, wurden am Standort Oberrüsselbach aufgrund der Sortenvielfalt und Größe der Anlage in den Jahren 1999 bis 2001, jeweils im März, jeder Baum nach der Menge der verbliebenen Blätter bonitiert. Hierzu wurden Noten von 0 bis 5 vergeben (Tabelle 4).

Tabelle 4: Boniturschema Belaubung

Note	Behang
0	Keine Blätter
1	Sehr wenige Blätter
2	Wenige Blätter
3	Zahlreiche Blätter
4	Viele Blätter
5	Sehr viele Blätter

4.3 Bekämpfung

Eine Bekämpfung der Blattbräune ist unabdingbar. Gerade die Jahre 1999 und 2001 mit verheerenden Befällen in Oberfranken machen dies deutlich.

Neben einem geeigneten Fungizid, das möglichst gleichzeitig auch andere pilzliche Erreger bekämpft (z.B. *Stigmina carpophila*, *Blumeriella jaapii*, *Monilinia laxa*), spielt der richtige Einsatzzeitpunkt eine entscheidende Rolle für eine effektive Bekämpfung dieser Krankheit.

Unter Berücksichtigung der erlangten Kenntnisse aus den epidemiologischen Untersuchungen (1998/1999) wurde in Zusammenarbeit mit der Obstbauberatung in den Jahren 2000 und 2001 am Standort Oberrüsselbach Spritzversuche durchgeführt.

4.3.1 Spritzversuch 2000

4.3.1.1 Fungizide

Zur Anwendung gelangten drei Fungizide aus der Wirkstoffgruppe der Azole (Baycor, Baymat, Systhane 6W), wobei Baycor und Baymat im Wechsel auf eine Parzelle verabreicht wurden, drei Fungizide aus der Wirkstoffgruppe der Strobilurine (Amistar, Discus, Flint), einem Prüfmittel der Firma BASF mit einem Strobilurinanteil, sowie einer Bayer- und Maximal-Variante (Max). Bei der Bayer-Variante wurden ausschließlich Mittel der Firma Bayer appliziert, bei der Maximal-Variante Fungizide von verschiedenen Firmen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete Fungizide 2000

FUNGIZID (HANDELSNAME)	WIRKSTOFF	WIRKSTOFFGEHALT
AMISTAR	Azoxystrobin	0,05 %
BAYCOR/BAYMAT	Bitertanol	0,15 %/0,1 %
BAYER-VARIANTE:		
Baycor	Bitertanol	0,1 % oder 0,15 %
Baymat	Bitertanol	0,1 %
Euparen	Tolyfluanid	0,2 %
Lebaycid (Insektizid)	Fenthion	0,1 %
Teldor	Fenhexamid	0,1 %
DISCUS	Kresoxim-methyl	0,0125 %
FLINT	Trifloxystrobin	0,01 %
Prüfmittel (BASF)	Strobilurinanteil + ?	0,025 %
SYSTHANE 6W	Myclobutanil	0,15 %

MAXIMAL-VARIANTE:		
Baycor	Bitertanol	0,1 % oder 0,15 %
Baymat	Bitertanol	0,1 %
Delan SC 750	Dithianon	0,05 %
Discus	Kresoxim-methyl	0,0125 %
Euparen	Tolyfluanid	0,2 %
Lebaycid (Insektizid)	Fenthion	0,1 %
Sythane 6W	Myclobutanil	0,15 %
Teldor	Fenhexamid	0,1 %

4.3.1.2 Spritzplan

Die verschiedenen Fungizide wurden auf 8 Parzellen appliziert, wobei sich jede Parzelle aus je 2 oder 3 Bäumen der Sorte "Burlat" und "Regina" zusammensetzte. Die Parzellen selber waren durch jeweils zwei Kontrollbäume getrennt (Abbildung 11).

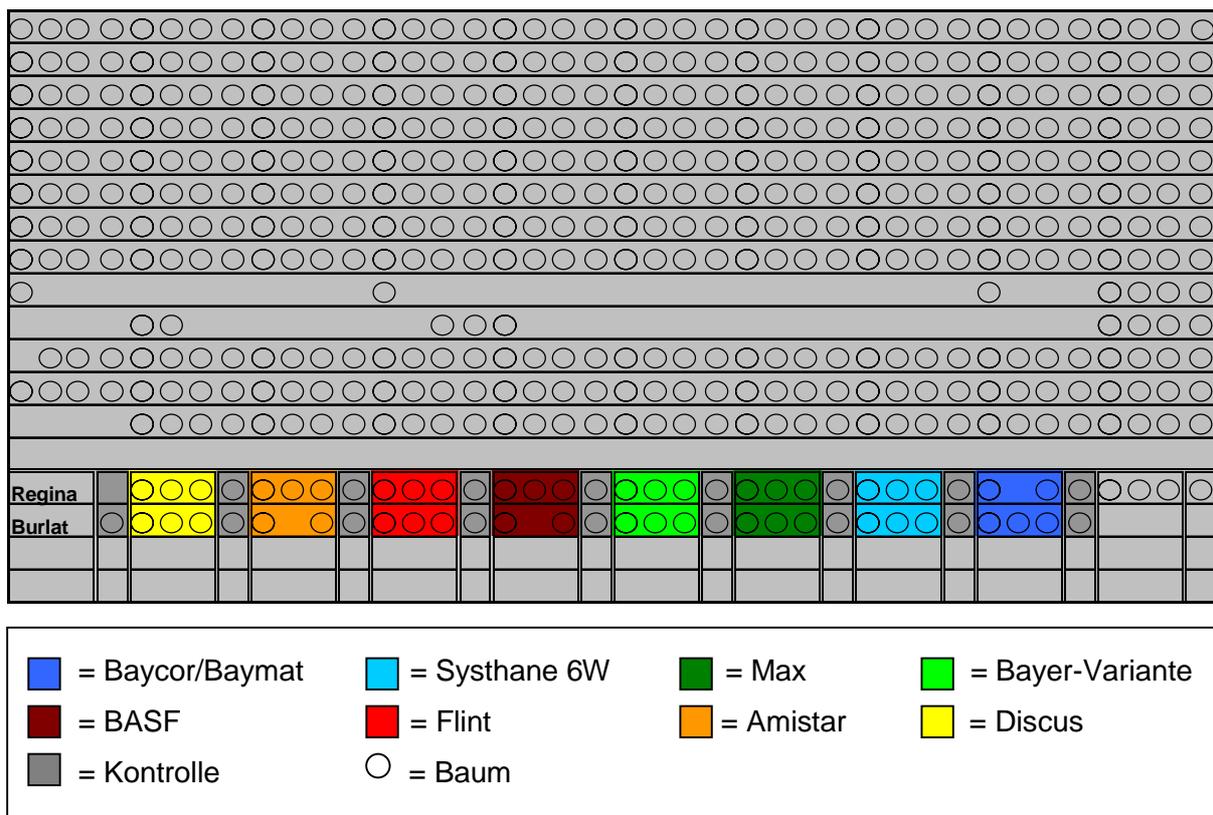


Abbildung 11: Spritzplan 2000 (Gemeinschaftsanlage Oberrüsselbach)

4.3.1.3 Spritztermine

In Bezug auf die Spritztermine wurden zwei Alternativen gefahren. Die Azole und Strobilurine (auch Prüfmittel) wurden nach den Witterungsbedingungen und Ascosporenflug appliziert (in Tabelle 6 mit einem Kreuz markiert). Bei den beiden Varianten wurde nach dem Entwicklungsstadium der Kirschbäume gespritzt (in Tabelle 6: Spalten mit grüner Schrift).

Tabelle 6: Spritztermine 2000

Datum	Entwicklungsstadium	Behandlung							
		Baycor/ Baymat	Systhane 6 W	Max- Variante	Bayer- Variante	Prüf- mittel	Flint	Ami- star	Discus
29.03.	Knospen- schwellen			Hydratweißkalk Kupfer					
20.04.	Mausohrstadium (Burlat)			Delan SC 750 0,05%					
22.04.	Blühbeginn (Burlat) Weiße Knospe (Regina)	x	x	Euparen WP 0,2% + Baycor 0,15%	Euparen WP 0,2% + Baycor 0,1%	x	x	x	x
26.04.	Blühende (Bur- lat) Vollblüte (Regi- na)			Systhane 6 W 0,15%	Euparen WP 0,2% + Baycor 0,1%				
28.04.	Blühende (Bur- lat) Vollblüte (Regina)	x	x	Discus 0,0125%	Euparen WP 0,2% + Baycor 0,1%	x	x	x	x
02.05.	1. Nachblüte (Burlat)			Delan 0,05% + Baycor 0,1%					
08.05.	1. Nachblüte (Regina)	x	x	Delan 0,05% + Baycor 0,1%	Baycor 0,15%	x	x	x	x
12.05.	2. Nachblüte / Buhlen			Systhane 6 W 0,15%	Baymat 0,1%				
16.05.	3. Nachblüte	x	x	Baymat 0,1%	Baymat 0,1%	x	x	x	x
02.06.	10 Tage vor Ernte Burlat			Teldor 0,1%	Teldor 0,1%				
21.06.	Kirschfrucht- fliege			Teldor 0,19% + Lebaycid 0,1%	Teldor 0,1% + Lebaycid 0,1%				
02.08.	Nachernte- behandlung			Delan 0,05% + Systhane 6 W 0,15%	Euparen WP 0,2% + Baycor 0,1%				

4.3.2 Spritzversuch 2001

4.3.2.1 Fungizide 2001

Tabelle 7 zeigt die im Jahr 2001 verwendeten Spritzmittel. Bei der Aminosol-Variante wurde Baycor, Delan SC 750 und das Benetzungsmittel Aminosol als Mischung appliziert. Die Bayer Fungizide Euparen und Flint wurden im Wechsel (EUFL-Variante) und einzeln auf Parzellen angewendet. Daneben kamen eine Maximal-Variante (MAX), sowie die Fungizide Ortiva (=Amistar), F 500 (BASF-Prüfmittel) und Systhane 20 EW zum Einsatz.

Tabelle 7: Verwendete Fungizide 2001

FUNGIZID (HANDELSNAME)	WIRKSTOFF	WIRKSTOFFGEHALT
AMNOSOL-VARIANTE:		
Baycor	Bitertanol	0,15 %
Delan SC 750	Dithianon	0,05 %
Aminosol (Benetzung)		0,3 %
EUFL-VARIANTE:		
EUPAREN	Tolyfluanid	0,2 %
FLINT	Trifloxystrobin	0,1 %
EUPAREN	Tolyfluanid	0,2 %
F 500	?	0,025 %
FLINT	Trifloxystrobin	0,1 %
MAXIMAL-VARIANTE:		
Baycor	Bitertanol	0,1 %
Baymat	Bitertanol	0,1 %
Delan SC 750	Dithianon	0,05 %
Euparen	Tolyfluanid	0,2 %
Systhane 6W	Myclobutanil	0,1 %
Teldor	Fenhexamid	0,1 %
ORTIVA	Azoxystrobin	0,05 %
SYSTHANE 20EW	Myclobutanil	0,045 %

4.3.2.2 Spritzplan 2001

Aus Abbildung 12 ist die Verteilung der Fungizide auf die Parzellen zu entnehmen.

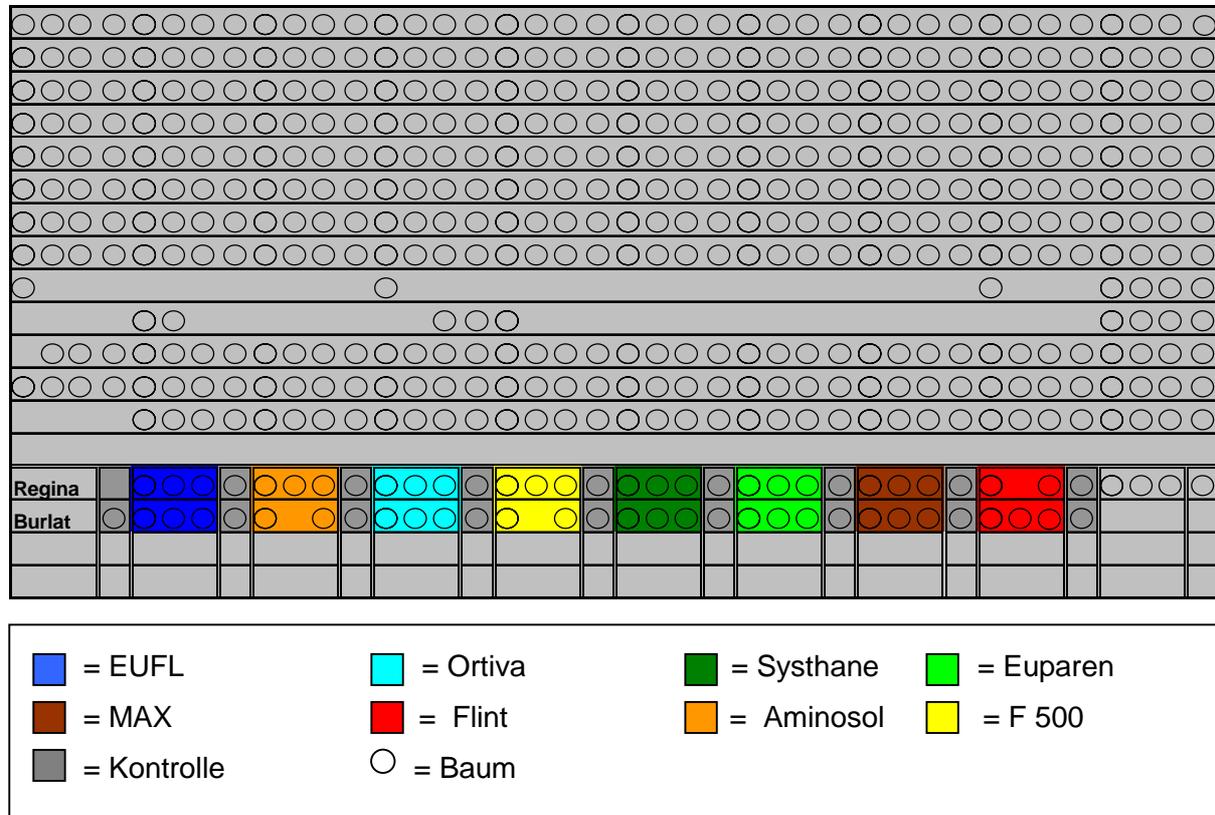


Abbildung 12: Spritzplan 2001 (Gemeinschaftsanlage Oberrüsselbach)

4.3.2.3 Spritztermine 2001

Die Maximal-Variante wurde nach dem Entwicklungsstadium des Wirtes gespritzt (in Tabelle 8: Spalte mit brauner Schrift) Die Ausbringung der restlichen Fungizide erfolgte nach der Witterung und dem Ascosporenflug (Spritztermine mit Kreuz gekennzeichnet).

Tabelle 8: Spritztermine 2001

Datum	Entwicklungsstadium	Behandlung							
		EUFL	Ortiva	Systhane	Aminosol Variante	Max-Variante	Flint	Euparen	F 500
28.03.	Knospenschwellen					Hydratweißkalk Kupfer			
27.04.	Mausohrstadium (Burlat)					Schwefel			
30.04.	Blühbeginn	x	x	x	x	Delan 0,05% + Systhane 6 W 0,1%	x	x	x

04.05.	Vollblüte Blühende	x	x	x	x	Euparen 0,2 % + Baycor 0,1 %	x	x	x
12.05.	Blühende 1. Nachblüte					Delan 0,05% + Systhane 6 W 0,1%			
19.05.	2. Nachblüte	x	x	x	x	Euparen 0,2 % + Baycor 0,1 %	x	x	x
25.05.	3. Nachblüte	x	x	x	x	Baymat 0,1 %	x	x	x
12.06.	vor Ernte Burlat					Teldor 0,1% bei Burlat			
12.07.	vor Ernte Regina					Teldor 0,1% bei Regi- na Delan 0,05 % + Systhane 0,1 % bei Burlat			
10.08.	Nachernte- behandlung					Delan 0,05 % + Systhane 6W 0,1 % bei Regina			

4.3.3 Bonitur des Blatt- und Fruchtbefalls

Mit Beginn des Sporenfluges wurde auf das Auftreten der ersten Symptome geachtet. Zur Ermittlung des Blatt- und Fruchtbefalls wurden aus den Boniturnoten Mittelwerte für die einzelnen Parzellen und für die Sorten innerhalb der Parzellen gebildet. Die vergleichenden Kontrollwerte ergaben sich als Mittelwert aller Kontrollbäume bzw. als Mittelwerte der Kontrollbäume der Sorten.

4.3.4 Wirkungsgrad der Fungizide

Zur Berechnung der Wirkungsgrade der Fungizide bzw. der Varianten wurden vom letzten Boniturtermin (25. September 2000 bzw. 9. Oktober 2001) die Befallsstärken ermittelt. Dabei entspricht die Boniturnote einer bestimmten Befallsstärke (Tabelle 9).

Tabelle 9: Umrechnung der Boniturnote in Befallsstärke

Boniturnote	Befallsstärke
0-1	0-10 %
1-2	10-25 %
2-3	25-50 %
3-4	50-80 %
4-5	80-100%

War zum Beispiel die Boniturnote 2,3, so entspricht das nach der Tabelle 9 einer Befallsstärke von 32,5 %. Die so erhaltenen Befallsstärken wurden mit der jeweiligen Kontrolle (Kon-

trolle Burlat + Regina oder Kontrolle der einzelnen Sorte) ins Verhältnis gesetzt und der Wirkungsgrad ermittelt.

$$\text{Wirkungsgrad} = \left(1 - \frac{\text{Befallsstärke Sorte}}{\text{Befallsstärke Kontrolle}}\right) * 100$$

4.3.5 Belaubung der Sorte "Burlat"

Diese Bonitur erfolgte wie bereits erwähnt ("4.2.6.2 Belaubung", S.22).

4.3.6 Bonitur der Fruchtkörper

Zusätzlich wurden im März 2001 die an den behandelten Bäumen verbliebenen Blätter auf Anzahl gebildeter Perithezien untersucht. Dazu wurden Blätter von allen Parzellen von der stark befallenen Sorte "Burlat" entnommen. Jeweils 50 Blätter der einzelnen Behandlungen wurden unter einem Binokular bonitiert. Nach der Anzahl bzw. der mit Perithezien besetzten Blattfläche wurden Noten von 1 bis 5 vergeben. Die nachfolgende Tabelle 10 zeigt das Boniturschema.

Tabelle 10: Boniturschema Fruchtkörper

Note	Perithezien (auf Blattfläche)
0	Keine Perithezien
1	Sehr wenige Perithezien (bis 10 %)
2	Wenige Perithezien (10 bis 25 %)
3	Zahlreiche Perithezien (25 bis 50 %)
4	Viele Perithezien (50 bis 80 %)
5	Sehr viele Perithezien (80 bis 100%)

4.4 Histologische Untersuchungen

Zur Aufklärung der Pathogenese wurden von Pflanzenteilen Semidünnschnitte hergestellt und mit speziellen Färbemethoden angefärbt.

4.4.1 Pflanzenmaterial

Um aussagekräftige Schnitte zu erhalten, wurde ausschließlich frisches Pflanzenmaterial verwendet. Untersucht wurden Blätter, Blattstiele und Zweigstücke.

Blätter:

Aus befallenen Blättern wurden mit einer Rasierklinge verschiedene Stadien der Befalls-symptome geschnitten (Größe ca. 5 x 3 mm) und jeweils 3 bis 5 Schnitte in ein 2 ml-Eppendorfcap gegeben. Für die spätere Einbettung ist es von Vorteil, wenn mindestens zwei Seiten des Schnittes parallel sind.

Blattstiele:

Von infizierten, nekrotischen Blättern wurden mit einer Schere die Blattstiele abgeschnitten und in ca. 5 mm lange Stücke zerteilt, die dann in 2 ml-Eppendorfcaps gegeben wurden.

Zweigstücke:

Zur Überprüfung, ob *Gnomonia erythrostoma* nicht doch als Myzel in der Rinde oder gar im Holz überwintert, wurden Astteile mit befallenen (nekrotischen) Blättern im Herbst abgeschnitten. Von diesen Ästen wurden ca. 5 mm lange Triebstücke entnommen und in 2 ml-Eppendorfcaps gegeben.

4.4.2 Präparation des Pflanzenmaterials

Die in die 2 ml-Eppendorfcaps plazierten Pflanzenteile wurde mit 2,5 %igen Glutaraldehyd (25 %iges Glutaraldehyd wird 1:10 mit 0,1 M Sørensen-Phosphatpuffer (pH 7,5) verdünnt) überdeckt (ca. Hälfte des Eppendorfcaps) und für 30 min in einen Vakuumexsikkator gestellt. Die Fixierung erfolgte, je nach Material, für ein bis acht Tage auf einem Tischschüttler (je kompakter die Probe, desto länger sollte die Einwirkzeit sein).

Nach Entfernen des Glutaraldehyds und Waschen der Proben mit Phosphatpuffer (30 min), erfolgte die Entwässerung der Proben mittels einer Ethanolkonzentrationsreihe (50 %, 70 %, 99 %). Hierzu wurden die Eppendorfcaps nacheinander mit Ethanol, beginnend mit der niedrigsten Konzentration, bis zur Hälfte aufgefüllt und für 30 min auf einen Tischschüttler gelegt.

Im nächsten Schritt wurden die Proben in einem aktivierten Historesin-Ethanolgemisch (1:1) für zwei Stunden vorinfiltriert. Die Infiltration erfolgte mit aktiviertem Historesin (Historesin = Glycolmethacrylat) für mindestens 2 Tage.

Nach der Infiltration wurden die Proben in Kunststoff eingebettet. Hierzu wurde aktiviertes Historesin (2 ml) mit Historesin Hardener (140 µl) vermischt und in spezielle Formen gegossen. Eine bis fünf Proben wurden in die gefüllten Formen gegeben, mit einem runden Plastikschildchen luftdicht abgeschlossen und für ca. 24 h in einen Trockenschrank mit 40 °C gestellt. Nach Entfernen der Plastikschildchen und Lösen der Kunststoffblöcke aus den Formen wurden diese mit Historesin Mountingmedium auf ca. 1 x 1 x 1 cm große Holzklötzchen geklebt.

Nach dem Trocknen der Klebmasse (24 h) wurden mit einem Leitz-Grundschlittenmikrotom 1400 mit Hartmesser 2 und 8 µm dünne Schnitte hergestellt.

Die 2 µm Schnitte wurden in Wasser aufgefangen und auf Objektträger aufgezo-gen (6 Schnitte pro Objektträger). Aufgrund der Oberflächenspannung glätten sich die Schnitte auf der Wasseroberfläche.

Die 8 µm Schnitte wurden ebenfalls in Wasser aufgefangen. Da sich diese dickeren Schnitte erst unterhalb der Wasseroberfläche glätten, wurden sie unter Wasser getaucht und dort auf Deckgläser plaziert (1 Schnitt pro Deckglas).

Nach der Trocknung der so präparierten Schnitte (für 10 min bei 40 °C im Trockenschrank) erfolgte die Anfärbung.

4.4.3 Färbemethoden

4.4.3.1 2 µm Schnitte

Die 2 µm Schnitte wurden mit verschiedenen Farbstoffen unterschiedlich lang angefärbt, danach mit destilliertem Wasser gespült, mit Druckluft trockengeblasen und für 10 min im 40 °C warmen Trockenschrank getrocknet.

Vor bzw. nach der Färbung sind zusätzliche Behandlungen möglich. Eine vorgeschaltete Natriumhypochloridbehandlung (ca. 12 % aktives Chlor) bewirkt durch Oxidation in vielen Fällen eine Farbintensivierung, eine nachgeschaltete Behandlung mit Jod/Jodkalilösung (0,25 %/0,5 % = Lugolsche Lösung) verstärkt die Farbeffekte. Phenole und lignifiziertes Gewebe behalten dabei ihre ursprüngliche Färbung bei, während die anderen Gewebe durch eine Ausfällungsreaktion schwarzbraun gefärbt werden. Zusätzlich wird vorhandene Stärke blau gefärbt. Bei diesen Schritten wurden die Lösungen für 10 Sekunden auf die Schnitte gegeben, abgespült und die Schnitte trockengeblasen. Tabelle 11 gibt einen Überblick über

die Färbemethoden. Welche Gewebe angefärbt werden und welchen Farbton sie annehmen, sind aus Tabelle 12 zu entnehmen.

Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden alle Schnitte mit Kanadabalsam eingedeckelt.

Tabelle 11: Färbemethoden

Färbung	Schritte								
	Vorbehandlung	1. Färbung	Spülen	Trocknenblasen	2. Färbung	Spülen	Trocknenblasen	Nachbehandlung	Trocknen
Toluidinblau	möglich	8 min	ja	ja	nein	nein	nein	möglich	ja
Safranin	nein	1 min	ja	ja	nein	nein	nein	möglich	ja
Safranin Azurblau II	nein	1 min Safranin	ja	ja	5 min Azurblau	ja	ja	nein	ja

Tabelle 12: Gewebe und Farbe

Gewebe	Färbungen			
	Toluidinblau O	Tol.+Natr.+Lug.	Safranin+Lug.	Safranin/Azur
Phenole	blaßgrün	leuchtend blaugrün bis blau	leuchtend rot	rot
lignifizierte Zellwände	blaßgrün	blaßgrün bis blaßblau	rosa	rosa bis hellblau
Zellulosewände	blau bis violett	braun bis violett- braun	orange bis rotbraun	blau
Zellkern	blau bis violett	braun bis violett- braun	orange bis rotbraun	rosa bis rot
Cytoplasma	blau bis violett	braun bis violett- braun	orange bis rotbraun	hellblau bis rosa
Reservestärke	ungefärbt	bräunlich bis blau- violett	blauviolett	ungefärbt

4.4.3.2 8 µm Schnitte

Mit der DMAZA-Färbung (p-Dimethylaminozimtaldehyd) können spezifisch Catechine und Proanthocyanidine nachgewiesen werden.

Bei dieser Färbung werden die Deckgläser mit den 8 µm Schnitten in kleine Glasschalen mit 0,1 %iger DMAZA-Lösung (in 0,5 M n-butanolischer Schwefelsäure) gegeben. Nach Abdecken der Glasschale mit einem locker sitzenden Deckel wird diese in eine Mikrowelle gestellt. Ein Glasbecher mit 50 ml Wasser, positioniert in der rechten, hinteren Ecke des Mikrowellengerätes, reduziert die Mikrowellenleistung. Die Schnitte werden dreimal für 15 Sekunden bei voller Mikrowellenleistung (800 W) erhitzt, wobei nach jedem Kochvorgang die

Glasschale für einen Temperatenausgleich kurz geschwenkt wird (GUTMANN und FEUCHT 1991). Im Anschluß werden die Deckgläser viermal für 30 Sekunden in n-Butanol gespült und für 30 Sekunden mit Xyol überschichtet. Die noch feuchten Schnitte werden mit Kanadabalsam eingedeckelt.

Die DMAZA-Färbung kann auch bei Zimmertemperatur oder im Trockenschrank bei 40 °C durchgeführt werden. Hierzu werden die Schnitte auf den Deckgläsern mit 1 %iger DMAZA-Lösung (in 0,5 butanolischer Salzsäure) beträufelt und für 10 bis 20 min unter den Abzug bzw. in den Trockenschrank gelegt. Um ein zu schnelles Antrocknen der DMAZA-Lösung zu verhindern, wird eine Petrischale über die Schnitte gestülpt. Nachdem die Färbelösung angetrocknet ist, wird mit 99 %igem Ethanol der Schnitt gespült bis der Abfluß klar ist. Nach dem Abdampfen des Ethanols (1 bis 2 min) wurden die Schnitte in Kanadabalsam konserviert.

4.4.3.3 Zellkernanfärbung

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl) kann als Nachweisfärbung für Zellkerne verwendet werden. Durch sein spezifisches Bindungsvermögen an die DNA erscheinen die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop als leuchtende, runde Strukturen.

Zur sicheren Identifizierung der Zellkerne von *Gnomonia erythrostoma* wurden 8 µm Schnitte von infizierten Blättern mit dem Farbstoff (0,1 µg DAPI/ml H₂O) behandelt. Nach einer Einwirkungszeit von 5 bis 10 min wurde der Schnitt unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.4.3.4 Proteinnachweis

Das Myzel von *Gnomonia erythrostoma* ist durch eine große Anzahl von Einschlüssen gekennzeichnet. Worum es sich dabei handelt, ist bisher ungeklärt. Coomassie Brilliant Blue hat die Eigenschaft, Proteine dunkelblau zu färben. Um herauszufinden, ob das Myzel proteinhaltig ist, wurden 2 µm Schnitte für 20 min mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Danach wurden die gefärbten Schnitte solange mit 99 %igem Ethanol beträufelt, bis der Kunststoff entfärbt war. Es folgte eine Spülung mit destilliertem Wasser, Trockenblasen mit Druckluft und nach einer 10 minütigen Trocknung im Wärmeschrank (40 °C) das Eindeckeln mit Kanadabalsam.

4.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Während bei histologischen Untersuchungen vor allem die Pathogenese im Pflanzengewebe studiert werden kann, ist die **Rasterelektronenmikroskopie (REM)** eine geeignete Methode zur Aufklärung des Penetrationsvorgang von *Gnomonia erythrostoma*. Bei diesem Verfahren wird die Oberfläche kompakter Objekte abgebildet.

Im Vergleich zur "klassischen" REM, bei der die Objekte meist aufwendig präpariert werden müssen, findet die Untersuchung bei der ESEM-Technologie (**E**nvironmental **S**canning **E**lectron **M**icroscopy) am "lebenden" Objekt statt.

Das zu untersuchende Objekt wird hierbei auf einen speziellen Objektträger, der mit Fett beschichtet ist, aufgelegt und angedrückt. Das Fett dient dabei als Fixierungsbelag, um ein Verutschen des Objektes beim Abpumpen der Luft zu verhindern. Der Objektträger wird anschließend in den Proberaum gelegt. Um ein Austrocknen der Proben zu verhindern, wird nach Erzeugen eines Unterdrucks von 4 bis 5 Torr die Temperatur auf 4 bis 5 °C abgesenkt und somit eine Luftfeuchtigkeit von 100 % erreicht (EHRIG 2000).

Mit einem Primärstrahl (= beschleunigte Primärelektronen) wird das Objekt abgerastert. Beim Auftreffen der Elektronen auf das Objekt werden Sekundärelektronen aus der Oberfläche gelöst, deren Anzahl vom Aufttrittswinkel des Primärstrahls auf die Objektfläche abhängt. Ein Detektor fängt diese Elektronen ein und sendet ein entsprechendes Signal an einen Monitor, der dieses in Form verschiedener Bildpunkthelligkeiten darstellt.

Die notwendige Ableitung der Primärelektronen von der Objekt Oberfläche geschieht über die Wassermoleküle im Proberaum (EHRIG, 2000).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an der BAZ Aschersleben mit dem Rasterelektronenmikroskop Philips XL 30 ESEM.

4.5.1 Wirtspflanzen

Als Wirtsgewebe wurden junge, symptomfreie Blätter der Sorte "Burlat" (besonders anfällig) verwendet.

4.5.2 Detached-leaf-Methode

Um die Blätter so lange wie möglich "frisch" (= grün) zu halten, kam die „detached-leaf“-Methode zur Anwendung. Bei dieser Methode wird ein Benzimidazolagar als Nährmedium verwendet, der den Abbau des Chlorophylls verzögert und somit die Blätter länger "frisch" hält (ca. 4 Wochen).

Benzimidazolagar:

- 20 g Agar
- 50 ml Benzimidazolösung (1g/l)
- 950 ml H₂O bidest.

Der Agar wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Benzimidazolösung hinzu gegeben. Glaspetrischalen wurden dann unter der Sterilbank bis auf halbe Höhe mit dem Benzimidazolagar befüllt und zum Abkühlen stehen gelassen.

Zur Fixierung der Blätter wurden aus den Petrischalen entsprechend große Agarrechtecke ausgeschnitten und die zugeschnittene Blätter (Blattspitze und Blattbasis mit Skalpell entfernt) in die Schnittkanten des Agar gesteckt, so daß das Blattsegment die agarfreie Fläche überspannte.

4.5.3 Inokulum

Da Ascosporen von *Gnomonia erythrostoma* am besten für Infektionen geeignet sind, wurden diese als Inokulum verwendet. Zur Gewinnung dieser Sporen wurden Blätter mit reifen Perithezien für 20 min in destilliertem Wasser eingeweicht. Anschließend wurden die nassen Blätter so an Petrischalendeckeln befestigt (mit Tesafilm), daß die Ascosporen direkt auf die in Benzimidazolagar fixierten und befeuchteten Blätter (entweder auf Blattober- oder Blattunterseite) geschleudert wurden. Auf die gleiche Weise wurden Sporen auf Membranfilterpapier, daß auf Wasseragarplatten gelegt wurde, ausgeschleudert. Zur Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchte wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen.

4.5.4 Inkubationsbedingungen

Die Inkubation der inokulierten Blätter bzw. Membranfilter erfolgte bei 18 °C und Dunkelheit.

4.5.5 Probenuntersuchung im ESEM

Nach 6, 12, 24, 48 und 72 h wurden ca. 5 x 5 mm große Quadrate mit einer Rasierklinge aus den inokulierten Blättern geschnitten und im REM untersucht.

4.6 RAPD-PCR

Die Anfangssymptome einer Blattinfektion und die Fruchtsymptome von *Gnomonia erythrostroma* sind selten typisch und können leicht mit anderen Krankheiten oder physiologischen Störungen verwechselt werden. Für einen eindeutigen Nachweis des Krankheitserregers, sowie einem Nachweis für latenten Befall, wurde versucht, die PCR für dieses Wirt-Pathogen-System zu etablieren. Ebenso sollte mit dieser Methode der von HASYN (1996) und der in dieser Arbeit isolierte Pilz identifiziert werden.

Das Grundprinzip der PCR ist, bestimmte Abschnitte der DNA mittels zweier bekannter DNA-Sequenzen zu markieren und in Anwesenheit von DNA-Polymerase und Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) unter bestimmten Reaktionsbedingungen zu vervielfältigen (NEWTON und GRAHAM 1997). Diese Methode wurde 1985 von Mullis entwickelt.

Da mit *Gnomonia erythrostroma* noch keine Erfahrungen im Bereich der PCR bestehen und folglich keine spezifischen Primer für diesen Pilz existieren, wurde die RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA Polymerase chain reaction) für die ersten Versuche gewählt. Für die Untersuchung von Pilzpopulationen, Arten und Rassen hat sich diese spezielle Anwendung der PCR als geeignet erwiesen. Weitere Gründe für die Wahl dieser PCR-Methode sind die vorhandenen Erfahrungen, das Vorhandensein von Primern, sowie der geringe Zeit-, Material- und technische Aufwand.

4.6.1 Extraktion der DNA

4.6.1.1 DNA der Kirsche

Um die DNA der Wirtspflanze zu erhalten, wurden symptomfreie Blätter und Früchte (entkernt) der Sorte "Burlat" in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und jeweils 100 mg zur Extraktion verwendet. Da die Blätter und Früchte einen hohen Gehalt an Polyphenolen aufweisen, wurden vor allem Extraktionsmethoden getestet, die hauptsächlich diese Substanzen ausfällen. Neben der CTAB-Methode nach SAGHAI-MAROOF et al. (1984) und davon abgeleiteten Variationen (MÖLLER et al. 1992, BAHNWEIG et al. 1998, POREBSKI et al. 1997) wurde das Dynabeads® DNA DIREKT™ System I von DYNAL und der DNeasy Plant Mini Kit von QIAGEN angewendet.

4.6.1.2 DNA von *Gnomonia erythrostroma*

Für die Gewinnung der Pilz-DNA wurden durchnässte Blätter mit Perithezien an 15 bis 20 Petrischalendeckeln befestigt, so daß die Ascosporen in die Petrischalen geschleudert wur-

den. Nach Verschließen der Petrischalen mit Parafilm wurden diese über Nacht bei 15 °C unter UV-Licht gestellt. Am nächsten Tag wurden die an den Petrischalen klebenden Ascosporen nach Hinzufügen von bidestilliertem Wasser mit einem Gummischaber in Suspension gebracht. Nach Zentrifugation (10 min bei 5000 g) der Suspension wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in einem 2 ml-Eppendorfcap mit Pistill gründlich zerdrückt und für die verschiedenen Extraktionen eingesetzt.

4.6.1.3 DNA der isolierten Pilze

Von der Oberfläche der mit den isolierten Pilzen (Isolat HASYN (1996)) und der im Rahmen dieser Arbeit isolierte Pilz) bewachsenen Agarplatten wurde mit einem Skalpell Myzel abgekratzt. Zirka 100 mg wurden dann in einem 2 ml-Eppendorfcap zerquetscht und die DNA mit dem DNeasy Plant Mini Kit extrahiert.

4.6.1.4 DNA von befallenen Blättern und Früchten

Um die DNA von *Gnomonia erythrostoma* in befallenen Blättern nachzuweisen, wurden Symptomstellen aus Blättern und Früchten geschnitten und in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemörsert. Jeweils 100 mg wurde mit DNeasy Plant Mini Kit von QIAGEN extrahiert.

4.6.1.5 Überprüfung des DNA-Gehalts

Die Ermittlung der aus den Proben extrahierten DNA-Menge erfolgte mit Horizontal-Gelelektrophorese (EPS 301 vom amersham pharmacia biotech). Hierzu wurden jeweils 4 µl Probe mit 5 µl H₂O bidest. und 1 µl Beladungspuffer (Herstellung siehe Anhang) vermischt und parallel zu dem Größen-Standard Lambda *Hind* III (Menge der einzelnen Banden bekannt: 50 ng DNA/µl ~ 500 ng DNA) auf ein 1 %iges, ethidiumbromidhaltiges Agarose-Gel (Herstellung siehe Anhang S. 121) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 30 V für 4 h mit TAE-Puffer (einfach konzentriert) als Laufpuffer (Herstellung des TAE-Puffer siehe Anhang S. 121).

Da Ethidiumbromid fluoresziert und an die DNA bindet, erscheint reine und intakte DNA als Bande unter dem UV-Licht. Aufgrund der Ausprägung der Bande kann mit Hilfe des Standards die DNA-Menge abgeschätzt werden. Je kräftiger die Bande ist, desto größer ist die DNA-Menge. Die Auswertung erfolgte mit einer Video-Geldokumentation (BioDocAnalyse von Biometra).

4.6.2 DNA-Vervielfältigung

Zur Amplifikation der entsprechenden DNA sind bestimmte Komponenten notwendig.

4.6.2.1 PCR-Komponenten

Die wesentlichen Komponenten der PCR sind:

- DNA-Matrize (extrahierte DNA)
- Primer
- dNTPs
- PCR-Puffer (MgCl₂)
- DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)

In Abhängigkeit von der Zahl der zu untersuchenden Proben wurde aus autoklaviertem Wasser, PCR-Puffer, dNTPs und Taq-Polymerase ein Mastermix hergestellt. Der Mastermix für eine Probe bestand aus:

		Endkonzentration:
H ₂ O autokl.	11,04 µl	
PCR-Puffer (10 x)	2,00 µl	1,5 mM MgCl ₂
dNTPs (10 mM)	0,80 µl	400 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	<u>0,16 µl</u>	0,8 U
	14,00 µl	

Bei zehn zu untersuchenden Proben wurde die Menge der einzelnen Komponenten verzehnfacht und zum Ausgleich von Pipettierfehlern zusätzlich 10 % der errechneten Menge hinzugefügt. Nach dem Zusammenpipettieren in einem sterilen 1,5-ml oder 2-ml Eppendorfcap wurden die Komponenten vermengt (Vortexer).

In sogenannte PCR-Tubes wurden jeweils 2 µl Primer, 4 µl DNA-Probe und 14 µl Mastermix gegeben, so daß jedes Tube ein Gesamtvolumen von 20 µl aufwies. Nach Verschließen der Tubes wurden diese zur Vervielfältigung der jeweiligen DNA in einen Thermocycler (PTC- 100 von MJ Research) positioniert.

Die hier verwendeten Komponentenmengen wurden von PIETREK (2000) zur Differenzierung von *Peronospora valerianella* Isolaten optimiert. Das diese Konzentrationen auch für *Gnomonia erythrostoma* geeignet sind, zeigten eigene durchgeführte Konzentrationsreihen.

4.6.2.2 Thermocycler-Programm

Bei einer Temperatur von 93 °C bis 100 °C wird die in DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Danach wird die Temperatur auf 65 °C bis 37 °C abgesenkt, wodurch die Primer an die denaturierte Matrize bindet. Die hitzestabile DNA-Polymerase verlängert bei 72 °C die Primer und beendet damit den ersten Zyklus.

Für die Amplifikation der Ziel-DNA wurde folgendes Programm gefahren:

1)	3 min	94 °C	
2)	12 sec	94 °C	← 35 x
3)	45 sec	36 °C	
4)	90 sec	72 °C	
5)	15 min	72 °C	
6)	∞	4 °C	

4.6.3 DNA-Auftrennung

Die Auftrennung der unterschiedlich großen, amplifizierten DNA-Produkte erfolgte, wie bei der DNA-Gehaltsüberprüfung, durch horizontale Gel-Elektrophorese. In einem 1,5 %igen Gel (Herstellung siehe Anhang S. 121) wurden die Proben, zu denen nach der Amplifikation jeweils noch 2 µl Beladungspuffer (Herstellung siehe Anhang S. 122) hinzugefügt wurde, in 20 µl Taschen pipettiert und für 90 min bei 70 V aufgetrennt. Die Auswertung des Gels erfolgte mit Hilfe der Gel-Videodokumentation "BioDocAnalyze". Die Größe der amplifizierten Produkte konnte mit Hilfe eines Standards (MassRuler™, DNA Ladder, Low Range von MBI Fermentas) ermittelt werden.

4.6.4 Primer-Screening

Um für den Nachweis von *Gnomonia erythrostoma* in der Kirsche einen geeigneten Primer zu finden, wurden 90 dekamere RAPD-Primer der Firma Roth (Kit A, B, C, D und 180) getestet.

Zuerst erfolgte die Testung der Primer an der Pilz-DNA. Hierzu wurden jeweils 4 µl Ascosporen-DNA (5 ng/µl), 2 µl des zu prüfenden Primers und 14 µl des Mastermix verwendet. Nach Amplifikation der DNA im Thermocycler wurden die Amplikate mit 2 µl Beladungspuffer vermischt und in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit der Gel-Videodokumentation. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten wurden zwei Wiederholungen durchgeführt.

4.6.5 Nachweis von *Gnomonia erythrostoma* DNA in befallenen Pflanzen

Geeignet erscheinende Primer, d.h. Primer, die nach der Auswertung eine oder zumindest nicht mehr als drei diskrete Banden aufwiesen, wurden mit reiner Pflanzen-DNA und DNA aus befallenen Blättern und Früchten getestet. Zusätzlich wurde überprüft, ob die DNA des isolierten Pilzes mit der der Ascosporen identisch ist.

5 Ergebnisse

5.1 Isolierung und Kultur von *Gnomonia erythrostoma*

5.1.1 Isolierung

5.1.1.1 Ascosporen und Konidien

Eine Isolierung von *Gnomonia erythrostoma* über Ascosporen ist prinzipiell möglich. Die Ascosporen keimten aus, jedoch unterblieb jegliche Myzelbildung, auch nach Umsetzung von gekeimten Sporen auf nährstoffreiche Medien. Auch der Zusatz von Antibiotika (Streptomycin) in die Nährmedien führte zu keinen anderen Ergebnissen.

Absolut negativ verlief die Isolierung über Konidien. Trotz umfangreicher Versuchsanstellungen unterblieb bereits die Keimung.

5.1.1.2 Bestimmung der Keimrate

Zur Keimung benötigen die Ascosporen einen ständigen Wasserfilm. Ist dieser nicht vorhanden, beginnen sie zu schrumpfen und verlieren ihre Keimfähigkeit.

Als günstige Temperaturen für die Keimung der Ascosporen von *Gnomonia erythrostoma* erwiesen sich 15 °C und 20 °C. Bei diesen Temperaturen wurde die maximale Keimrate von etwa 80 % nach 24 h erreicht. Nach 48 h waren die Petrischalen mit Fremdmyzel überwachsen, so daß keine Auswertung möglich war. Tabelle 13 zeigt, daß die Sporen auch bei

Tabelle 13: Keimrate (%)

Stunden (h)	Temperatur (°C)				
	5	10	15	20	25
4	0	0	2	2	0
6	2	2	17	20	0
12	7	16	25	32	2
24	10	39	80	80	3
36	22	50	80	80	2
48	20	50	-	-	-

niedrigen Temperaturen keimten. Allerdings nimmt die Keimrate mit Rückgang der Temperatur ab. Die maximale Keimrate wird erst nach 36 Stunden erreicht. Bei einer Temperatur von 25 °C blieb eine Keimung nahezu aus.

5.1.1.3 Gewebe

Die Frucht als Wirtsgewebe erwies sich als ungeeignet. In nahezu allen Versuchen trat ein starkes Bakterienwachstum auf, das eine Isolierung verhinderte. Erfolgsversprechender zeigten sich befallene Blattproben. Natürlich waren auch hier einige Platten mit Bakterien- oder Fremdmyzel kontaminiert, aber in einigen Fällen war ein geringes Myzelwachstum zu erkennen.

5.1.2 Kultur

Das Wachstumsprofil des Myzels von *Gnomonia erythrostoma* ist unabhängig von den Nährmedien und Inkubationsbedingungen sehr unterschiedlich. In den meisten Fällen wuchs das Myzel sehr ungleichmäßig aus den runden ($\varnothing = 0,5 \text{ cm}$), überimpften Myzelstücken, in einigen anderen Fällen stellte der Pilz nach einer geringen Wachstumsphase sein Wachstum ein. Ein gleichmäßiges Wachstum konnte nur selten beobachtet werden.

Die "höchste" Zuwachsrate mit 5 mm in 4 Wochen zeigte sich auf Möhrensaftagar, gefolgt vom Biomalzagar mit 3 mm (Abbildung 13). Auch nach 12 Wochen wiesen diese beiden Nährböden das stärkste Myzelwachstum auf.

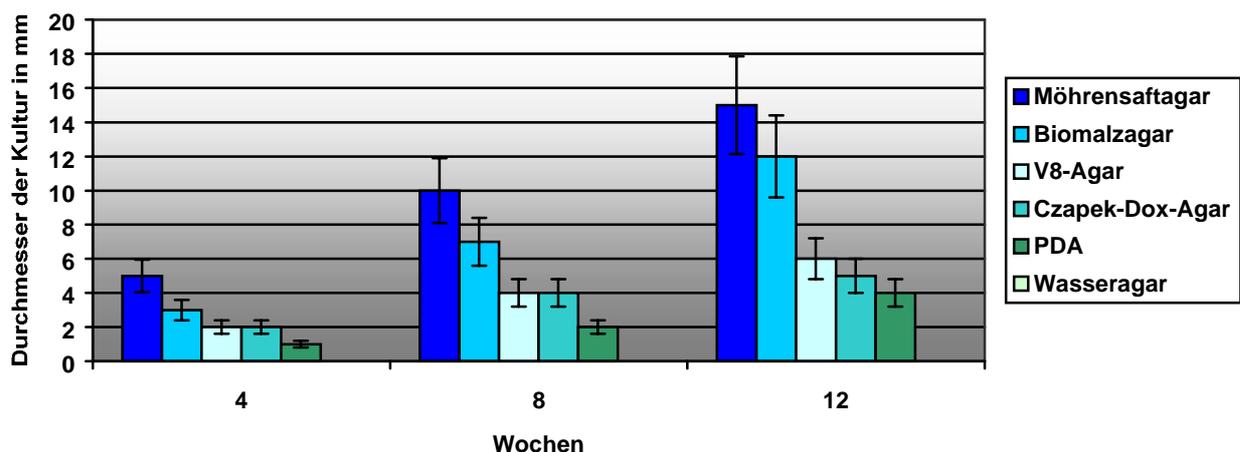


Abbildung 13: Einfluß der Nährmedien 1 auf das Wachstum von *G. erythrostoma*

Zur Ermittlung der günstigsten Wachstumsbedingungen wurde Möhrensaftagar verwendet. Für die Kultur pathogener Pilze spielt der pH-Wert des Nährbodens mitunter eine erhebliche Rolle, wohl aber nicht bei *Gnomonia erythrostoma*. Das Wachstum war bei pH-Werten von 3 bis 9 annähernd gleich, wobei eine fördernde Tendenz in Richtung des sauren Bereiches erkennbar war.

Auch der Faktor Licht scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Myzelbildung war bei den Varianten Dauerdunkelheit, Dauerlicht in etwa gleich (15 mm bzw. 14 mm nach 12 Wochen im Durchmesser). Eine etwas geringere Wachstumsgeschwindigkeit zeigte sich auf den bei Wechsellicht (12 mm) inkubierten Petrischalen. Mit 4 mm war die Myzelbildung bei UV-Licht (4 mm) deutlich reduziert (Abbildung 14).

Den größten Einfluß auf das Wachstum des Pilzes hat die Temperatur. Als sehr günstig erwiesen sich Temperaturen zwischen 15 °C und 18 °C (Abbildung 15). Der Pilz wuchs unter diesen Bedingungen während der zwölfwöchigen Beobachtungszeit deutlich schneller (15 mm nach 12 Wochen), so daß man hier von einem Temperaturoptimum des Pilzes sprechen kann. Mit zunehmenden bzw. abnehmenden Temperaturen ging die Wachstumsgeschwindigkeit zurück, bis bei 5 °C bzw. 25 °C kein Wachstum mehr stattfand.

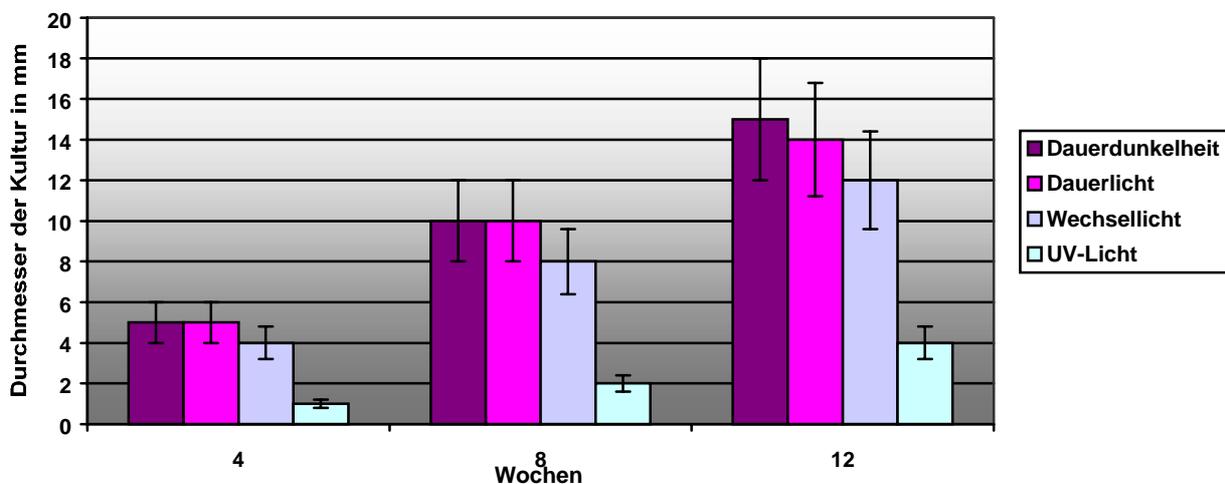


Abbildung 14: Einfluß des Lichts auf das Wachstum von *G. erythrostoma*

Interessant war die Beobachtung, daß die Isolate, die bei 5 °C inkubiert wurden, bei einer nachfolgenden Inkubation von 18 °C wieder zu wachsen begannen, während das bei den mit 25 °C inkubierten Isolaten nicht der Fall war.

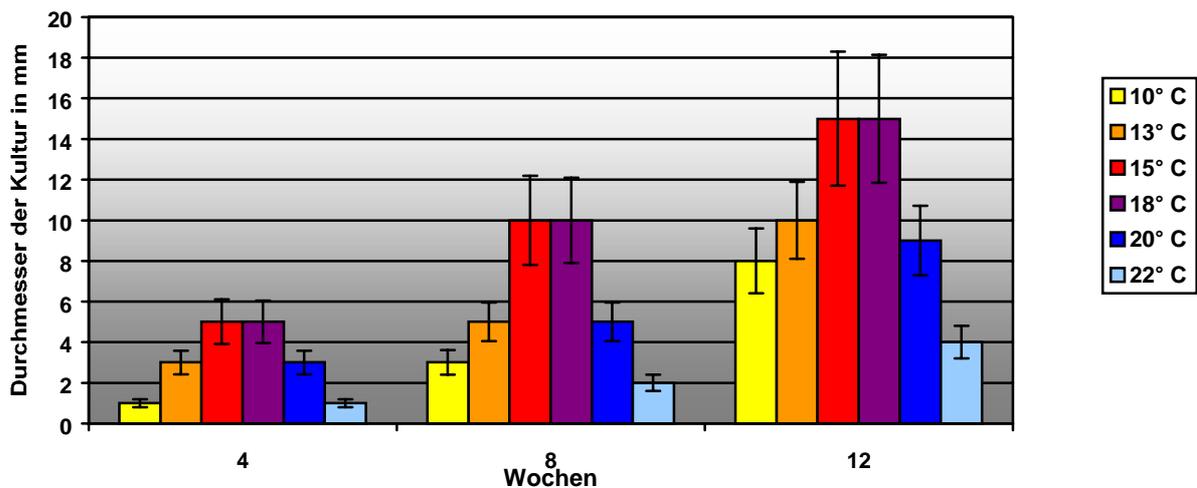


Abbildung 15: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum von *G. erythrostoma*

Nach mehrmaligem Umsetzen von *Gnomonia*-Myzel auf Möhrensaftagar konnte eine deutliche Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit erreicht werden. Nach einer Phase langsamen Wachstums (in den ersten 4 Wochen ca. 15 mm = Anfangsphase) wies das Myzel nach 8 Wochen einen Durchmesser von 40 mm auf. 12 Wochen nach der Überimpfung hatte das Myzel einen Durchmesser von 65 mm (Abbildung 16). Allerdings war dieser Effekt nur bei 50 % der überimpften Petrischalen festzustellen. Die andere Hälfte kam über die "Anfangsphase" nicht hinaus. Dieses "verbesserte" Myzel wurde erneut einem Nährbodenscreening unterzogen.

Am wachstumsstärksten erwies sich der Möhren-Cola-Agar (Abbildung 16). Das Myzelwachstum unterschied sich in der Wachstumsgeschwindigkeit (60 mm nach 12 Wochen) und im Wachstumsverhalten nur sehr gering zum Myzelwachstum auf dem Möhrensaftagar. Das erhoffte schnellere Myzelwachstum, im speziellen auf dem Kirschlaubagar (braun und grün) und dem Kirschsftagar, blieb aus. Mit 30 mm nach 12 Wochen wies das Myzel auf dem Kirschlaubagar (braun) nur die Hälfte des Durchmessers des Myzels auf dem Möhren-Cola-Agar auf.

Das extrem geringe Myzelwachstum auf dem Kirschlaubagar (grün) und dem Kirschsftagar ist wohl auf hohe Phenolgehalte zurückzuführen.

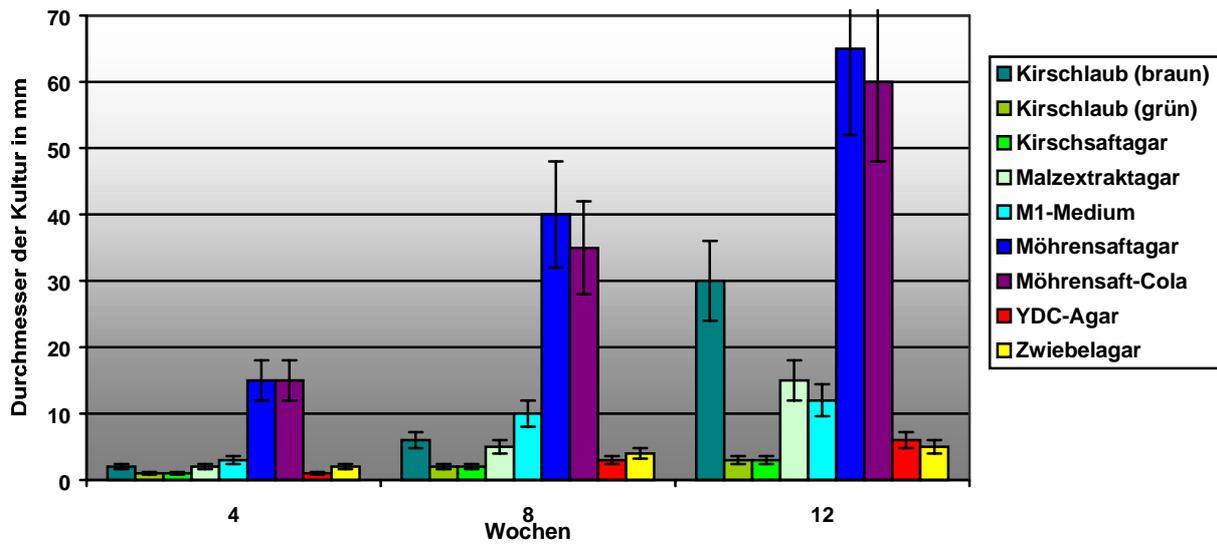


Abbildung 16: Einfluß der Nährmedien 2 auf das Wachstum von *G. erythrostoma*

5.1.3 Fruchtkörperbildung

Bei allen Kultivierungsversuchen von *Gnomonia erythrostoma* blieb eine Fruchtkörperbildung d.h. die Bildung von Perithezien mit Ascosporen (= Hauptfruchtform) oder Pyknidien mit Konidien (= Nebenfruchtform) aus. Ob es sich bei dem isolierten Myzel wirklich um *Gnomonia erythrostoma* handelt, konnte auf diesem Wege nicht eindeutig nachgewiesen werden.

5.2 Epidemiologische Untersuchungen

5.2.1 Untersuchungsjahr 1998

Die Aufstellung der Sporenfallen erfolgte am 29. April 1998, die Wetterstationen wurden am 1. Mai 1998 installiert. Die Blütezeit der Süßkirschen an den Versuchsstandorten war von Ende April bis Anfang Mai. Die Blattentfaltung erfolgte ab Mitte April.

5.2.1.1 Sporenflug am Standort Oberrüsselbach

Bereits am Aufstellungstag (29. April) der Sporenfalle konnten die ersten Sporenfänge (556 Sporen/m³ Luft) registriert werden. Da die Ascosporen Mitte April noch nicht reif waren, kann der Beginn des Sporenfluges auf Ende April geschätzt werden. Nach einer Sporenflugdauer von 10 Wochen wurden am 7. Juli die letzten Sporen (89 Sporen/m³ Luft) erfaßt (Abbildung 17).

Der Vergleich des Sporenfluges mit der Witterung (Abbildung 18) zeigt, daß mit nahezu jedem Niederschlag Ascosporen ausgeschleudert wurden, d. h. die aus dem Niederschlag resultierende Durchnässung der braunen Blätter bewirkt den Vorgang der Ausschleuderung. In wenigen Fällen konnten auch Sporenausschleuderungen nach Perioden mit lang anhaltender relativer Luftfeuchte von nahezu 100 % (vor allem nachts) beobachtet werden.

Ende April/Anfang Mai (29. April – 6. Mai) kam es auf Grund der regelmäßigen Niederschläge fast täglich zu Ausschleuderungen. Der Zeitraum vom 7. Mai bis 24. Mai war durch eine Trockenperiode geprägt, in der auch bei den geringen Niederschlägen am 17. Mai (0,4 mm) und 21. Mai (0,2 mm) Sporenausschleuderungen ausblieben. Am 25. Mai kam es zur größten Sporenentlassung im Jahr 1998. Bei einer Niederschlagsmenge von 3,1 mm wurden ca. 1700 Sporen/m³ Luft ausgeschleudert. Ursache für dieses Maximum ist die vorangegangene Trockenperiode, in der viele Sporen herangereift sind, die dann bei entsprechender Niederschlagsmenge explosionsartig ausgeschleudert wurden. Trotz einer höheren Niederschlagsmenge (4,1 mm) am folgenden Tag ging die Sporenentlassung in Folge des nachlassenden Potentials an reifen Sporen zurück. Ein Defekt der Sporenfalle verhinderte vom 27. Mai bis 1. Juni Sporenfänge. Häufiger Regen von Ende Mai bis Anfang Juli (27. Mai bis 7. Juli: ca. 116 mm) sorgte für regelmäßige Ausschleuderungen (ca. 7950 Sporen/m³ Luft). Erwähnenswert ist der 12. Juni, an dem es nahezu durchgehend geregnet hat (40 mm). Fast die gesamte Menge der an diesem Tag ausgeschleuderten 1500 Sporen/m³ Luft, wurde bis 17 Uhr entlassen. Daraus läßt sich folgern, daß nach diesem Zeitpunkt keine reifen Sporen mehr vorlagen, die durch die weiter fallenden Niederschläge freigesetzt werden konnten. An Hand der zurückgehenden Sporenzahlen nach dem 17. Juni läßt sich die Erschöpfung der

Inokulumquellen erkennen, die am 7. Juli mit einer letzten Ausschleuderung ihre Aufgabe beendeten.

Die ersten Symptome der Krankheit wurden Ende Mai beobachtet. Auf der Blattoberseite waren grünlichgelbe Verfärbungen zu erkennen. Die Früchte zeigten noch keine Symptome. Bei einer Inkubationszeit von zwei bis drei Wochen und unter Berücksichtigung der dreiwöchigen Trockenperiode im Mai müssen die Infektionen der Blätter bereits durch die Ausschleuderungen von Ende April/Anfang Mai gesetzt worden sein. Die relative Luftfeuchte war während dieses Zeitraums fast immer höher als 80 % (Tagesmittelwerte), so daß man von guten Infektionsbedingungen (Blattnässedauer länger als 6 h) sprechen kann. Die ersten Symptome an den Früchten zeigten sich ab Mitte Juni. Betroffen waren vor allem die mittleren und späten Sorten. Daraus ist abzuleiten, daß die Früchte erst durch die Sporenausschleuderungen von Ende Mai (vor allem vom 25. Mai und 26. Mai) infiziert wurden. Auch in diesem Zeitraum herrschten gute Infektionsbedingungen (Luftfeuchte höher als 80 %). Eine Blüteninfektion ist daher auszuschließen (Abbildung 18).

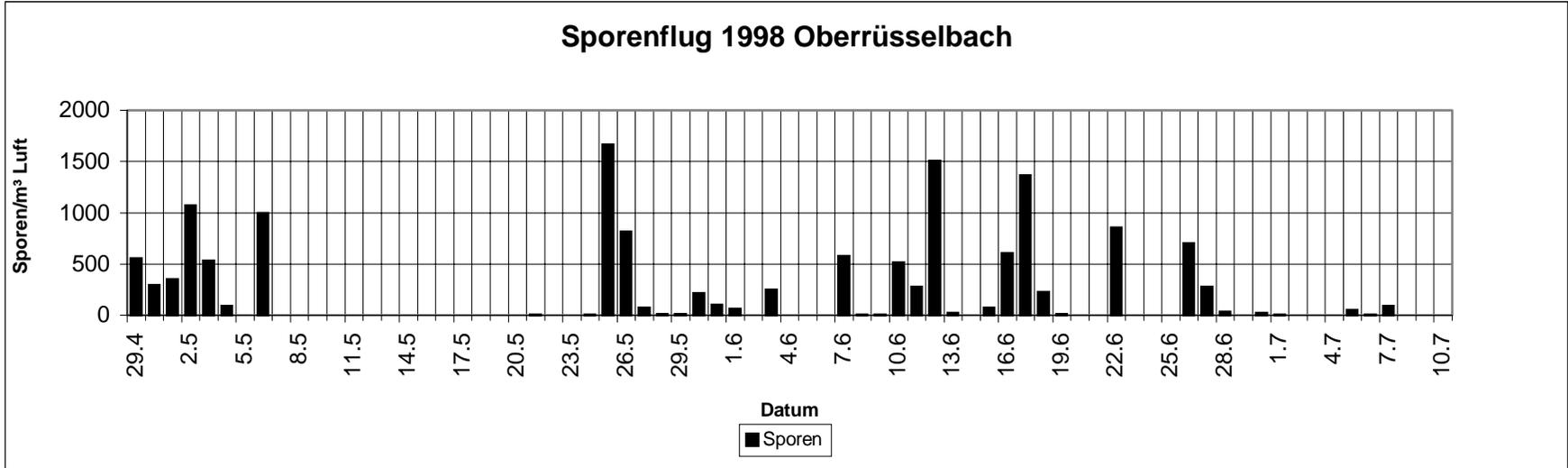


Abbildung 17: Sporenflug am Standort Oberrüsselbach 1998

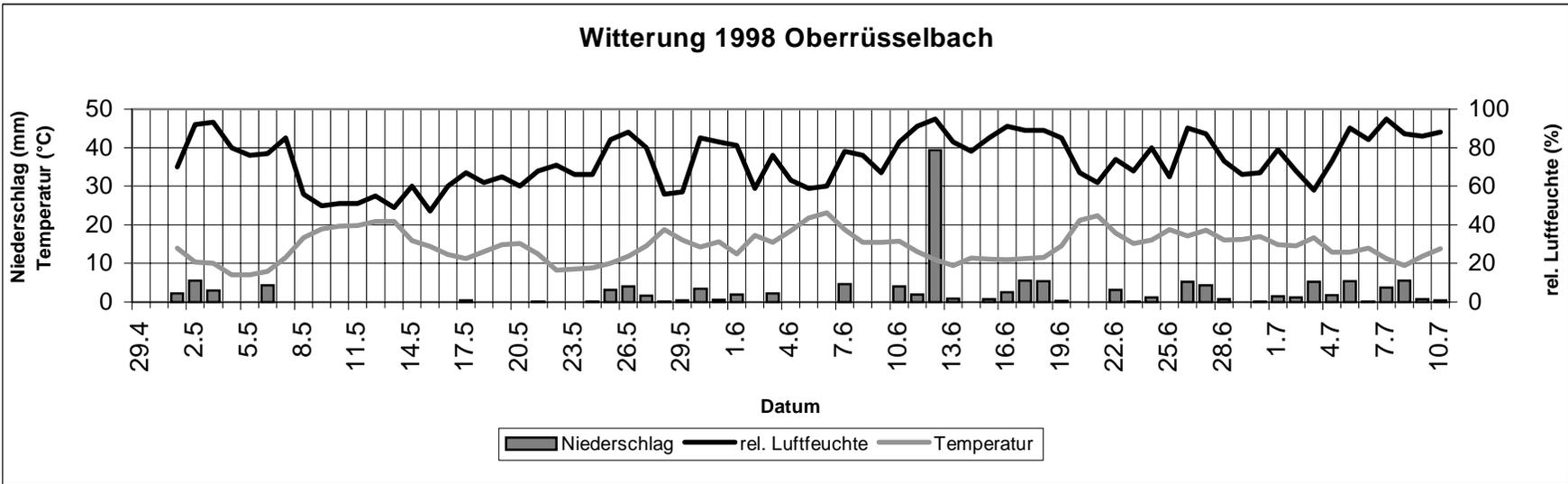


Abbildung 18: Witterung am Standort Oberrüsselbach 1998

5.2.1.2 Sporenflug am Standort Hiltpoltstein

Auch am Standort Hiltpoltstein wurden am 29. April 1998 von der Sporenfalle die ersten Sporen (87 Sporen/m³ Luft) gefangen. Da beide Standorte nur wenige Kilometer auseinander liegen und man deshalb auf eine ähnliche Witterung schließen kann, dürfte der Sporenflugbeginn ebenfalls Ende April gewesen sein. Der letzte größere Sporenfang (ca. 300 Sporen pro m³ Luft) fand am 28. Juni statt, die letzten Sporen (26 Sporen/m³ Luft) wurden am 5. Juli gefangen (Abbildung 19). Die Dauer des Sporenfluges war also unwesentlich kürzer als in Oberrüsselbach.

Der Standort Hiltpoltstein zeigt einen ähnlichen Verlauf des Sporenfluges. Wie in Oberrüsselbach waren aufgrund der nassen Bedingungen von Ende April bis Anfang Mai (29. April bis 6. Mai) fast täglich Sporenausschleuderungen zu beobachten, wobei bereits am 2. Mai der Höhepunkt mit ca. 1650 Sporen/m³ Luft (bei 5,5 mm Niederschlag) erfolgte. Auch von der Sporenmenge unterscheiden sie sich in diesem Zeitraum (ca. 4000 Sporen pro m³ Luft an beiden Standorten) nur sehr gering.

Nach der Trockenperiode (7. Mai bis 24. Mai) ist die Sporentlassung aber deutlich niedriger als in Oberrüsselbach. Auch der extrem hohe Niederschlag von 42 mm am 12. Juni (Abbildung 20) führte lediglich zu einer Ausschleuderung von knapp über 500 Sporen/m³ Luft.

Die wesentlich kleinere Anlage und ein geringerer Belaubungsgrad (Blätter tragen die Perithezien mit den Ascosporen = Inokulumquellen) machen dieses Ergebnis erklärbar. Dies war auch am Befall zu sehen, der niedriger war.

Anhand der gemachten Beobachtungen für die Infektionsbedingungen kann man folgern, daß die Ausschleuderungen am 29. April, 2., 3., 25. – 27. Mai, 30. Mai – 1. Juni, 7. Juni und 10. bis 12. Juni zu Infektionen geführt haben (Abbildungen 21 und 22).

Mögliche Infektionstage waren der 1. und 6. Mai, sowie der 24., 26., 28. Juni und 5. Juli. Während bei den beiden Terminen im Mai die "kritischen" Werte für die Blattnässedauer (6 h) bzw. relative Luftfeuchte (90 %) nicht ganz erreicht wurden, hatten schon viele Sporen bei den Ausschleuderungen Ende Juni/Anfang Juli (es herrschten hier gute Infektionsbedingungen; Abbildung 22) ihre Vitalität verloren.

Wegen den ungünstigen Infektionsbedingungen am 30. April und 4. Mai können Infektionen an diesen Tagen nahezu ausgeschlossen werden (Abbildungen 21 und 22).

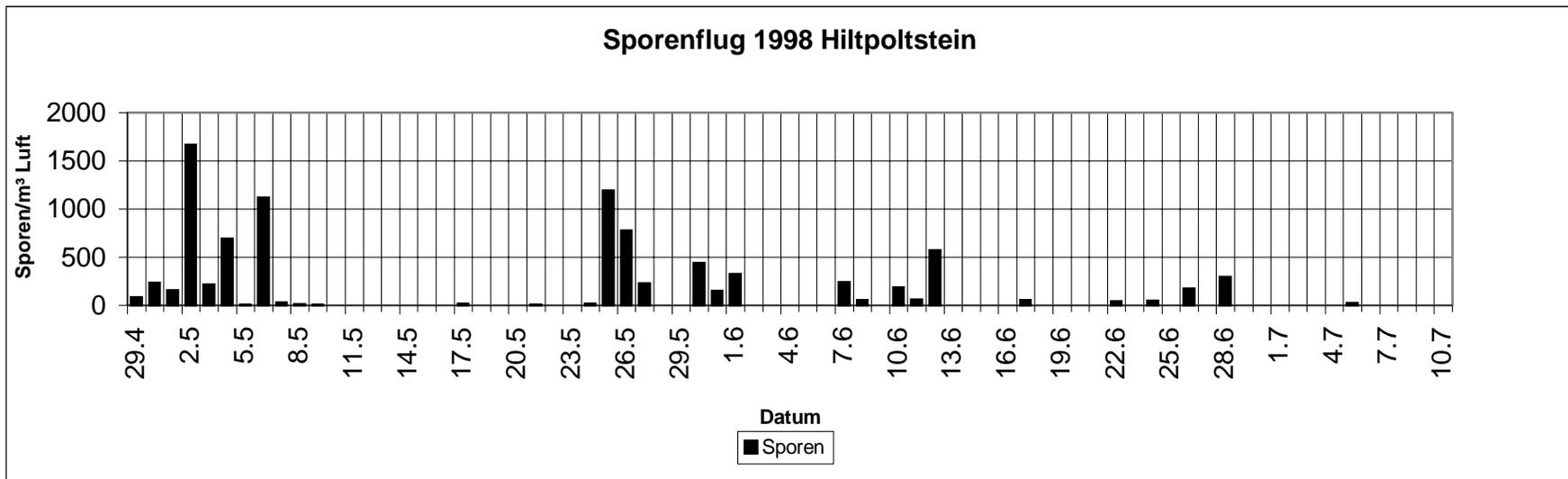


Abbildung 19: Sporenflug am Standort Hiltoltstein 1998

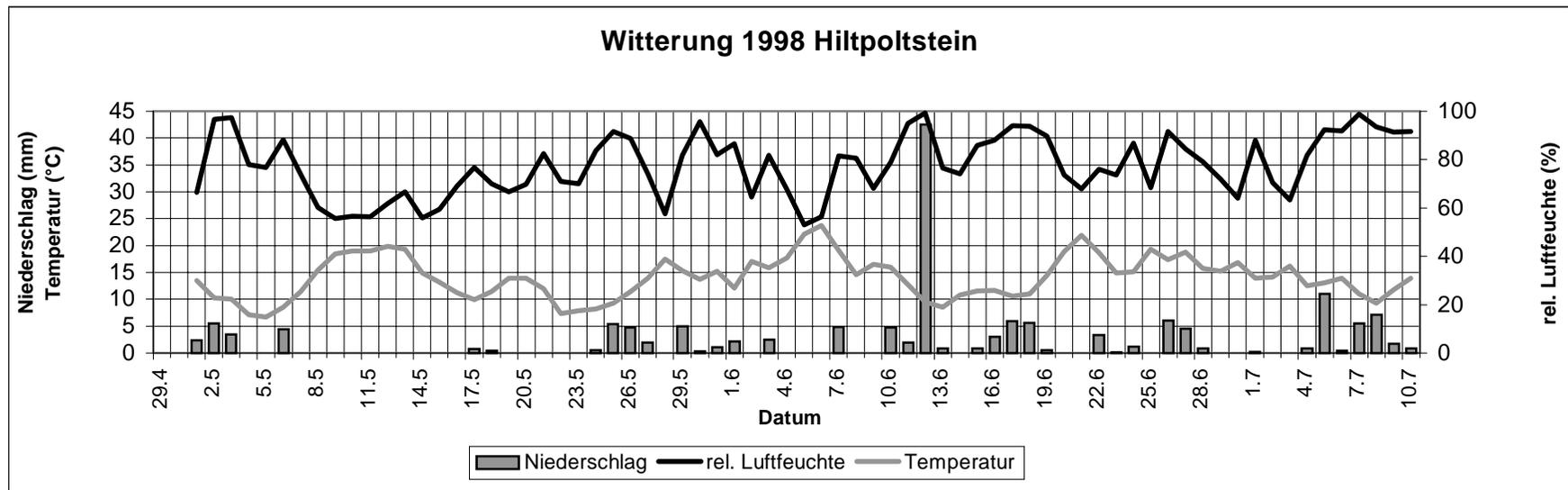


Abbildung 20: Witterung am Standort Hiltoltstein 1998

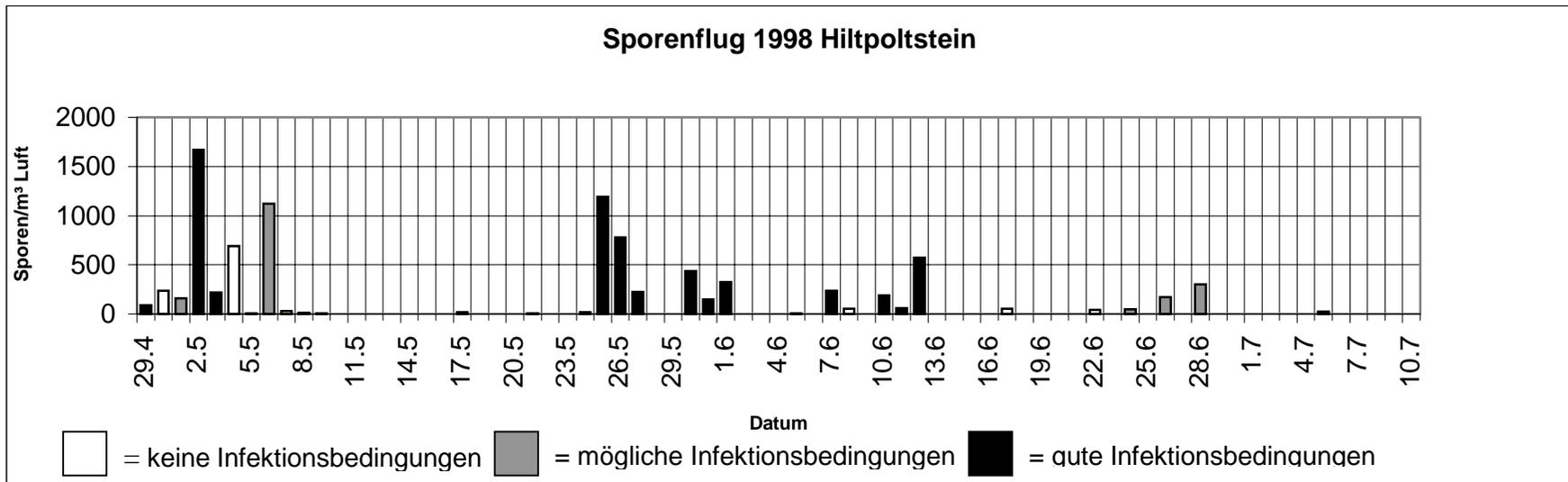


Abbildung 21: Sporenflug und Infektionsbedingungen am Standort Hiltoltstein 1998

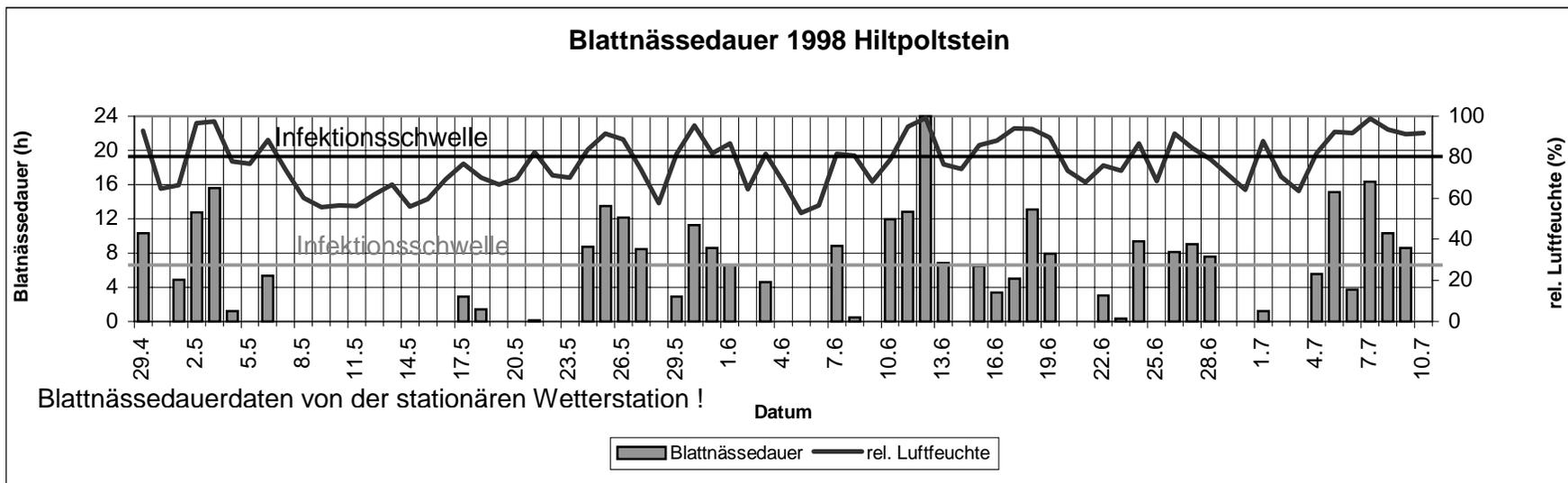


Abbildung 22: Blattnässedauer am Standort Hiltoltstein 1998

5.2.2 Untersuchungsjahr 1999

Die Kirschblüte in diesem Jahr war Ende April/Anfang Mai (26. April – 5. Mai). Zu diesem Zeitpunkt waren auch die Blätter schon nahezu entfaltet, so daß wie 1998 einer Grünblüte vorlag.

Der Aufstellungstermin der Sporenfallen und Wetterstationen war in diesem Jahr der 25. März.

5.2.2.1 Sporenflug am Standort Oberrüsselbach

Der erste Sporenfang erfolgte am 28. März (6 Sporen/m³ Luft bei 1,6 mm Niederschlag), der letzte am 19. Juni (9 Sporen/m³ Luft bei 7,6 mm Niederschlag), wobei mengenmäßig ernstzunehmende Ausschleuderungen (≥ 100 Sporen/m³ Luft) vom 4. April bis 11. Mai stattfanden (Abbildungen 23 und 24).

Die regelmäßigen Niederschläge von Anfang April bis Mitte/Ende April sorgten beinahe täglich für Ausschleuderungen. Anfang Mai kam es zu einer massiven Freisetzung von Sporen. Vom Nachmittag des 1. Mai bis in die frühen Morgenstunden des 2. Mai wurden bei einer Niederschlagsmenge von 5,6 mm fast 59.000 Sporen/m³ Luft ausgeschleudert. Neben den vorangegangenen niederschlagsfreien Tagen, in denen viele Sporen gereift sind, sorgte auch der optimale Reifezeitpunkt der Ascosporen für dieses Maximum. Nach diesem Höhepunkt sanken die Sporenzahlen wieder, stiegen am 8. Mai noch einmal auf über 4000 Sporen/m³ Luft und gingen nach dem 11. Mai auf Null zurück. Die ersten Symptome wurden am 17. Mai (Blatt) bzw. am 31. Mai (Frucht) entdeckt. Berücksichtigt man die Inkubationszeit von 2 bis 3 Wochen, so wurden die Infektionen hauptsächlich durch die Sporenausschleuderungen im Mai verursacht. Da die neuen Blätter bereits am 1. Mai nahezu entfaltet waren, spricht vieles dafür, daß die Ausschleuderungen am 1. und 2. Mai die ersten Symptome hervorgerufen haben. Auch wenn zu diesem Zeitpunkt die Blattnässefühler noch nicht angebracht waren (Blätter müssen dazu ganz entfaltet sein), kann man bei einer Niederschlagsmenge von 5,6 mm und einer relativen Luftfeuchte, die über einen Zeitraum von 16 Stunden fast immer höher als 90 % (Stundenmesswerte) war, von günstigen Infektionsbedingungen ausgehen.

In welchem Entwicklungszustand die Früchte infiziert werden, ist noch ungeklärt. Eine Infektion vor der Befruchtung ist nach bisherigen Beobachtungen auszuschließen. Die frühen Sorten waren Anfang Mai gerade verblüht, während die mittleren und späten Sorten in voller Blüentracht standen. Wenn man auch bei der Fruchtfektion von einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Wochen ausgeht, so können die Früchte erst im Jugendstadium befallen worden sein.

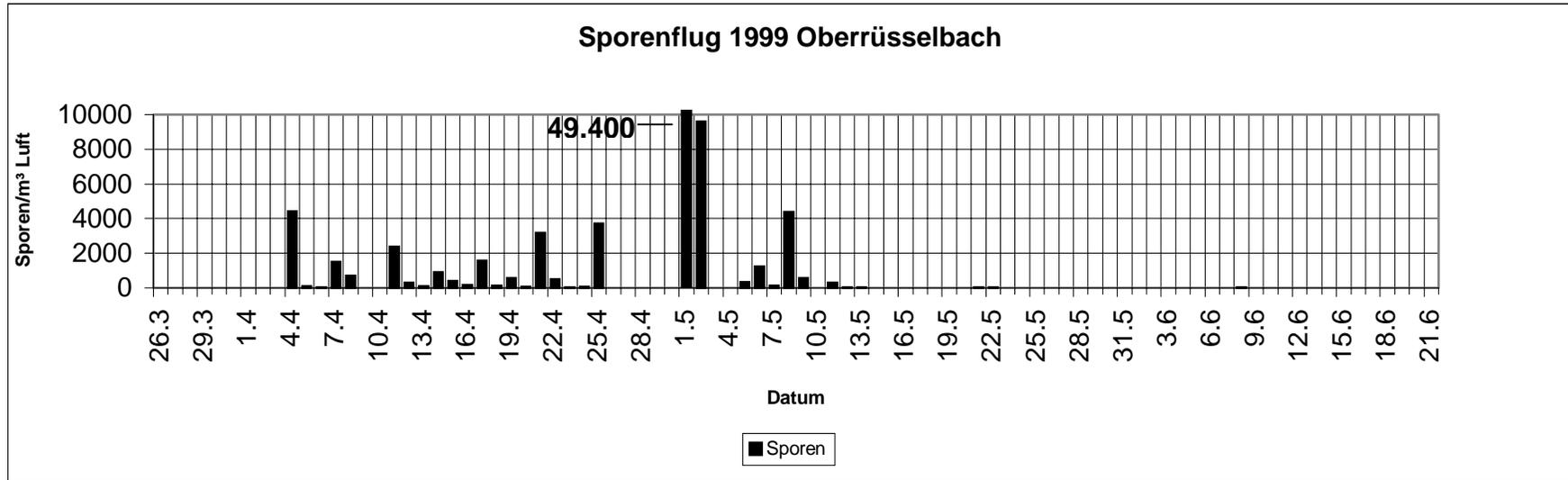


Abbildung 23: Sporenflug am Standort Oberrüsselbach 1999

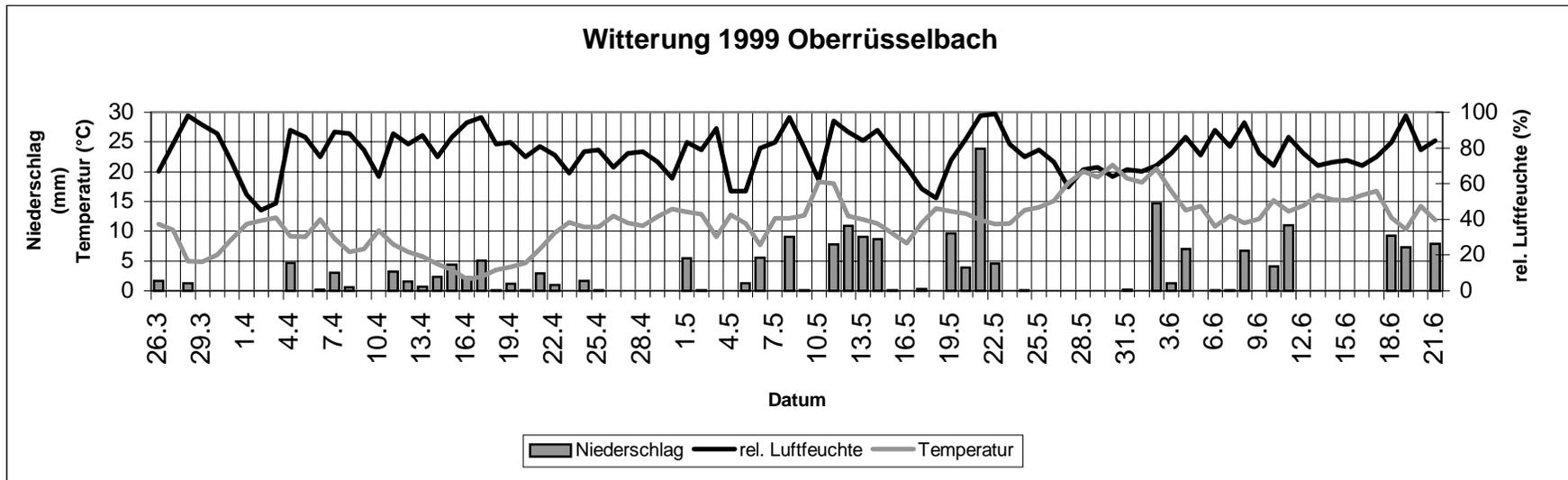


Abbildung 24: Witterung am Standort Oberrüsselbach 1999

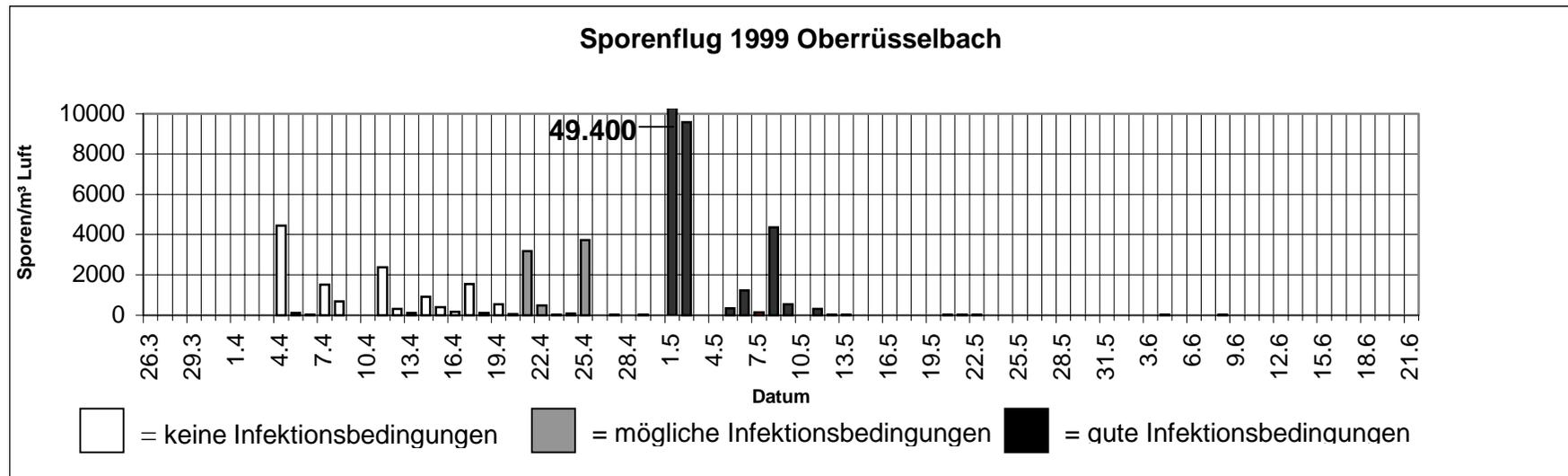


Abbildung 25: Sporenflug und Infektionsbedingungen am Standort Oberrüsselbach 1999

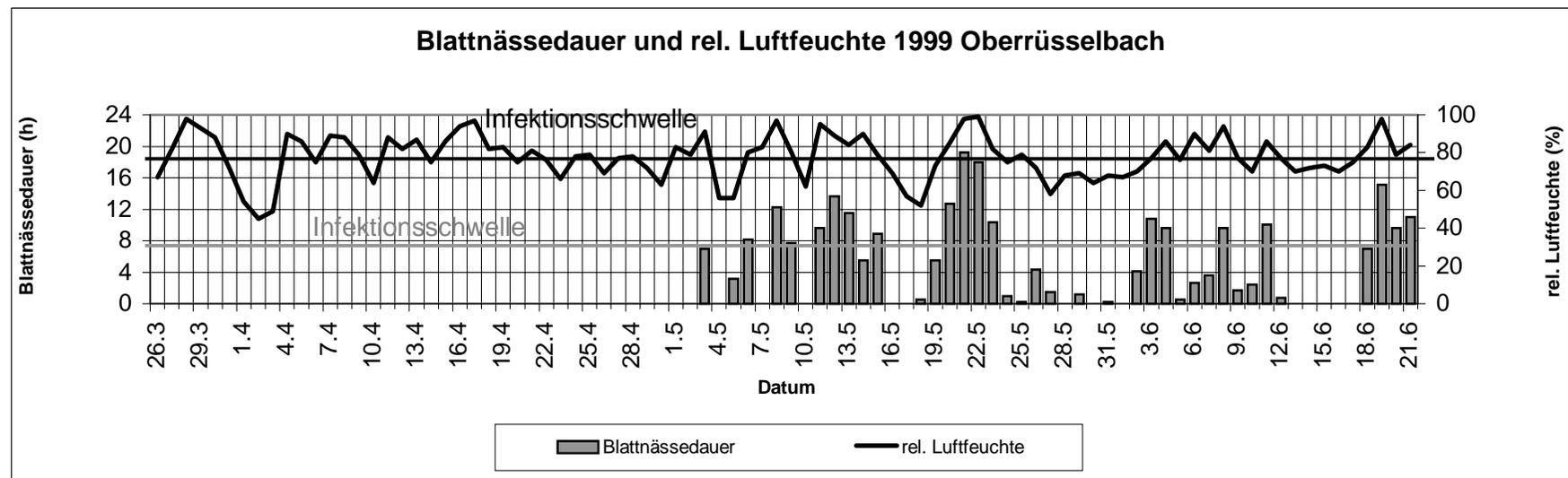


Abbildung 26: Blattnässedauer am Standort Oberrosselbach 1999

Infektionstage, die dafür in Frage kommen, sind der 8., 9. und 11. Mai (Abbildungen 25 und 26). Die Sporenausschleuderungen bis Mitte April haben mit hoher Sicherheit zu keinen Infektionen geführt. Die Blätter waren zu diesem Zeitpunkt in keinem infektiösfähigen Zustand. Mit der Blattempfaltung, die um den 20. April einsetzte, können Infektionen nicht ausgeschlossen werden.

5.2.2.2 Standort Hiltspoltstein

Durch einen Defekt der Sporenfalle konnten am 4., 5. und 14. – 18. April keine Sporenfänge durchgeführt werden.

Wenn auch am 28. März die ersten Sporen (6 Sporen pro m³ Luft) und am 20. Juni die letzten Sporen (3 Sporen/m³ Luft) gefangen wurden, erfolgten bedeutende Sporenausschleuderungen nur im Zeitraum vom 7. April bis 13. Mai (Abbildung 27).

Die Sporenentlassungen von Anfang April sind wieder mit denen am Standort Oberrüsselbach vergleichbar. Ab dem 11. April sinken die Sporenzahlen im Vergleich zu Oberrüsselbach deutlich ab. Die höchsten Sporenentlassungen erfolgten am 24. April. An diesem Tag wurden bei einer Regenmenge von 19,4 mm fast 2500 Sporen pro m³ Luft ausgeschleudert. Ursache dieses hohen Peaks war die große Niederschlagsmenge, durch die alle reifen Sporen ausgeschleudert wurden. Nach diesem Höhepunkt waren die Inokulumquellen erschöpft, so daß es auch nach einer niederschlagsfreien Zeit von 5 Tagen, am 1. und 2. Mai nur noch zu relativ geringen Ausschleuderungen kam. Einer letzten höheren Sporenfreisetzung am 11. Mai (1200 Sporen/m³ Luft bei 12,6 mm Regen) folgten nur noch minimale Sporenentlassungen (Abbildungen 27 und 28).

Die ersten Blattsymptome konnten Mitte Mai beobachtet werden. Diese waren aber im Vergleich zu Oberrüsselbach weniger deutlich ausgeprägt und in geringer Anzahl vorhanden. Fruchtsymptome zeigten sich erst Mitte Juni. Wie in Oberrüsselbach haben wohl nur die Sporenfreisetzungen im Mai zu Infektionen geführt. Betrachtet man die Sporenausschleuderung im Zusammenhang mit der Blattnässedauer (Abbildungen 29 und 30), so ist zu erkennen, daß bei fast jeder Sporenentlassung im Mai günstige Infektionsbedingungen (Blattnässe von mehr als 6 h) geherrscht haben. Infektionen durch Sporenfreisetzungen von Mitte/Ende April (20. bis 25. April) können nicht ausgeschlossen werden. In diesem Zeitraum war die Witterung für Infektionen gut, aber nur einige Blätter ausreichend entwickelt.

Die niedrigere Inokulumdichte an diesem Standort sorgte für die schwächere Symptombildung, der ausschließliche Anbau von mittleren und späten Kirscharten für einen späten Fruchtbefall.

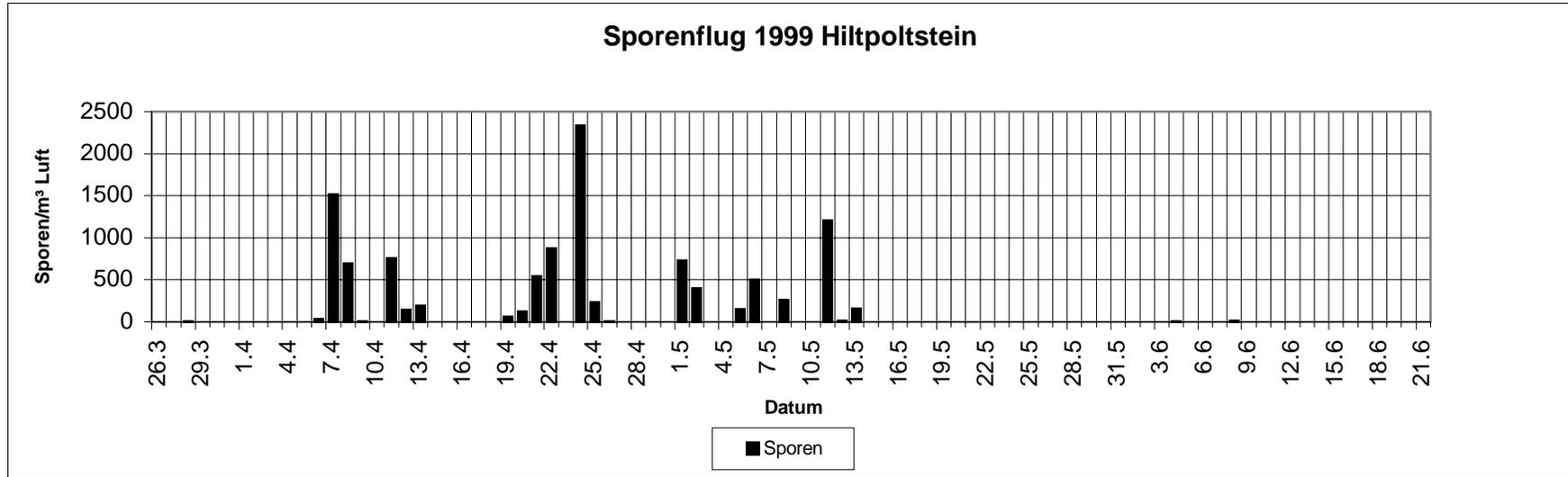


Abbildung 27: Sporenflug am Standort Hiltoltstein 1999

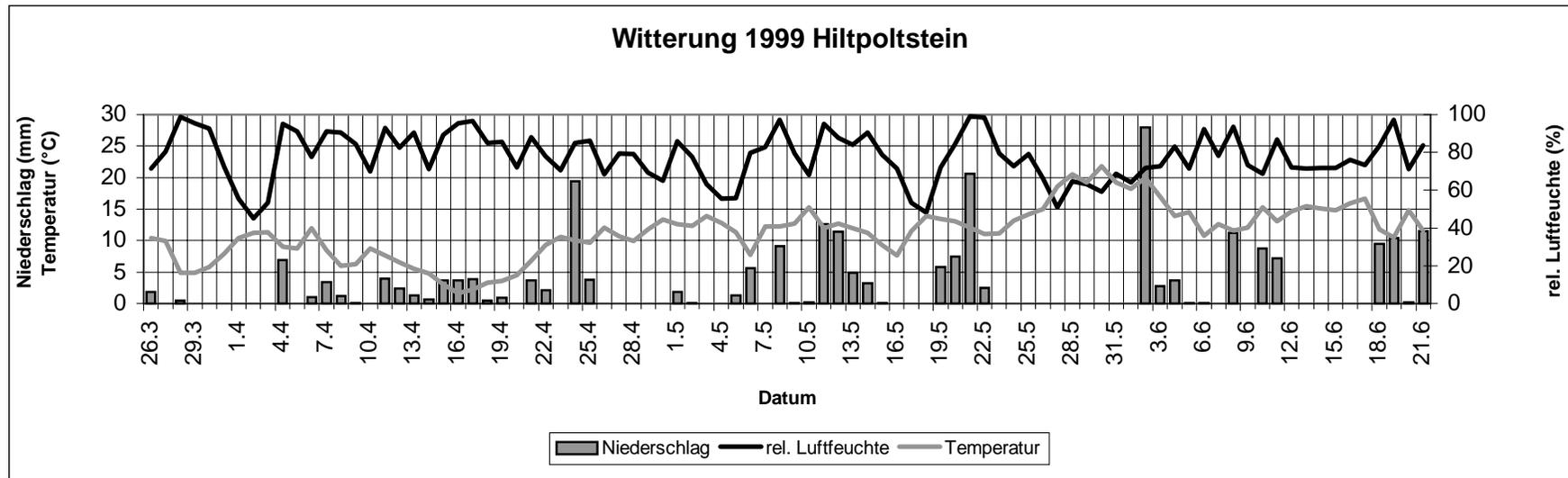


Abbildung 28: Witterung am Standort Hiltoltstein 1999

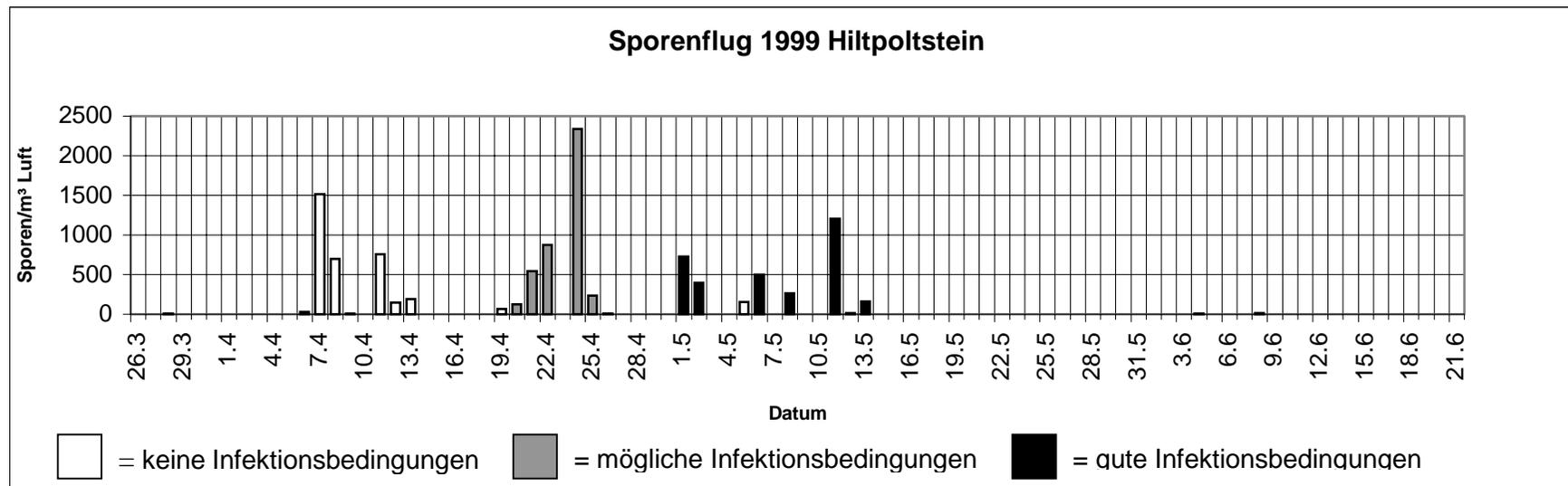


Abbildung 29: Sporenflug und Infektionsbedingungen am Standort Hiltoltstein 1999

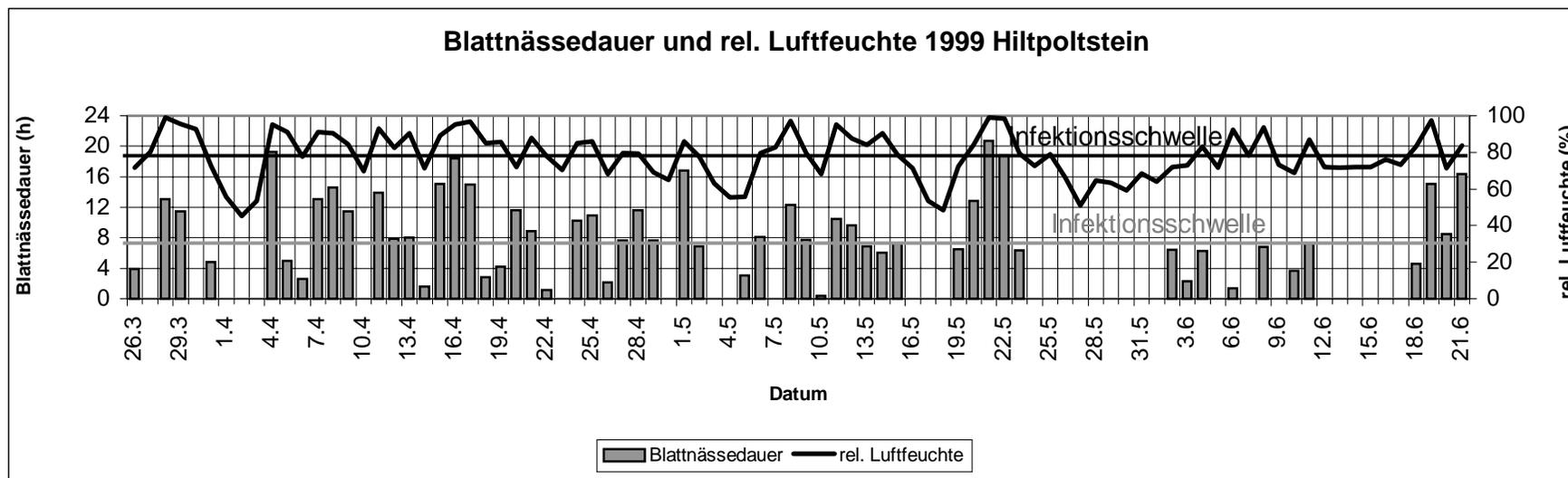


Abbildung 30: Blattnässedauer am Standort Hiltoltstein 1999

5.2.3 Untersuchungsjahr 2000

Auch dieses Jahr zeichnete sich durch eine Grünblüte aus. Der Blühzeitraum erstreckte sich vom 24. April bis zum 3. Mai. Die Installation der Sporenfallen und Wetterstationen erfolgten am 21. März.

5.2.3.1 Sporenflug am Standort Oberrüsselbach

Die ersten Sporen wurden im Jahr 2000 am 24. März registriert, wobei die erste größere Ausschleuderung (mehr als 100 Sporen/m³ Luft) am 11. April stattfand. Die letzten Sporen wurden am 25. Juni gefangen. Der letzte Sporenfang von mehr als 100 Sporen/m³ Luft ereignete sich am 5. Juni (Abbildung 31).

Ende März/Anfang April kam es nach ausgiebigen Niederschlägen nur zu geringen Sporentlassungen, so daß der 11. April (180 Sporen/m³ Luft) als eigentlicher Beginn des Sporenfluges anzusehen ist. In der folgenden Zeit (11. – 24. April) stiegen die Sporenzahlen bei geringen Niederschlägen stetig an, bis sie am 24. April mit einer Ausschleuderungsmenge von ca. 14.300 Sporen/m³ Luft ihren Höhepunkt erreichten. Danach gingen die Sporenausschleuderungen mangels fehlenden Niederschlags und zurückgehenden Sporenpotentials zurück und stiegen erst wieder durch die höheren Niederschläge ab dem 12. Mai an. Nach dem 28. Mai verebbte der Sporenflug trotz hoher Niederschläge (Abbildungen 31 und 32).

Während im Jahr 1999 ein extrem starker Fruchtbefall verzeichnet werden mußte, war das Jahr 2000 nahezu befallsfrei. Der Blattbefall kann als mittelstark eingestuft werden. Die ersten eindeutigen Blattsymptome wurden am 15. Mai beobachtet. Diese Symptome wurden durch die Ausschleuderungen am 24. und 25. April verursacht. Weitere Infektionstage waren der 30. April, sowie 18., 19., 22. Mai und 29. bis 31. Mai (Abbildungen 33 und 34). Die wenigen Infektionstage und günstige Spritztermine können möglicherweise den geringen Fruchtbefall erklären.

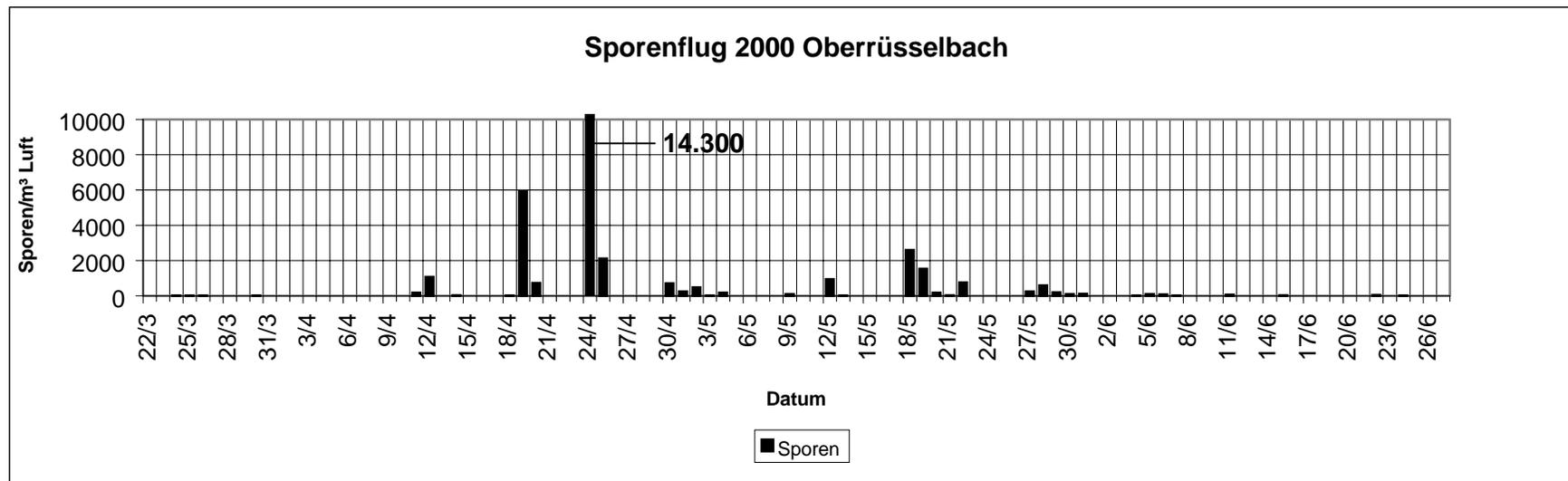


Abbildung 31: Sporenflug am Standort Oberrüsselbach 2000

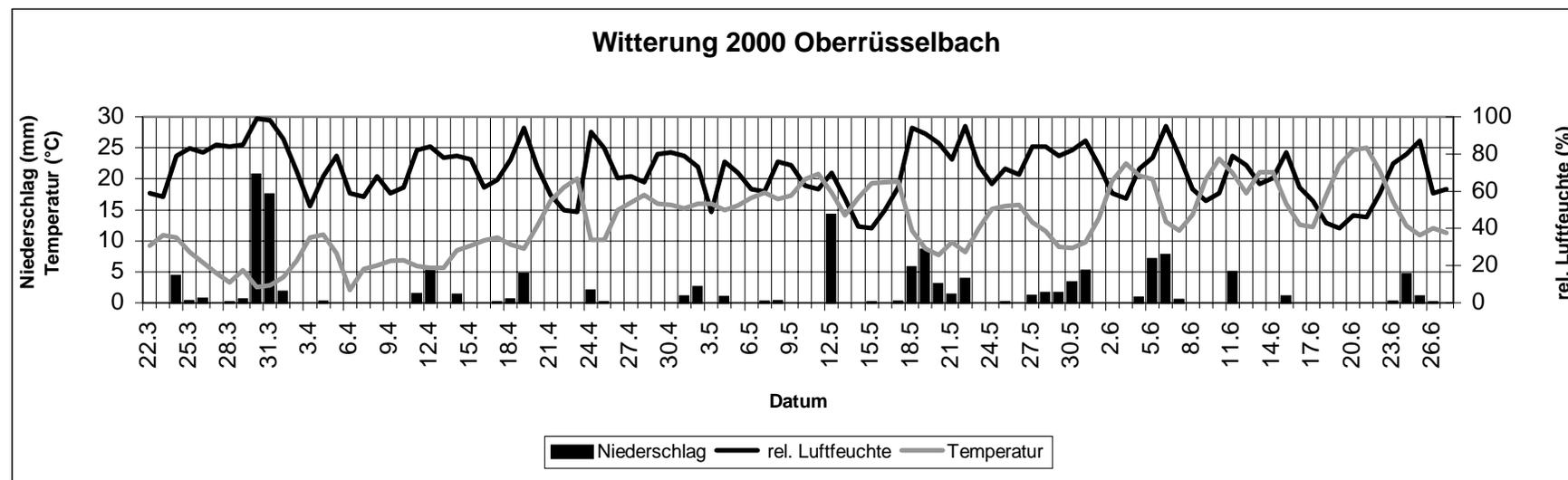


Abbildung 32: Witterung am Standort Oberrüsselbach 2000

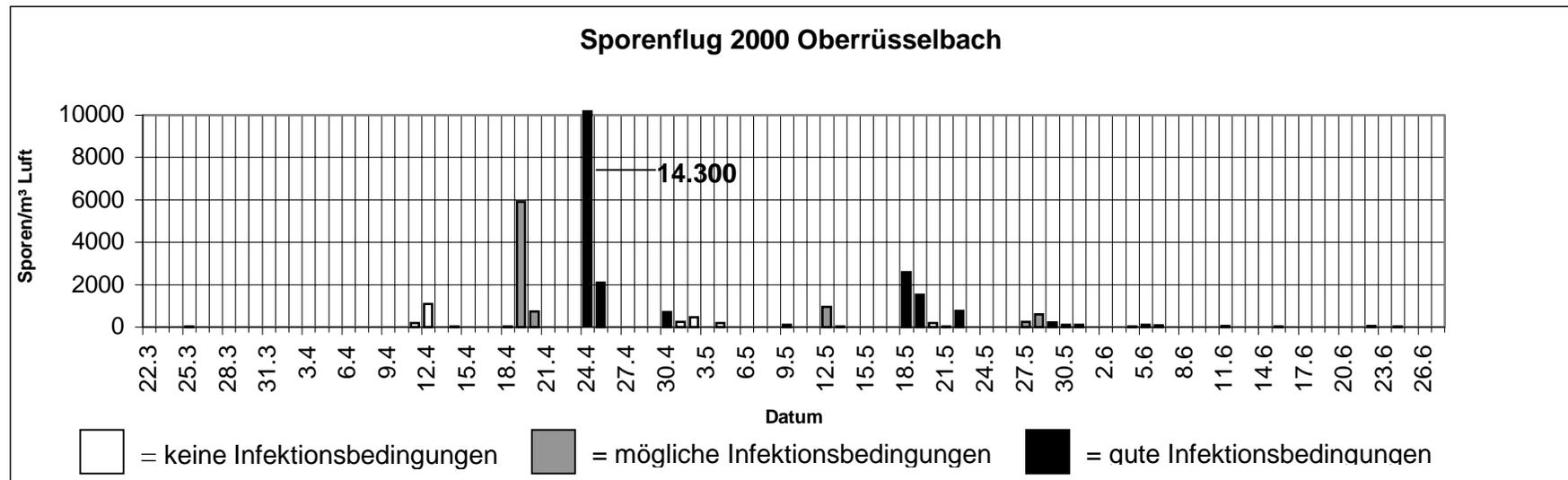


Abbildung 33: Sporenflug und Infektionsbedingungen am Standort Oberrüsselbach 2000

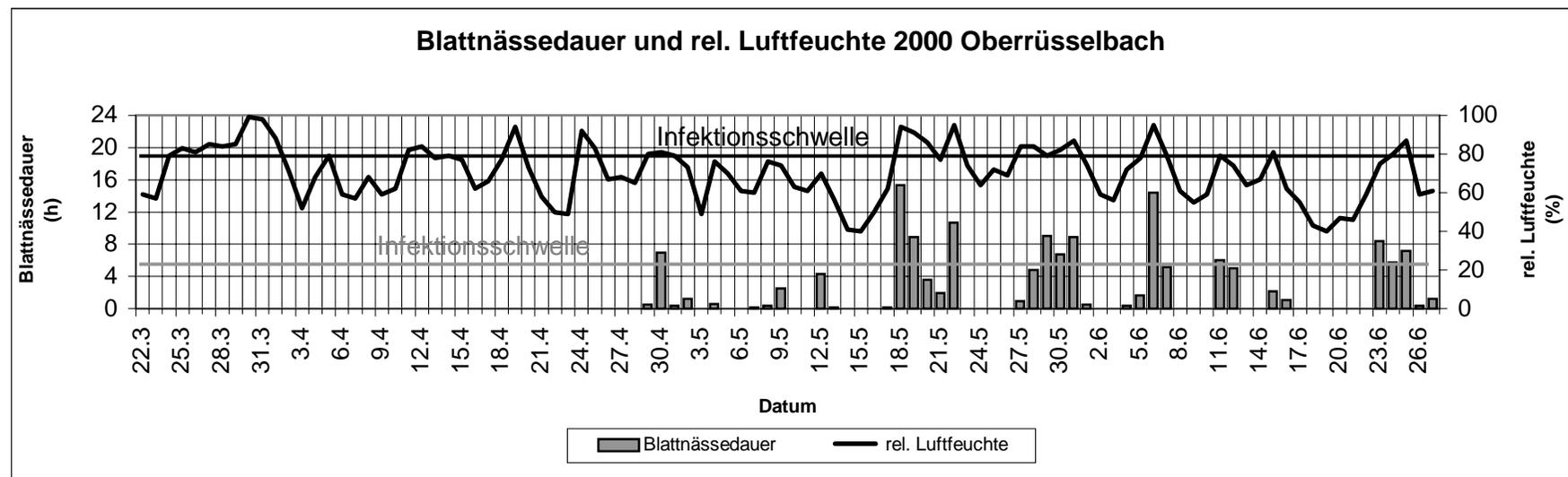


Abbildung 34: Blattnässedauer am Standort Oberrüsselbach 2000

5.2.3.2 Sporenflug am Standort Hiltspoltstein

Mit dem 24. März hat auch am Standort Hiltspoltstein der Beginn des Sporenfluges (10 Sporen/m³ Luft) eingesetzt. Diese Ausschleuderung und die folgenden bis zum 11. April waren allerdings so gering, daß man hier wohl von "frühreifen" Sporen sprechen muß. Selbst die hohe Niederschlagsmenge am 30. März mit nicht ganz 40 mm führte lediglich zur Entlassung von 5 Sporen pro m³ Luft und Tag. Am 12. April wurden erstmals knapp 100 Sporen/m³ Luft ausgeschleudert. Die Tausendermarke (1892 Sporen/m³ Luft) wurde am 19. April bei einer Regenmenge von 4,6 mm übertroffen, die Höchstmarke mit 6430 Sporen/m³ Luft (bei 2,4 mm Niederschlag) wurde am 24. April erreicht. Aus diesen Zahlen wird ersichtlich, daß nicht die Niederschlagsmenge der entscheidende Faktor für die Ausschleuderungsmenge ist, sondern das Reifestadium der Sporen. Eine letzte höhere Sporenfreilassung ereignete sich am 2. Mai mit 2455 Sporen/m³ Luft (7 mm). Danach gehen die Sporenentlassungen deutlich zurück, bis am 31. Mai die letzten Sporen von der Sporenfalle registriert wurden (Abbildungen 35 und 36).

Wie in den Jahren zuvor traten die ersten Blattsymptome zum gleichen Zeitpunkt auf wie am Standort Oberrüsselbach (Mitte Mai). Fruchtfektionen konnten nicht beobachtet werden.

Sichere Infektionstage an diesem Standort waren der 24. und 25. April, der 1. Mai, der 18. bis 20. Mai und der 31. Mai. Mögliche Infektionen fanden am 18. April und 2. Mai statt. Die restlichen Ausschleuderungen blieben mangels fehlender Infektionsbedingungen wirkungslos (Abbildungen 37 und 38).

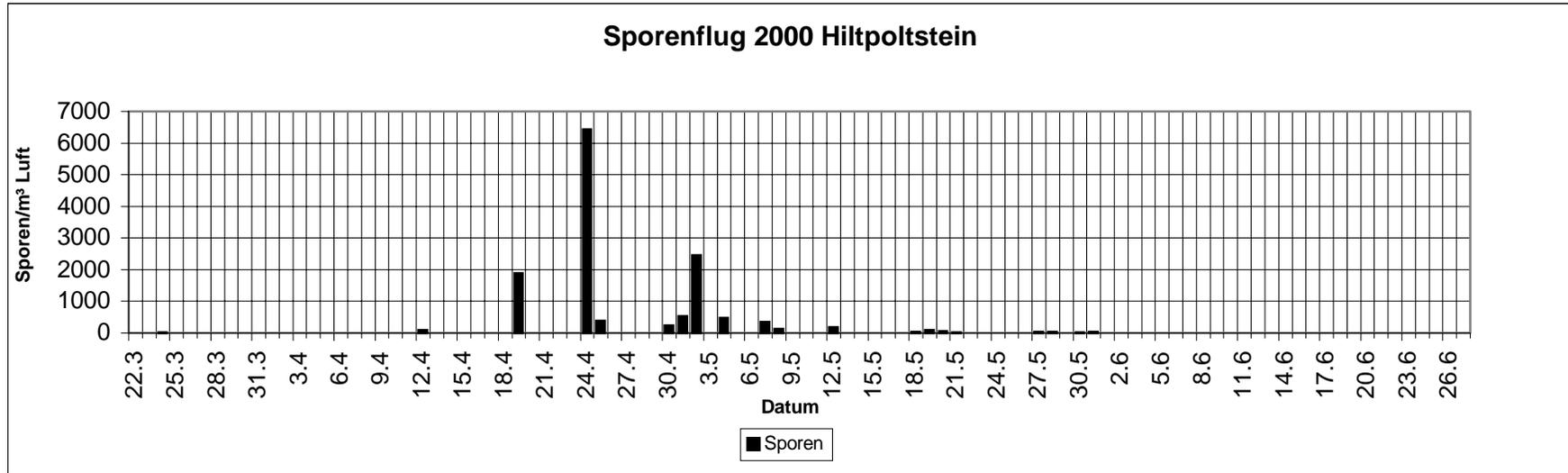


Abbildung 35: Sporenflug am Standort Hiltpoltstein 2000

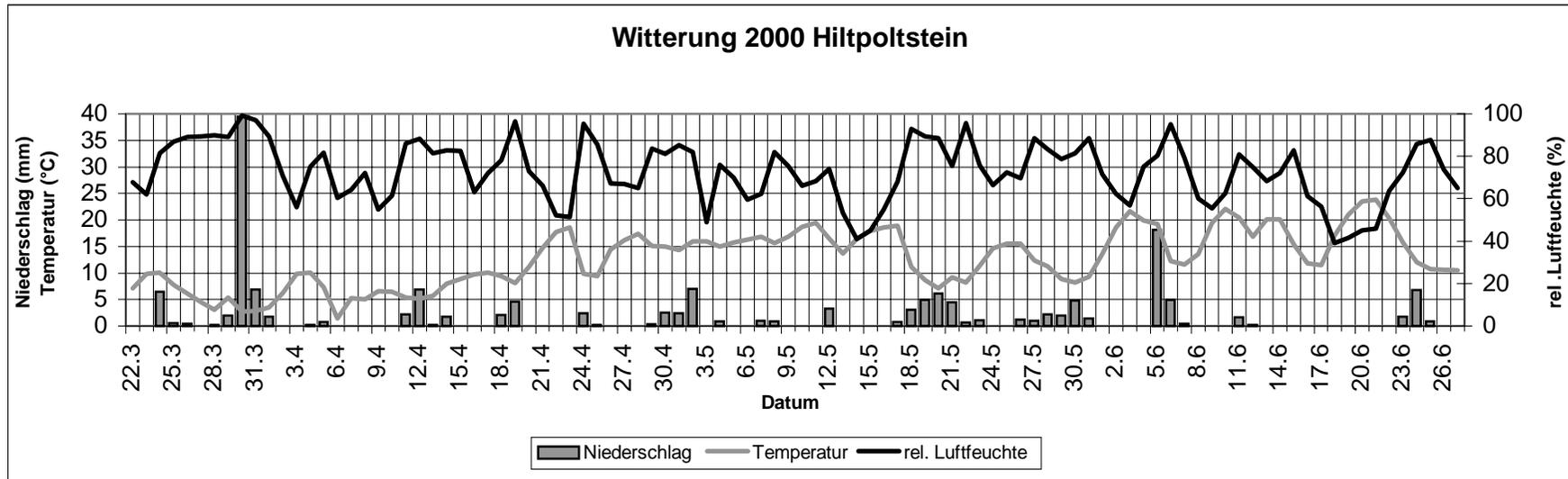


Abbildung 36: Witterung am Standort Hiltpoltstein 2000

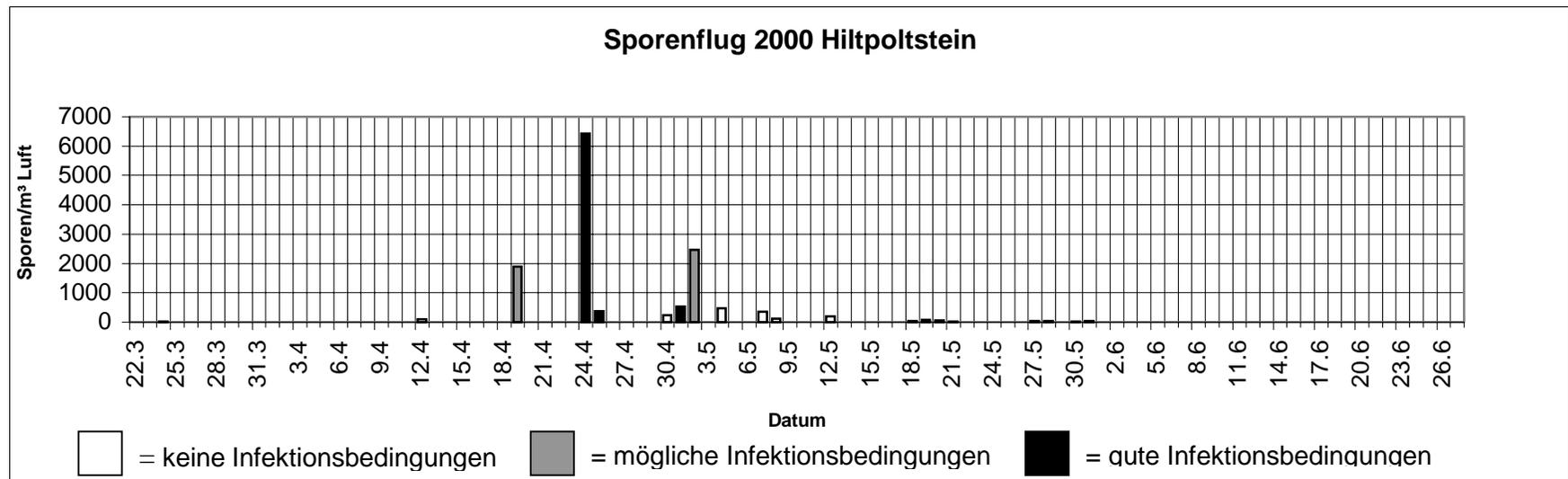


Abbildung 37: Sporenflug und Infektionsbedingungen am Standort Hiltoltstein 2000

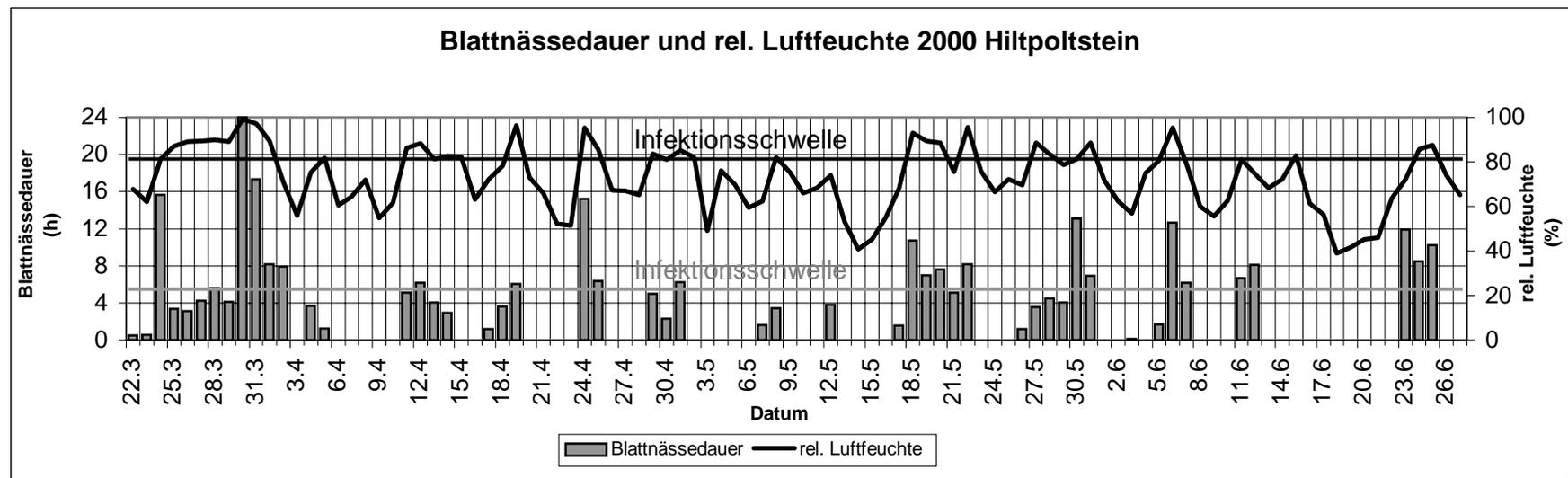


Abbildung 38: Blattnässedauer am Standort Hiltoltstein 2000

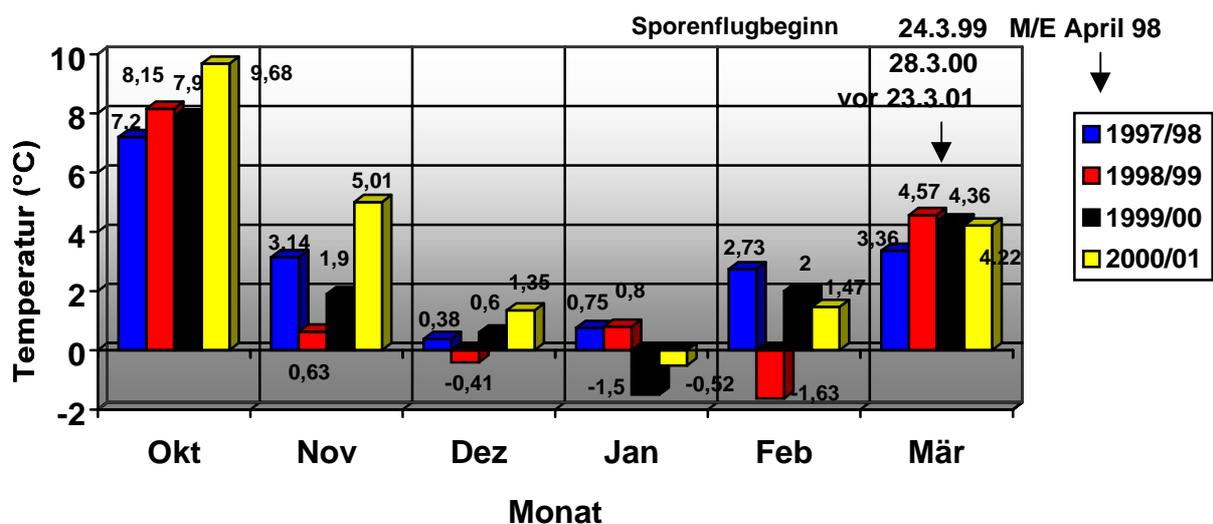
5.2.4 Beginn des Sporenfluges

Für den Reifungsprozeß der Ascosporen scheint die Temperatur der entscheidende Parameter zu sein. Sicherlich hat auch der Niederschlag einen Einfluß, da die Sporen zur Reifung Feuchtigkeit benötigen. Die dürften aber während der Herbst- und Wintermonate ausreichend vorhanden sein. Tabelle 14 zeigt den Beginn der Sporenflüge der Jahre 1998 bis 2001.

Tabelle 14: Beginn der Ascosporenflüge 1998 bis 2001

Jahr	Ascosporenflugbeginn
1998	Mitte bis Ende April (geschätzt)
1999	28. März
2000	24. März
2001	vor 23. März (Sporenfallenaufbau am 23.März)

In der Abbildung 39 ist zu erkennen, daß vor allem in den Monaten Oktober, November und Dezember des Jahres 2000 die Temperaturen deutlich höher waren als in den anderen Jahren. Geht man davon aus, daß bei einer Temperatur knapp über dem Nullpunkt die Entwicklung zum Stillstand kommt (Ascosporenkeimung auch noch bei 5 °C), sind die Monate November (Ausnahme Jahr 2000/01), Dezember, Januar und wohl auch Februar zu vernachlässigen. Vergleicht man die Temperatur der verbleibenden Monate (Oktober und März) mit dem Beginn der Sporenflüge, so erkennt man eine Korrelation. Demnach fördern Temperaturen über 3 °C (bis 4 °C) die Reifung der Ascosporen.

**Abbildung 39:** Durchschnittstemperaturen der Monate Oktober bis März der Jahre 1997 bis 2001

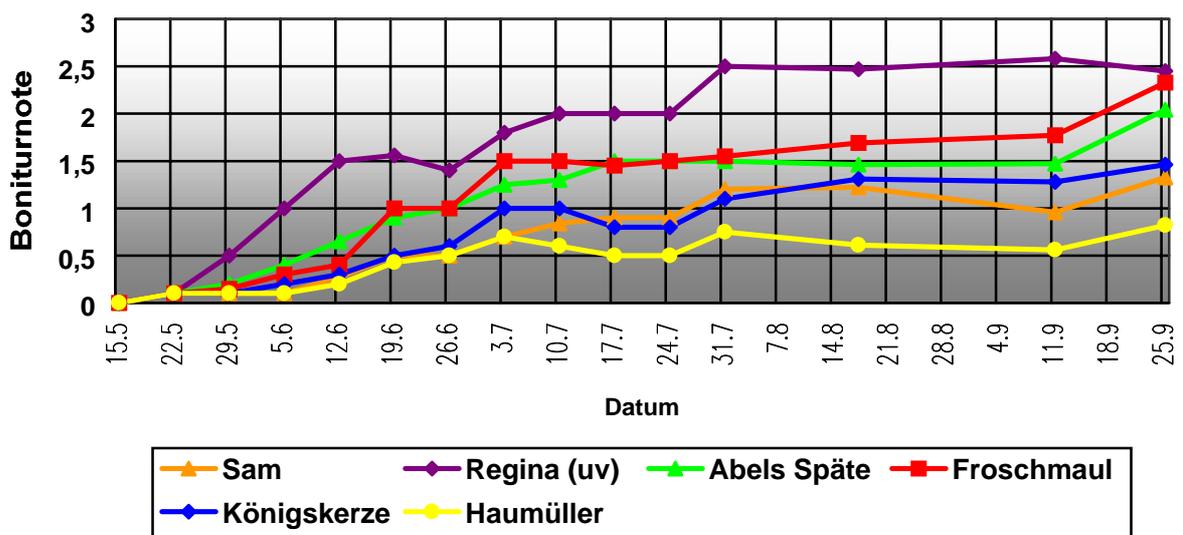
5.2.5 Sortenanfälligkeit

Um eine Aussage über die Sortenanfälligkeit machen zu können, wurden die Sorten im Jahr 2000 nach dem Blattbefall und in den Jahren 1999 bis 2001 nach der verbleibenden Belaubung bonitiert.

5.2.5.1 Blattbefall

Da nur bei den Sorten "Sam", "Regina" (unveredelt = uv), "Abels Späte", "Froschmaul", "Königskerze" und "Haumüller" der gleiche Pflanzenschutz erfolgte, wurden diese für die Bonitur berücksichtigt. Die Bonitur der Sorte "Burlat" und "Regina" erfolgte gesondert, da hier ein Spritzversuch mit verschiedenen Fungiziden durchgeführt.

Wie schon erwähnt, konnten die ersten Blattsymptome im Jahr 2000 am 15. Mai beobachtet werden. Bei allen Sorten zeigte sich von Mitte Mai bis etwa Ende Juli eine stetige Zunahme der Befallssymptome. Danach veränderten sich die Symptome nur noch in geringem Maße.



0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall

4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

Abbildung 40: Bonitur nach Blattbefall

Nur vom vorletzten zum letzten Boniturtermin kam es mit Ausnahme der Sorte "Regina" zu einem Anstieg der Werte.

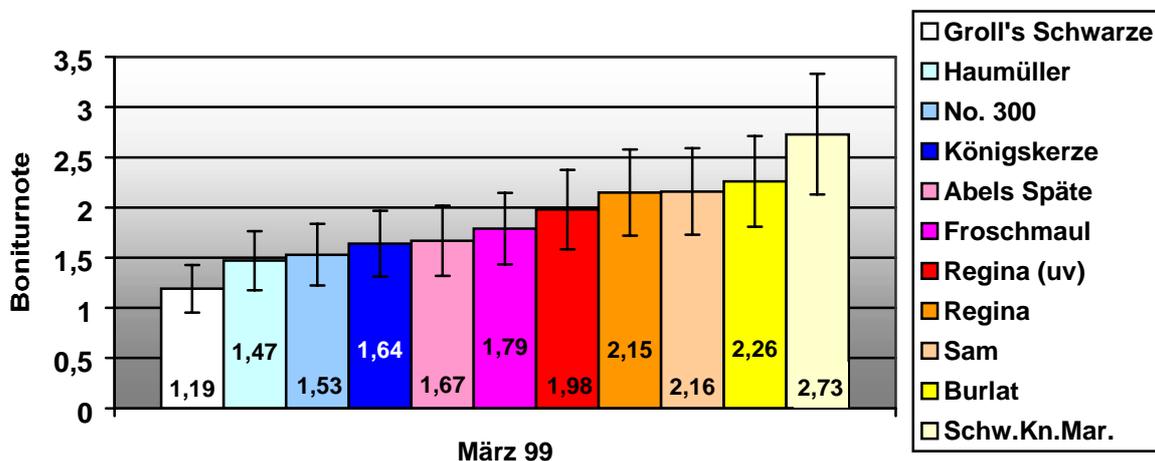
Ende September zeigte die Sorte "Regina (uv)" mit einer Boniturnote von 2,46 einen schwachen bis mittleren Befall. Es folgten "Froschmaul" (2,33), "Abels Späte" (2,04), "Königskerze" (1,46) und "Sam" (1,33). Die größte Resistenz gegen die Blattbräune wies die Sorte "Haumüller" auf. Mit einem Boniturnote von 0,82 zeigte die Sorte keinen bis sehr schwachen Befall (Abbildung 40).

5.2.5.2 Belaubung

5.2.5.2.1 März 1999

Die Laubbonitur (hängengebliebenes Laub) im folgenden Frühjahr (März) zeigte deutliche Sortenunterschiede (Abbildung 41).

Die wenigsten Blätter wies die Sorte "Grolls Schwarze" mit einer Boniturnote von 1,19 auf, gefolgt von den Sorten "Haumüller" (1,47), "No. 300" (1,53), "Königskirsche" (1,64) und "Abels Späte" (1,67). Einen Mittelplatz mit einer Boniturnote von 1,79 nimmt die Sorte "Froschmaul" ein. Einen etwas höheren Grad an Belaubung zeigten die Sorten "Regina", veredelt und unveredelt (uv), sowie "Sam" und "Burlat" mit Werten um 2 (1,98 bis 2,26). Den höchsten Belaubungsgrad (2,73) wies die Sorte "Schwarze Knorpelkirsche Margetshöchheim" (Sch.Kn.Mar.) auf.



0 = keine Blätter, 1 = sehr wenig Blätter, 2 = wenige Blätter, 3 = zahlreiche Blätter,
4 = viele Blätter, 5 = sehr viele Blätter

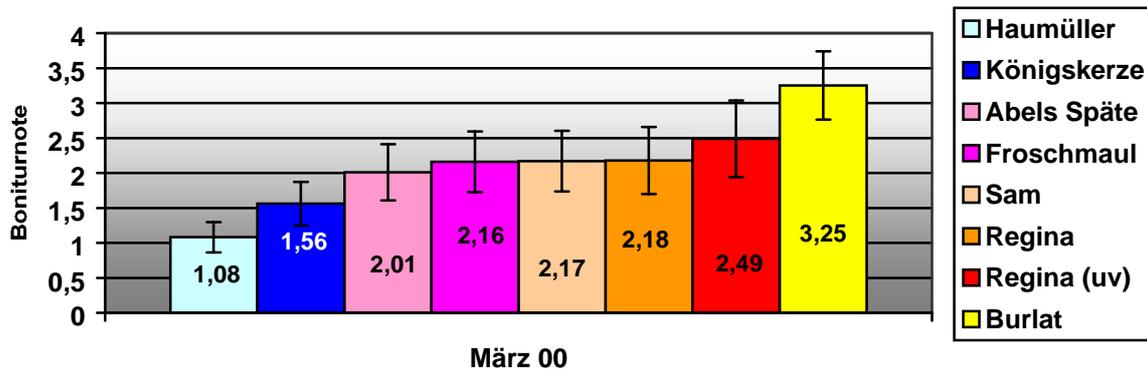
Abbildung 41: Laubbehang der Sorten im März 1999

5.2.5.2.2 März 2000

Als Folge des starken Fruchtbefalls im Jahr 1999 wurde die Sorte "Schwarze Knorpelkirsche Margetshöchheim" gerodet. Die Sorten "Grolls Schwarze" und "No. 300" fielen dem Markttrend nach großen, festen Kirschen zum Opfer.

Bei den verbliebenen Sorten zeigte wieder "Haumüller" die geringste Belaubung. Mit einer Boniturnote von 1,08 war diese sogar kleiner als im Vorjahr. Die Sorten "Königskirsche", "Abels Späte", "Froschmaul" und "Burlat" nahmen die gleichen Positionen wie im Vorjahr ein, während die restlichen Sorten ihre Positionen tauschten. Abgesehen von "Königskerze" und "Sam", die in etwa ihre Boniturwerte behielten, ging die Tendenz zu einem stärkeren Behang. Die Sorte "Burlat", die für eine hohe Blattanfälligkeit bekannt ist, bildete auch im

Jahr 2000 das Schlußlicht (Abbildung 42). Dieses Ergebnis korreliert mit dem stärker beobachteten Befall im Jahr 1999.



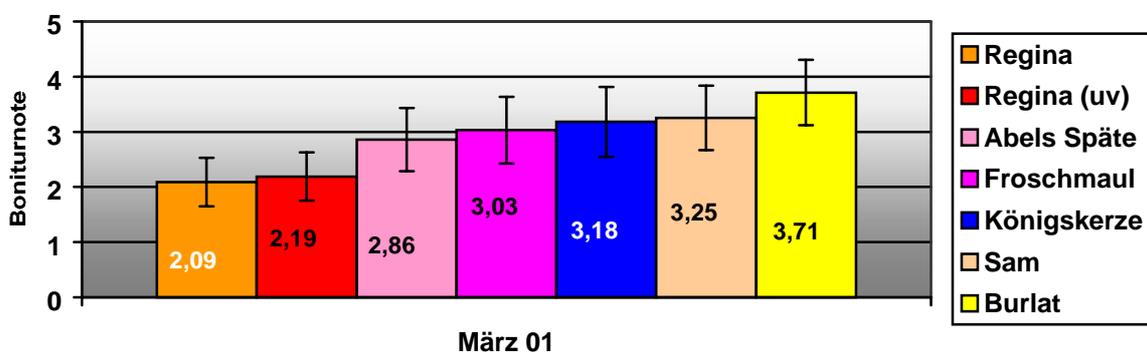
0 = keine Blätter, 1 = sehr wenig Blätter, 2 = wenige Blätter, 3 = zahlreiche Blätter,
4 = viele Blätter, 5 = sehr viele Blätter

Abbildung 42: Laubbehang der Sorten im März 2000

5.2.5.2.3 März 2001

Die Sorte "Haumüller" wurde aufgrund eines Virusbefalls im Winter 2000/2001 gerodet.

Die Laubbonitur weicht doch sehr deutlich von denen der beiden letzten Jahre ab. Mit Ausnahme der Sorte "Regina" stiegen alle Boniturnoten deutlich an. Der Wert der Sorte "Königskerze" verdoppelte sich nahezu, der von "Sam" wuchs um mehr als eins. Von den verbliebenen Sorten belegte "Burlat" mit einer Note von 3,71 den letzten Platz. Mit ebenfalls sehr hohen Noten folgten "Sam" (3,25), "Königskerze" (3,18), "Froschmaul" (3,03) und "Abels Späte" (2,86). Auffällig war, daß die Sorte "Regina", die bisher die hinteren Plätze belegte, diesmal am besten abschnitt (Abbildung 43).



0 = keine Blätter, 1 = sehr wenig Blätter, 2 = wenige Blätter, 3 = zahlreiche Blätter,
4 = viele Blätter, 5 = sehr viele Blätter

Abbildung 43: Laubbehang der Sorten im März 2001

5.3 Bekämpfung

Zur Ermittlung von günstigen Spritzterminen und wirksamen Fungiziden wurden in den Jahren 2000 und 2001 Spritzversuche durchgeführt. Um die Effektivität dieser Bekämpfungsmaßnahmen überprüfen zu können, wurden die Blätter und Früchte nach dem Befall bonitiert.

5.3.1 Blatt- und Fruchtbonitur

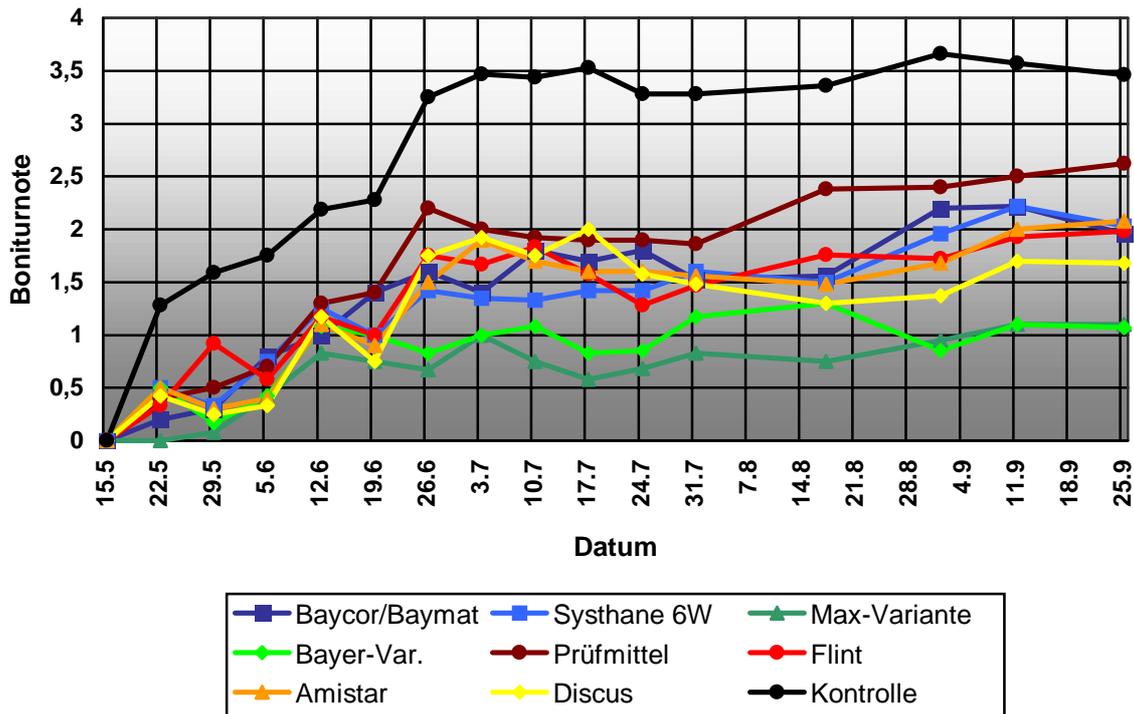
Der Fruchtbefall am Standort Oberrüsselbach war im Jahr 2000 so gering, so daß er nicht zahlenmäßig erfaßt wurde. Die Fruchtbonitur im Jahr 2001 erfolgte nur bei der Sorte "Regina". Die Sorte "Burlat" war durch Vogelfraß und Platzer nicht zu bonitieren.

5.3.1.1 Spritzversuch 2000

5.3.1.1.1 Sorte "Burlat" + "Regina" (= BURE)

Von Mitte Mai bis Anfang Juli nahmen die Befallssymptome an Intensität zu, verblieben dann bis Ende September auf einem Niveau. Der stetige Anstieg bis Anfang Juli ist mit dem Sporenflug zu erklären. Die Sporenausschleuderungen von Ende April bis Anfang Juni haben immer wieder zu Infektionen geführt, deren Folge zunehmende Befallssymptome waren.

In der Abbildung 44 erkennt man auf den ersten Blick, daß die unbehandelten Kontrollbäume den stärksten Befall zeigten. Mit einer Boniturnote um 3,5 (Ende September), das entspricht einem mittleren bis starkem Befall, war sie fast um eine ganze Note schlechter als die mit dem Prüfmittel von BASF (Note 2,6) behandelten Bäume. Auch diese Behandlung war optisch deutlich von den anderen zu unterscheiden. Kein Unterschied konnte bei den Behandlungen mit den Azolen Baycor/Baymat, Systhane 6W und den Strobilurinen Amistar und Flint festgestellt werden. Die Boniturnoten dieser Behandlungen lagen bei zwei, d.h. es lag ein schwacher Befall vor. Das dritte Strobilurin "Discus" war etwas schwierig zu bonitieren, da hier die Symptome in ihrer Ausprägung etwas von der Norm abwichen. Die Symptome zeigten sich als gelblichgrüne, verwaschene Flecken, die im Laufe der Zeit größer wurden, aber nicht so deutlich hervortraten wie bei den anderen Behandlungen. So ist die Boniturnote von 1,7 nicht ganz eindeutig. Einen sehr schwachen Befall zeigten die Parzellen, die ausschließlich mit Bayer-Fungiziden (Bayer-Variante) und der Max-Variante behandelt wurden. Die Boniturnoten dieser Varianten lagen knapp über 1.



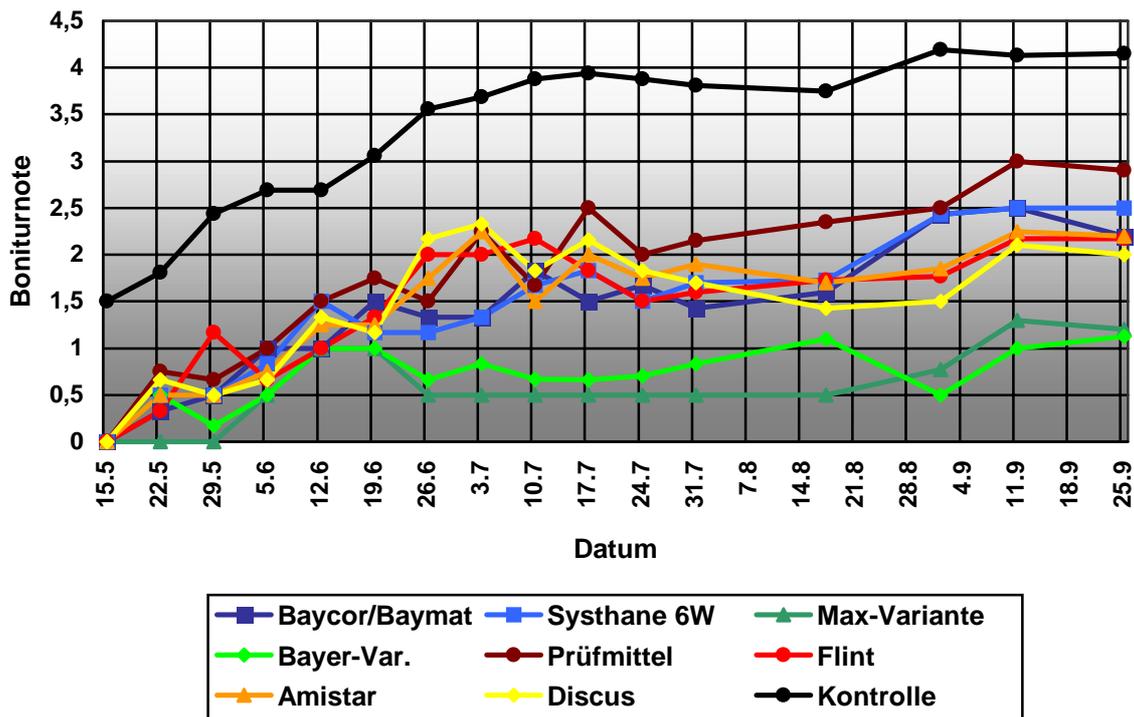
0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall
 4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

Abbildung 44: Blattbonitur "Burlat" + "Regina" (= BURE)

5.3.1.1.2 Sorte "Burlat"

In der Reihenfolge ihrer Wirksamkeit nehmen die Fungizide nahezu die gleichen Plätze wie in der Gesamtbonitur ein. Allerdings sind die Boniturnoten und damit auch der Befall höher (Abbildung 45). Dieses Ergebnis bestätigt "Burlat" als sehr anfällige Sorte.

Die Kontrollbäume der Sorte "Burlat" waren schon aus großer Entfernung zu erkennen. Fast das gesamte Laub zeigte Befallssymptome. Dieser starke Befall spiegelt sich auch in der Boniturnote von 4,15 wieder. Dem BASF-Prüfmittel mit einer Note von 2,9 folgt Systhane 6W mit einem schwachen bis mittleren Befall (2,5). Wie auch schon bei BURE haben Baycor/Baymat, Amistar und Flint Ende September die gleiche Boniturnote. Mit 2,2 unterscheidet sie sich auch nicht allzu sehr von BURE. Bei der Discus-Parzelle (2,0) zeigte sich wieder ein leicht veränderter Symptomverlauf. Erneut schnitten die beiden Varianten am besten ab, deren Boniturnoten sich im Vergleich zur Gesamtbonitur nur gering verschlechterten (Bayer: 1,13; Max: 1,2). Der geringe Unterschied zwischen den beiden Varianten ist zu vernachlässigen.



0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall
 4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

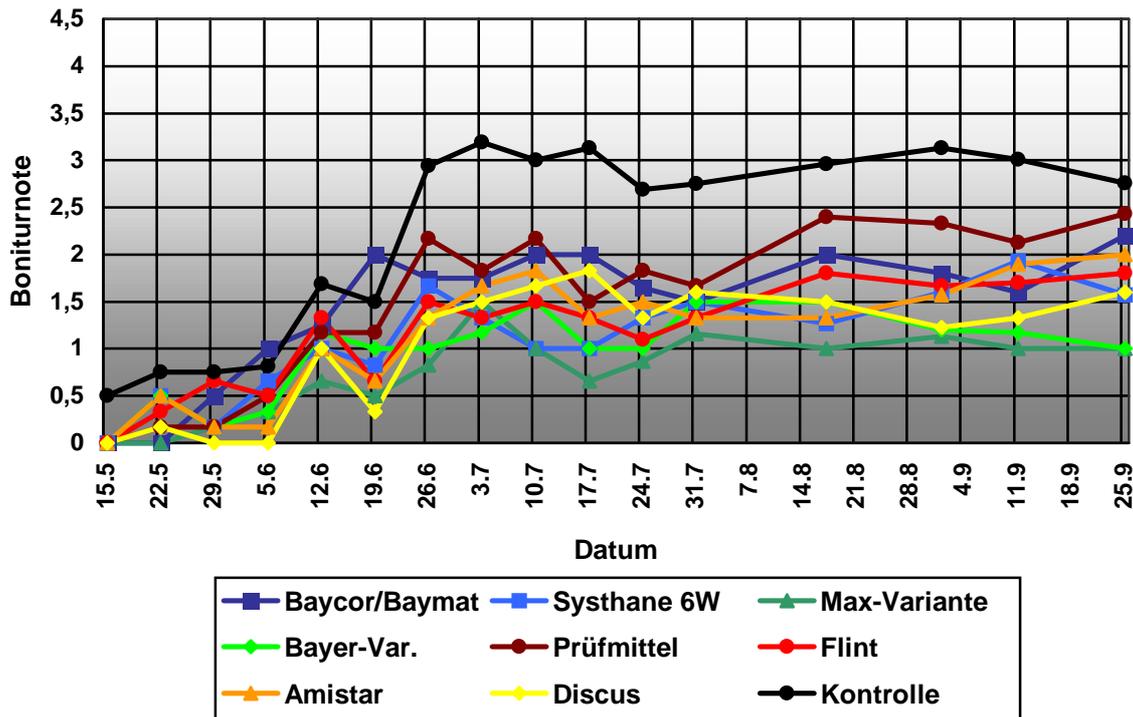
Abbildung 45: Blattbonitur "Burlat"

5.3.1.1.3 Sorte "Regina"

Der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Sorten zeigte sich bei den Kontrollbäumen. Während bei "Burlat" der Blattbefall stark war (Note 4,15), zeigte "Regina" eine klar höhere Resistenz (Note 2,76).

In der Reihenfolge der Wirksamkeit der Fungizide traten ebenfalls Verschiebungen ein (Abbildung 46). An erster Stelle - Behandlung mit der geringsten Wirksamkeit - stand erwartungsgemäß die Kontrolle. Den zweiten Platz belegte das Prüfmittel (Note 2,43). Danach folgten Baycor /Baymat (Note 2,2), Amistar (Note 2,0), Flint (Note 1,8), Discus und Sythane 6W (beide Note 1,6). Die geringsten Blattsymptome wiesen wieder die beiden Varianten (beide Note 1,0) auf.

Neben der Kontrolle zeigten die mit dem Fungizid Sythane 6W behandelten Bäume eine erhebliche niedrigere Boniturnote (um 0,9 besser) als bei der Sorte "Burlat". Ebenfalls kleiner waren die Boniturnoten der mit Flint und Discus (jeweils um 0,4 besser) behandelten Bäume. Fast unverändert zeigten sich die Noten der beiden Varianten sowie der mit Baycor/Baymat und Amistar behandelten Parzellen.



0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall
 4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

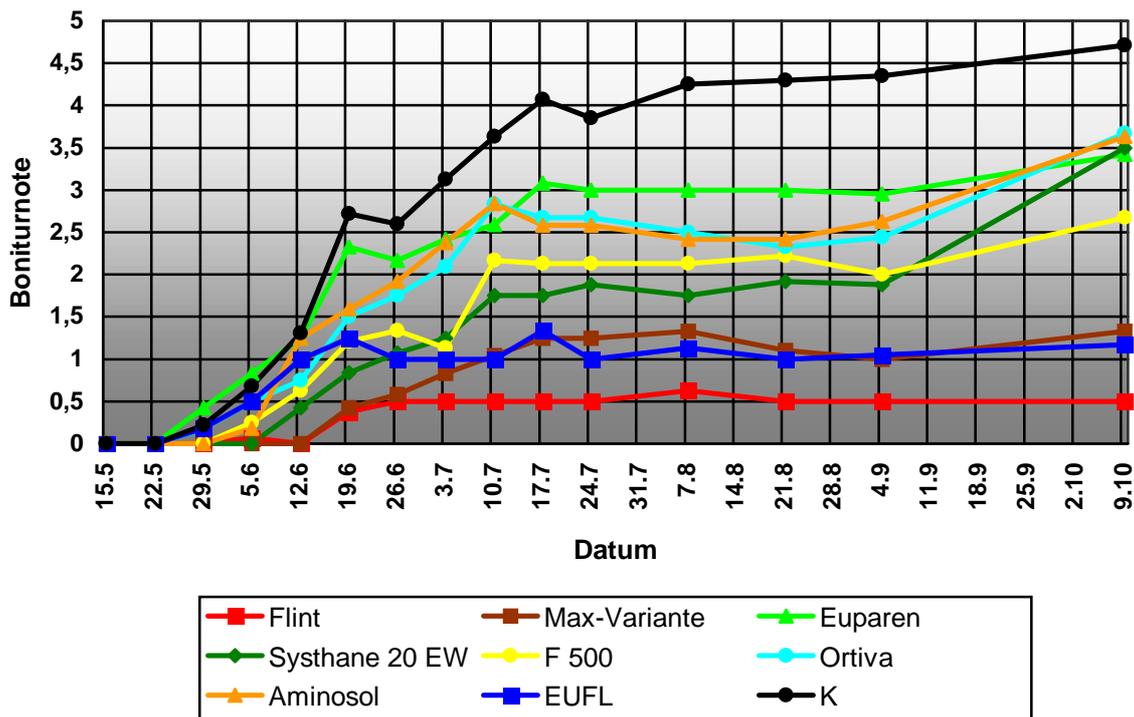
Abbildung 46: Blattbonitur "Regina"

5.3.1.2 Spritzversuch 2001

5.3.1.2.1 Sorte "Burlat" + "Regina" (= BURE)

Bei der Blattbonitur beider Sorten als Mittelwert zeigte die mit dem Fungizid Flint behandelte Parzelle (Boniturnote: 0,5) keinen bis sehr schwachen Befall. Die EUFL- und Maximal-Variante mit einer Boniturnote von knapp über eins wiesen einen schwachen Befall auf. Die mit den restlichen Fungiziden applizierten Parzellen lagen in einem Bereich von 2 bis 3 (= schwacher bis mittlerer Befall). Der deutlichst stärkste Befall (Boniturnote: 4,35) wurde an den unbehandelten Bäumen (= Kontrolle) bonitiert (Abbildung 47).

Die ersten Symptome wurden Ende Mai beobachtet. Der Befall nahm bis Anfang Juli zu und verblieb dann bis Ende September auf einem Niveau. Der am letzten Boniturtermin sprunghafte Anstieg der Boniturnoten, der mit Aminosol (Variante), Euparen, Flint und F 500 behandelten Parzellen, wurde durch die zunehmende Nekrotisierung der kranken Blätter verursacht. Da es sich hierbei um keine Befallzunahme handelt, wurden die Daten nicht weiter berücksichtigt.



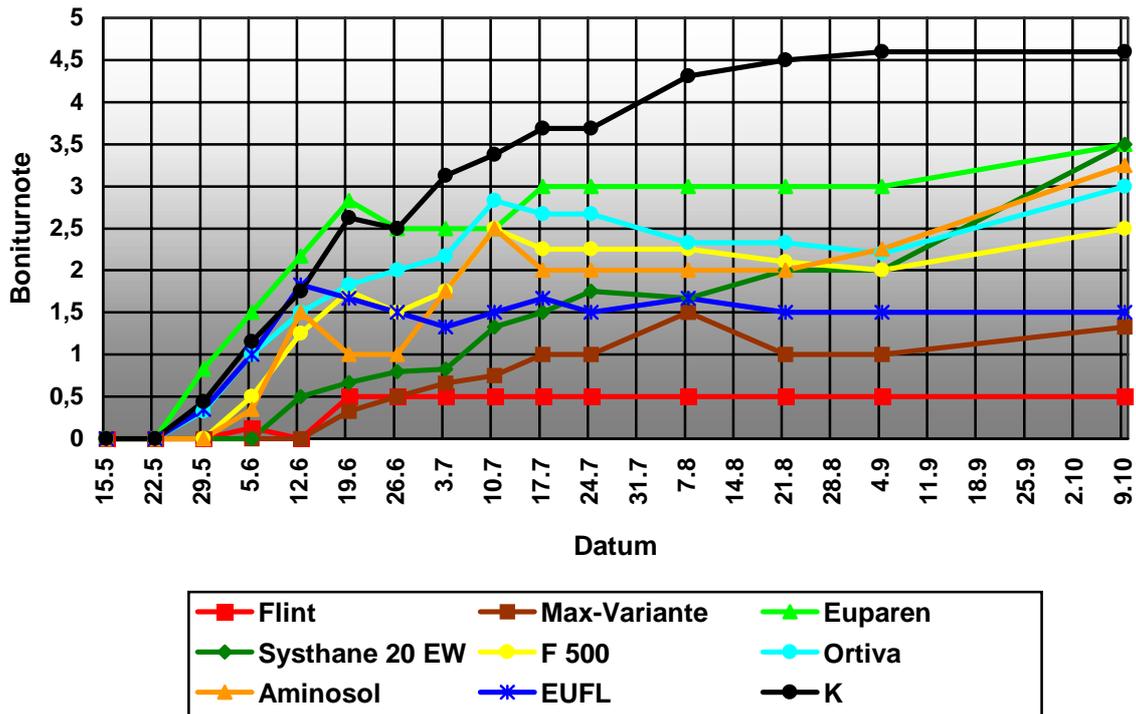
0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall
 4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

Abbildung 47: Blattbonitur "Burlat" + "Regina" (BURE)

5.3.1.2.2 Sorte "Burlat" und "Regina"

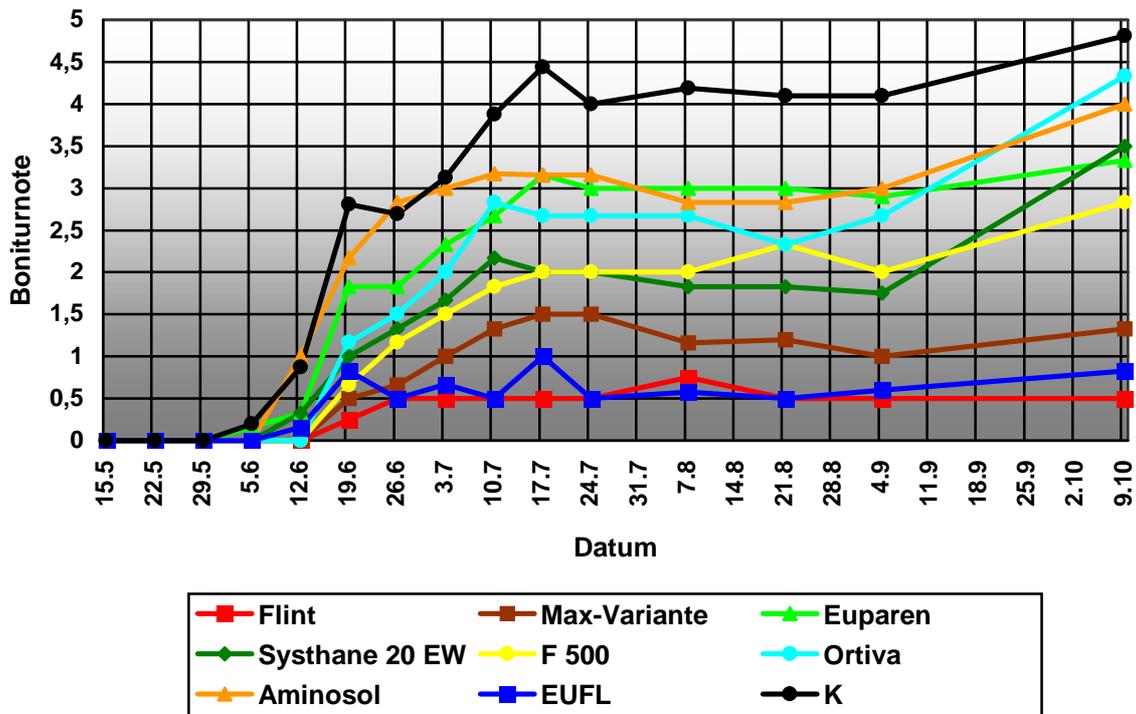
Während im Jahr 2000 die Sorte "Regina" im Vergleich zu "Burlat" einen deutlich schwächeren Befall und damit verbunden auch eine geringere Wirksamkeit der Fungizide aufwies, war der Unterschied im Jahr 2001 nur gering.

Die EUFL-Variante zeigte bei der Sorte "Burlat" eine geringere Wirkung als bei "Regina" (Note 1,5 zu 0,6). Die Aminosol-Variante und Ortiva verhielten sich umgekehrt. Die anderen Fungizide hatten bei beiden Sorten in etwa die gleiche Wirkung (Abbildungen 48 und 49). Wie bei BURE wurde der letzte Boniturtermin aus bereits erwähnten Grund vernachlässigt.



0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall
 4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

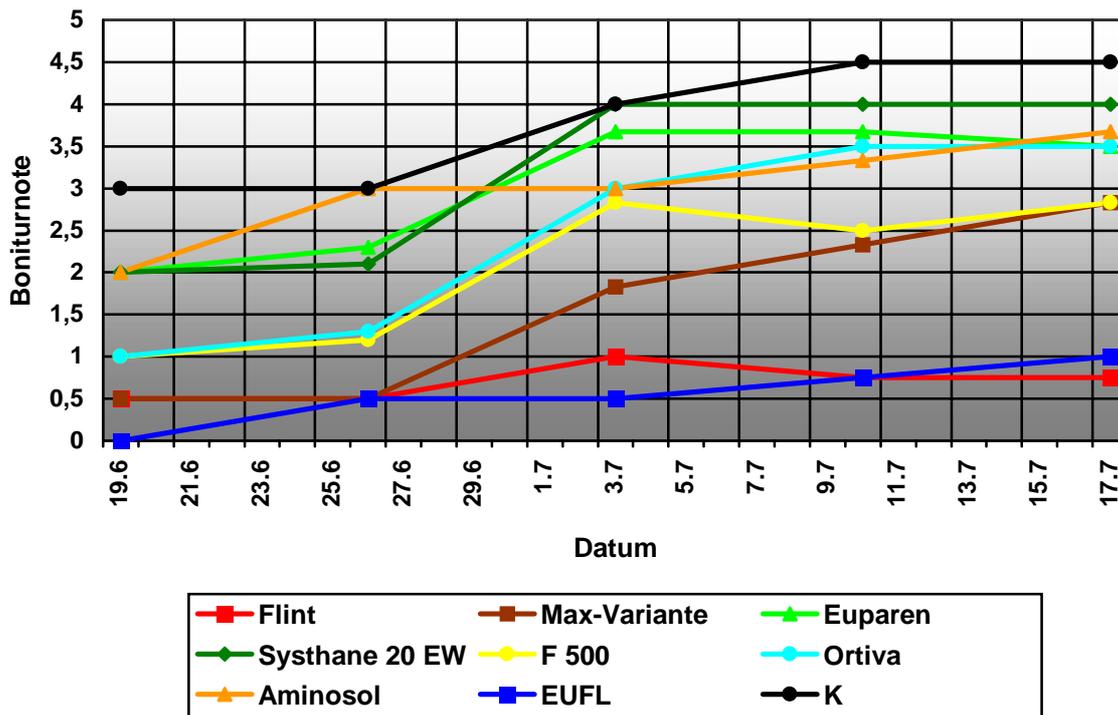
Abbildung 48: Blattbonitur "Burlat"



0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall
 4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

Abbildung 49: Blattbonitur "Regina"

Die ersten Fruchtsymptome bei der Sorte "Regina" traten sehr plötzlich und massiv auf. Während Flint und die EUFL-Variante den Befall auf einem sehr niedrigen Niveau halten konnten (Boniturnote unter 1), zeigten die anderen Behandlung keinen ausreichenden Schutz. Selbst die Maximal-Variante wies, wie die mit F 500 applizierte Parzelle, einen mittlere Befall (Note: 2,83) auf. Die anderen Behandlungen mit Boniturnoten von 3,5 bis 4 offenbarten einen mittleren bis starken Befall und schnitten damit nicht viel besser ab als die unbehandelten Bäume (Abbildung 50).



0 = kein Befall, 1 = sehr schwacher Befall, 2 = schwacher Befall, 3 = mittlerer Befall
4 = starker Befall, 5 = sehr starker Befall

Abbildung 50: Fruchtboniturbonitur "Regina"

5.3.2 Wirkungsgrad

Der Wirkungsgrad macht eine Aussage über die tatsächliche Wirksamkeit der Fungizide, indem er die Befallsstärken der behandelten Bäume mit denen der nicht behandelten Bäume (= Kontrolle) ins Verhältnis setzt. Aus Tabelle 15 (Jahr 2000) und 16 (Jahr 2001) sind die Boniturnoten sowie die daraus errechneten Befallsstärken und Wirkungsgrade der Fungizide zu entnehmen. In den Abbildungen 51 bis 53 (Jahr 2000) und 54 bis 57 (Jahr 2001) sind die Wirkungsgrade für die Sorten graphisch dargestellt.

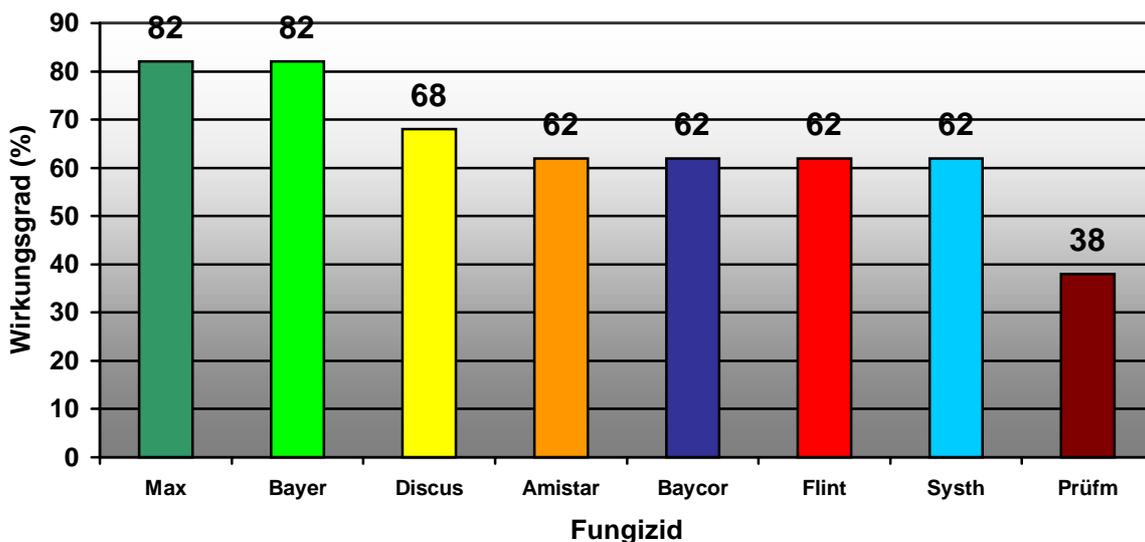
5.3.2.1 Spritzversuch 2000

Tabelle 15: Errechnete Befallsstärken (%) und Wirkungsgrade (%) für das Jahr 2000

Behandlung	Boniturnote			Befallsstärke (%)			Wirkungsgrad (%)		
	B+R	B	R	B+R	B	R	B+R	B	R
Sorte									
Kontrolle	3,5	4,2	2,8	65	84	45	0	0	0
Prüfmittel	2,6	2,9	2,4	40	47,5	35	38	43	22
Amistar	2,0	2,2	2,0	25	30	25	62	64	44
Baycor/Baymat	2,0	2,2	2,2	25	30	30	62	64	33
Flint	2,0	2,2	1,8	25	30	22	62	64	51
Systhane 6W	2,0	2,2	1,6	25	30	19	62	64	58
Discus	2,7	2,0	1,6	20,5	25	19	68	70	58
Bayer-Variante	1,1	1,2	1,0	11,5	13	10	82	85	78
Max-Variante	1,1	1,2	1,0	11,5	13	10	82	85	78

B = Burlat R = Regina

Die Abbildung 51 zeigt die Wirkungsgrade der Fungizide als Mittelwert beider Sorten. Wie nicht anders zu erwarten war, wiesen die beiden Varianten mit jeweils 82 % die höchsten Wirkungsgrade auf. Es folgten Discus mit 68 %, Amistar, Baycor/Baymat, Flint und Systhane 6W mit jeweils 62 % und das Prüfmittel mit 38 %.

**Abbildung 51:** Wirkungsgrad der Fungizide bei "Burlat" + "Regina" (Blatt)

Bei der Sorte "Burlat" waren die Wirkungsgrade der Fungizide etwas höher. Mit 85 % standen die Varianten wieder an erster Stelle. Die Werte für die anderen Fungizide sind aus der Abbildung 52 zu entnehmen.

Die Wirkungsgrade der Fungizide sind bei der Sorte "Regina" niedriger. Die besten Wirkungen hatten auch hier die beiden Varianten (78 %). Einen Wirkungsgrad von je 58 % zeigten Discus und Systhane 6W. Mit Flint (51 %) beginnend, verlieren die Fungizide Amistar (44 %), Baycor/Baymat (33 %) und Prüfmittel (43 %) deutlich an Wirkung (Abbildung 53).

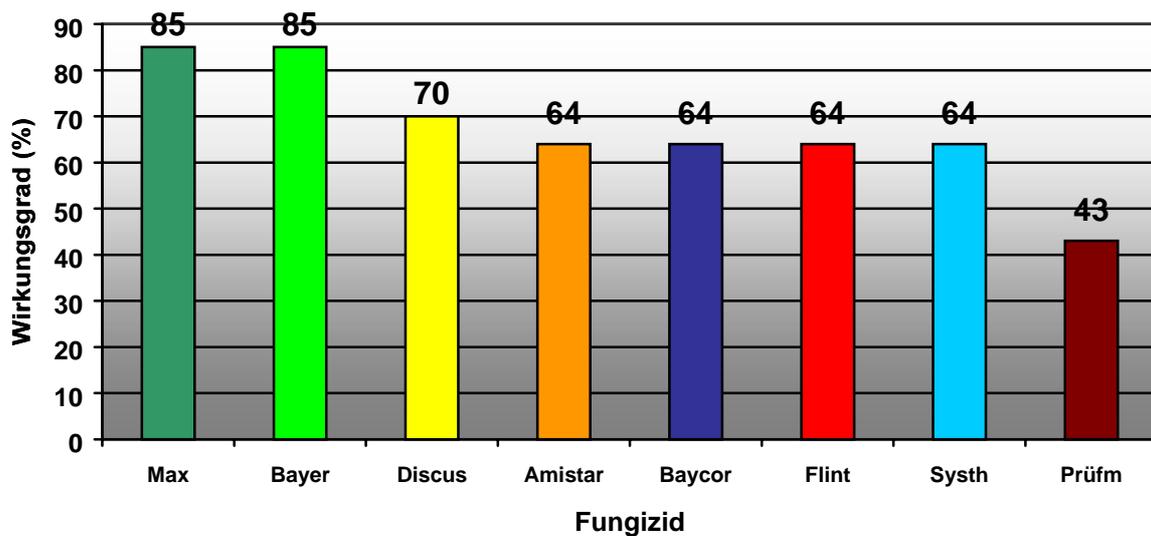


Abbildung 52: Wirkungsgrad der Fungizide bei der Sorte "Burlat" (Blatt)

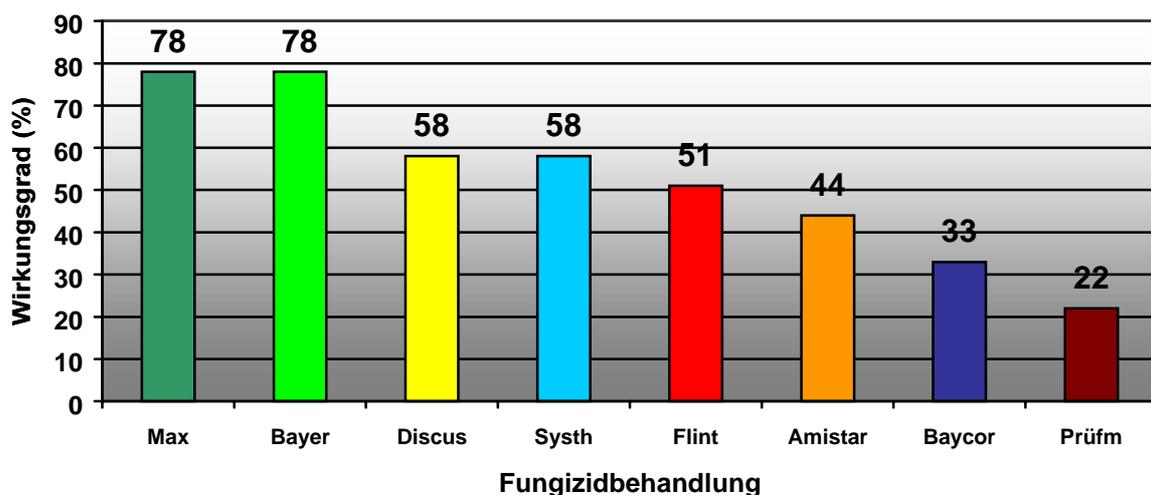


Abbildung 53: Wirkungsgrad der Fungizide bei Sorte "Regina" (Blatt)

5.3.2.2 Spritzversuch 2001

Tabelle 16: Errechnete Befallsstärken (%) und Wirkungsgrade (%) für das Jahr 2001

Behandlung	Boniturnote				Befallsstärke (%)				Wirkungsgrad (%)			
	B+R	B	R	RF	B+R	B	R	RF	B+R	B	R	RF
Sorte												
Flint	0,5	0,5	0,5	1	5	5	5	10	94	95	93	89
EUFL	1,1	1,5	0,6	0,8	10,8	17,5	6	7,5	88	81	93	92
Max	1	1	1	2,5	10	10	10	37,5	89	89	88	58
F 500	2	2	2	2,7	25	25	25	42,5	71	73	70	53
Euparen	3	3	2,9	3,5	48,8	50	47,5	65	44	46	42	28
Sythane 20 EW	1,9	2	1,8	4	23,2	25	21,3	80	73	73	74	11
Aminosol	2,6	2,3	3	3,5	40,8	31,3	50	65	53	66	39	28
Ortiva	2,4	2,2	2,7	3,5	36	30	41,8	65	59	67	49	28
Kontrolle	4,4	4,6	4,1	4,5	87	92	82	90				

B = Burlat R = Regina RF = Regina Frucht

Aus den Abbildungen 54 bis 57 sind die Wirkungsgrade der Fungizide zu entnehmen. Abbildung 54 zeigt den Wirkungsgrad der Fungizide als Mittelwert beider Sorten beim Blatt, die Abbildungen 55 und 56 die Wirkungsgrade der Fungizide der einzelnen Sorten beim Blatt. Der Wirkungsgrad der Fungizide bei der Frucht ist in Abbildung 57 dargestellt.

Da bereits die Befallsbonituren keine großen Differenzen zwischen den beiden Sorten aufwiesen, zeigten die daraus errechneten Wirkungsgrade auch keine großen Abweichungen. Wünschenswerte Wirkungsgrade um die 90 % wiesen das Fungizid Flint und die Max-Variante auf. Die EUFL-Variante, ebenfalls mit einem Wirkungsgrad über 90 % bei der Sorte "Regina", fiel bei der Sorte "Burlat" mit einem Wirkungsgrad von 81 % leicht ab. Wirkungsgrade von knapp über 70 % besaßen F 500 und Sythane 20 EW. Deutlich unzureichende Wirkungsgrade mussten bei den Fungiziden Euparen und Ortiva und der Aminosol-Variante festgesellt werden.

Nur die mit Flint und der EUFL-Variante behandelten Parzellen konnten den Fruchtbefall bei der Sorte "Regina" auf einem niedrigen Niveau halten. Der Wirkungsgrad dieser Mittel lag um 90 %. Alle anderen Behandlungen mit Wirkungsgrade von 22 bis 58 % zeigten keinen ausreichenden Schutz (Abbildung 57).

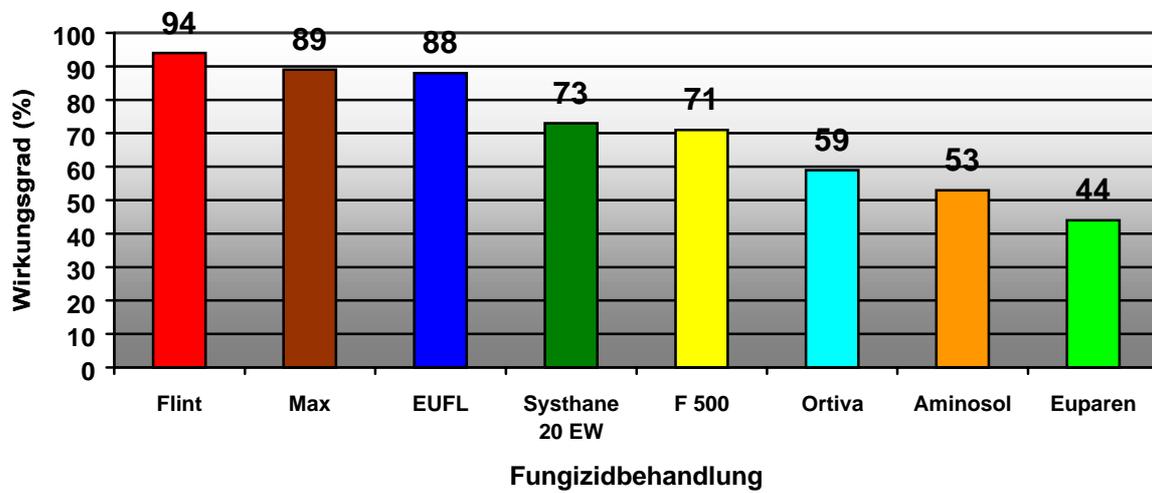


Abbildung 54: Wirkungsgrad der Fungizide bei "Burlat" + "Regina" (Blatt)

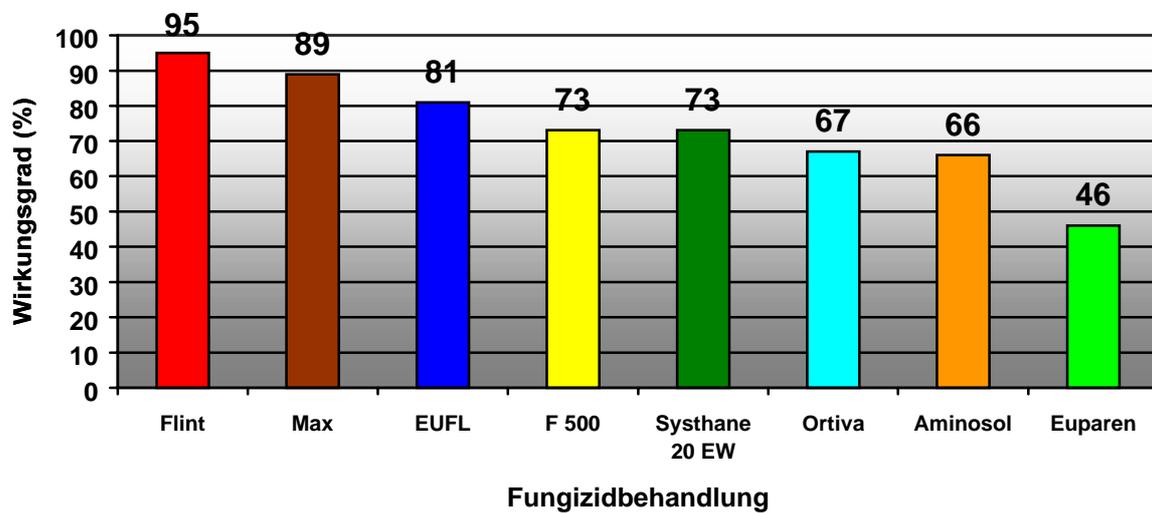


Abbildung 55: Wirkungsgrad der Fungizide bei der Sorte "Burlat" (Blatt)

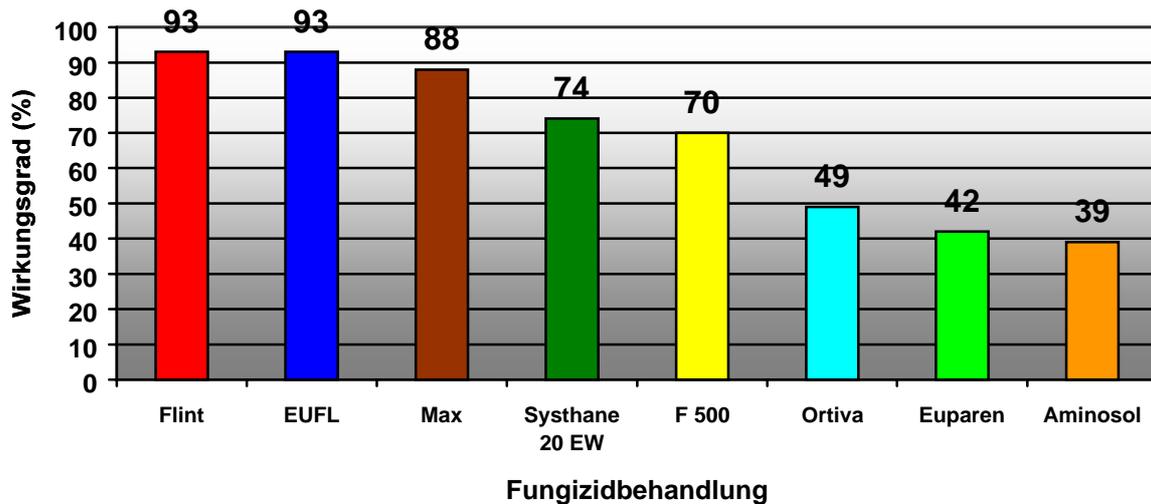


Abbildung 56: Wirkungsgrad der Fungizide bei Sorte "Regina" (Blatt)

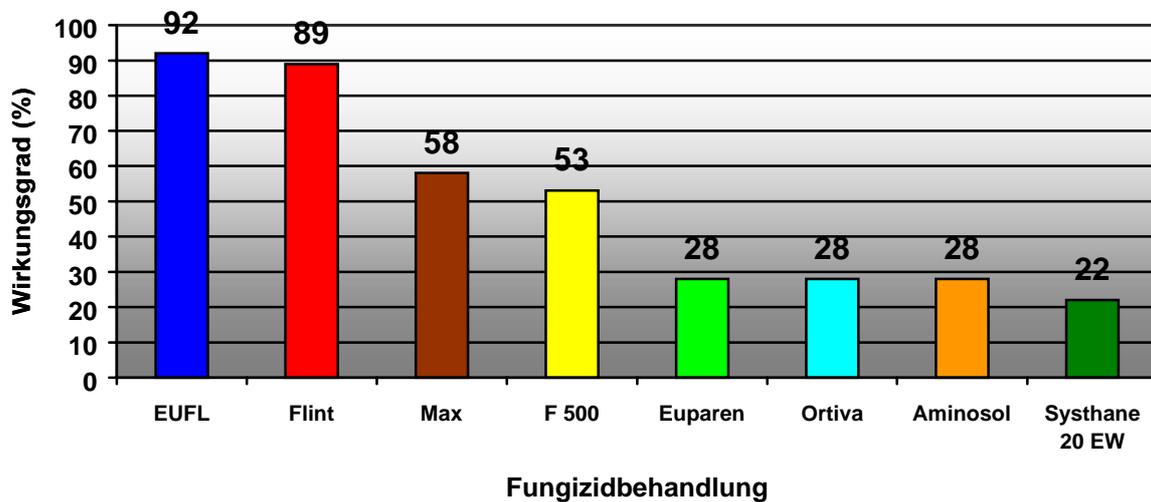


Abbildung 57: Wirkungsgrad der Fungizide bei Sorte "Regina" (Frucht)

5.3.3 Belaubung der Sorte "Burlat"

Den geringsten Laubbehang zeigte die mit Discus behandelte Parzelle. Eine Boniturnote von 2,33 bedeutet einen Behang mit wenigen Blättern. Eine etwas stärkere Belaubung (Boniturnote 2,67) konnte an der mit der Bayer-Variante behandelten Parzelle bonitiert werden. Etwa die gleichen Mengen an nicht abgeworfenen Laub zeigten die Fungizidbehandlungen mit Flint, der Max-Variante und der unbehandelten Kontrolle (Noten von 3,67 bis 3,48). Die stärkste Belaubung wiesen die mit Systhane 6W (Note 4,5), dem Prüfmittel (Note 4,5), Amistar (Note 4,75) und Baycor/Baymat (Note 5) applizierten Parzellen auf (Abbildung 58).

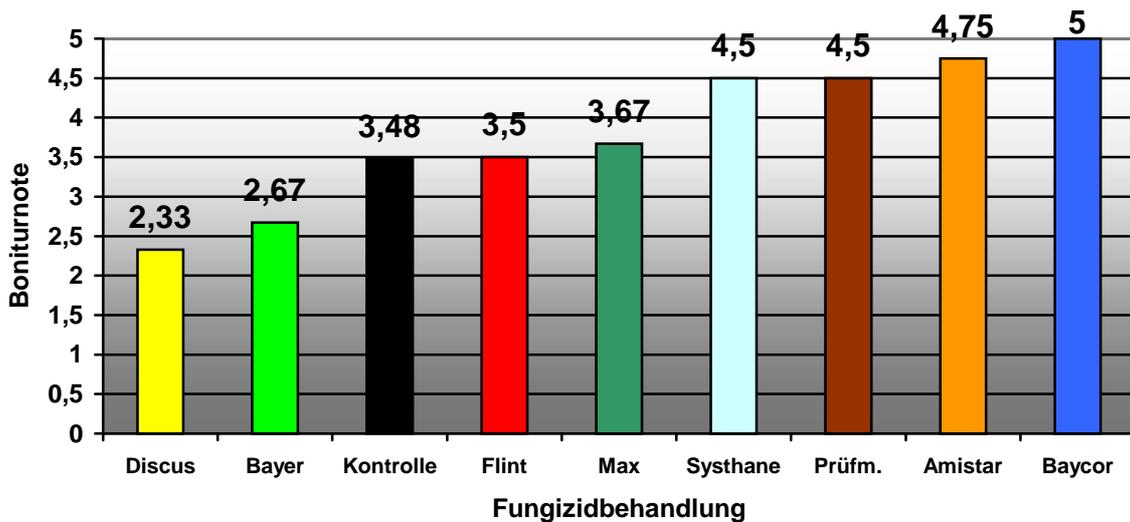


Abbildung 58: Belaubung der Sorte "Burlat" im März 2001

5.3.4 Fruchtkörperbonitur (Perithezien)

Erwartungsgemäß zeigten die Blätter der unbehandelten Kontrolle den höchsten Besatz an Perithezien (71 %) und die der beiden Varianten den geringsten (Bayer: 16 %; Max: 22 %) (Abbildung 59). Mit einer mit Perithezien bedeckten Blattfläche von 71 %, also gleich der Kontrolle, schnitt die mit Discus behandelte Parzelle (Sorte "Burlat") im Gegensatz zur Blattbonitur (Abbildung 45, S. 71) und Belaubung (Abbildung 58) schlecht ab. Die vielen am Stamm verbliebenen Blätter der mit Baycor/Baymat und Amistar applizierten Parzellen wiesen verhältnismäßig wenige Perithezien (23% bzw. 37,5%) auf. Flint, Systhane 6W und das Prüfmittel korrelieren mit der Belaubungsbonitur.

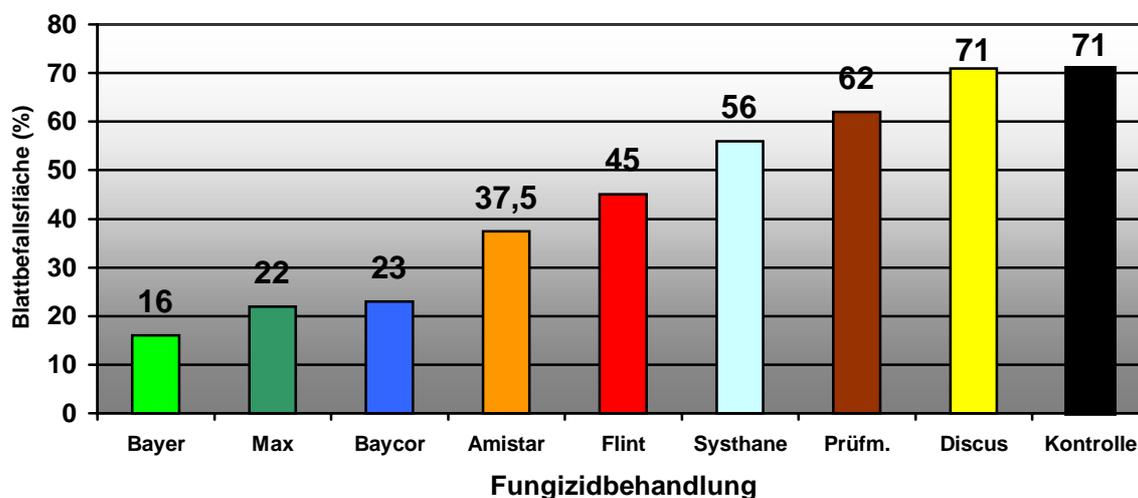


Abbildung 59: Fruchtkörperbonitur März 2001 ("Burlat")

5.4 Histologische Untersuchungen

Das erste Anzeichen einer Infektion mit *Gnomonia erythrostoma* ist das Auslaufen von Pektinen oder verwandten Substanzen aus den oberen Epidermiszellen. Pektine sind Bausteine der Mittellamellen, kommen aber bei Stein- und Beerenobst auch intrazellulär in löslicher Form vor (FRITSCHKE, 1990). Abbildung 60 zeigt einen 2 µm Gewebeschnitt (angefärbt mit Toluidinblau O und einer Nachbehandlung mit Lugolscher Lösung) von einem mit *Gnomonia erythrostoma* infizierten Kirschblatt. Obwohl keine Pilzstrukturen zu erkennen sind, zeigt das Blatt durch das Freisetzen von Pektinen eine Stresssituation. Unterhalb der oberen Epidermis und in den Interzellularen sind diese Pektine als violette Wolken zu erkennen.

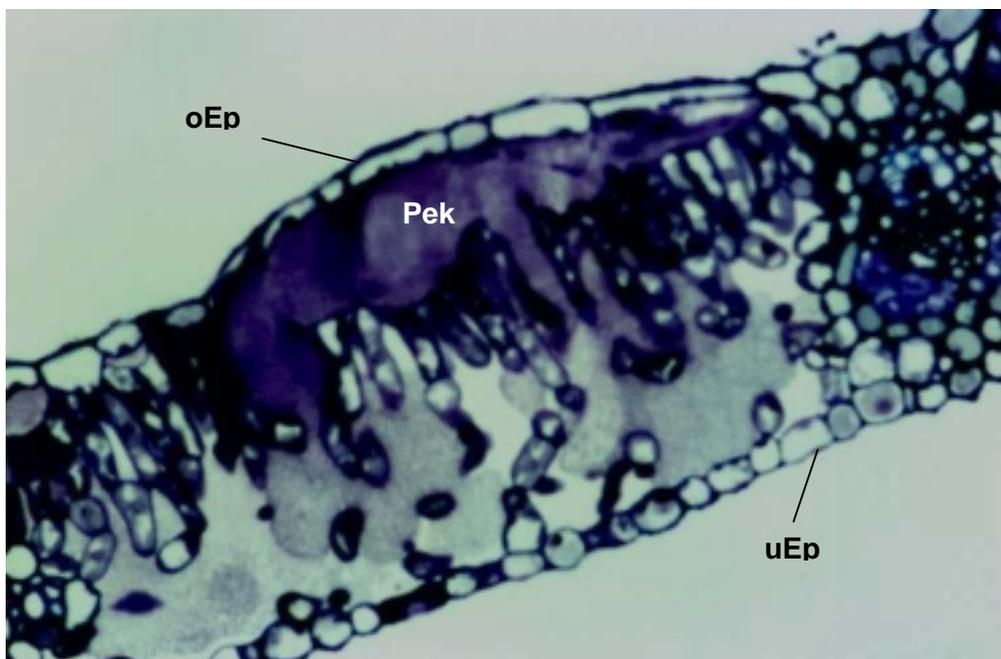


Abbildung 60: Auslaufen von Pektinen aus oberen Epidermiszellen, 400 x

Pek = Pektin, oEp = obere Epidermis, uEp = untere Epidermis

Zur Abwehr des Parasiten bildet die Pflanze in den Zellen Phenole. Diese sind bei einer Safranin/Azurblau II Färbung rot gefärbt (Abbildung 61). Um welche Phenole es sich dabei handelt, konnte nicht ermittelt werden. Eine negativ verlaufene DMAZA-Färbung (Ausbleiben einer Blaufärbung der Phenole) schließt Catechine und Proanthocyanidine aus.

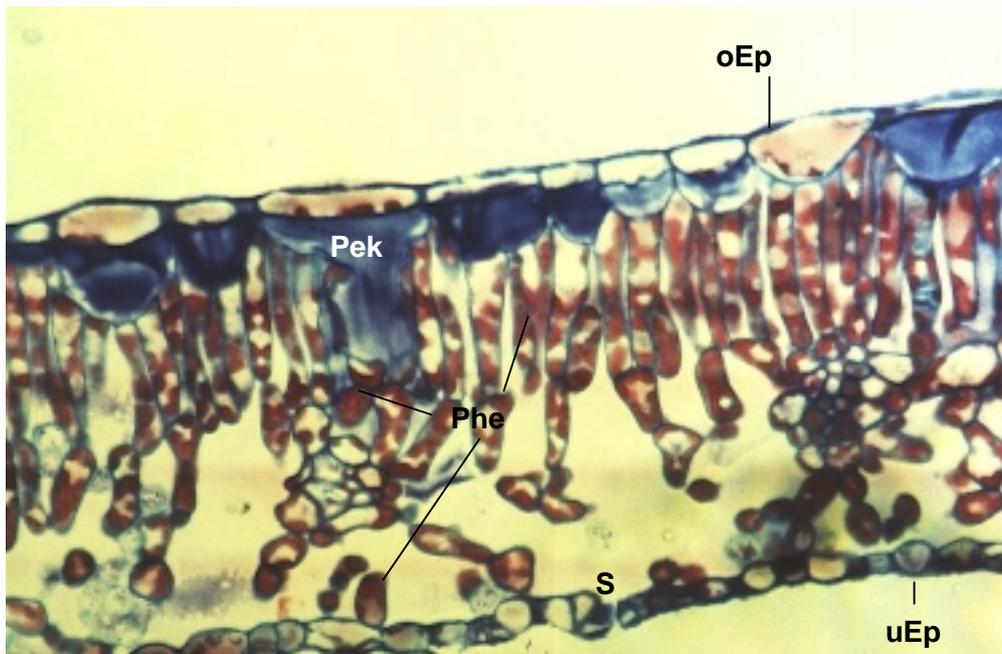


Abbildung 61: Phenole in den Zellen, 400 x (Safranin/Azur), oEp = obere Epidermis, uEp = untere Epidermis, S = Stomata, Phe = Phenole, Pek = Pektin

In den meisten Fällen dringt der Pilz nach dem Auskeimen der Ascosporen von der Blattoberseite in das Blattgewebe ein. Der genaue Penetrationsvorgang des Pilzes ist noch nicht geklärt, vermutlich löst der Pilz mit Hilfe von Enzymen die Zellwand bzw. die Mittellamelle auf und wächst in das Blatt. In Abbildung 62 erkennt man auf der Blattoberseite eine pilzliche Struktur, von der eine Hyphe zwischen zwei Epidermiszellen durch das Palisadenparenchym in das Schwammparenchym wächst. Bei der Ausgangsstruktur handelt es sich um ein Appressorium.

Das Myzel von *Gnomonia erythrostoma* ist mit Einschlüssen ausgefüllt. In Abbildung 63, die einen mit Safranin gefärbten Gewebeschnitt (2 µm) zeigt, ist das gut zu erkennen. Was diese Einschlüsse enthalten, ist nicht bekannt. Mit einer Coomassie Brilliant Blue Färbung konnte aber nachgewiesen werden, daß Proteine vorhanden sind (Abbildung 64: blaugefärbte Bereiche). Neben den hyalinen Einschlüssen sind immer wieder dunkle, runde Körper in den Pilzzellen zu sehen. Im Falle der Safraninfärbung erscheinen diese Körper dunkelrot (Abbildung 63). Eine durchgeführte DAPI-Färbung identifizierte diese als Zellkerne. Nach Anfärbung von 8 µm dicken Gewebeschnitten mit diesem Fluoreszenzfarbstoff erschienen die pilzlichen Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop als bläuliche, leuchtende Punkte (Abbildung 65). Im Unterschied zu den Myzelzellkernen fluoreszierten die größeren, pflanzlichen Zellkerne deutlich schwächer.

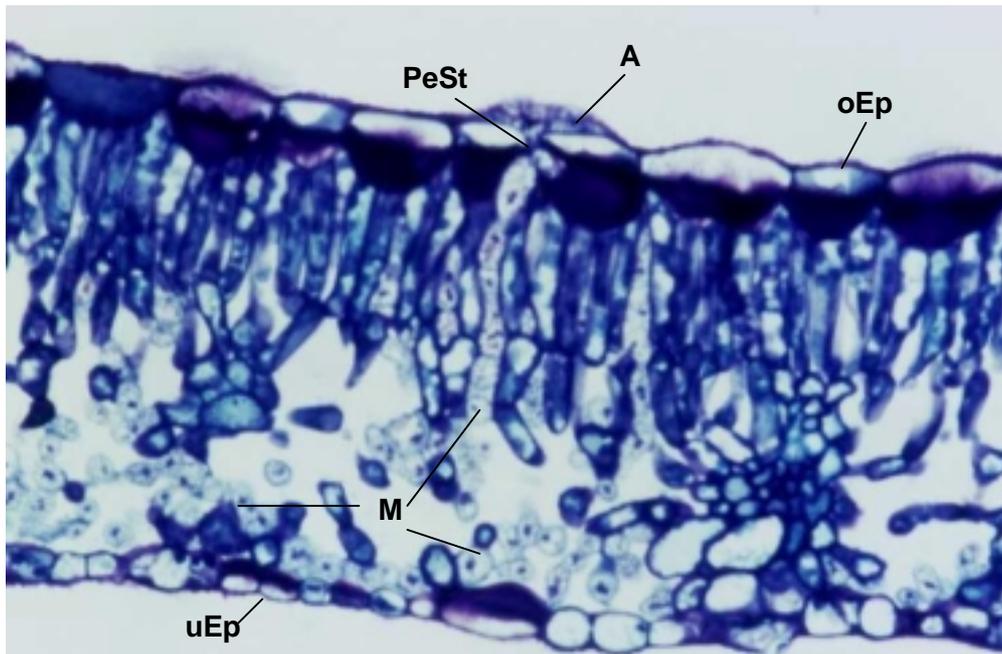


Abbildung 62: Penetration, 400 x (2 μ m, Toluidinblau), oEp = obere Epidermis, uEp = untere Epidermis, PeSt = Penetrationsstelle, M = Myzel, A = Appressorium

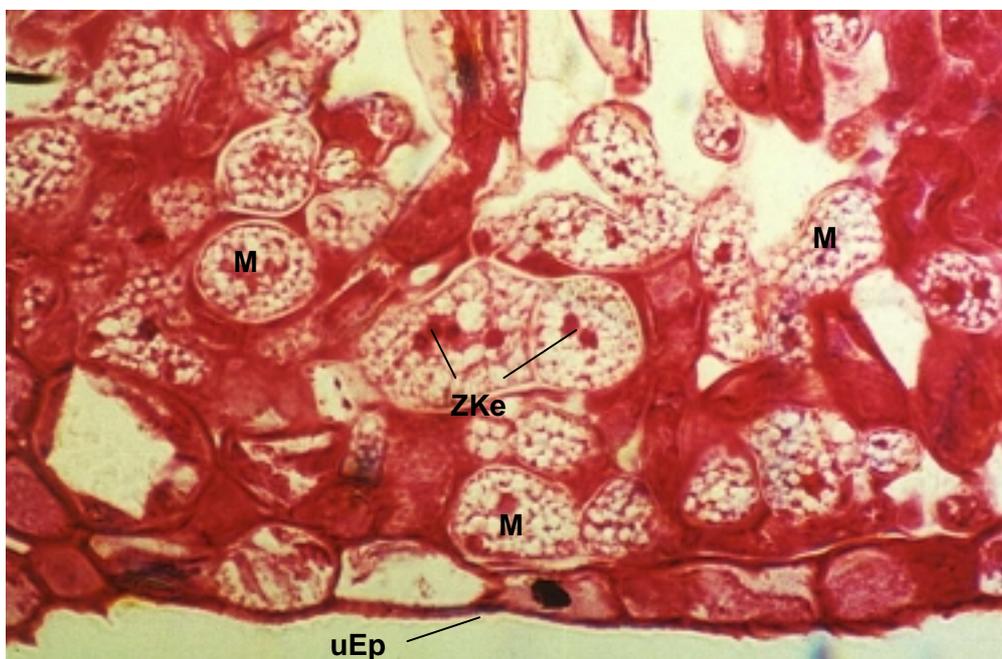


Abbildung 63: Myzelstruktur von *G. erythrostoma*, 1000 x (2 μ m Schnitt, Safranin)
Zke = Zellkerne, E = Einschlüsse, M = Myzel, uEp = untere Epidermis

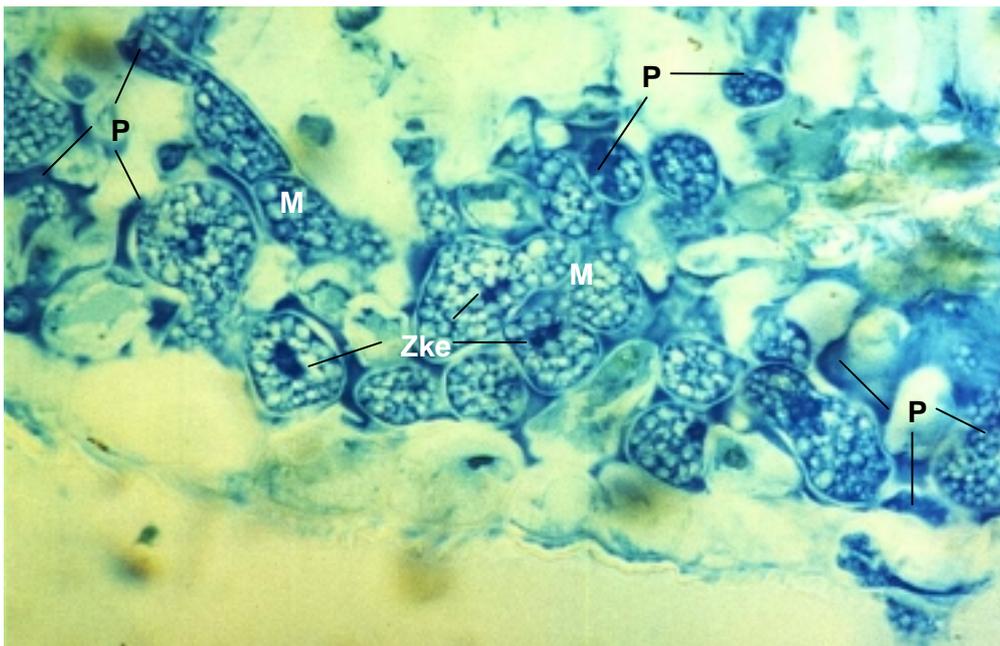


Abbildung 64: Anfärbung von Proteinen mit Coomassie Brillant Blue in Myzel (1000-fach)

M = Myzel, P = Proteine, Zke = Zellkerne

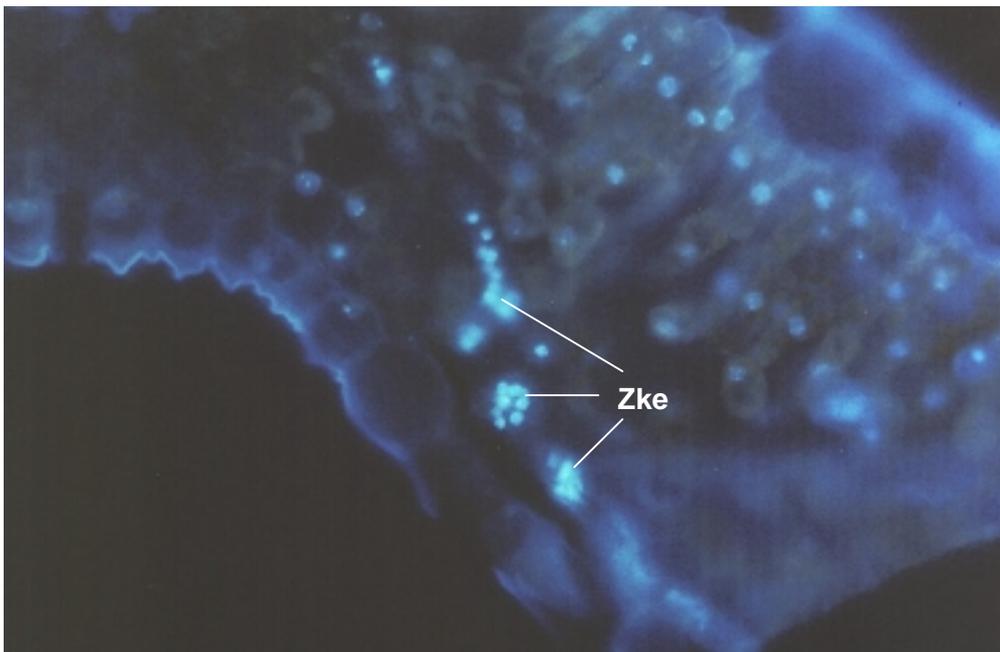


Abbildung 65: Fluoreszierende Zellkerne, 400 x (8 μ m, DAPI-Färbung), Zke = Zellkerne

Die ersten makroskopisch erkennbaren Blattsymptome sind grünlichgelbe Verfärbungen auf der Blattoberseite, die anfangs noch sehr undeutlich sind. Im Laufe der Zeit gehen diese Flecken in einen gelblichen Farbton über, vergrößern sich und treten deutlicher hervor. Gewebeschnitte von solchen Symptomstellen zeigen, daß das Myzel sich langsam im Schwammparenchym ausbreitet (Abbildung 66).

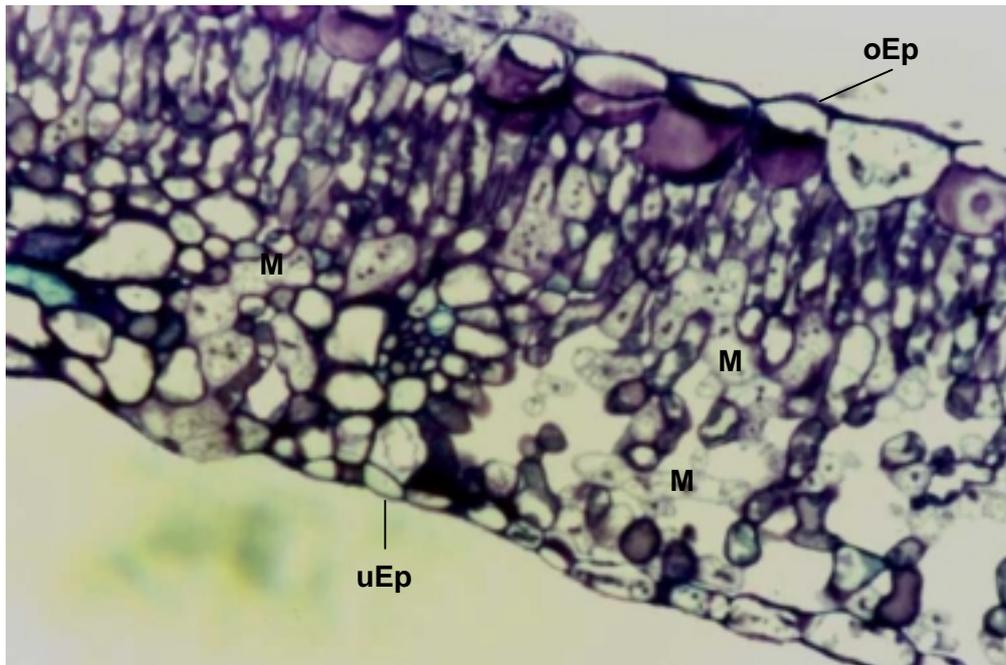


Abbildung 66: Gewebeschnitt durch eine grüngelbe Symptomstelle 400 x
(2 μ m, Toluidinblau mit Vor- und Nachbehandlung), uEp = untere Epidermis,
oEp = obere Epidermis, M = Myzel

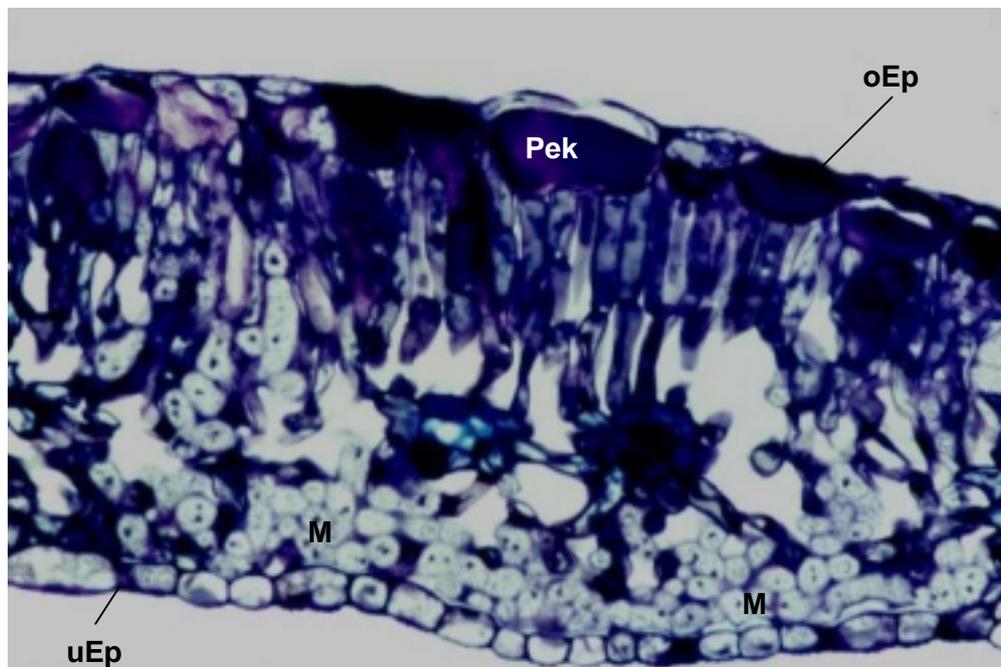


Abbildung 67: Gewebeschnitt durch eine chlorotische Symptomstelle 400 x
(2 μ m, Toluidinblau), uEp = untere Epidermis, oEp = obere Epidermis,
Pek = Pektin, M = Myzel

Nachdem das Schwammparenchym nahezu ganz vom Myzel des Pilzes zersetzt wurde, wird auch das Palisadenparenchym zerstört (Abbildung 67). In diesem Stadium zeigt sich das Blatt fast vollständig chlorotisch. Im weiteren Verlauf beginnt das Blatt zu nekrotisieren und es bildet sich die Nebenfruchtform (Pyknidien) des Pilzes. Zu diesem Zeitpunkt ist mehr oder weniger das gesamte Mesophyll zerstört, und zwischen der oberen und unteren Epidermis befindet sich Myzel (Abbildung 68). Die Bildung der Pyknidien erfolgt durch subepidermale Zusammenlagerung von Hyphen an der unteren Epidermis. Mit der Volumenzunahme des Fruchtkörpers beginnt sich die Epidermis zu heben, bis sie letztendlich reißt und die Pyknidien freigibt (Abbildung 69).

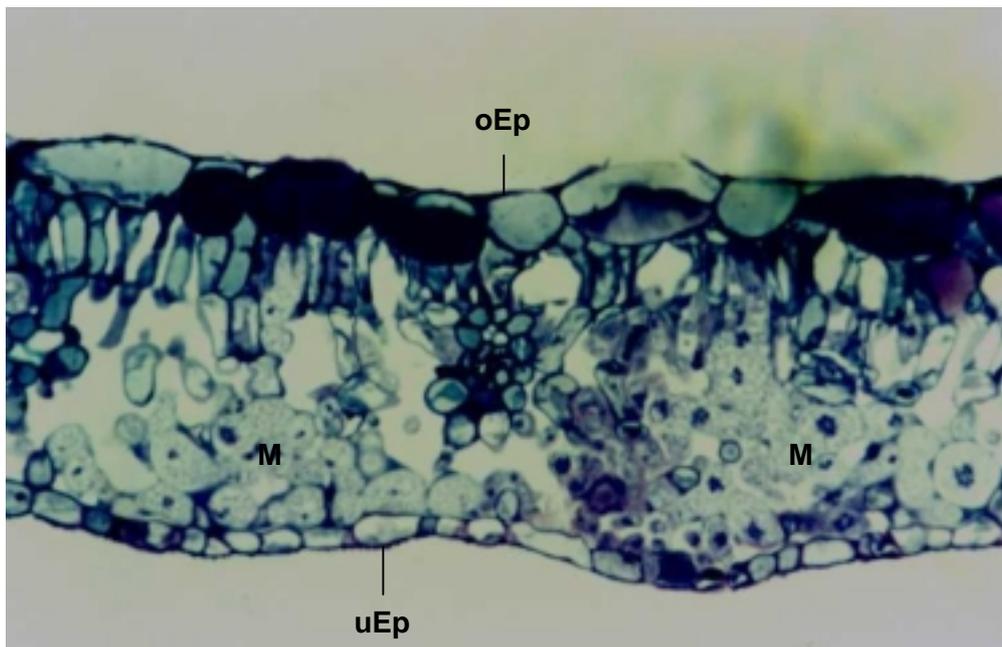


Abbildung 68: Gewebeschnitt durch eine nekrotische Symptomstelle 400 x
(2 μ m, Toluidinblau), uEp = untere Epidermis, oEp = obere Epidermis,
M = Myzel

Zur Bildung der Hauptfruchtform lagern sich die aus den Pyknidien entlassenen Konidien an die aus den Stomata wachsenden Empfängnishyphen des Ascogons (Trichogynen). Einen eindeutigen Beweis für diesen Sexualvorgang gibt es bisher nicht. Die herauswachsende Hyphen, an die sich Konidien anhaften, konnten in vielen Fällen beobachtet werden (Abbildung 70). Ab Ende September/Anfang Oktober sind die Perithezien auf den abgestorbenen, braunen Blättern zu erkennen (Abbildung 71).

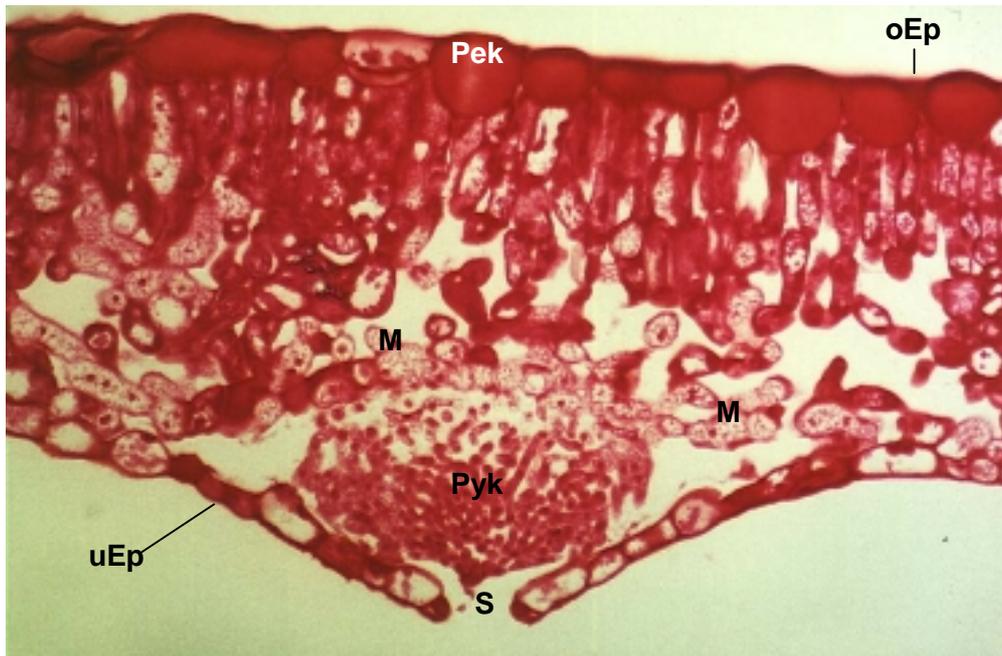


Abbildung 69: Entstehendes Pyknidium 400 x (2 μ m, Safranin), uEp = untere Epidermis, oEp = obere Epidermis, M = Myzel, S = Stomata, Pyk = Pyknidium, Pek = Pektin

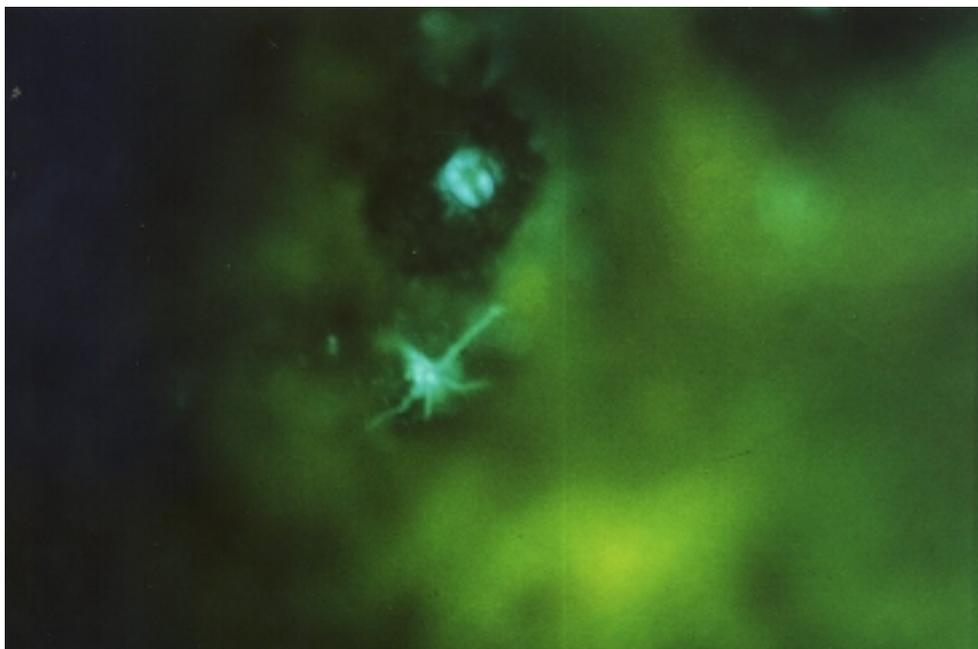


Abbildung 70: Aus Stomata wachsende Hyphen, 200 x (Fluoreszenzmikroskopie)

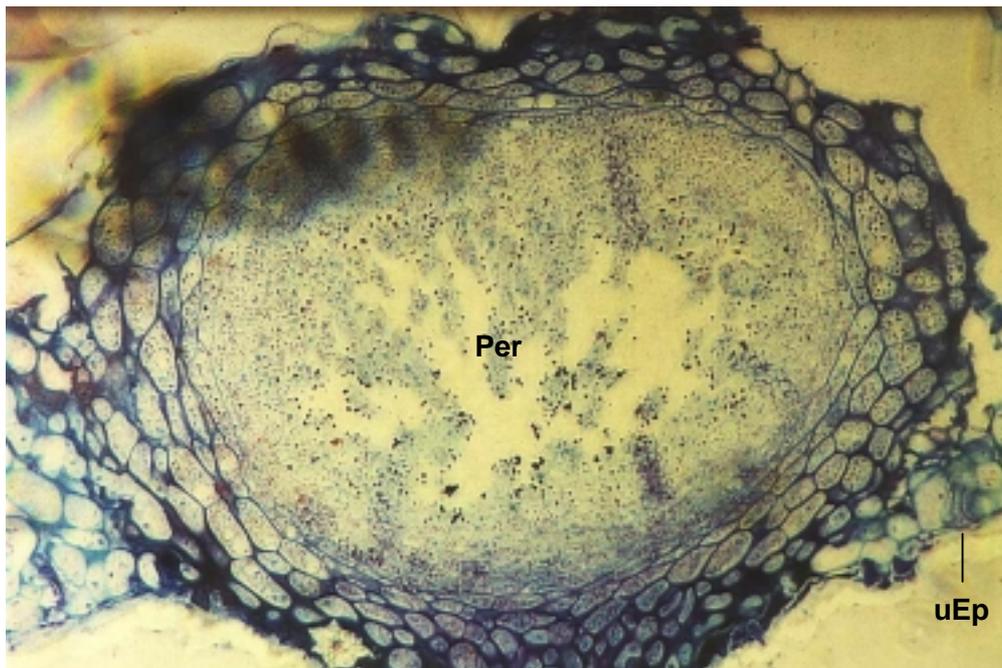


Abbildung 71: Sich bildendes Perithecium Oktober, 400 x (2 μ m, Toluidinblau),
Per = Perithecium, uEp = untere Epidermis

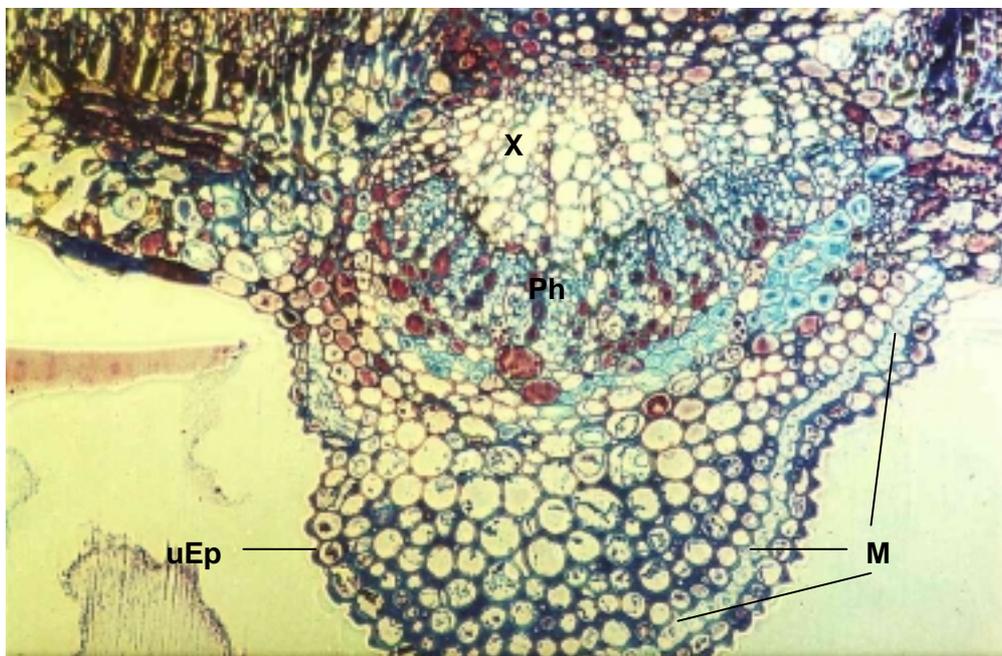


Abbildung 72: Wachstum des Myzels durch die Hauptblattader 200 x (2 μ m, Safranin/Azur)
M = Myzel, Ph = Phloem, X = Xylem, uEp = untere Epidermis

Das Myzel von *Gnomonia erythrostoma* kann sich über das gesamte Blattgewebe ausbreiten. Selbst die Hauptblattader stellt keine Barriere da. In Abbildung 72 ist zu sehen, wie der Pilz direkt unter der Epidermis (Blattunterseite) die Blattader umwächst.

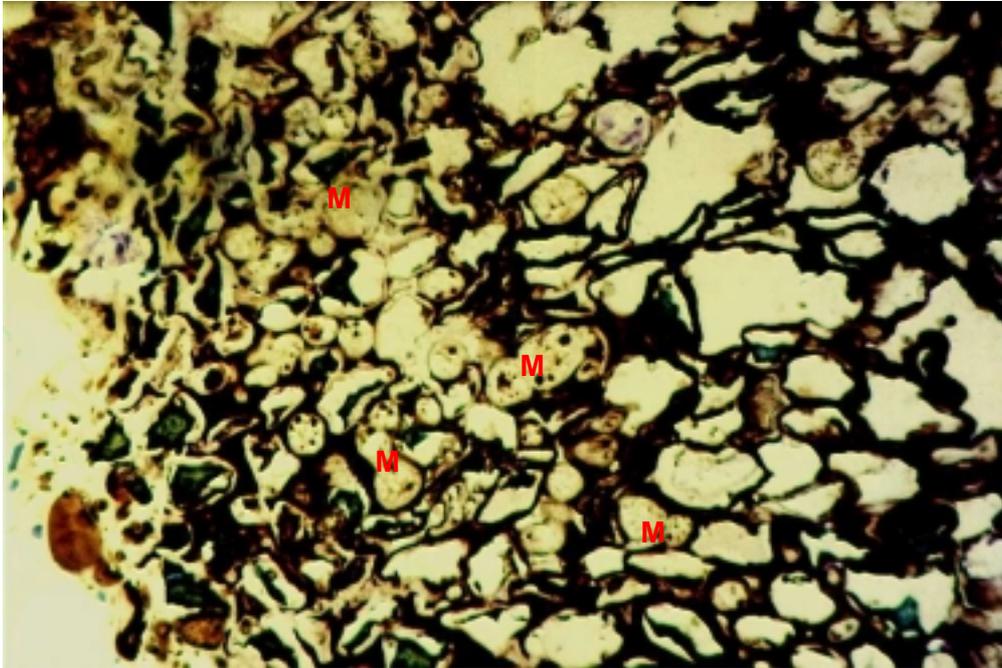


Abbildung 73: Myzel im Blattstiel 1000 x (2 μ m, Toluidinblau mit Vor- und Nachbehandlung, M = Myzel)

Ein eindeutiges Erkennungsmerkmal der Krankheit ist das Nichtabwerfen der Blätter im Herbst. Die histologischen Untersuchungen von infizierten Blättern haben gezeigt, daß der gesamte Blattstiel mit *Gnomonia*-Myzel durchwachsen ist (Abbildung 73).

Allgemein wird davon ausgegangen, daß der Pilz nicht in der Lage ist, verholzte Teile zu befallen. In Abbildung 74 ist eindeutig Myzel von *Gnomonia erythrostoma* zu erkennen. Tatsächlich wächst der Pilz jedoch auch zwischen den stark verdichteten Zellen des Phellems von Buketttrieben.

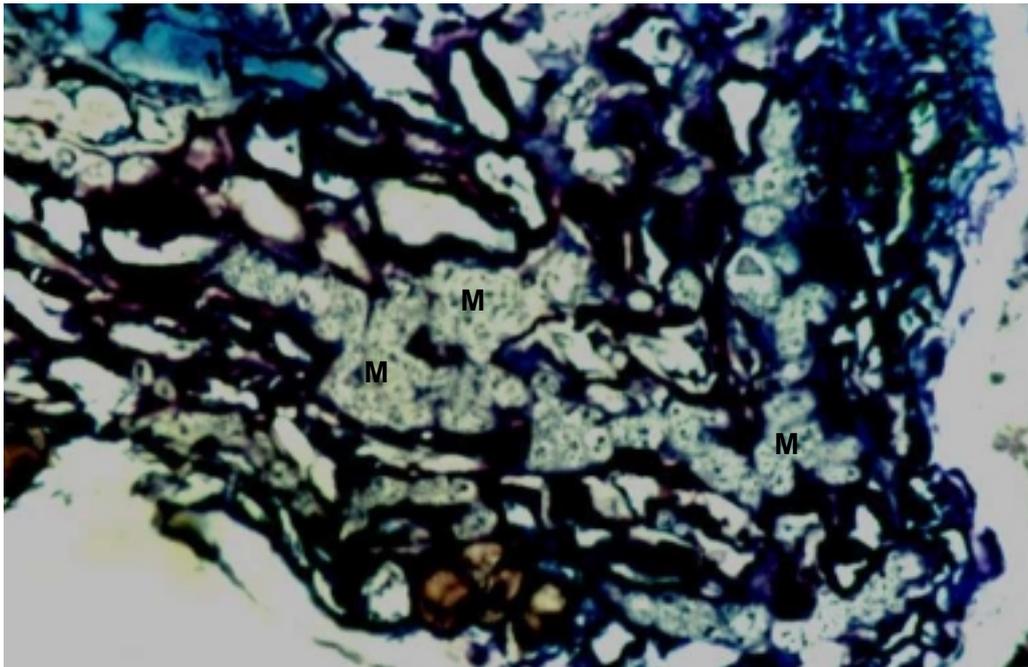


Abbildung 74: Myzel im Buketttrieb, 400x (2 μ m, Toluidinblau mit Vor- und Nachbehandlung), M = Myzel

5.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Wenn Ascosporen nach der Ausschleuderung auf ein Kirschblatt treffen und dort ein nasses Milieu für mindestens 6 h vorfinden, beginnen sie, unabhängig von der Blattseite, auszukeimen.

Die Notwendigkeit einer mehrstündigen Blattnässe offenbarten auch die rasterelektronischen Untersuchungen. Nur inokulierte Blätter, auf denen nach dem Öffnen der Petrischale ein Wasserfilm zu erkennen war, zeigten in Abhängigkeit vom Inokulationszeitpunkt unterschiedliche Keimraten. War dieser Film nicht vorhanden, konnten auch 72 Stunden nach Inokulation nur wenige ausgekeimte Sporen beobachtet werden. Selbst auf feuchtes Filterpapier ausgeschleuderte Ascosporen wiesen nach 14 Stunden nahezu keine Keimschlauchbildungen auf (Abbildung 75).

Zur Penetration des Blattes bildet *Gnomonia erythrostoma* nur sehr kurze Keimschläuche. Wie in den Abbildungen 76 bis 80 zu sehen ist, beträgt die Länge des Keimschlauches nicht einmal die Breite der Ascospore (4 - 6 µm). Die Bildung eines Appressoriums ist möglich, aber eher selten (Abbildung 76). Eine Penetration über Stomata konnte nicht beobachtet werden. Da der Pilz meist direkt mit der Keimhyphe ins Blattgewebe eindringt (Abbildung 78), ist von einer Infektion durch kutinlösende Enzyme auszugehen.

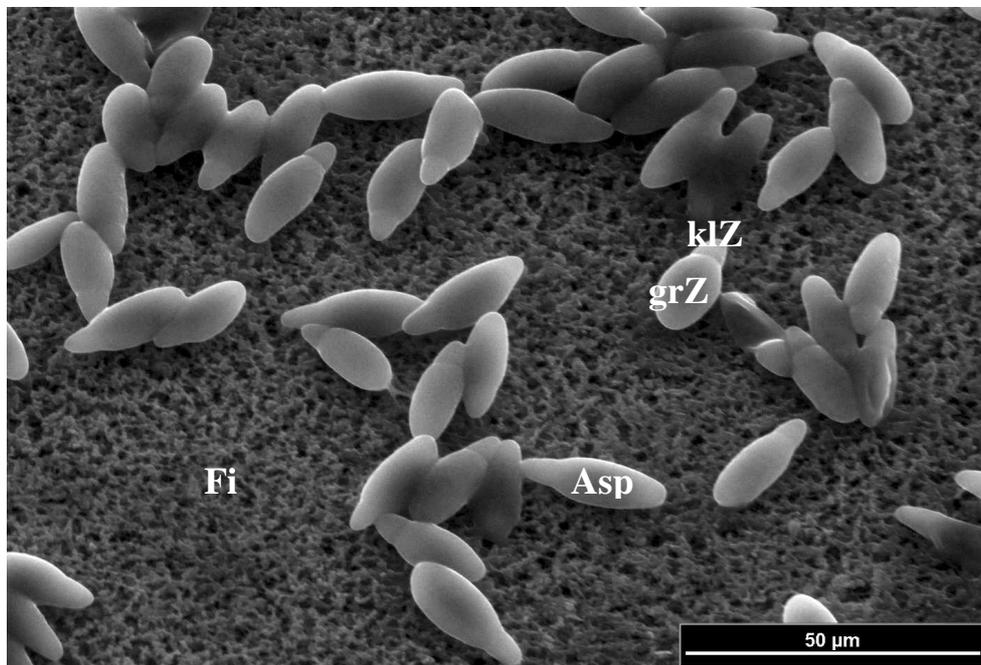


Abbildung 75: Ascosporen auf Filterpapier (14 Stunden nach Ausschleuderung)

Asp = Ascospore, Fi = Filterpapier, kIZ = kleine Zelle, grZ = große Zelle

In der Abbildung 75 erkennt man die inaequale, zweizellige Gestalt der Ascosporen, bestehend aus einer großen Zelle mit stumpfem Ende und einer deutlich kleineren Zelle mit spitzem Ende. In den meisten Fällen wächst aus der länglichen Seite der größeren Zelle ein Keimschlauch (Abbildung 78), aber auch mehrere Keimschlauchbildungen sind möglich (Abbildung 76). Sehr selten konnte ein Auskeimen der kleinen Zelle beobachtet werden.

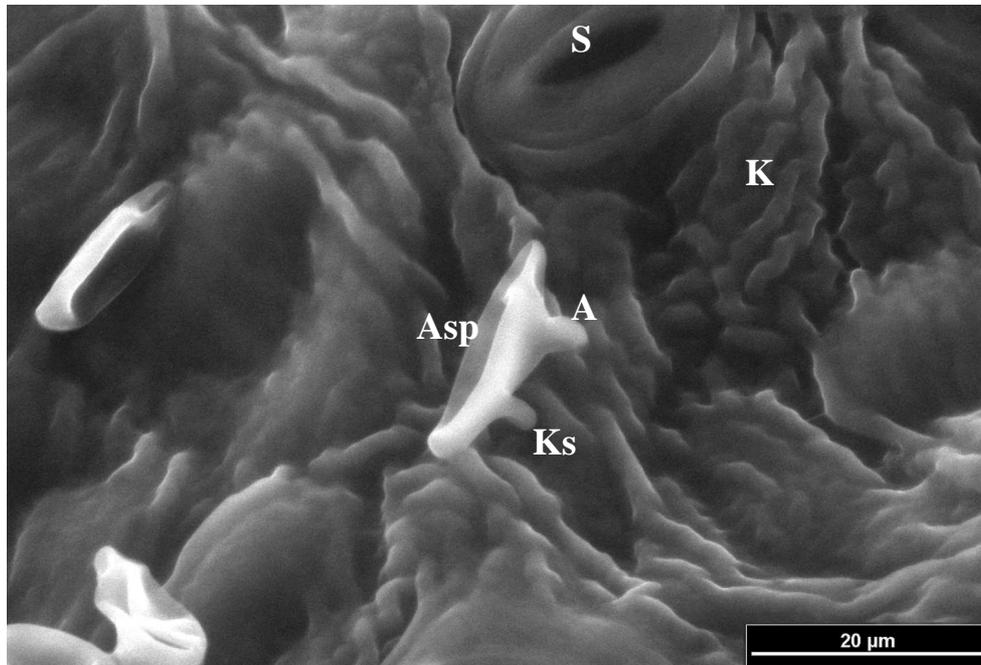


Abbildung 76: Ausgekeimte Ascospore mit zwei Keimschläuchen auf Blattunterseite

S = Stomata, K = Kutin, Asp = Ascospore, klZ = kleine Zelle, grZ = große Zelle, Ks = Keimschlauch, A = Appressorium

24 Stunden nach der Inokulation waren ca. 80 % der Ascosporen gekeimt (Abbildung 77). In der Abbildung 78 sieht man, wie die Keimhypho durch die Wachsschicht (Kutin) in das Pflanzengewebe wächst. Auffällig sind die mosaikartigen Strukturen der Ascosporen, wie sie in den Abbildungen 76 bis 79 zu sehen sind. Diese kommen durch Verlust der Turgeszenz zustande. Besonders deutlich zeigt die Abbildung 79 zwei kollabierte Ascosporen. Wurde die relative Luftfeuchte im ESEM erhöht, konnte die Turgeszenz der Sporen wieder hergestellt werden (Abbildung 80).

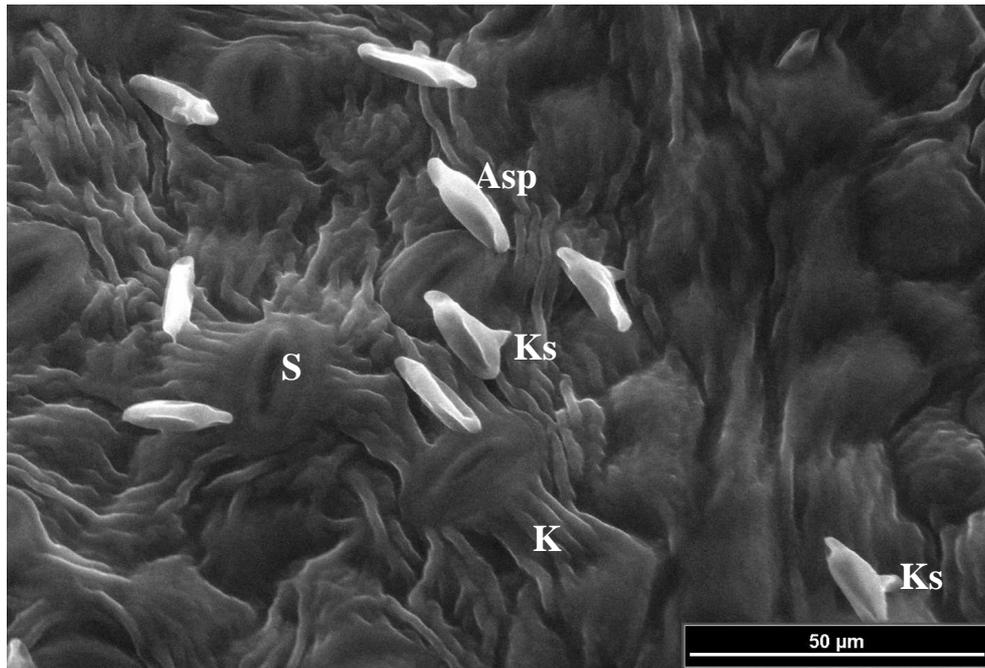


Abbildung 77: Ausgekeimte Ascosporen nach 24 Stunden (Blattunterseite)
Asp = Ascospore, S = Stomata, K = Kutin, Ks = Keimschlauch

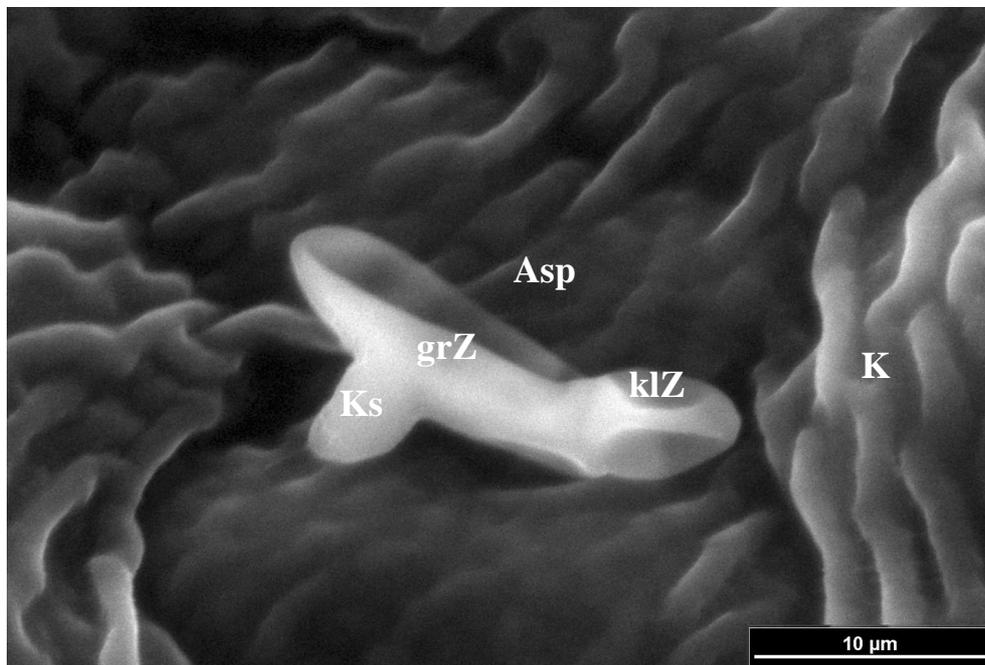


Abbildung 78: Ausgekeimte Ascospore auf der Blattoberseite
Asp = Ascospore, Ks = Keimschlauch, klZ = kleine Zelle, grZ = große Zelle, K = Kutin

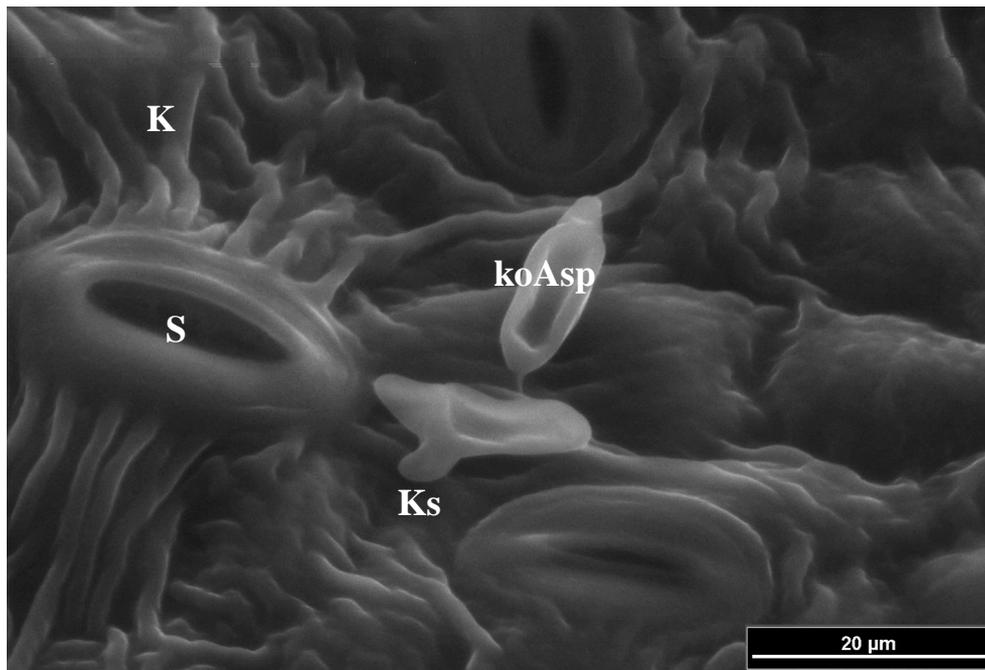


Abbildung 79: Kollabierte Ascosporen auf der Blattunterseite

koAsp = kollabierte Ascospore, Ks = Keimschlauch, K = Kutin, S = Stomata

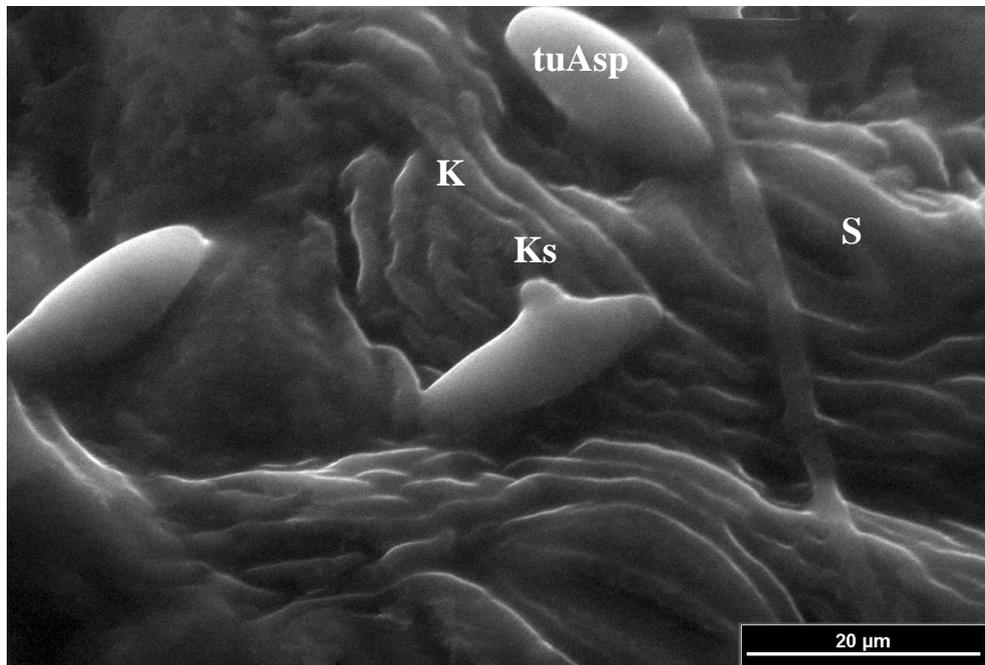


Abbildung 80: Turgeszente Ascosporen auf der Blattunterseite

tuAsp = turgeszente Ascospore, Ks = Keimschlauch, K = Kutin, S = Stomata

5.6 RAPD-PCR

5.6.1 Extraktion der DNA

Das beste Extraktionsergebnis lieferte die Methode von Qiagen. Sowohl bei der Gewinnung der Pflanzen-DNA wie auch der Pilz-DNA überzeugte dieser Kit mit dem höchsten und reinsten Ertrag (Abbildung 81). Deshalb wurde diese Methode für die Extraktion von befallenen Proben verwendet.

5.6.1.1 DNA-Gehalt

Der linke Spur (Gr.St.) der Abbildung 81 zeigt den Größenstandard Lambda/*Hind* III, bei dem die DNA-Menge der einzelnen Banden bekannt ist. Der rechte Teil der Abbildung zeigt exemplarisch ein Bild, wie es auf dem Monitor der Video-Geldokumentation zur Auswertung der DNA-Menge erscheint.

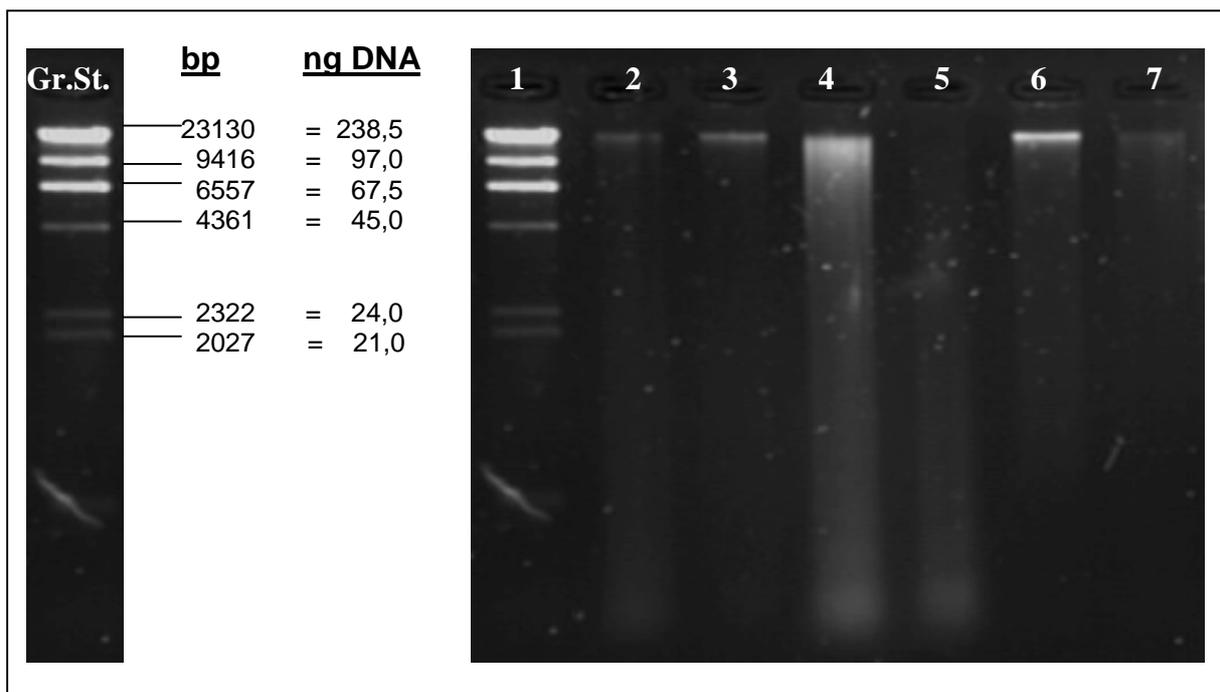


Abbildung 81: Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Molekular-Standard Lambda *Hind* III

Neben dem Größen-Standard (Gr.St.) wurden auf den Spuren 2, 3 und 6 DNA-Proben von Blättern (2), Früchten (3) und Ascosporen (6) aufgetragen, die mit dem Qiagen Kit extrahiert wurden. Auf den Spuren 4, 5 und 7 wurde Ascosporen-DNA, extrahiert nach Möller et al. (1992), Dynal und Porebski et al. (1997), aufgetrennt. Vergleicht man die Banden der Proben mit denen des Standards, so kann man den Gehalt an DNA abschätzen.

So entspricht die Bande in Spur 2 in etwa 20 ng DNA, in Spur 3 50 ng, in Spur 6 70 bis 100 ng und in Spur 7 weniger als 20 ng. Mit der Dynal-Methode konnte keine DNA extrahiert werden (Spur 5). Die Probe, die nach Möller et al. extrahiert wurde (Spur 4), enthielt neben intakter DNA auch RNA (zeigt die untere, undeutliche Bande) und degradierte DNA (milchiger Schmier, der sich die gesamte Spur entlang zieht). Für das Primer-Screening wurden 4 µl der extrahierten DNA mit einer Konzentration von 5 ng/µl verwendet. Folglich konnte Probe 2 direkt verwendet werden, während z.B. Probe 6 vierfach verdünnt wurde.

5.6.2 Primer-Screening

Abbildung 82 zeigt den Größenstandard MassRuler™ mit definierten Banden, der stets parallel zu den Primern gelaufen ist. In Abbildung 83 sind die Ergebnisse der mit 90 Primern getesteten DNA aus Ascosporen von *Gnomonia erythrostoma* dargestellt. Eine einzelne diskrete Bande konnte bei der Testung nicht gefunden werden. In vielen Fällen waren neben deutlichen Banden auch schwach ausgeprägte Banden zu sehen.

Bei einer Wiederholung zeigten sich bei einigen Primern mehr Banden als bei den anderen Wiederholungen. Diese abweichende Wiederholung wurde vernachlässigt. Die Primer B2, B12 und B13 erzeugten jeweils nur eine Bande. Da diese aber sehr schwach waren und RAPD-Primer als sehr unspezifisch gelten, wurden diese nicht berücksichtigt. Für weitere Testungen wurden die Primer A15 und D13 verwendet.

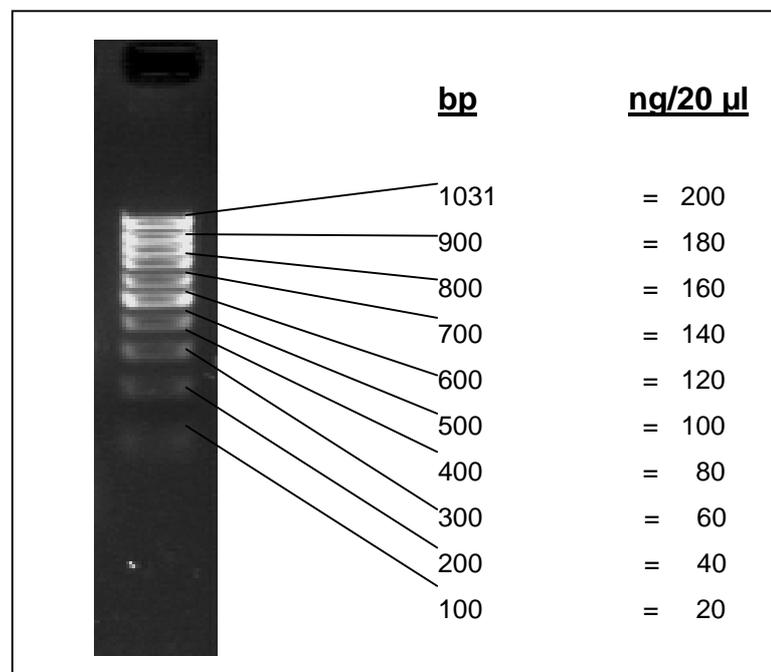
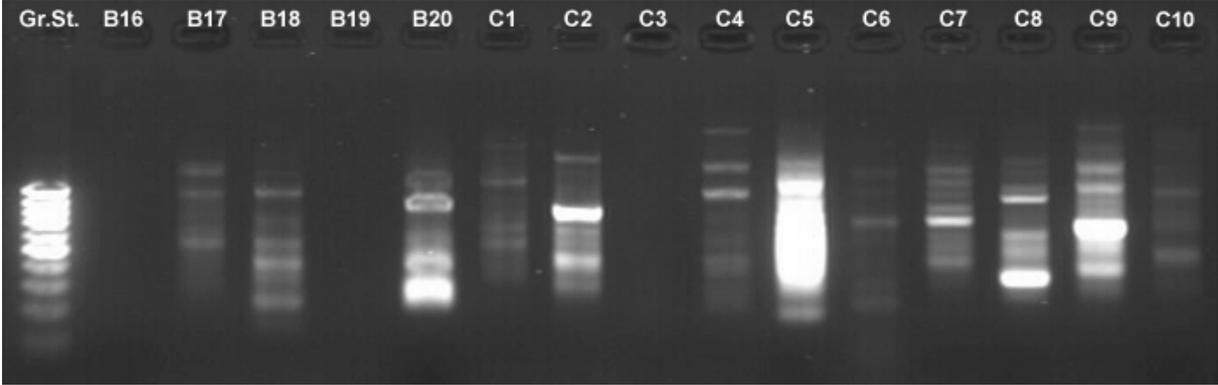
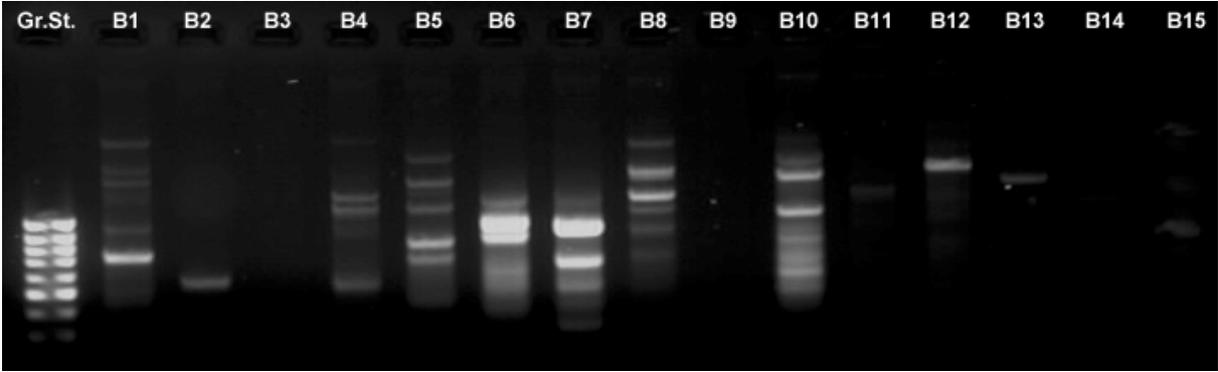
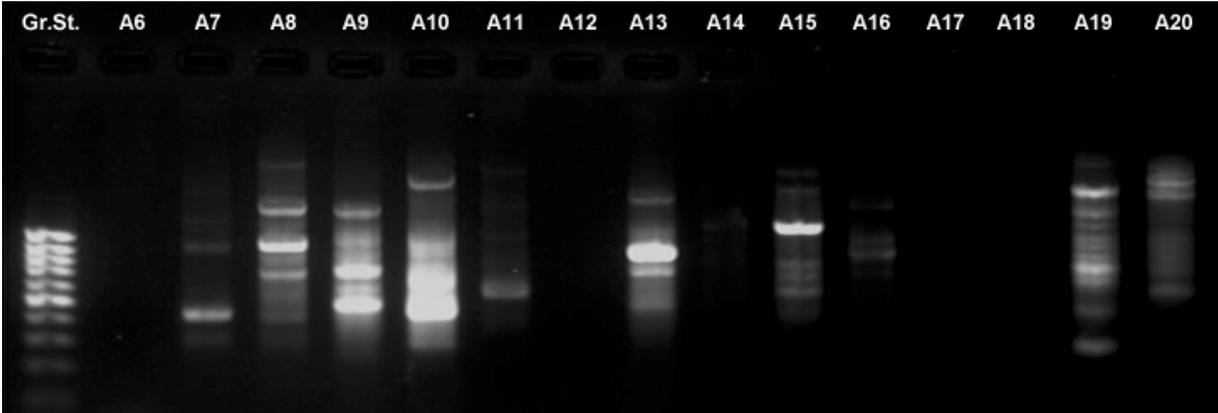
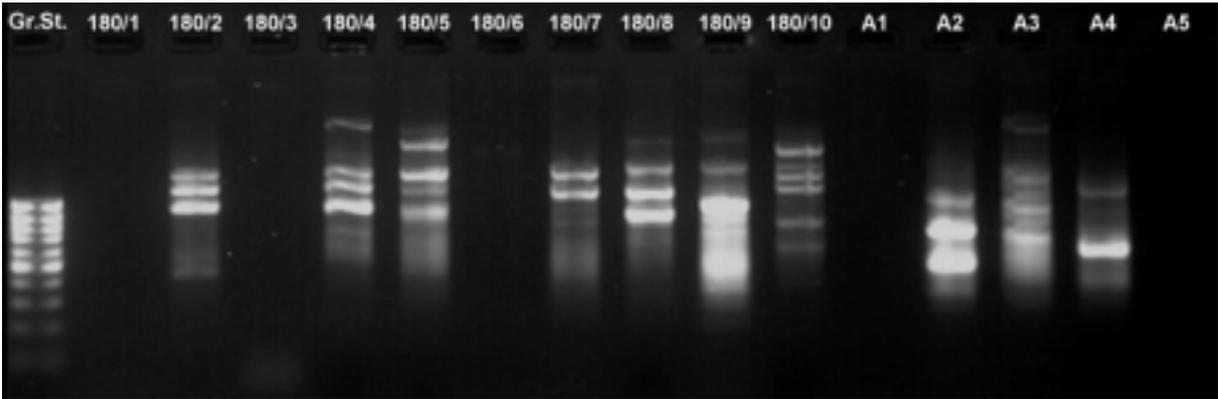


Abbildung 82: MassRuler™ mit Anzahl der Basenpaare und entsprechender DNA



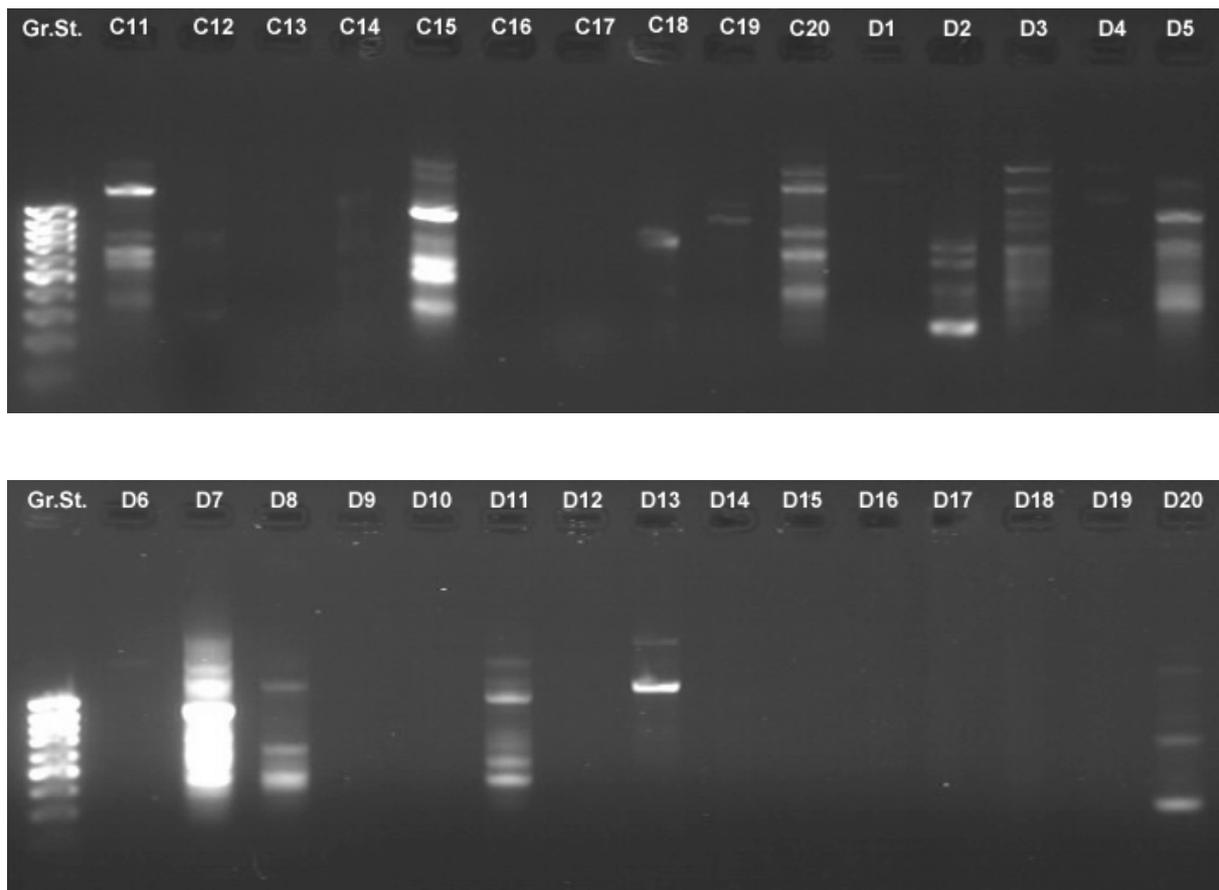


Abbildung 83: Primer-Screening mit 90 Primern

5.6.3 Nachweis von *Gnomonia erythrostoma* DNA in infizierten Pflanzen

Sowohl bei der reinen Pflanzen-DNA als auch bei der DNA von infizierten Pflanzen konnte mit den Primern A15 und D13 keine DNA-Auftrennung beobachtet werden.

5.6.4 Identifizierung der isolierten Pilze

Die DNA-Bandenspektren der isolierten Pilze unterschieden sich untereinander. Beide wiesen keine Übereinstimmung mit dem DNA-Bandenspektrum der Ascosporen auf. Eine Identität von isolierten Blattparasiten mit Ascosporen von *Gnomonia erythrostoma* konnte mit Hilfe der RAPD-PCR nicht nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Das zeitliche Auftreten der Symptome der Blattbräune wird ausschließlich durch die jeweilige am Standort herrschende Witterung bestimmt. So beeinflusst die Temperatur im Herbst, Winter und Frühjahr die Ausreifung von Perithezien und Ascosporen sowie die Vegetationsentwicklung. Die Ausschleuderung und Keimung der Ascosporen erfolgt im Frühjahr bzw. Frühsommer nach Niederschlägen.

In einigen Veröffentlichungen (FRANK 1887a, SORAUER 1928, VUKOVITS 1980, FRIEDRICH und RHODE 1984, BRAUN und RIEHM 1996) wird neben den immer auftretenden grüngelben Blattflecken von kleinen braunen Flecken berichtet.

Diese Symptome konnten während vier Vegetationsperioden (1998-2001) nicht beobachtet werden und stehen in keinem Zusammenhang mit der hier beschriebenen Erkrankung. Es dürfte sich bei diesen beschriebenen Schadbildern um die Schrotschußkrankheit (*Stigmia carpophila*) handeln, denn FRANK (1887a) berichtet auch, daß die braunen Flecken wie "herausgeschnitten" aus dem Blattgewebe fallen.

Der Symptomverlauf auf der Frucht ist nicht immer eindeutig. Nach eigenen Beobachtungen ist eine farbliche Veränderung des Fruchtgewebes, d.h. das Auftreten von Flecken, das einzige Symptom, daß bei einem Befall mit *Gnomonia erythrostoma* immer vorzufinden ist. Verkrüppelungen oder Risse sind dagegen nicht die Regel. Viele durch stärkere Niederschläge aufgeplatzte Kirschen zeigten einen Befall mit *Gnomonia*. Nach PEREZ et al. (1992) wird die Anfälligkeit der Früchte fürs Platzen durch einen Befall mit der Blattbräune erhöht.

Nicht zufriedenstellend verliefen die Versuche, *Gnomonia erythrostoma* zu isolieren. Nur aus Blattgewebe konnte ein Myzel isoliert werden, das den Beschreibungen FRANK's (1887a) und Myzel im lebenden Gewebe (Blatt und Frucht) entspricht. Da aber Fruktifikation ausblieb, fehlt ein Nachweis, daß es sich hierbei um *Gnomonia erythrostoma* handelt. Obwohl die Ascosporen von *Gnomonia erythrostoma* auf verschiedenen Nährmedien sehr gut auskeimten, blieb eine Myzelbildung aus. Anscheinend benötigt der Pilz bestimmte Nährstoffe, die nur in lebenden Pflanzen vorhanden sind, um ein Myzel auszubilden.

Keimungs- und Infektionsversuche mit *Gnomonia*-Konidien verliefen erfolglos. Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch VUKOVITS und WITTMANN (1990) sowie DOBREV (1987) bei Keimungsversuchen mit Konidien von *Apiognomonia erythrostoma* (syn. *Gnomonia erythrostoma*), dem Erreger der Blattbräune bei Marillen. BONDAR (1976) nimmt an, daß es sich bei den Marillen um eine andere biologische Form von *Gnomonia erythrostoma* handelt. Andere *Gnomonia*-Arten, wie z.B. *Gnomonia comari* (am Lehrstuhl in Kultur) oder *Gnomonia rostellata* (ARSENIJEVIĆ und VESELIĆ 1997) wachsen sehr gut auf künstlichen Nährmedi-

en. So ist es eher unwahrscheinlich, daß es sich bei *Gnomonia erythrostoma* um einen obligaten Parasiten handelt.

Wenn die Konidien von *Gnomonia erythrostoma* nicht keimen, spricht vieles dafür, daß die Konidien nicht infektiös sind und somit auch keine Rolle bei der Verbreitung der Krankheit spielen.

NIKUSCH (1994) und HOLIGHAUS (1999) hingegen schreiben den Konidien Infektionsfähigkeit zu, da sie immer sehr späte Infektionen feststellten. FRANK (1887a) meint, daß es sich bei den im Sommer gebildeten Fruchtkörpern um Spermogonien mit Spermastien handelt.

Zur Bestätigung dieser Annahme führt FRANK (1887a) die Bildung von Empfängnishyphen (Trichogynen) auf, die ihren Ursprung in einem kleinen oder größeren Hyphengeflecht haben und zum Zeitpunkt der "Spermogonienbildung" aus den Stomata wachsen. Weiter konnte er feststellen, daß die gebogenen "Spermastien" sich an die Empfängnishyphen anhaften.

Bei einzelnen Gewebeschnitten konnten Myzelballen in der Nähe von Empfängnishyphen beobachtet werden (Abbildung 84). Ob eine Verbindung zwischen diesen bestand, war nicht ersichtlich. Da die Entwicklung dieser Pilzorgane aber nahezu parallel verläuft, ist die Wahrscheinlichkeit einer Verbindung sehr groß.

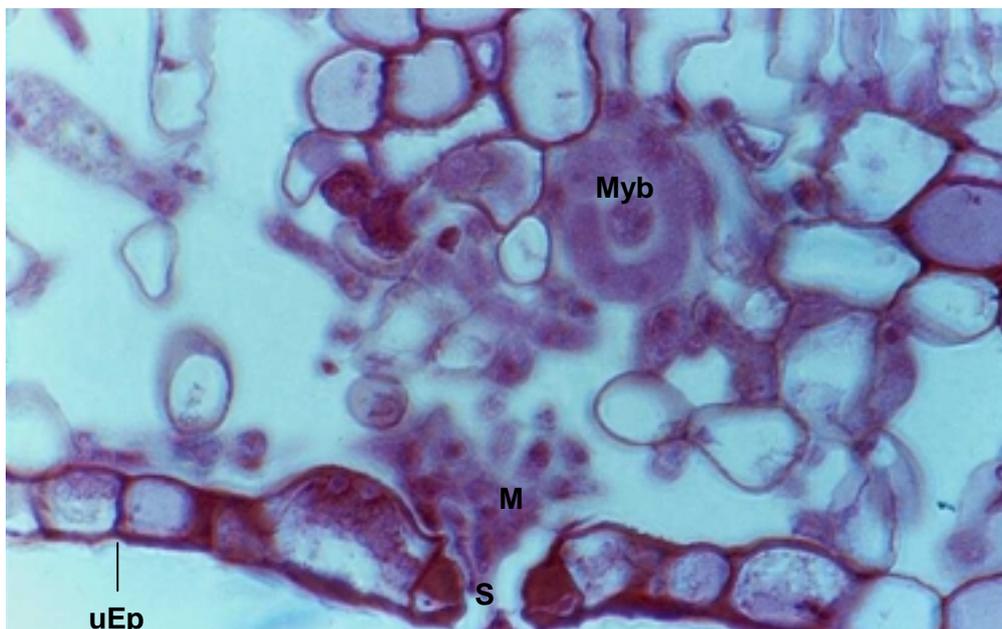


Abbildung 84: Trichogyne und Myzelballen, 1000 x, Tr =Trichogyne, Myb = Myzelballen, uEp = untere Epidermis, S = Stomata, M = Myzel

Allem Anschein nach handelt es sich bei *Gnomonia erythrostoma* um einen Pilz, der sich nur über seine Ascosporen verbreitet.

Eine Keimung der Ascosporen konnte leicht erreicht werden. Hierzu benötigten die ausgeschleuderten Sporen ein feuchtes Milieu (ständiger Wasserfilm) von mindestens 6 Stunden. Auf Wasseragar betrug die Keimrate nach 6 h bei Temperaturen um 15 °C bis 20 °C 17 bis 20 %. Die maximale Keimrate von 80 % wurde nach 24 Stunden erreicht. Dieses Ergebnis lieferten auch die REM-Untersuchungen.

Da die sehr kurzen Keimschläuche auch direkt unter der Ascospore auskeimen und sofort in das Pflanzengewebe eindringen, können diese Sporen beim Auszählen leicht übersehen werden. Nur ein ständiges Fokussieren läßt unter dem Lichtmikroskop (400-fache Vergrößerung) dieses Ereignis sichtbar werden. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß die maximale Keimrate noch etwas höher liegt.

FRANK (1887a) führt als eindeutiges Erkennungsmerkmal für gekeimte Sporen das Auflösen der beiden Öltröpfchen der größeren Zellen auf. Diese Aussage trifft in den meisten Fällen zu, aber mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß unreife Sporen, die durchaus auch ausgeschleudert werden können bzw. im Jahr sehr spät gebildete Sporen (ab Mitte Juni), sich ebenfalls durch das Fehlen dieser Tröpfchen auszeichnen.

Gnomonia erythrostoma ist auch in der Lage, bei kühlen Temperaturen die Kirschen zu infizieren. Noch bei 5 °C können Ascosporen auskeimen. Dieser Temperaturwert dürfte normalerweise im Infektionszeitraum von Ende April bis Anfang Juli nur in der Nacht erreicht werden. Demnach hat die Temperatur für die Infektion keinen großen Einfluß.

Das aus befallenen Blättern isolierte Myzel zeigte auf Möhrensaftagar das schnellste Wachstum. Nach mehrmaligen Überimpfen konnte die Wachstumsrate deutlich gesteigert werden. Allerdings war dieses gesteigerte Wachstum nur in einzelnen Chargen zu sehen.

Der Einfluß des pH-Wertes in den Nährböden kann als sehr gering eingestuft werden. Im leicht sauren Bereich (pH: 4 - 5) war der Myzelzuwachs geringfügig höher. Dies ist auch nicht außergewöhnlich, da die meisten Pilze ein saures Milieu bevorzugen.

Ebenso wie der pH-Wert hat das Licht einen geringen Einfluß auf das Wachstum des Pilzes. Den mit Abstand größten Einfluß auf das Wachstum des Pilzes hat die Temperatur. Das Optimum liegt in einem Temperaturbereich von 15 °C bis 18 °C.

In der Literatur gibt es Hinweise vom Einfluß der Nässe und im Zusammenhang damit der Temperatur auf den Epidemieaufbau der Blattbräune.

Nach KOTTE (1958) ist *Gnomonia erythrostoma* alljährlich in nahezu gleichbleibender Stärke in höheren Gebirgslagen (= tiefere Temperaturen) an Brennkirschen und Wildkirschen anzutreffen. HEINZE (1978) schreibt, daß regenreiche Sommer (= kühlere Temperaturen) das Auftreten der Krankheit in weniger gefährdeten Gebieten des Flachlandes begünstigen. Es

spricht also einiges dafür, daß die Temperatur für die Entwicklung der Krankheit eine Bedeutung hat.

Untersuchungen zur Aufklärung der Epidemiologie von *Gnomonia erythrostoma* erfolgten an zwei Standorten in Oberfranken.

Da sich *Gnomonia erythrostoma* nur über seine Ascosporen vermehrt, ist die Erfassung des Ascosporenfluges in Abhängigkeit von der Witterung grundlegend für die Entwicklung von Prognose und gezielter Bekämpfung.

Um eine Aussage über den Beginn des Sporenfluges zu machen, wurden über den Zeitraum Oktober bis März der Jahre 1997 bis 2001 die Wetterdaten der Wetterstation Hiltlpoltstein ausgewertet. Für eine gesicherte Aussage sind nur Daten aus mehreren Jahren verwertbar, so daß hier nur Tendenzen angegeben werden können.

Den größten Einfluß auf den Reifungsprozeß der Ascosporen und damit den Beginn des Sporenfluges scheint die Temperatur zu haben. Natürlich benötigt die Ascosporenbildung, wie jedes Wachstum, Wasser. So hat HASYN (1996) herausgefunden, daß nur immer wieder durchnäßte Blätter (Perithechien) reife Ascosporen hervorbringen. In den Untersuchungsjahren (1998-2000) hat sich aber gezeigt, daß der Niederschlag wohl nicht der limitierende Faktor ist.

Die Bildung der Ascosporen beginnt mit dem Sichtbarwerden der Perithechien Anfang Oktober. Zu diesem Zeitpunkt werden die Asci angelegt, in denen sich jeweils 8 Ascosporen bilden. Bei Temperaturen knapp über dem Gefrierpunkt (ca. 3 °C bis 4 °C) beginnen sich die Ascosporen zu entwickeln. Je höher die Temperatur ist, desto schneller die Entwicklung.

Das Jahr 2000/01 ist dafür ein gutes Beispiel, zeigten sich doch bereits bei Untersuchungen der Perithechien Ende Januar 2001 aufgrund der sehr warmen Monate Oktober (Monatsdurchschnittstemperatur: 9,68 °C) und November (Monatsdurchschnittstemperatur: 5,01 °C), schon fast voll entwickelte Ascosporen. In den folgenden drei Monaten stieg die Monatsdurchschnittstemperatur nicht über 1,5 °C, so daß die Entwicklung der Ascosporen in diesem Zeitraum still stand. Erst mit steigenden Temperaturen im März (Monatsdurchschnittstemperatur: 4,22 °C) erfolgte die endgültige Reifung, so daß bereits vor dem Aufstellungstermin der Sporenfalle (23. März 2001) Ascosporen ausgeschleudert wurden.

In den anderen Jahren waren die Oktober- und Novembertemperaturen deutlich niedriger. Auch zeigten sich bei Untersuchungen der Perithechien Ende Februar/Anfang März noch keine differenzierten Ascosporen. Im April kam es dann in den Jahren 1998/99 und 1999/2000 bei Monatsdurchschnittstemperaturen von 4,57 °C bzw. 4,36 °C zu einer sehr schnellen Reifung, so daß die ersten Sporen Ende März entlassen wurden. Der späte Sporenflugbeginn im Jahr 1998 (Mitte bis Ende April) läßt sich durch den kühlen Oktober (7,2 °C) und März (3,36 °C) erklären.

DOBREV (1987) berichtet, daß die Perithezien von *Gnomonia erythrostoma* an der Aprikose für eine normale Entwicklung Temperaturen unter oder höchstens knapp über dem Gefrierpunkt über einen Zeitraum von mindestens 10 bis 12 Tage benötigen. Ob man diesen Pilz mit dem Erreger der Blattbräune an der Kirsche vergleichen kann, ist fraglich, unterscheiden sie sich doch in einigen Punkten. Im Gegensatz zur Aprikose werden befallene Blätter der Kirsche über den Winter nicht abgeworfen, auch sind die Perithezien schon Anfang Oktober zu sehen, während diese bei der Aprikose erst im Januar augenscheinlich werden (VUKOVITS und WITTMANN 1990). Vermutlich ist erst der Kältereiz der Auslöser für die Perithezienbildung bei der Aprikose.

Die epidemiologischen Untersuchungen haben gezeigt, daß für die Ausschleuderung der Ascosporen die Blätter durchnäßt sein müssen. Vollkommen ausgetrocknete Blätter benötigen eine Regenmenge von in etwa 1 l/m², um ausreichend durchfeuchtet zu werden.

FRANK (1887a) kam in seiner Arbeit zu dem Ergebnis, daß der Vorgang der Sporentlassung erst bei Rückgang der relativen Luftfeuchte einsetzt, d.h. wenn das Blatt an die umgebende Luft Wasser abgeben kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Bestimmung der Keimrate bestätigen die Resultate von FRANK (1887a). In Petrischalen fixierte, nasse Blätter entließen ihre Ascosporen um so schneller, je öfter die Petrischale geöffnet wurde. Schon nach 5 bis 10 Minuten setzte mit dieser Methode die Sporenausschleuderung ein.

Nach HASYN (1996) sporulieren die Perithezien erst nach 6 bis 16 Stunden, wobei die Menge der Sporentlassung mit zunehmendem Feuchtegrad der Blätter zunimmt.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich leicht erklären. Da HASYN (1996) die unterschiedlich stark durchnäßten Blätter in mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischalen fixierte, begann die relative Luftfeuchte erst nach 6 Stunden in einem ausreichenden Maße abzunehmen, um die Sporenausschleuderung in Gang zu setzen. Je höher der Durchnäsungsgrad der Blätter war, desto später wurde der Vorgang ausgelöst. Zusätzlich wird durch das feuchte Filterpapier ein rasches Abtrocknen verhindert, so daß die Sporen über einen längeren Zeitraum günstige Ausschleuderungsbedingungen haben. Dies erklärt, warum mit zunehmendem Feuchtigkeitsgrad der Blätter das Sporulationsvermögen stieg.

Weiter stellte HASYN (1996) bei ihren Versuchen zur Sporentlassung fest, daß Blätter, die ihre Sporen entlassen hatten, einige Tage Trockenheit benötigten, um wieder sporulieren zu können. Bei ähnlichen Versuchen von FRANK (1887a) passierte das schon nach kurzer Zeit. Auch dieser augenscheinliche Gegensatz läßt sich mit den Ausschleuderungsbedingungen erklären. Da Frank seine durchnäßten Blätter an der "trockenen" Luft sporulieren ließ, waren diese nach wenigen Minuten wieder so weit abgetrocknet, daß der Vorgang der Sporentlassung auf Grund suboptimaler Bedingungen endete. Durch eine erneute Befeuchtung der Blätter konnte der limitierende Faktor Nässe wieder optimiert werden. Bei HASYN (1996)

endete der Prozeß mangels erschöpfter Inokulumquellen und konnte erst wieder nach Heranreifung von Ascosporen in Gang gebracht werden.

In der Natur konnten diese Erscheinungen des öfteren beobachtet werden. Als Beispiel werden hier der 12. Juni 1998 und der 7. und 8. April 1999 aufgeführt. Obgleich es am 12. Juni fast durchgehend geregnet hat, wurden am Standort Oberrüsselbach nur bis 17 Uhr Sporen ausgeschleudert. Danach waren keine reifen Sporen mehr vorhanden. Am 7. und 8. April kam es immer wieder zu kurzen Schauern, bei denen immer wieder Sporen ausgestoßen wurden. Dies ist nur bei Vorhandensein von reifen Sporen möglich.

Gnomonia erythrostoma ist nur in der Lage, entfaltete Blätter bzw. sich entwickelnde Früchte bei einer länger anhaltenden Blattnässe zu infizieren. Um auszukeimen, benötigen die Ascosporen ständige Nässe von mindestens 6 h. Das bedeutet, die Gefahr einer Infektion mit *Gnomonia erythrostoma* besteht dann, wenn nach der Ausschleuderung von Sporen die Blätter bzw. Früchte nach 6 Stunden nicht abgetrocknet sind.

Infektionsversuche von HASYN (1996) haben ergeben, daß nur entfaltete Blätter befallen werden. Die Inkubationszeit betrug bei 15 °C 10 Tage, bei 20 °C 13 Tage. Bei der Beobachtung der Pathogenese über die Jahre 1998 bis 2000 konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Im Bestand zeigten sich nach etwa 2 - 3 Wochen die ersten Symptome. Da hier keine konstanten Bedingungen wie bei den Infektionsversuchen herrschten, ist die längere Inkubationszeit leicht erklärbar. Das Temperaturoptimum des Pilzes liegt im Bereich zwischen 15 °C und 18 °C. Kühlere bzw. wärmere Temperaturen oder Trockenheit führen zu einem verlangsamten Wachstum des Myzels und damit zu einer längeren Inkubationszeit.

Im Jahr 1998 wurden die ersten Symptome der Blattbräune an den Standorten Hiltpolstein und Oberrüsselbach Ende Mai registriert. Diese Symptome sind durch die Sporentlassungen von Ende April/Anfang Mai verursacht worden. Durch die dreiwöchige Trockenperiode hat sich die Inkubationszeit auf drei bis vier Wochen verlängert.

Allgemein konnte beobachtet werden, daß die ersten Blattsymptome frühestens drei Wochen nach der Blattentfaltung entstanden. Die also deutlich vor Beginn der Blattentfaltung entlassenen Ascosporen führen mit Sicherheit nicht zu Infektionen, selbst bei optimalen Witterungsbedingungen.

Die Entfaltung der Kirschblätter im Oberland des Landkreises Forchheim begann, abhängig von der Witterung, Mitte/Ende April.

Der Vergleich der Sporenflüge der Jahre 1998 bis 2000 mit den erforderlichen Infektionsbedingungen hat gezeigt, daß die Gefahr einer Infektion mit *Gnomonia erythrostoma* mit der Blattentfaltung (Mitte /Ende April) beginnt und meist Ende Mai/Anfang Juni mit der Abnahme des Inokulums und der Infektionsminderung der Ascosporen endet.

Demnach wäre für den Kirschanbauer ein früher Sporenflugbeginn (Mitte/Ende März) und ein regenreicher März und April, der den Erreger veranlaßt, viele Ascosporen frühzeitig zu entlassen, wünschenswert.

Diese Kriterien wurden im Jahr 1999 erfüllt. Einem frühen Sporenflugbeginn (Ende März) folgte ein niederschlagsreicher April. Die Folge war, daß fast alle Sporen bis Ende Mai ausgeschleudert wurden. Günstige Infektionsbedingungen herrschten nur vom 1. bis 11. Mai. Trotz dieser kurzen Infektionsperiode sorgte ein extrem hoher Befallsdruck (ca. 70.000 Sporen/m³ Luft in diesem Zeitraum: Standort Oberrüsselbach) für einen starken Blatt- und Fruchtbefall. Nur optimale Spritztermine, d.h. Applikationen ein oder zwei Tage vor Niederschlägen, hätte den Befall niedrig halten können. Diese wurden damals nicht durchgeführt.

Im Gegensatz dazu haben günstig gewählte Spritztermine vor allem Fruchtfäulnissen im Jahr 2000 weitgehend verhindert. Der Sporenflug begann ebenfalls Ende März. Danach kam es bis Mitte Mai zu vereinzelt Niederschlägen mit drei sicheren Infektionstagen (24./25. April und 30. April). Die folgenden vier Wochen waren sehr regenreich, die zu Sporenausschleuderungen mit guten Infektionsbedingungen geführt haben. Obwohl die Fruchtbildung in diesen Zeitraum fiel, war der Fruchtbefall zu vernachlässigen. Dieses Jahr zeigt, dass optimale Spritztermine zumindest den Fruchtbefall mit *Gnomonia erythrostoma* verhindern können.

Das Jahr 1998 war durch einen späten Sporenflugbeginn und einer dreiwöchigen Trockenperiode im Mai geprägt, der die Dauer der Sporenfreisetzung bis Anfang Juli hinauszögerte. Gefährliche Infektionsperioden herrschten Ende April/Anfang Mai (29. April bis 6. Mai), Ende Mai/Anfang Juni (25. Mai bis 1. Juni) und vom 7. bis 12. Juni.

Auffällig in diesem Jahr waren ein starker Blattbefall und ein starker Fruchtbefall der mittleren und späten Sorten. Verursacht wurden die Symptome durch die Sporenausschleuderungen von Ende Mai und Anfang/Mitte Juni. Der anscheinend nicht so hohe Befallsdruck in dieser Zeitspanne (ca. 4.000 Sporen/m³ Luft: Oberrüsselbach) ist etwas irreführend, da im Gegensatz zu den Jahren 1999 und 2000 keine Blätter als Sporenquelle um die Sporenfallen platziert wurden. Man kann also davon ausgehen, daß bei gleichen Voraussetzungen die Zahl der gefangenen Sporen deutlich höher gewesen wäre.

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Früchte nur in einem frühen Entwicklungsstadium für *Gnomonia erythrostoma* anfällig sind. Damit wird auch die Beobachtung von NIKUSCK (1994b) bestätigt, daß junge Früchte nur bei hohem Befallsdruck befallen werden.

Die Dauer bzw. das Ende des Ascosporenfluges hängt ausschließlich von der Häufigkeit der Niederschläge ab. Einerseits wird durch eine Durchnässung der Blätter der Vorgang der Sporenausschleuderung verursacht, andererseits bewirkt die Nässe eine Beschleunigung der Ascosporenausreifung.

Ein Vergleich der Sporenzahlen beider Standorte zeigt, daß der Befallsdruck in Hiltoltstein deutlich geringer war als in Oberrüsselbach. Dies machte sich auch in der Ausprägung der Befallssymptome, die in Hiltoltstein geringer waren, bemerkbar.

Dieses Ergebnis ist um so erstaunlicher, bei der Berücksichtigung der offenen Lage von Oberrüsselbach. Im Gegensatz dazu ist die Anlage Hiltoltstein nahezu ganz von Wald umschlossen. Aber gerade die offene Lage kann die Ursache für den höheren Befallsdruck sein, da sie den Zugang für Ascosporen aus externen Inokulumquellen (Ascosporen von anderen befallenen Anlagen) erleichtert. Ohne Zweifel sind die Infektionsbedingungen in geschlossenen Lagen besser, aber die isolierte Lage bietet auch nur ein begrenztes Angebot an Inokulum.

In den Jahren 1999 und 2000 wurden an beiden Standorten Blätter mit Perithezien als Sporendepots um die Sporenfallen gelegt, um gesicherte Sporenfänge zu erhalten.

Vergleicht man die Sporenzahlen der letzten drei Jahre innerhalb jeder Anlage, so erkennt man, daß die in Hiltoltstein nur gering variieren. Bis auf einen etwas stärkeren Fruchtbefall im Jahr 1999 waren auch die Ausprägungen der Befallssymptome über die drei Jahre nahezu gleich. Anders verhält sich das in Oberrüsselbach.

Hier war im Jahr 1999 die Ausschleuderungsmenge (ca. 87.000 Sporen/m³ Luft) fast dreimal so hoch wie im folgenden Jahr (ca. 34.000 Sporen/m³ Luft). Da 1998 keine Sporendepots um die Sporenfallen angelegt wurden, wurde dieses Jahr vernachlässigt. Dieser enorme Befallsdruck machte sich 1999 vor allem in einem hohen Fruchtbefall bemerkbar. Große Unterschiede im Blattbefall konnten dagegen nicht festgestellt werden. Es wird hier noch einmal ersichtlich, daß ein hoher Befallsdruck vor allem die Ausprägung der Fruchtsymptome beeinflusst.

Eine im Jahr 2000 durchgeführte Blattbonitur zeigte die unterschiedliche Anfälligkeit der Sorten gegenüber der Blattbräune. Bereits 1926 hatte von TUBEUF das unterschiedliche Verhalten der Sorten beobachtet.

Die Mitte Mai beobachteten Anfangssymptome konnten an allen untersuchten Sorten festgestellt werden. Bis Ende Juli nahmen die Symptome in Abhängigkeit von der Sorte sehr langsam, aber stetig zu. Danach blieben die Befallssymptome bis Ende September in etwa gleich. Der deutliche Anstieg der Werte am letzten Boniturtermin (25. September 2000), mit Ausnahme der Sorte "Regina", die eine der spätesten Sorten ist, wurde durch die verstärkte Nekrotisierung der Blätter hervorgerufen, die den Eindruck eines stärkeren Befalls verursachte.

Den höchsten Befall wies die Sorte "Regina" auf. Als am widerstandsfähigsten zeichneten sich die Sorten "Haumüller", "Sam" und "Königskirsche" aus. Von einer erhöhten Anfälligkeit der Sorte "Regina" berichtet HOLIGHAUS (1999).

Weitere Aufschlüsse über die Sortenanfälligkeit brachte die Bonitur des am Baum verbliebenen Laubes, die jeweils im Frühjahr (Ende März) erfolgte. In den Jahren 1999 und 2000 stimmte die Sortenrangfolge hinsichtlich der Belaubung nahezu überein, während sie sich im Jahr 2001 änderte.

Wenn man den Grad der Belaubung im Winter als Maßstab für die Anfälligkeit für *Gnomonia erythrostoma* nimmt, ist die Sorte "Burlat", die in den drei Bonituren immer die stärkste Belaubung aufwies, als sehr anfällig einzustufen. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, daß diese Sorte stets die stärksten Blattsymptome aufwies. Trotz der hohen Anfälligkeit ist ein Verzicht auf diese Sorte nicht möglich, da sie als frühe Sorte konkurrenzlos ist.

Die Sorten "Sam", "Froschmaul", "Abels Späte" und "Königskirsche" unterschieden sich in der Ausprägung der Befallssymptome nicht wesentlich. Diese Gemeinsamkeit spiegelte sich, mit Ausnahme im März 2000 (Sorte "Königskirsche" zeigte einen deutlich geringeren Laubehang), in der Belaubung im Winter wieder.

Bis auf die Sorte "Regina", deren Belaubung nahezu auf einem Niveau bleibt, nimmt der Grad der Belaubung über die Jahre zu (Ausnahme: "Königskirsche" März 00). In den drei Jahren war der Befall zwar unterschiedlich, jedoch stieg der Belaubungsgrad. Ein Zusammenhang zwischen Befallsstärke und Belaubung im Winter ist wahrscheinlich, jedoch nur über das Ausmaß des Myzelwachstums in den Blättern zu erklären.

Darüberhinaus ist bekannt, daß durch einen mehrjährigen Befall mit *Gnomonia erythrostoma* die Bäume geschwächt werden (KOTTE 1958; RÜEGG 1994). Der ansteigende Belaubungsgrad, der an den Bäumen über den Winter verbliebene Blätter, zeigt die zunehmende Schwächung der Bäume.

Die epidemische Ausbreitung der Blattbräune und hohe Ernteauffälle in den letzten Jahren hat viele Anbauer über die Rentabilität des Süßkirschenanbaus nachdenken lassen. Es besteht also dringender Handlungsbedarf, um den Kirschenanbau in der Fränkischen Schweiz nicht zu gefährden.

Die in den Jahren 2000 und 2001 am Standort Oberrüsselbach durchgeführte Spritzversuche haben deutlich gemacht, daß der Einsatz von Fungiziden den Befall, im Vergleich zu unbehandelten Bäumen, deutlich reduzieren kann.

Im Jahr 2000 zeigten die beiden Varianten (Bayer und Max) mit neun bzw. elf Spritzungen gegen *Gnomonia* eindeutig den geringsten Befall. Mit einem Wirkungsgrad um die 80 % haben sie eine gute bis sehr gute Wirkung. Allerdings darf bezweifelt werden, ob sich die Anzahl der Behandlungen in der Praxis auszahlt. Im Jahr 2001 erwiesen sich Flint, die Maximal- und EUFL-Variante mit Wirkungsgraden um die 90 % als sehr gut geeignete Spritzmittel gegen *Gnomonia erythrostoma*. Berücksichtigt man den Kostenfaktor, so sind Flint und EUFL mit nur 4 Spritzterminen der Max-Variante (10 Behandlungen) vorzuziehen.

Fungizidapplikationen sollten sich nach Witterungsbedingungen und Inokulumangebot richten. Ein Vergleich der Spritztermine mit dem Sporenflug im Jahr 2000 (Abbildungen 85 und 86; Sporenflug 2001 wurde zahlenmäßig nicht überwacht) zeigt, daß die vier Termine für die Azole und Strobilurine günstig gewählt waren. Mit den Spritzterminen am 22., 28. April und 16. Mai wurden "gefährliche" Sporenausschleuderungen abgedeckt. Der Spritztermin am 8. Mai war vielleicht etwas zu früh gewählt und hätte zwei Tage später eine bessere Wirkung gehabt. Nicht erfaßt wurden die Sporenausschleuderungen vom 27. bis 31. Mai, die zu neuen Infektionen geführt haben (Abbildung 85).

Bei den Varianten wurden zusätzlich zu den vier Spritzterminen (22., 28. April, 8. und 16. Mai), Fungizide am 26. April, 12. Mai, 2., 21. Juni und 2. August ausgebracht. Zwei weitere Applikationen wurde bei der Max-Variante am 20. April und 2. Mai vorgenommen. Vor allem die Spritzung am 12. Mai scheint für das bessere Abschneiden der Varianten in Frage zu kommen. Besonders bei der Blattbonitur der Sorte "Burlat" wird deutlich, daß nach dem 12. Juni die Boniturnoten zwischen den Varianten und den restlichen Fungiziden auseinander driften. Während der Befall bei den mit den Varianten applizierten Bäumen gleich bleibt,

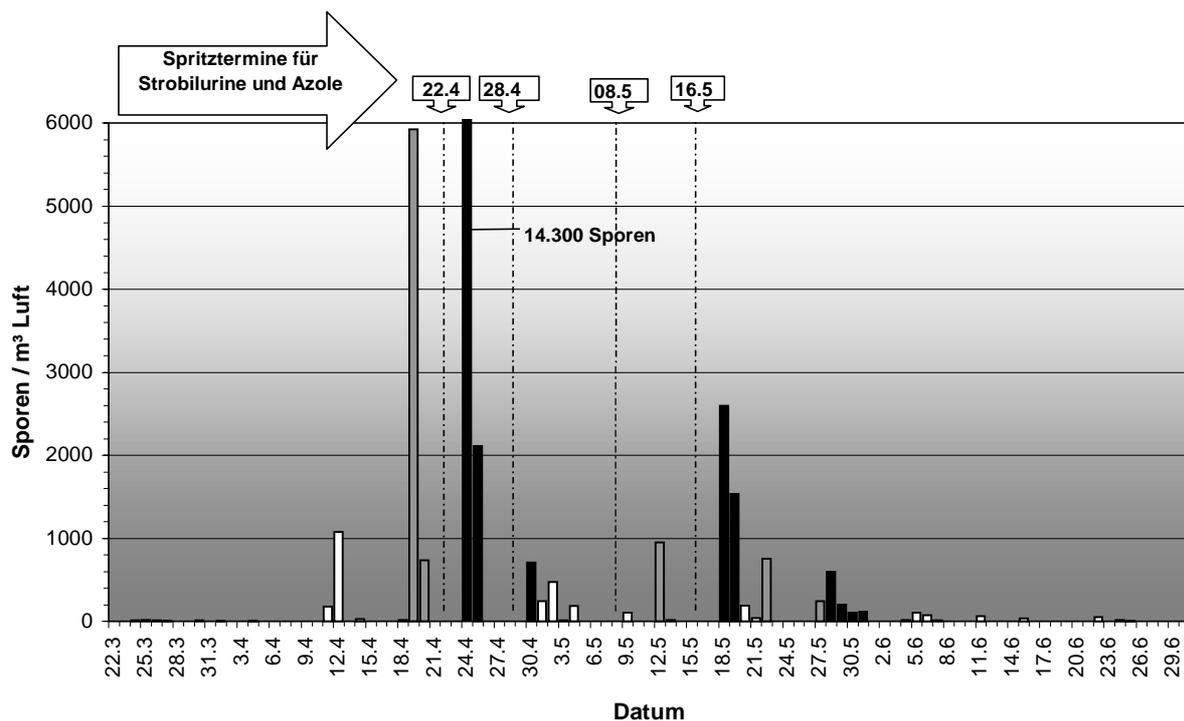


Abbildung 85: Sporenflug und Spritztermine (Fungizide): Oberrüsselbach 2000

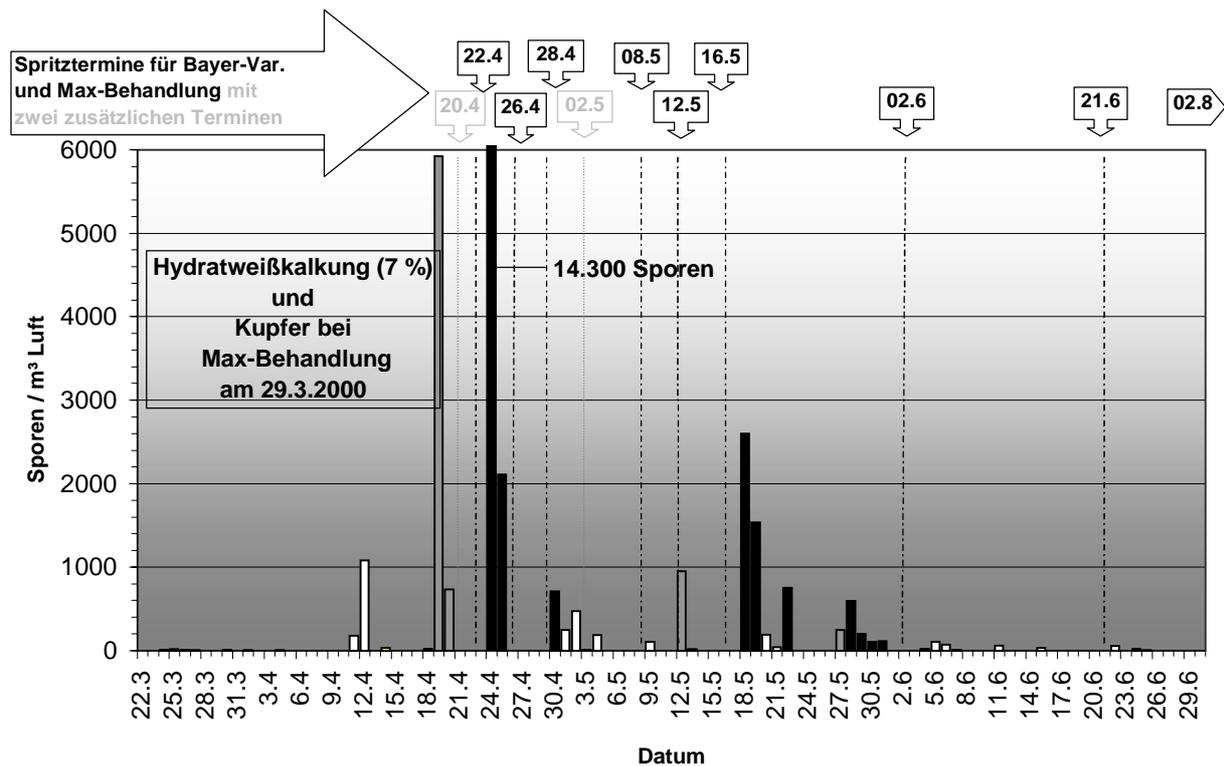


Abbildung 86: Sporenflug und Spritztermine (Varianten): Oberrüsselbach 2000

steigt er bei den anderen Behandlungen deutlich an. Dieser Anstieg ist, wie bereits erwähnt, durch die Sporenausschleuderungen vom 27. bis 31. Mai verursacht worden.

war wurde auch bei den Varianten der optimale Spritztermin verpaßt, aber anscheinend haben die Spritzungen mit den systemischen Fungiziden Systhane 6W (Max) und Baymat (Bayer) am 16. Mai diese Ausschleuderungen noch abgedeckt bzw. erfolgte Infektionen durch die Applikation am 2. Juni gestoppt (Abbildung 86).

Die anderen, zusätzlichen Spritztermine haben nur zu einer geringfügigen Befallsreduzierung geführt. Demnach ist der Spritztermin das entscheidende Kriterium für eine erfolgreiche Bekämpfung der Blattbräune.

Die mit Systhane 6W behandelten Bäume wiesen im Spritzversuch 2000 einen leichten bis mittleren Befall auf. Mit einem Wirkungsgrad um die 60 % (Wirkungsgrad bei Berücksichtigung beider Sorten) bei vier Behandlungen lag Systhane 6W auf einem Niveau mit den Fungiziden Amistar, Baycor/Baymat und Flint. Das im Jahr 2001 verwendete Systhane 20 EW zeigte mit einem Wirkungsgrad um die 70 % (Blatt) eine etwas bessere Wirkung.

Bei Bekämpfungsversuchen der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt Oppenheim (1994 bis 1998) wurde für Systhane 6W ebenfalls ein Wirkungsgrad von 70 % ermittelt. An erster Stelle dieser Versuchsreihe (HOLIGHAUS 1999) mit einem Wirkungsgrad von fast 80 % lag das Strobilurin Discus.

Spritzversuche des Landratsamtes Forchheim in Zusammenarbeit mit dem Amt für Landwirtschaft und Ernährung Bayreuth (1997 bis 1999) konnten die gute Wirkung der Fungizide (Amistar, Discus) aus der neuen Wirkstoffgruppe der Strobilurine bestätigen.

Im Spritzversuch 2000 konnte diese Überlegenheit nicht festgestellt werden. Hinter den beiden Varianten folgte das Strobilurin Discus mit einem Wirkungsgrad von 68 %. Als nur unwesentlich schlechter in ihrer Wirkung erwiesen sich die bereits oben erwähnten Azole Systhane 6W, Baycor/Baymat und die Strobilurine Amistar und Flint. Das Prüfmittel der Firma BASF mit einem Strobilurinanteil als Wirkstoff nahm mit einem Wirkungsgrad von 38 % deutlich den letzten Platz ein. Das schlechte Abschneiden des Prüfmittels wurde von einem Vertreter der Firma BASF mit einem niedrigen Wirkstoffgehalt begründet.

Das Strobilurin "Flint", das im Jahr 2000 eine gute bis mittlere Wirkung aufwies, zeigte im folgenden Jahr, mit einer 10-fach höheren Wirkstoffkonzentration, eine sehr gute Wirkung (Wirkungsgrad über 90 %). Auch wenn ein Vergleich damit hinfällig ist, zeigt dieses Ergebnis, daß eine effektive Bekämpfung der Blattbräune möglich ist. Pflanzenschäden konnten, rein äußerlich, nicht festgestellt werden. Das ebenfalls in diesem Versuch getestete Strobilurine Ortiva (=Amistar) zeigte eine vergleichbare Wirkung wie im Jahr 2000, das Strobilurin F 500 (= BASF-Prüfmittel) schnitt im Vergleich zu Vorjahr deutlich besser ab. Für das unterschiedliche Verhalten der Strobilurine bei den Spritzversuchen konnte bisher keine Erklärung gefunden werden. Eine Resistenzbildung bei *Gnomonia erythrostoma* kann ausgeschlossen werden, da alle Strobilurine am gleichen Wirkungsort ansetzen (Elektronentransportkette). Der starke Fruchtbefall im Jahr 2001 konnte lediglich von Flint und der EUFL-Variante (Euparen und Flint im Wechsel) wirksam bekämpft werden (Wirkungsgrade um die 90 %).

Eine mehrtägige Regenperiode Mitte Mai hat zu diesen erheblichen Fruchtfektionen geführt. Obwohl die letzten Applikationen von Flint und EUFL 12 Tage (4. Mai) vor dieser Schlechtwetterphase erfolgten, konnte die lange anhaltende Wirkung des teilsystemischen Fungizids Flint in Verbindung mit dem hohen Wirkstoffgehalt Infektionen nahezu ganz verhindern. Für das schlechte Abschneiden der anderen Spritzmittel sind die ungünstigen Spritztermine verantwortlich.

Die Anzahl der Anwendungen ist von der Witterung und Inokulumangebot abhängig. Sind nach Beginn des Sporenfluges gute Infektionsbedingungen zu erwarten, sollte auf jeden Fall gespritzt werden. Die Wirkungsdauer der Behandlung ist von der Witterung und vom Fungizid abhängig. Die bekanntermaßen längere Wirkungsdauer der Strobilurine läßt einen größeren Spielraum im Bezug auf die Spritztermine zu.

Da der Pilz bereits nach 6 h beginnt, in das Blatt- oder Fruchtgewebe einzudringen, ist eine Behandlung mit Kontaktfungiziden nach Regen unwirksam. Zu diesem Ergebnis kam auch NIKUSCH (1994b). Inwieweit kurative Fungizide bei bereits gesetzten Infektionen eine Wirkung haben, ist unklar. Nach den bisherigen Beobachtungen scheint der Pilz durch diese

nicht abgetötet, sondern in seinem Wachstum gehemmt zu werden. Nach dem Abbau der Wirkstoffe beginnt der Pilz (Myzel) sich wieder auszubreiten.

Die bisher in der Diskussion für den Spritzversuch 2000 angegebenen Wirkungsgrade wurden aus den Befallsstärken beider Sorten ("Burlat" und "Regina") gebildet. Vergleicht man die errechneten Wirkungsgrade für die einzelnen Sorten, so sind hier klare Unterschiede zu erkennen. Für das Jahr 2001 trifft das nicht zu.

Im Jahr 2000 sind die Wirkungsgrade bei der Sorte "Regina" durchgehend niedriger als bei der Sorte "Burlat". Dies wird besonders bei Baycor/Baymat und dem Prüfmittel deutlich, deren Wirkungsgrade um fast 50 % niedriger sind. Auch sind die Wirkungsgrade der einzelnen Fungizide bei "Regina" sehr unterschiedlich, während bei "Burlat" fünf von acht Fungiziden fast die gleichen Wirkungsgrade (Discus, Amistar, Baycor/Baymat, Flint und Systhane 6W) aufweisen.

Dieses unterschiedliche Verhalten liegt an der höheren Resistenz von "Regina". Dies wird auch bei der Blattbonitur der einzelnen Sorten deutlich. Die Kontrollbäume der Parzellen von "Burlat" und "Regina" unterschieden sich im Befall sehr deutlich. So wies "Burlat" Ende September eine Boniturnote von 4,15 (= starker Befall) und "Regina" eine Boniturnote von 2,76 (= mittlerer Befall) auf. Da die Fungizide aber den Befall bei "Regina" im Vergleich zu "Burlat" deutlich weniger reduzieren konnten, ergaben sich bei der Berechnung der Wirkungsgrade für die Sorte "Regina" die niedrigeren Prozentzahlen. Außerdem haben die kleineren Differenzen zwischen den Boniturnoten von Kontrolle und Fungizidbehandlungen schon bei geringen Boniturunterschieden einen großen Einfluß auf die Berechnung der Wirkungsgrade.

Da die Sorte "Regina" nicht resistent gegen die Blattbräune ist, kann die Ausprägung der Befallssymptome von Jahr zu Jahr unterschiedlich sein. So ist der starke Befall von "Regina" im Jahr 2001 nichts außergewöhnliches.

Für eine weitere Prüfung der Effizienz der Fungizide wurde im März des folgenden Jahres der Laubbehang und Fruchtkörperbesatz der Sorte "Burlat" bonitiert.

Die wenigsten Blätter wies die Parzelle mit der Discusbehandlung auf. Allerdings zeigten sich auf 71 % der Blattfläche Perithezien. Die wenigsten Perithezien wiesen die beiden Varianten auf, obwohl die Max-Variante einen relativ hohen Belaubungsgrad (3,67) hatte. Fast genauso viele Blätter trugen die Kontrollbäume der Sorte "Burlat".

Ein Befall mit *Blumeriella jaapii* führt zu einem frühzeitigen Blattfall. Da die nicht behandelten Bäume auch von dieser Krankheit betroffen waren (die Behandelten wiesen so gut wie keine Sprühfleckensymptome auf), kann der verhältnismäßig "geringe" Belaubungsgrad dadurch erklärt werden. Dafür spricht auch, daß die Blätter voller Perithezien waren (71 %). Die Fungizide Systhane 6W, Amistar, Baycor/Baymat und das Prüfmittel wiesen einen hohen Grad an Belaubung (4,5 - 5) auf. Die Perithezienbildung dagegen war sehr unterschiedlich. Den

geringsten Perithezienbesatz mit 23 % wies Baycor/Baymat auf. Es folgten Amistar mit 37,5 %, Systhane 6W mit 56 % und das Prüfmittel mit 62 %. Die Belaubung im Winter erlaubt keine Aussage über das Inokulumangebot im nächsten Jahr.

Versucht *Gnomonia erythrostoma* mittels einer Keimhypho in die Pflanze einzudringen, reagiert diese mit Ausschüttung von Pektinen aus den Epidermiszellen. Laut FEUCHT (2001) reagiert die Pflanze damit auf eine Stresssituation.

Parallel zum Pektinfluß kommt es in der Pflanze zur Akkumulation von Phenolen. MATERN und KNEUSEL (1988) berichten, daß es unmittelbar nach Befall mit einem Erreger zu einer Anreicherung von Phenolen an der Infektionsstelle kommt. Im Fall von *Gnomonia erythrostoma* waren in sämtlichen Zellen über einen weiten Blattbereich Phenole zu finden. Um welche Phenole es sich dabei handelt, konnte nicht ermittelt werden. Eine Bildung von Catechinen und Proanthocyanidin kann ausgeschlossen werden, da Anfärbungen mit DMAZA stets negativ verliefen.

Die Infektion beginnt in den meisten Fällen auf der Blattoberseite. Dies erscheint logisch, wenn man bedenkt, daß die Ascosporen nach unten ausgeschleudert werden. Der Pilz ist aber durchaus in der Lage die Blattunterseite zu penetrieren.

Die Schnitte von Blättern mit unterschiedlich ausgeprägten Symptomen haben gezeigt, daß der Pilz zwischen bzw. durch die Palisadenzellen wächst und sich dann langsam im Schwammparenchym ausbreitet. Da die Palisadenzellen nicht weiter beeinträchtigt werden, bleiben die Blätter funktionsfähig. Erst nachdem das gesamte Schwammparenchym "verdaut" worden ist, beginnt der Pilz das Palisadenparenchym zu schädigen. Dies äußert sich makroskopisch mit dem Beginn der Nekrotisierung.

Zum gleichen Zeitpunkt kommt es an der unteren Epidermis zu Hyphenzusammenlagerungen, aus denen sich die Nebenfruchtformen bilden. Auf Grund der Kugelform muß man von Pyknidien oder zumindest von pyknidienartigen Gebilden sprechen und nicht wie VUKOVITS (1980) und NIKUSCH (1994b) behaupten, von Acervuli. Diese Pyknidien durchbrechen die Epidermis und sind als braune Pünktchen auf den nekrotischen Stellen zu sehen.

Da die von *Gnomonia erythrostoma* verursachten Blattflecken typischerweise nicht scharf begrenzt sind und sich über das gesamte Blatt ausbreiten, muß der Pilz in der Lage sein, die Blattadern zu überwinden. Dies konnte bestätigt werden. Direkt unterhalb der Epidermis (Blattunterseite) löst der Erreger die Mittellamelle auf und überwindet die Blattadern.

Die von FRANK (1887a) aufgestellte These, daß *Gnomonia* nicht in den Blattstiel wächst, konnte widerlegt werden. In allen Bereichen des Blattstiels konnte Myzel nachgewiesen werden. Aber nicht nur im Blattstiel, sondern auch im Phellem der Buketttriebe war *Gnomonia erythrostoma* mit seinem Myzel vorhanden. Das Myzel wuchs zwischen den stark verdichteten Zellen des Phellems. Erst durch eine Verletzung des Periderms, wodurch das verdichtete

Phellem "dekomprimiert" wurde, war das Myzel zu erkennen. Es ist also nicht verwunderlich, daß man bisher ein Wachstum ins Holz ausgeschlossen hat. Ob der Pilz auch Kurz- oder Langtriebe befallen kann, konnte nicht festgestellt werden. Unabhängig davon steht fest, das *Gnomonia erythrostoma* mit seinem Myzel, zumindest im Buketttrieb, überwintert. Damit besteht die Möglichkeit, daß der Pilz ständig latent in der Kirsche vorhanden ist und sich bei idealen Witterungsbedingungen von diesen Überwinterungsorten entwickeln kann.

Die Untersuchung von Kurztrieben befallener Bäume hat die Schwächung der Baumkondition gezeigt. Phloem und Kambium sind durch Eintrocknung des Holzes geschrumpft bzw. teilweise zerstört, so daß nur noch ein eingeschränktes Wachstum stattfinden kann. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Aussagen von NIKUSCH (1994b) und RÜEGG (1994), daß ein mehrjähriger Befall mit *Gnomonia erythrostoma* den Baum so schwächt, daß es zum Absterben kommen kann.

Die histologischen Untersuchungen haben auch einige Aufschlüsse über den Pilz gegeben. Das Myzel von *Gnomonia erythrostoma* weist neben vielen hyalinen Einschlüssen, ein bis mehrere dunkle, runde Körper auf. Eine durchgeführte DAPI-Färbung identifizierte diese als Zellkerne. Da *Gnomonia erythrostoma* zu den Ascomyceten gehört, sind die Septen mit einem Lochporus ausgestattet, so daß eine Wanderung der Zellkerne möglich ist und damit das Vorhandensein von mehreren Zellkernen pro Zelle erklärt. Proteine als weitere Inhaltsstoffe des Myzels konnten mit einer Coomassie Brilliant Blue Färbung nachgewiesen werden.

Der Vorteil der Environmental Scanning Electron Microscopy ist, daß die Untersuchungen am lebenden Objekt durchgeführt werden können, wodurch das Auftreten präparationsbedingter Veränderungen verhindert wird. Da eine Präparation entfällt, können die Untersuchungen spontan durchgeführt werden. Dies hat sich auch bei der Untersuchung des Penetrationsvorgangs von *Gnomonia erythrostoma* als Vorteil erwiesen.

Sehr auffällig sind die kurzen Keimschläuche, die die Ascosporen von *Gnomonia erythrostoma* ausbilden (teilweise kürzer als 6 µm). Pro Ascospore können sich ein oder auch mehrere Keimschläuche entwickeln. Eine Appressorienbildung ist möglich, aber nicht notwendig. In den meisten Fällen dringt der Parasit direkt mit der Keimhypho in das Gewebe ein. Schon HERING et al. (1993) beobachteten diese Fähigkeit bei Konidien von *Venturia inaequalis*. Penetrationen über Spaltöffnungen konnten nicht beobachtet werden.

Zeigten die Ascosporen eine mosaikartige Struktur, so war dies ein Zeichen für Turgeszenzverlust. Dieser Verlust konnte durch Absenken der relativen Luftfeuchte künstlich herbeigeführt werden. Ausgekeimte Sporen hatten von Anfang an diesen "entwässerten" Zustand. Eine einleuchtende Erklärung dafür gibt FRANK (1887a). Seiner Meinung nach transferiert

die Spore ihren Inhalt als Reservestoffe in die Keimhypho. Wurde die relative Luftfeuchte im REM wieder erhöht, erlangten auch die Sporen ihre Turgeszenz zurück.

Da mit den herkömmlichen mikrobiologischen Methoden ein latenter Befall von *Gnomonia erythrostoma* nur sehr schwierig nachzuweisen ist, wurde versucht dieses Problem mit Hilfe der RAPD-PCR zu lösen.

Für die Isolierung der Pilz-DNA wurde eine Ascosporensuspension verwendet, da keine eindeutige Identifizierung des isolierten Myzels möglich war. Als beste Extraktionsmethode für die DNA des Pilzes und der Pflanze (Blatt und Frucht) erwies sich der DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen. Durch die Ausfällung von Kohlenhydraten, anderen Pflanzenmetaboliten und vor allem Polyphenolen, die in großen Mengen in Kirschen vorkommen, konnte ein störungsfreier Ablauf der PCR erreicht werden.

Von insgesamt 90 getesteten Primern konnten lediglich zwei den gewünschten Anforderungen nach ein bis zwei diskreten Banden entsprechen. Einige wenige hatten ebenfalls diese begrenzte Anzahl an Banden, doch waren sie sehr schwach ausgeprägt. Da RAPD-Primer als sehr unspezifisch gelten (EDEL 1998), wurden diese Primer nicht weiter berücksichtigt. Bei den anderen Primern wurde entweder keine DNA aufgetrennt oder es entstanden viele, oft sehr undeutliche Banden.

Leider zeigten sich auch die selektieren Primer (A15 und D13) für den Nachweis von *Gnomonia erythrostoma* in der Pflanze als ungeeignet bzw. als zu unspezifisch. Somit kann die von EDEL (1998) getroffene Aussage, daß RAPD-Primer zu unspezifisch sind, um einen Erreger in infizierten Pflanzen nachweisen zu können, nur bestätigt werden.

Um einen latenten Befall von *Gnomonia erythrostoma* im Pflanzengewebe nachweisen zu können, wird es nötig sein, spezifische Primer zu entwickeln. Hiermit könnten viele Unklarheiten (Blüteninfektion?, Überwinterung als Myzel in Rinde?) geklärt werden. Auch die Unsicherheit, ob es sich bei einem der isolierten Pilze um *Gnomonia erythrostoma* handelt, könnte ausgeräumt werden.

7 Zusammenfassung

Die Blattbräune der Kirsche (Süßkirsche), die durch den Ascomyceten *Gnomonia erythrostroma* verursacht wird, hat in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung gewonnen. In Abhängigkeit von der Witterung kam es in den letzten Jahren immer wieder zu hohen Ernteaussfällen, die im Jahr 2001 in einem 80 %igen Verlust gipfelten. Mehrere aufeinander folgende Jahre mit solchen Ausfällen würden den Kirschenanbau in Oberfranken ernsthaft gefährden.

Um der Ausbreitung der Krankheit Einhalt zu gebieten und sichere Ernten gewährleisten zu können, wurden biologische, epidemiologische, pathogenetische sowie bekämpfungsstrategische Untersuchungen als Grundlage für die Entwicklung eines Blattbräune-Prognose-Modells durchgeführt.

Aus Blättern konnte ein Myzel isoliert werden, bei dem es sich voraussichtlich um *Gnomonia erythrostroma* handelt. Da eine Fruchtkörperbildung ausblieb, konnte der Pilz nicht sicher identifiziert werden. Auch eine erhoffte Identifizierung über die DNA des Pilzes mit Hilfe der RAPD-PCR verlief ergebnislos.

Nach mehrmaligen Umsetzen des isolierten Myzels erwies sich ein aus Möhrensaft hergestellter Agar als geeignetstes Nährmedium.

Das Temperaturoptimum des Pilzes liegt im Bereich von 15 °C bis 20 °C. Temperaturen über 25 °C führen zum Absterben des Myzels. Bei Temperaturen um 5 °C beginnt der Pilz sein Wachstum einzustellen. Wird der Pilz wieder höheren Temperaturen ausgesetzt, beginnt er wieder zu wachsen.

Licht und der pH-Wert haben keinen großen Einfluß auf das Wachstum des Myzels.

Bei *Gnomonia erythrostroma* handelt es sich um einen Pilz, der sich nur über Ascosporen vermehrt. Die Ascosporenbildung und -reifung ist vor allem von den Temperaturen abhängig, die im Herbst und Winter herrschen. Je höher sie sind, desto schneller verläuft die Entwicklung der Ascosporen. Nicht zu vernachlässigen ist auch der Einfluß des Niederschlages (Wasser), der Grundvoraussetzung für die Entwicklung ist. In unseren Breiten ist er aber nicht der limitierende Faktor.

Voraussetzung für die Sporenausschleuderung ist eine ausreichende Durchfeuchtung von Blättern mit reifen Perithezien. Erst mit Abgabe von Wasser an die umgebende Luft kommt es zur Sporenfreisetzung.

Die Ascosporen von *Gnomonia erythrostroma* benötigen zur Keimschlauchbildung einen ständigen Wasserfilm von mindestens 6 Stunden. Die maximale Keimrate beträgt bei Temperaturen um 15 °C bis 20 °C 80 %.

Die Ascosporen sind nur in der Lage entfaltete Blätter und sich bildende Früchte zu infizieren.

Die Dauer des Sporenfluges wird durch die Witterung bestimmt. Häufige Niederschläge lassen die Inokulumquellen rasch erschöpfen, trockenes Wetter verlängert den Sporenflug.

In den meisten Fällen dringt *Gnomonia erythrostoma* mit einer extrem kurzen Keimhyph (meist nicht einmal 6 µm) direkt in das Blattgewebe ein. Die Bildung von Appressorien konnte auch beobachtet werden.

Zur Abwehr des Parasiten synthetisiert die Pflanze Phenole. Es handelt sich dabei nicht um Catechine und Proanthocyanidine.

Nach der Penetration wächst der Pilz durch das Palisadenparenchym in das Schwammparenchym und breitet sich dort aus. Blattadern stellen für ihn keine Barrieren dar. Dieses Befallsstadium zeigt sich auf der Blattoberseite als verwaschene, grünlichgelbe Verfärbung.

Wenn der Pilz das gesamte Schwammparenchym absorbiert hat (Dauer 4 - 6 Wochen), beginnt er das Palisadenparenchym zu zersetzen. Das Blatt wird chlorotisch.

Mit der einsetzenden Nekrotisierung bilden sich Pyknidien, die auf der Blattunterseite als braune Pünktchen zu erkennen sind.

Da die Konidien nicht keimfähig sind, kann eine Verbreitung der Krankheit durch diese ausgeschlossen werden. Die Bildung von Empfängnishyphen lassen die Funktion der Konidien als Spermarien als sehr sicher erscheinen.

Ab Anfang Oktober sind auf den abgestorbenen Blättern Perithezien zu sehen. Die Hauptfruchtform stellt die Überwinterungsform von *Gnomonia erythrostoma* dar. Sie scheint aber nicht die alleinige zu sein.

Gewebeschnitte von Buketttrieben haben gezeigt, daß *Gnomonia erythrostoma* auch in verholzten Geweben wachsen und überwintern kann.

Das Myzel von *Gnomonia erythrostoma* ist septiert und mit Einschlüssen gefüllt. Pro Zelle sind meist mehrere Zellkerne anzutreffen. Proteine sind weitere Bestandteile des Myzels.

Eine erfolgreiche Bekämpfung der Blattbräune ist nur durch optimale Spritztermine möglich. Da eine Infektion mit *Gnomonia erythrostoma* nur nach stärkeren Niederschlägen mit anhaltender Blattnässe (mindestens 6 h) erfolgt, sollte mit Beginn der Blatitentfaltung auf die Witterung geachtet werden. Sind stärkere Niederschläge zu erwarten, sollte eine Spritzung durchgeführt werden.

Eine deutlich bessere Wirkung von Fungiziden aus der neuen Wirkstoffgruppe der Strobilurine konnte nicht festgestellt werden. Lediglich im Jahr 2001 zeigt das Strobilurin Flint mit einem sehr hohen Wirkstoffgehalt eine sehr gute Wirkung.

Die RAPD-PCR ist keine geeignete Methode, um einen Befall mit *Gnomonia erythrostoma* nachzuweisen. Hierzu ist die Entwicklung von spezifischen Primern notwendig.

Zur Entwicklung eines effektiven Blattbräune-Prognose-Modells sind weitere Untersuchungen dringend notwendig.

8 Anhang



Abbildung 87: Lage der Standorte Hiltpolstein und Oberrüsselbach

Gemeinschaftsanlage Oberrüsselbach (Halbstämme)

Pflanzjahr: 1975

Gerüstveredelung: 1978 (Unterlage F 12/1)

Pflanzenabstand: 8 m x 8 m



Sorten

Königskirsche

Froschmaul

Froschmaul

Abels Späte

Abels Späte

Regina (uv)

Haumüller

Haumüller

Schw. Kn. Ma.

Groll's Schw.

Sam

Sam

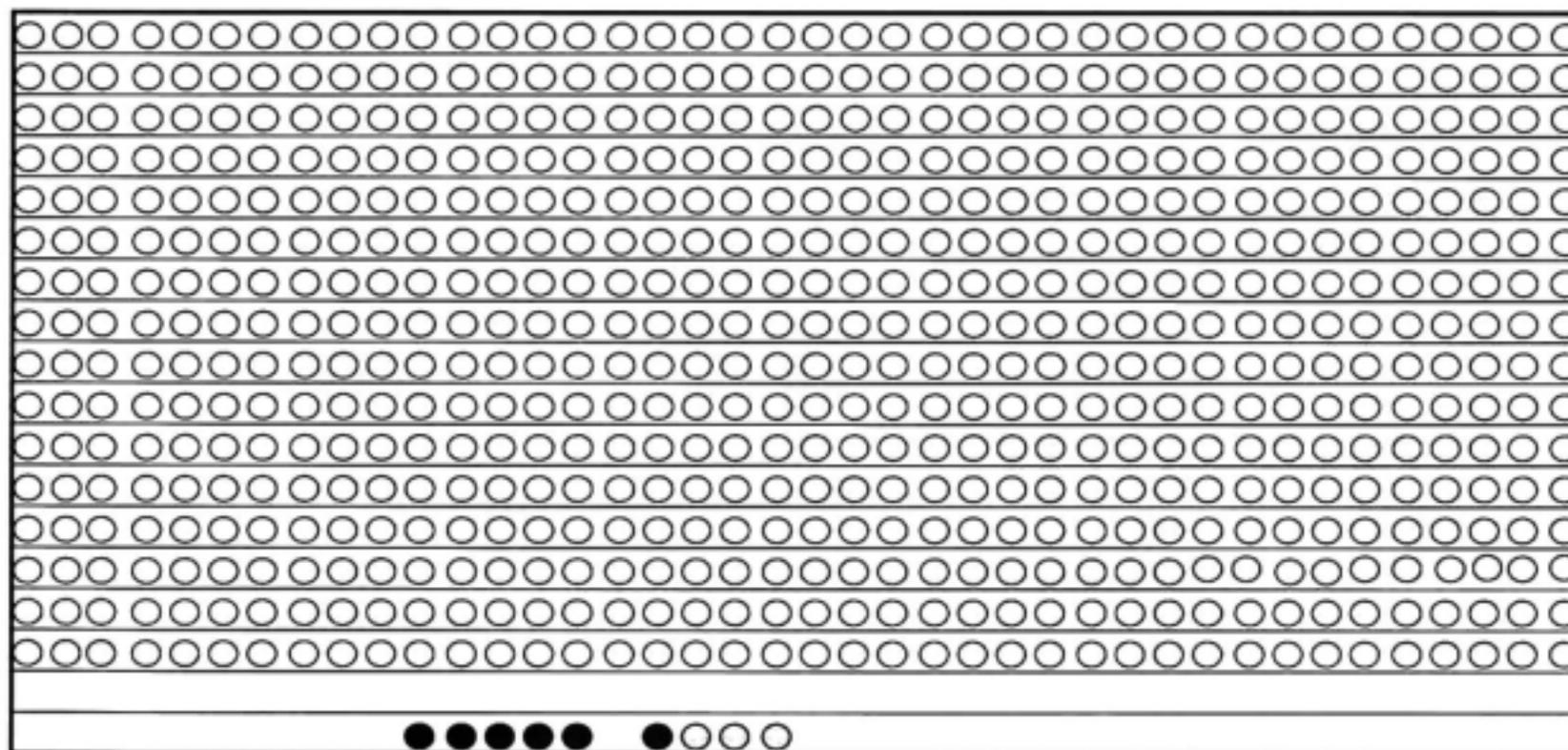
Sam

No. 300

Regina

Burlat

Verschiedene



Rodung 1999: Verschiedene, No. 300, Schwarze Knorpelkirsche Margetshöchheim, Groll's Schwarze

Rodung 2000: Haumüller

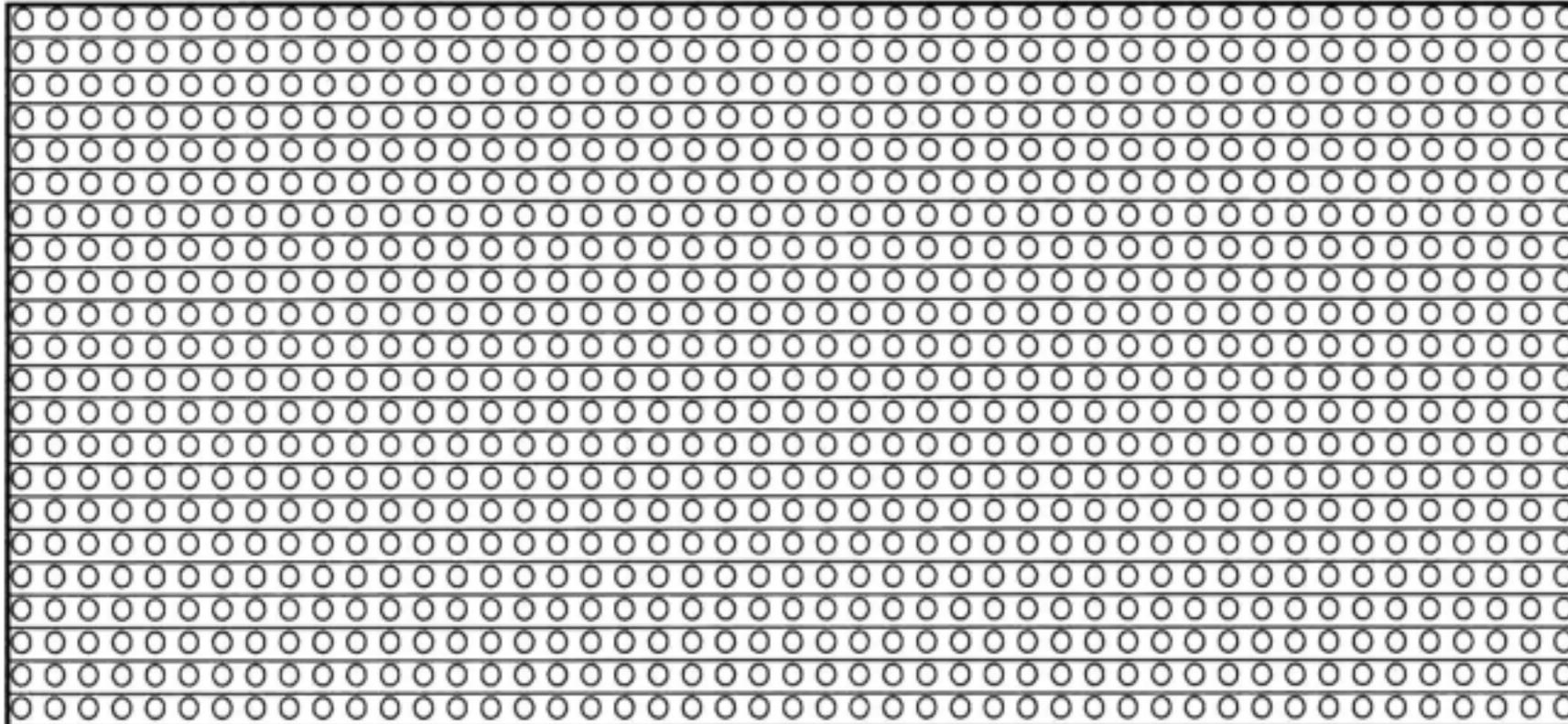
○ = Regina

● = Fr. Meckenheimer

Abbildung 88: Halbstammanlage Oberrüsselbach

Gemeinschaftsanlage Oberrüsselbach (Busch)

Pflanzjahr: 1990 (Sorte "Margit" 1991)
 Wurzelhalsveredelung (Sorte "Margit" unveredelt)
 Pflanzabstand: 6 m x 4 m



Sorten

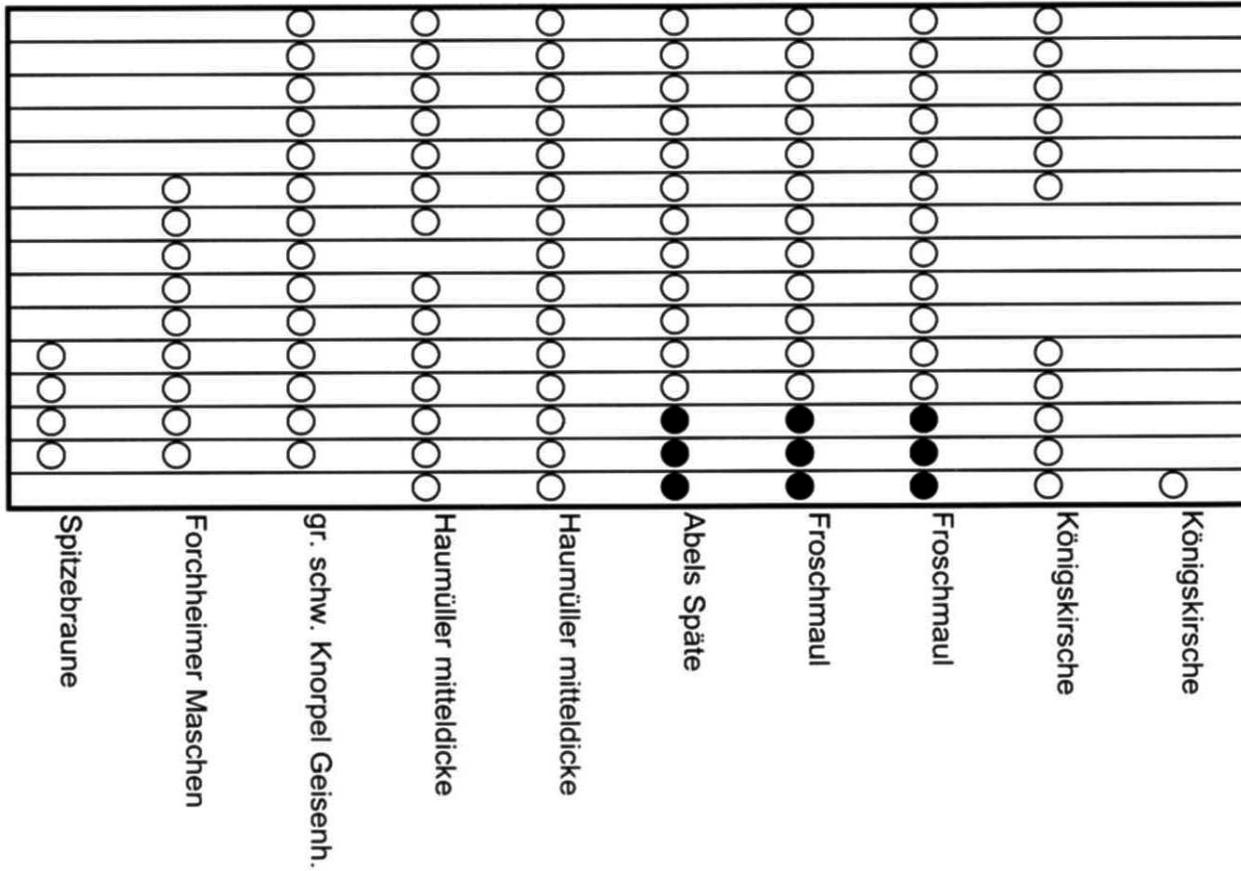
- Margit
- Margit
- Margit
- Sam / W14
- Sam / W14
- Sam / W14
- Sam / W14
- Kordia / W13
- Kordia / W13
- Kordia / W10
- Schneiders / W14
- Schneiders / W13
- Schneiders / W10
- Regina / W14
- Regina / W14
- Regina / W14
- Regina / W13
- Regina / W13
- Regina / W13
- Regina / W10
- Regina / W10
- Regina / W10

Unterlagen: W10 = Weiroot 10
 W13 = Weiroot 13
 W14 = Weiroot 14

Abbildung 89: Buschanlage Oberrüsselbach

Kirschenanlage Hiltpoltstein

Pflanzjahr: 1967
 Gerüstveredelung: 1969 (Unterlage F12/1)
 Pflanzabstand: 8 m x 8 m



Sorten

Abbildung 90: Kirschenanlage Hiltpoltstein

Sporenprotokoll für *Gnomonia erythrostoma*

Standort: *Oberrüsselbach*

Datum: *11.5.99*

Uhrzeit: *10⁰⁰*

↓ *12.5.99*

nomonia erythro. Streifen	Uhrzeit	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰	12 ⁰⁰	13 ⁰⁰	14 ⁰⁰	15 ⁰⁰	16 ⁰⁰	17 ⁰⁰	18 ⁰⁰	19 ⁰⁰	20 ⁰⁰	21 ⁰⁰	22 ⁰⁰	23 ⁰⁰	0 ⁰⁰	1 ⁰⁰	2 ⁰⁰	3 ⁰⁰	4 ⁰⁰	5 ⁰⁰	6 ⁰⁰	7 ⁰⁰	8 ⁰⁰	9 ⁰⁰
1	98	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	102	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	103	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	104	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	105	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	106	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	107	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gesamt/h		6	20	47	57	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gesamt Sporen/h*m ²		10	33	78	95	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

223 Sporen

Abbildung 91: Sporenprotokoll

Puffer und Gele für die RAPD-PCR:TAE –Puffer (50-fach)

Verwendete Chemikalien:

- Tris (AppliChem): Tris = Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
- EDTA (AppliChem): EDTA = **E**thyhlen-**D**iamin-**T**etra-**E**ssigsäure
- Eisessig (96%; Merck)
- H₂O bidest.

Für einen Liter TAE-Puffer (50x) wurden 242 g Tris (c=2 M), 18,6 g EDTA (c=50 mM) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in 800 ml H₂O bidest. gelöst. Mit Eisessig wurde der pH-Wert auf 7,8 eingestellt und mit H₂O bidest. auf einen Liter aufgefüllt.

Aus dieser Stammlösung wurde der einfache TAE-Puffer hergestellt.

Agarose-Gel zur DNA-Gehaltsprüfung (1 %)

Verwendete Chemikalien:

- Agarose low EEO (AppliChem)
- TAE-Puffer (einfach)
- Ethidiumbromid (Roth)

Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose low EEO Pulver in einem 250 ml Duranglas mit 150 ml TAE (1x) gelöst und mehrmals in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis nahezu alle Luftbläschen verschwunden waren. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 10 ml Ethidiumbromid (= 0,4 µg Ethidiumbromid pro ml Gel) hinzu gegeben und nach Mischung auf einen Gelträger mit Kamm (10 µl Taschen) gegossen. Der Kamm wurde nach Erhärten des Gels vorsichtig herausgezogen und der Träger in die Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer gelegt.

Agarose-Gel für PCR (1,5 %)

Bei der Herstellung des 1,5 %igen Gels wurden 2,25 g Agarose low EEO und Kämmen mit 20 µl Zähnen verwendet. Die Prozedur war ansonsten die gleiche.

TE-Puffer

Verwendete Chemikalien:

- Tris (AppliChem)
- EDTA (AppliChem)
- HCl (32 %; Merck)
- NaOH (20 %; Merck)
- H₂O bidest.

Der TE-Puffer setzt sich aus einer 10 mM Tris-Lösung (pH = 8) und einer 1 mM EDTA-Lösung (pH-Wert = 8) zusammen. Das heißt für 100 ml TE-Puffer wurden 1 ml der 10 mM Tris-HCl-Lösung mit 200 µl der 1 mM EDTA-Lösung und 98,8 ml H₂O bidest. vermengt und autoklaviert.

Beladungs-Puffer (10-fach)

Verwendete Chemikalien:

- EDTA (AppliChem)
- Saccharose (Merck)
- Bromphenolblau (Merck)
- TAE-Puffer (1x) oder H₂O bidest.

Der Beladungs-Puffer besteht aus einer 0,25 M EDTA-Lösung, 40 % Saccharose und 0,25 % Bromphenolblau. Für 50 ml Beladungs-Puffer wurden 37,5 ml TAE-Puffer (1x) oder H₂O bidest. mit 12,5 ml 1 M EDTA-Lösung, 20 g Saccharose und 125 mg Bromphenolblau vermengt und autoklaviert.

Chemikalienliste:

Chemikalie	Firma
Agar	Serva
Airvol/Gelvatol Grade 605	Burkard Sc
Aktivator/Historesin	Jung
Ammoniumacetat	Merck
Anilinblau	Merck
Azurblau II	Fluka
Baumwollblau	Chroma
Benzimidazol	Merck
Biomalz	Biomalt
Bromphenolblau	Merck
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck
CaCO ₃	Merck
Calcofluor White M2R	Polysciences
Ceryltrimethylammoniumbromid	ROTH
Chloralhydrat	Merck
Chloroform z.A.	Merck
Coca Cola	Coca Cola
Coomassie Brilliant Blue	Merck
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Fluka
Czapek-Dox-Agar	Merck
D-Glucose-Monohydrat	Merck
4'-6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl	Serva
dNTPs	Roth
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Applichem
Essigsäure (100%)=Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	Sigma
Gemüsesaft (Biogemüsesaft)	Pölz
Glutaraldehyd	Serva
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Merck
Historesin	Leica
Historesin Hardener	Leica
Historesin Mounting medium liquid	Leica
Historesin Mounting medium Pulver	Leica
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
Calciumchlorid	Merck
Kanadabalsam	Fluka
KH ₂ PO ₄	Merck
Kirschsafte	Albi
L-Asparagin	Merck
Lugolsche Lösung	Fluka
Malzextrakt	Merck
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
Milchsäure	AppliChem
MnCl ₄ x 4 H ₂ O	Merck
Karottensaft mit Honig	deleg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
n-Butanol	Merck
PDA-Agar	Merck
p-Dimethylaminozimtaldehyd	Fluka
PeqGOLDUniversal Agarose	peQLab
Pflaumensaft (Pflaumi)	Rabenhorst
Phenol z.A.	Merck
Primer Kit 180 1-10	ROTH
Primer Kit A 1-20	ROTH
Primer Kit B 1-20	ROTH
Primer Kit C 1-20	ROTH
Primer Kit D 1-20	ROTH
Proteinase K	Qiagen
PVP	Sigma
Ribonuclease	ROTH
Saccharose	Merck
Safranin O	Merck
Salzsäure (32 %)	Merck
Salzsäure (37 %)	Merck
Säurefuchsin	Merck
Schwefelsäure (95-97 %)	Merck
Stickstoff (fluid)	Air Liquide GmbH
Streptomycin	Merck
TaqPolymerase	peQLab
Thiaminhydrochlorid	Merck
Tolunidinblau O	Serva
Tris ultrapure	AppliChem
Xylol	Roth
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck

Gerätschaften:

<u>Autoklav:</u>	Webecke & Co. Baujahr: 1976 Inhalt des Druckraumes: 120 l Zulässiger Betriebsdruck: 2,5 bar Temperatur: 138° C Vakuum: 1 bar
<u>Epromlesegerät:</u>	haaga Typ: H1000
<u>Kühlraum:</u>	Vötsch GmbH Typ: VEMZ 2/240/S Baujahr: 1976 Temperaturbereich: +2 bis +15 Innenabmessungen: 3280 x 3230 x 2200 mm Lampen: Philips TLD 36W/08
<u>Lichtthermostat:</u>	Rubarth Apparate GmbH Glems-Technik Typ: GT 82/30-180 30 W 0,25 A Lampen: 4 x Philips TLD 36W-1/25 4 x Osram L 36W/76-1
<u>Zentrifuge:</u>	Beckmann Typ: Avanti 30 Kompaktzentrifuge Baujahr: 1995 Geschwindigkeit: 0 bis 30.000 RPM Aktiver Temperaturbereich: 2 bis 40° C
<u>Photometer:</u>	Pharmacia Typ: Pharmacia LKB Ultrospec III Wellenbereich: Deuteriumlampe: 325 – 900 nm Tungstenlampe: 200 – 325 nm

Mikroskope: Carl Zeiss
Universalmikroskop Axioplan (Durchlicht und Auflichtfluoreszenz)
Mit Mikroskopkamera MC 63 S mit Kameraansatz M 35 für KB-Film
24 x 35

Ernst Leitz GmbH Wetzlar
SM-Lux
Typ: 020-411.010

Carl Zeiss
Binokular

Thermocycler: MJ Research
Typ: PTC-100 with Hot Bonnet

Horizontal-Gelelektrophorese:
amersham pharmacia biotech
Typ: EPS 301

Sporenfalle: Burkard Manufacturing Co Ltd.
Burkard 7 Tage Sporenfalle

Video-Geldokumentation:
Biometra
Typ: BioDocAnalyse

Wetterstation: Thies Clima Göttingen
Benetzungsfühler nach Häckel
Batterien: Fa. Sonnenschein
Hobbybatt oder Dryfit: 6 V/3 Ah/s
Eproms

9 Literaturverzeichnis

- Ackermann, P. (1971):** *Gnomonia erythrostoma* (Pers. ex Fr.) Auersw. *Libertina stipata* (Lib.v. Hohnel) as a cause of in our country unknown disease of apricot (*Armeniaca vulgaris* Lam.). *Ochrana Rostlin* **7**, XLIV, 157-158.
- Arsenijević, M., und Veselić, M. (1997):** Development of *Gnomonia rostellata* (Fr.) Wehm. in vitro. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **104**, 5, 492-500.
- Bahnweg, G., Schulze, S., Möller, E.M., Rosenbrock, H., Langebartels, C., Sandermann, H.J. (1998):** DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Annual Biochemistry* **263**, 1, 79-82.
- Bobes, I., Feniser, F., Stegorean, P. (1993):** Retrospectiva bibliografica asupra antracnozei caisului (*Gnomonia erythrostoma* f.c. *Libertina stipata*). *Buletinul-Universitatii-de Stiinte-Cluj-Napoca, Seria-Agricultura-si-Horticultura* **47**, 1, 425-434.
- Bondar, I.A. (1976):** Forma nova *Gnomonia erythrostoma* (Pers. ex FRIES) Auerswald forma *armeniaca* Bondar. *Nov. Sist. vyssh. Rast.* **3**, 237-240.
- Bovey, R. (1967):** *La Défense des Plantes cultivées*. 5. Auflage, Payot, Lausanne.
- Braun, H. und Riehm, E. (1957):** *Krankheiten und Schädlinge an Kulturpflanzen und ihre Bekämpfung*. 8. Auflage, Paul Parey Verlag Berlin, Hamburg.
- Bünter, M. :** <http://www.lib.zh.ch/beratung/100/112/GNOMONI3.htm>
- Dobrev, A. (1987):** Biological and ecological studies on *Gnomonia erythrostoma* (Pers. ex Fr.) Auersw. on apricots. *Pochvoznanie, -Agrokhimiya-i-Rastitelna-Zashchita* **22**, 2, 82 –90.
- Edel, V. (1998):** Polymerase Chain reaction in Mycology: an Overview. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P., (Hrsg.): *Application of PCR in Mycology*. CAB international, 1-20.

- Ehrig, F. (2000):** Electron microscopy on a live objekt ?. Philips ESEM Application Note, Eindhoven, Niederlande.
- Feucht, W. (2001):** Persönliche Mitteilung.
- Feucht, W., Vogel, T., Schimmelpfeng, H., Treuter, D., Zinkernagel, V. (2001):** Kirschen- und Zwetschenanbau. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- Friedrich, F. und Rode, H. (1996):** Pflanzenschutz im integrierten Obstbau. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- Fritsche, W. (1990):** Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag Jena, 1. Auflage.
- Frank, B. (1886):** Über *Gnomonia erythrostoma*, die Ursache einer jetzt herrschenden Blattkrankheit der Süsskirschen im Altenlande, nebst Bemerkungen über Infection bei blattbewohnenden Ascomyceten der Bäume überhaupt. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft **4**, 200-205.
- Frank, B. (1887a):** Die jetzt herrschende Krankheit der Süsskirschen im Altenlande. Landwirtschaftliche Jahrbücher **16**, 401-436.
- Frank, B. (1887b):** Über die Bekämpfung der durch *Gnomonia erythrostoma* verursachten Kirschbaumkrankheit im Altenlande. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft **5**, 281-286.
- Freyer, F. (1953):** Erfolgreiche Bekämpfung der Blattbräune. Der hessische Obst- und Gartenbau **8**, 57-58.
- Gutmann, M. und Feucht, W. (1991):** A new method for selective localization of flavan-3-ols in plant tissues involving glycomethacrylate embedding and microwave irradiation. Histochemistry, **96**, 83-86.
- Haase, F. (1925):** Verheerendes Auftreten der Blattbräune an Süßkirschen in Oberbaden. Deutsche Obst- und Gemüsebauzeitung **71**, 21, 278-279.
- Haase, F. (1931):** Die Blattbräune und Schrotschußkrankheit der Süßkirschen in Oberbaden. Der Obst- und Gemüsebau **77**, 7, 113.

- Hasyn, S. (1996):** Untersuchungen zur Blattbräune der Kirschen und deren Erreger *Gnomonia erythrostoma*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München-Weihenstephan.
- Heinze, K. (1978):** Leitfaden der Schädlingsbekämpfung, Band III, Schädlinge und Krankheiten im Obst- und Weinbau. 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Hering, O., Zinkernagel, V., Bartscherer, H.-Ch. (1993):** Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zum Infektionsverhalten von *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. Auf Blättern unterschiedlich resistenter Apfelsorten. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten **100**, 4, 379-388.
- Hoffmann, G.M., Nienhaus, F., Poehling, H.M., Schönbeck, F., Weltzien, H.C., Wilbert, H. (1994):** Lehrbuch der Phytomedizin. Blackwell Wissenschaftsverlag. 3. Auflage.
- Holighaus, F. (1999):** Gnomonia – Die Blattbräune der Süßkirsche. Obstbau **2**, 77-79.
- Hubmann, H. (2001):** persönliche Mitteilung.
- Kotte, W. (1958):** Krankheiten und Schädlinge im Obstbau. 2. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.
- Landesanstalt für Pflanzenschutz und Regierungspräsidien (2001):** Pflanzenschutz im Erwerbsobstbau 2001, Baden-Württemberg.
- Landratsamt Forchheim (2000):** Maßnahmen zur Bekämpfung.
- Lickfeld, K.G. (1979):** Elektronenmikroskopie. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1979.
- Matern, U. und Kneusel, R.E. (1988):** Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*, **16**, 53-70.
- Mühr, F. (1998):** Steinobst und Schalenobst. Obst- und Gartenbauverlag München.
- Müller-Thurgau, H. (1913):** Die Gnomonia-Krankheit der Kirschbäume in der Schweiz. Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau **22**, 98-104.

- Müller-Thurgau, H. (1915):** Die Gnomonia-Krankheit (Blattbräune) der Kirschbäume. Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz **29**, 513-514.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H.J., Geiger, H.H. (1992):** A simple and efficient Protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic acids research **20**, 22, 6115-6116.
- Newton, C.R. und Graham, A. (1997):** PCR. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Nikusch, I. (1994a):** Die Gnomonia-Blattbräune (*Gnomonia erythrostoma*) – nach fast 100jähriger Pause wieder ein Problem für den Kirschanbau in Mitteleuropa?. Mitteilungen aus der Biologischen BA für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem. 49. Deutsche Pflanzenschutztagung in Heidelberg 26.-29.09.1994. Heft 301. Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin/Wien
- Nikusch, I. (1994b):** Die Gnomonia-Blattbräune der Kirsche – ein “neues“ Problem für den Kirschanbau?. Obstbau **12**, 587-588.
- Oberdiek, J.G.C. und Lucas, E. (1875):** Illustrated handbook of fruit varieties. Verlag Ulmer, Stuttgart.
- Ogawa, J.M., Bird, G.W., Uriu, K., Zehr, E.I., Ritchie, D.F., Uyemoto, J.K. (1995):** Compendium of stone fruit diseases. APS Press.
- Perez, J.A., Garcia, T., Arias, A., Martinez de Velasco, D. (1992):** Control of *Gnomonia erythrostoma* (Pers) Auersw. on cherry. III. The effect of treatments on cherry cracking. Boletin-de-Sanidad-Vegetal, -Plagas **18**, 3, 585-590.
- Pietrek, G. (2000):** Die Wirt-Pathogen-Beziehung von *Valerianella locusta* (L.) Laterr. und *Peronospora valerianellae* Fuckel als Grundlage der Resistenzzüchtung. Dissertation TU-München/Weihenstephan Lehrstuhl für Phytopathologie.
- Porebski, Sue, Bailey, L.G., Baum, B.R. (1997):** Modification of a CTAB DNA extraction Protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular biology reporter **15**,1, 8-15.

Royal Horticultural Society (2000):

http://www.rhs.org.uk/advice/profiles1100/mn_cherry_scorch.asp

Rüegg, J. (1994): Die Blattbräune der Kirsche – Eine “neue“ Pilzkrankheit im süddeutschen Raum. Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau **103**, 240-242.

Sagai-Maroo, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. und Allard, R.W. (1984): Ribosomale DNS spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 8014-8018.

Soran, H. (1978): Nachweis des Blattbräunerregers an Sauerkirsche in Afyon. Journal of turkish phytopathology **7**, 1-8.

Sorauer, P. (1928): Handbuch der Pflanzenkrankheiten, II. Band, Die pflanzlichen Parasiten, 1. Teil, Paul Parey Verlag, Berlin.

Spaar, D., Kleinhempel, H., Fritzsche, R. (1990): Stein- und Schalenobst: Diagnose von Krankheiten und Beschädigungen an Kulturpflanzen. Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin.

Tubeuf von, K. (1926): Auftreten der Blattbräune der Süßkirschen durch von *Gnomonia erythrostoma* im Ramberger Tal (Rheinpfalz). Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten **36**, 237-238.

Vukovits, G. (1980): Obstkrankheiten. Erkennung, Ursachen und Bekämpfung, Teil III Steinobst: Lepold Stocker Verlag, Graz und Stuttgart.

Vukovits, G. und Wittmann, W. (1990): Identifizierung, Biologie und Bekämpfung des Pilzes *Apiognomonina erythrostoma* (Pers.) v. Höhnel, Erreger der Blattbräune bei Marillen. Pflanzenschutzberichte **51**, 2, 78-90.

Webster, A.D. (1996): The Taxonomic Classification of Sweet and Sour Cherries and a Brief History of Their Cultivation. In: Webster, A.D., Looney, N.E., (Hrsg.): Cherries: Crop Physiology and Uses. CAB International, 3-24.

10 Abkürzungsverzeichnis

A	Appressorium
Asp	Ascospore
B	Burlat
BURE	Burlat + Regina
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMAZA	p-Dimethylaminozimtaldehyd
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy
Fi	Filterpapier
gr. schw. Knorpel Geisenh.	große schwarze Knorpel Geißsenheim
GrSt	Größenstandard
grZ	große Zelle
K	Kutin
klZ	kleine Zelle
koAsp	kolabierte Ascospore
Ks	Keimschlauch
M	Myzel
Myb	Myzelballen
oEp	obere Epidermis
P	Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
Per	Perithecium
PeSt	Penetrationsstelle
Ph	Phloem
Phe	Phenol
PSt	Pilzstruktur
Pyk	Pyknidium
R	Regina
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
S	Stomata
sch.Kn.Mar.	Schwarze Knorpelkirsche Margetshöchheim
Tr	Trichogyne
tuAsp	turgeszente Ascospore

uEp	untere Epidermis
Uv	unveredelt
X	Xylem
Zke	Zellkerne

Danke

Ein besonderer Dank gebührt folgenden Personen (Institution), ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)

Herrn Meier und den Anbauern der Gemeinschaftsanlage Oberrüsselbach

Tobias und Christof Vogel

Prof. Dr. Zinkernagel

Erika und Peter Hecht

Herzlichen bedanken möchte ich mich auch bei:

Nicole Adler

Regina Dittebrand

Dr. Ehrig

Prof. Dr. Feucht

Frank Fleischmann

Kerstin Janisch

Sandra Kern

Julia Koehl

Christof Leser

Tom Müller

Gabriele Pietrek

Markus Pleßl

Harry Schempp

Arne Schieder

Andrea Wosnitza

Stets mit Rat oder Tat oder guter Laune zu Hilfe, ließen sie die Zeit wie im Fluge vergehen.

Herrn **Prof. Dr. Treutter** und **Prof. Dr. Huber** danke ich für die Übernahme des Koreferats und der Bereitschaft für den Prüfungsvorsitz.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Dieter, Willy Hecht
Geburtsdatum:	12.12.1967
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Persönlicher Werdegang

1974 - 1978	Grundschule am Strehleranger in München
1978 - 1988	Werner-von-Siemens-Gymnasium in München
1988 - 1989	Wehrdienst: Pionierlehrbataillon in München
1989 - 1991	Studium der Geodäsie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1991 - 1997	Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München-Weihenstephan
1998 - 2001	Doktorand am Lehrstuhl für Phytopathologie an der Technischen Universität München-Weihenstephan