

**Untersuchung des Gefahrenpotentials von
Pleurotus ostreatus ((Jacq.: Fr.) Kummer) und
Flammulina velutipes ((Curtis: Fr.) Singer)
innerhalb der neuen Rosskastanien-Komplexkrankheit**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

Institut für Holzwissenschaften

der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Annika Müller-Navarra

Bad Iburg

2019

Tag der Disputation: 20.08.2019

Erstgutachterin: Prof. Dr. E. A. Magel

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. Dujesiefken

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. A. Krause und Prof. Dr. O. Schmidt

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Bad Iburg, den _____

Annika Müller-Navarra

Danksagung

Ich bedanke mich bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für das Forschungsstipendium, ohne das meine Promotion nicht möglich gewesen wäre; insbesondere bei Dr. Hedda Schlegel-Starmann für ihre Betreuung während der Laufzeit.

Weitere finanzielle Unterstützung erhielt ich durch die „Gesellschaft der Förderer und Freunde der Holzwissenschaft in Hamburg e.V.“, sowie durch den „Frauenförderfonds der Universität Hamburg“. Dafür vielen Dank.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Elisabeth A. Magel, die mich bei meinem Vorhaben, die Rosskastanien-Komplexkrankheit zu untersuchen, unterstützt hat und mit mir gemeinsam das Forschungsvorhaben bei der DBU eingereicht hat. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit und das Vertrauen, in ihrem Labor meine Untersuchungen selbständig durchführen zu können, sowie für die Bewertung meiner Dissertation.

Amelie von der Heyde, Katharina Erdt, Dana Krüger und Anna Klemmer danke ich für ihre Hilfe im Labor. Arefa Najib danke ich für die Isolierung von *P. syringae* pv. *asculi* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit. Ein besonderer Dank gilt Marieke Nissen, die mir eine ganz wunderbare Kollegin ist.

Prof. Dr. Dirk Dujesiefken danke ich für das Zweitgutachten und die umfang- und hilfreichen Hinweise bei der Fertigstellung der Dissertation.

Beim Thünen Institut für Holzforschung bedanke ich mich, für die Bereitstellung der holzphysikalischen Prüfeinrichtungen. Insbesondere möchte ich auch Dörte Bielenberg und Johannes Beruda für Ihre Hilfe bei sämtlichen Fragen zur Durchführung und Auswertung meiner Versuche danken.

Für die Aufarbeitung meiner Proben bedanke ich mich bei Stefanie Warsow. Den Zuschnitt der Kastanien-Prüfkörper übernahm Matthias Höpken für mich. Danke dafür. Marie Lenz danke ich für ihre Hilfe bei den Abbauversuchen.

Außerdem bedanke ich mich bei Goran Schmidt für die holzphysikalischen Diskussionen und Dr. Oliver Mertens für das Korrekturlesen meines Manuskriptes.

Mein Dank gilt auch dem Team der Gärtnerei des Thünen Instituts, dessen Mitarbeiter mir bei der Vorbereitung meiner Proben geholfen und sich um „meine“ Kastanien gekümmert haben.

Für die Probenbäume und die Erlaubnis weitere Bäume zu untersuchen, bedanke ich mich bei der Stadt Hamburg. Insbesondere bei dem Bezirksamt Bergedorf und Mattias Fritzsche, sowie Felix Petersen vom Bezirksamt Harburg und Frau Hage vom Bezirksamt Rahlstedt.

Der Hamburger Behörde für Umwelt und Energie, Gerhard Doobe und Torsten Melzer, danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit, das große Interesse an meinen Untersuchungen und die Möglichkeit, meine Arbeit innerhalb des „Arbeitskreises Stadtbäume“ vorzustellen.

Ich danke Herrn R. Ripke vom Landkreis Uelzen und der Kreisstraßenmeisterei für die Fällung erkrankter Rosskastanien in Wulfode und für die Möglichkeit Proben zu nehmen.

Bei der Stadt München, Herrn L. Wilhelm, und den Mitarbeitern der Städtischen Baumschule Herrn W. Töns sowie Herrn P. Schlinsog bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei der Probennahme vor Ort.

Ein besonderer Dank gilt Lars S. Mortensen von der Fanø Kommune, DK, der mich ohne Aufhebens Kastanien auf Fanø untersuchen und für mich fällen ließ.

Dr. Thomas Gienapp danke ich für den „letzten Schliff“ meiner Dissertation.

*Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für die bedingungslose
Unterstützung und die große Hilfe,
besonders Mirko und Julius!*

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
ABSTRACT	2
1 ANLASS UND HINTERGRUND DER UNTERSUCHUNG	4
1.1 ROSSKASTANIEN-KOMPLEXKRANKHEIT	6
1.1.1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	7
1.1.2 Hauptschadverursacher	8
1.1.3 Beteiligte Ascomyceten	9
1.1.4 <i>Aesculus hippocastanum</i> und <i>Aesculus x carnea</i>	9
1.2 ZIELSETZUNG DER UNTERSUCHUNG	10
2 MATERIAL	11
2.1 AUFNAHME VON BESTÄNDEN UND EINZELBÄUMEN	11
2.1.1 Hamburg	11
2.1.2 Niedersachsen	12
2.1.3 Schleswig-Holstein	12
2.1.4 Bayern.....	13
2.1.5 Dänemark/Fanø.....	13
3 METHODEN	14
3.1 PROBENNAHME	14
3.1.1 Holz- und Rindenproben.....	14
3.1.2 Pilz- und Bakterienproben	15
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE IDENTIFIZIERUNG DER SCHADORGANISMEN	16
3.2.1 DNS-Extraktion	17
3.2.2 Polymerasekettenreaktion.....	17
3.2.3 Multiplex-PCR und Taxon-Primer	18
3.2.4 Gelelektrophorese und Aufreinigung.....	19
3.2.5 Sequenzierung und Artbestimmung.....	19
3.3 ISOLATION DER REINKULTUREN	20
3.3.1 Basidiomyceten.....	20
3.3.2 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	21
3.4 DUAL- UND MULTIPLEXKULTUREN	23
3.4.1 Dualkulturen	23
3.4.2 Multiplexkulturen	23
3.4.3 Wachstumsdokumentation der Dual- und Multiplexkulturen.....	24
3.5 ABBAUVERSUCHE.....	25
3.5.1 Vorversuch.....	25
3.5.2 Langzeit-Abbauversuch.....	25
3.5.3 Probenauswahl und -vorbereitung	25
3.5.4 Versuchsaufbau.....	26
3.6 FESTIGKEITSVERSUCHE.....	28
3.6.1 Versuchsaufbau.....	28
3.6.2 4-Punkt-Biegefestigkeit und Biege-Elastizitätsmodul nach DIN 52186:1978-06	30
3.6.3 Schlagbiegeversuch nach DIN 52189-1:1981-12	32
3.7 INOKULATIONSVERSUCH.....	34
3.7.1 Inokulierte <i>A. hippocastanum</i>	34

3.7.2 Versuchsaufbau.....	35
3.7.3 Messung der Verfärbungen durch Inokulation	36
4 ERGEBNISSE	37
4.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE IDENTIFIZIERUNG DER SCHADORGANISMEN	37
4.1.1 Entwicklung der Taxonprimer und der Multiplex-PCR	37
4.1.2 Nachweis der Basidiomyceten mittels Multiplex-PCR	39
4.1.3 Nachweis weiterer Organismen mittels herkömmlicher PCR	40
4.1.4 Nachweis von Psa über das Gyrase-B-Gen	41
4.2 REINKULTUREN	42
4.2.1 Basidiomyceten.....	42
4.2.2 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	43
4.3 DUALKULTUREN.....	44
4.3.1 <i>P. ostreatus</i> und <i>F. velutipes</i>	44
4.3.2 <i>P. ostreatus</i> und <i>P. syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	46
4.3.3 <i>F. velutipes</i> und <i>P. syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	46
4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Rein- und Dualkulturen.....	47
4.4 MULTIPLEXKULTUREN	49
4.4.1 <i>P. ostreatus</i> , <i>F. velutipes</i> und <i>P. syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	49
4.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Rein- und Multiplexkultur	49
4.5 ABBAUVERSUCHE.....	52
4.5.1 Vorversuch.....	52
4.5.2 Langzeitabbauversuch	53
4.5.3 Beobachtungen an Prüfkörpern	57
4.6 FESTIGKEITSVERSUCHE.....	58
4.6.1 4-Punkt-Biegefestigkeit	58
4.6.2 Bruchschlagarbeit	64
4.7 INOKULATION	65
4.7.1 Kallusbildung.....	65
4.7.2 Verfärbte Fläche axial und in der Dübelebene im Querschnitt.....	65
4.7.3 Länge der axialen Verfärbung	66
4.7.4 Länge der tangentialen und radialen Verfärbung in Querschnitt.....	66
4.7.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	67
5 DISKUSSION	69
5.1 STAND DES WISSENS	69
5.2 ERGEBNISDISKUSSION	70
5.3 EINORDNUNG IN DIE LITERATUR.....	73
6 AUSBLICK	82
7 LITERATUR	84
ANHANG	97

Zusammenfassung

Die neuartige Komplexkrankheit der Rosskastanien (*Aesculus* sp.), die durch das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) sowie die Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* und *Flammulina velutipes* als Hauptschadverursacher charakterisiert ist, wurde in dieser Arbeit durch die Kombination unterschiedlicher Methoden untersucht. Dafür wurden mykologische, holzphysikalische und molekularbiologische Methoden gewählt, die es ermöglichen das Gefahrenpotential der beteiligten Basidiomyceten zu beurteilen.

Die Bewertung des Gefahrenpotentials von holzerstörenden Pilzen an Bäumen ist aus Verkehrssicherheitsgründen von großer Bedeutung, da durch diese die Maßnahmen zur Wiederherstellung der Verkehrssicherheit festgelegt werden können. Es lagen Hinweise vor, dass die Beteiligung von *P. ostreatus* und *F. velutipes* Grund für die rasch voranschreitende Weißfäule im neuartigen Krankheitsbild der Rosskastanien ist. Deswegen umfassten sämtliche Versuche beide Basidiomyceten. Von großem Interesse war außerdem der Einfluss von Psa auf beide Pilze.

Für die Beurteilung des Krankheitsverlaufes betroffener Rosskastanien ist besonders von Bedeutung, ob sowohl das Bakterium Psa als auch *P. ostreatus* und *F. velutipes* an dem Schaden beteiligt sind.

Die eigenen Funde von betroffenen Rosskastanien zeigen eine Verbreitung der Krankheit von Bayern bis Süddänemark und von Helgoland bis Rügen. Die Ausprägung der Schadsymptome ist dabei sehr unterschiedlich, kann aber der Krankheit zugeordnet werden.

Durch die gewählten Untersuchungsmethoden ist es gelungen, das Gefahrenpotential für die Bruchsicherheit, das von *P. ostreatus* und *F. velutipes* ausgeht, innerhalb der neuartigen Rosskastanien-Komplexkrankheit zu beschreiben.

Die hier durchgeführte Untersuchung von natürlich infizierten Rosskastanien mittels neu entwickelter Multiplex-PCR zeigte eine verhältnismäßig stärkere Beteiligung von *F. velutipes* als von *P. ostreatus*. Wobei deren Beteiligung am Schaden nicht immer durch Pilzfruchtkörper im Probenbereich angezeigt war.

Das radiale Mycelwachstum von *F. velutipes* wurde in Dualkultur mit Psa und in Multiplexkultur mit *P. ostreatus* und Psa im Vergleich zu seiner Reinkultur gesteigert, wohingegen *P. ostreatus* kein gefördertes Wachstum zeigte. Die Pilze hemmen sich in Dualkultur gegenseitig in ihrem Mycelwachstum. Dabei konnte das geförderte Wachstum von *F. velutipes* nur bei vorheriger Etablierung von Psa in der Petrischale beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass Psa die Etablierung von *F. velutipes* an der Rosskastanie begünstigen kann. Woraus sein vermehrtes, bislang nicht beobachtetes Vorkommen an der Rosskastanie resultiert.

In Abbauversuchen, bei denen der Masseverlust der Prüfkörper als Maß für das Gefahrenpotential herangezogen wurde, konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inkubation von *P. ostreatus* und *F. velutipes* den Holzabbau beschleunigen kann. Hat sich also nicht nur *F. velutipes* sondern auch *P. ostreatus* in einer durch Psa verursachten Wunde im Baum etabliert, wird das Gefahrenpotential weiter gesteigert. Ein Abbauversuch mit Buchen- und Kiefernholz ergab geringere Masseverluste als bei Rosskastanienholz. Diese Beobachtung weist auf die Präferenz von *F. velutipes* für das Holz der Rosskastanie hin.

Durch die Bewertung von Festigkeits- und E-Moduländerungen nach Holzabbau zeigte sich außerdem, dass *F. velutipes* die Festigkeits- und Elastizitätseigenschaften am schnellsten

verringert. Im Vergleich dazu wurden diese beiden mechanischen Eigenschaften des Holzes durch die Inkubation beider Pilze gemeinsam geringfügig weniger negativ beeinflusst. *P. ostreatus* besitzt diesen Versuchen nach das geringere Gefahrenpotential.

Bei einem Inokulationsversuch konnte an Hand der Wundreaktionen im Holz innerhalb der Sprossachse von *A. hippocastanum* gezeigt werden, dass *F. velutipes* vergleichsweise zu *P. ostreatus* und der Inokulation beider Pilze gemeinsam weniger effektiv abgeschottet werden kann.

Aus den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche wird deutlich, dass besonders *F. velutipes* in diesem Schadbild ein deutlich höheres Gefahrenpotential hat als ihm bisher zugesprochen wird. Durch das gleichzeitige Auftreten von *F. velutipes* und *P. ostreatus* innerhalb des Schadens wird dieses Gefahrenpotential weiter erhöht. Im Vergleich beider Arten muss *F. velutipes* ein höherer Anteil im gesamten Schaden zugesprochen werden.

Daraus folgt, dass das Erkennen der Komplexkrankheit bei der Regelkontrolle Anlass für eine eingehende Baumuntersuchung gibt. Bei dieser muss an Hand von Fruchtkörpern und Schadsymptomen, die durch Psa verursacht werden, geklärt werden, welche der Organismen an dem betroffenen Baum vorhanden sind. Die Pilzfruchtkörper weisen auf die bereits vorhandene Weißfäule im Innern des Baumes hin. Deshalb sind nach Identifikation einer der Arten, weitere Kontrollen in kürzeren Abständen zu einem späteren Zeitpunkt notwendig, um eventuell neu erschienene Pilzfruchtkörper weiterer Arten in die Beurteilung mit einzubeziehen.

Abstract

A new type of complex disease affecting *Aesculus* species has been investigated by different methods evaluating the risk potential of involved basidiomycetes fungi. As main cause of the resulting white rot *P. ostreatus* and *F. velutipes* were identified. Both were not known to have a high-risk potential, up to the occurrence of the new disease. In order to assess affected *Aesculus* trees and their risk to stem breakage it is necessary to know about the risk potential of the fungi. The state of infection and visibility of symptoms of observed *Aesculus* trees is often very versatile, but always caused and distinguished by this investigated complex disease of *Aesculus* species.

During the investigation, infected *Aesculus* trees were discovered from Bavaria (Southern Germany), the island of Fanoe (South Denmark), the island of Helgoland (North Germany), both located in the North Sea and the island of Rügen (North Germany), located in the Baltic Sea.

In case of this disease the primary cause has been certified firstly by the bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) and secondarily by the fungi.

The chosen methods aim to achieve knowledge about the interspecific interactions between the bacteria and the fungi and between the fungi.

In vitro interactions were studied by observing the mycelia growth in sterile cultures. To observe whether the presence of Psa has an influence on mycelia growth or if the presence of fungi affect each other, they were combined in dual cultures (both fungi or one fungi with Psa) or in multiplex cultures (both fungi plus Psa). Results have shown that Psa had a positive influence on the mycelia growth of *F. velutipes* whereas the growth of *P. ostreatus* was inhibited. The presence of Psa may be the reason why *F. velutipes* can more easily colonize

Aesculus trees. That caused the conclusion that *F. velutipes* might colonize the trees before *P. ostreatus* does. Because both fungi are proven to be present close together by their DNS in naturally infected *Aesculus* trees, it is probable that the close related incidence of them is the reason for the extensive decay. The DNS was detected by use of Multiplex PCR method, which comprised the development of newly designed species-specific primers.

The *in vitro* decay caused by *F. velutipes* and *P. ostreatus* alone or combined was supposed to clarify the wood decay potential. It was shown that *F. velutipes* could cause a higher mass loss than *P. ostreatus* does. Therefore, both fungi combined caused an even higher mass loss than *F. velutipes* does. If the different mass loss had a different influence on the modulus of rupture (MOR) or of elasticity (MOE) and the impact bending of degraded *Aesculus* wood a four point bending and impact bending test were done and investigated. In comparison to *P. ostreatus* *F. velutipes* and both fungi combined caused a higher loss of MOR, MOE and impact bending force. The result of which is that there is a higher risk potential, concerning tree failures caused by *F. velutipes* and both fungi together. Decay tests on beech (*Fagus sylvatica*) and Scots Pine (*Pinus sylvestris*) showed that *F. velutipes* prefers *Aesculus* wood by lesser decay rates.

In vivo young *Aesculus* trees were inoculated with the involved fungi. After felling, the maximum extend of discolouration around inoculation dowels was measured in axial, radial and tangential direction. The spread of discolouration showed, that *F. velutipes* was the weakest compartmentalised fungus. This result is highlighting the high-risk potential of this fungus.

For tree risk management and examination of *Aesculus* trees infected with the investigated disease it is necessary to surely identify, which organism is involved, because risk potential distinguishes as the composition of involved organisms does.

1 Anlass und Hintergrund der Untersuchung

Bäume haben besonders in Städten als Individuen, Straßengrün oder in Parks eine große Bedeutung für die städtische Ökologie und eine positive Wirkung auf das kleinräumige Stadtklima (z.B. TYRVÄINEN et al. 2005, NOWAK et al. 2006). Bäume in Metropolen werden daher zunehmend als Bestandteil eines vorsorgenden integrierten Umweltschutzes verstanden. Die Wirkung der Bäume auf das Stadtklima wird jedoch von vitalitätsschwächenden Einflüssen (beispielsweise Wasser- und Nährstoffmangel) massiv negativ beeinflusst. Die Abwehrmechanismen der Bäume werden teilweise so geschwächt, dass durch Parasiten verursachte Schäden nicht ausreichend abgeschottet werden können. Hinzu kommt, dass Bäume zunehmend mit transkontinental eingeschleppten Parasiten und anderen Schadorganismen, dessen Gefahrenpotential noch nicht bekannt ist, in Kontakt kommen (MACK et al. 2000).

Die langlebigen Bäume werden im Hinblick auf das sich ändernde Klima (z. B. Trockenstress und Hitzebelastung) und ihre vielseitige Verwendung als Park- und Straßengrün nach ihrer Stadtklimafestigkeit und Verträglichkeit gegenüber den Standortbedingungen ausgewählt (s. GALK¹-Straßenbaumliste, 2012). Die Auswahl von Bäumen im öffentlichen Grün hat lange nur nach Kriterien der Tradition und Verfügbarkeit von Pflanzmaterial oder nach dekorativen Gesichtspunkten, wie Blüte oder herbstliche Laubfärbung, stattgefunden (SÆBØ et al. 2003). In Nordwesteuropa wurden laut PAULEIT et al. (2002) als Hauptgattungen *Platanus*, *Aesculus*, *Acer* und *Tilia* als Straßenbäume verwendet. Diese Arten-Verteilung findet sich beispielsweise auch in Hamburg wieder, wo mit 24 % die Linde (*Tilia* spp.) den Hauptanteil der Stadtbäume ausmacht. Die Gattung *Acer* ist mit 13 %, die Gattung *Platanus* mit 5 % und die Gattung *Aesculus* mit 3 % vertreten.² Oft wurden ganze Alleen mit diesen Baumarten bepflanzt.

Neben den abiotischen Faktoren, die einen negativen Einfluss auf die Vitalität und damit auf die Verkehrssicherheit von Bäumen haben können, sind auch die biotischen Faktoren von großer Bedeutung. Um mit gezielten Maßnahmen die Verkehrssicherheit zu erhalten oder wieder herzustellen, müssen die Schaderreger und deren Gefahrenpotential bekannt sein.

Der Großteil der biotischen Schädlinge, die eine Gefährdung der Verkehrssicherheit hervorrufen können, findet sich in der Abteilung der Basidiomyceten. Die holzerstörenden Basidiomyceten besitzen die Fähigkeit, das Holz befallener Bäume parasitär abzubauen und durch den Abbau die Stand- und Bruchsicherheit herabzusetzen (SCHMIDT et al. 2012). Dabei können bei unterschiedlichen Pilz-Wirt-Kombinationen unterschiedliche Gefahrenpotentiale entstehen (BAIETTO und WILSON 2010). Als Gefahrenpotential wird hier demnach das Potential der holzerstörenden Pilze bezeichnet, welches zur Gefährdung der Verkehrssicherheit führt.

Bei der Besiedlung von Bäumen durch Bakterien, die auch eine Gruppe von biotischen Schädlingen darstellen, wird das Holz des Baumes nicht bis zur Gefährdung der Verkehrssicherheit abgebaut. Es kommt vielmehr zu einer Schädigung von Gewebeteilen. Dies stellt eine zusätzliche Schwächung des Abwehrsystems des Baumes dar, was die

¹ www.galk.de „Straßenbaumliste“ Deutsche Gartenamtsleiterkonferenz - Arbeitskreis ‚Stadtbäume‘

² Quelle: www.hamburg.de/hamburgs-stadtbaeume/6125908/hamburgs-strassenbaeume-ein-privileg/, aufgerufen (15.01.2019)

Besiedlung durch Basidiomyceten begünstigen kann (RAYNER und BODDY 1988). Die Abwehrmechanismen sind von der Vitalität und der Art des Baumes abhängig (KEHR 2007). Die vollständige Abwehr eines Schadens durch den Baum gelingt nicht immer. Grundsätzlich werden Bäume in „effektiv“ und „schwach“ abschottende Arten eingeteilt (DUJESIEFKEN und LIESE 2015).

Für den Erhalt der Verkehrssicherheit werden nach dem Stand des aktuellen Wissens, Maßnahmen zum Erhalt der Verkehrssicherheit mit der entsprechenden Technik durchgeführt. Die Anspruchsgrundlage, die der Verkehrssicherungspflicht bei Bäumen zugrunde liegt, ist § 823 Abs. 1 BGB. Der Baumeigentümer ist demnach verpflichtet, Schäden an Personen und Sachen durch den Baum zu vermeiden (BRELOER 2003). Die Verkehrssicherheit eines Baumes ist durch seine Stand- und Bruchsicherheit gegeben (FLL-Baumkontrollrichtlinien 2010, FLL-Baumuntersuchungsrichtlinien 2013). Neu eingeschleppte und unbekannte Krankheiten führen auf Grund ihres nicht bekannten Gefahrenpotentials zu großen Unsicherheiten bei der Beurteilung der Verkehrssicherheit.

Im Falle der hier untersuchten Rosskastanien-Komplexkrankheit liegen noch keine ausreichenden Kenntnisse über den Verlauf des Schadens vor. Die Komplexkrankheit wird in diesem Fall durch das zeitgleiche Auftreten mehrerer artunterschiedlicher Organismen charakterisiert. Die Beurteilung befallener Rosskastanien ist nicht zuverlässig möglich, wenn die beteiligten Schadorganismen nicht an den Symptomen erkennbar sind.

Da zurzeit keine wissenschaftlich validierten Aussagen über den Schaden durch *P. ostreatus* und *F. velutipes* gemacht werden können, widmet sich diese Untersuchung der Aufklärung des Gefahrenpotentials der Basidiomyceten innerhalb der Rosskastanien-Komplexkrankheit.

1 Anlass und Hintergrund der Untersuchung



Abbildung 1: a) Leckstelle verursacht durch *P. syringae* pv. *aesculi* (Pfeil) an Rotblühender Rosskastanie an Starkast in der Krone eines Alleebaumes. b) Fruchtkörper des *F. velutipes* (1, oben) und des *P. ostreatus* (2 unten rechts), die am Stamm einer Weißblühenden Rosskastanie aus augenscheinlich gesunder Rinde erschienen.

1.1 Rosskastanien-Komplexkrankheit

An der Rosskastanie ist seit 2012 nordwestlich des Niederrheins und des Ruhrgebietes bis in den Norden nach Hamburg ein bislang unbekanntes Schadbild gehäuft aufgetreten. Dieses Schadbild wurde auch in Köln und Magdeburg beobachtet. Die zukünftige Ausbreitung der Krankheitssymptome in den Süden und Osten Europas gilt als wahrscheinlich (DUJESIEFKEN et al. 2016).

Bei der Weißblühenden Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*) und der Rotblühenden Rosskastanie (*Aesculus x carnea*) treten Pilzfruchtkörper verschiedener parasitärer und saprophyter Basidio- und Ascomyceten auf. Zudem wurde der Befall durch das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* festgestellt. Dieses ist bereits umfangreich untersucht worden und als Verursacher von Rindennekrosen bei der Gattung *Aesculus* identifiziert (WEBBER et al. 2006, MABETTE 2007, GREEN et al. 2009, STEELE et al. 2010). Erstmals wurde das Bakterium in Indien an *Aesculus indica* als blattbewohnendes Bakterium nachgewiesen (DURGAPAL und SINGH 1980). Der Erstnachweis in Deutschland erfolgte durch SCHMIDT et al. (2009) an Weißblühenden Rosskastanien.

Bei Weiß- und Rotblühenden Rosskastanien verursacht das Bakterium streifen- bis flächenförmige Rindennekrosen (SCHMIDT et al. 2008) und wird im Falle der hier beschriebenen Komplexkrankheit als Primärschädling eingestuft (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014). Die Schäden sind durch schwarze Leckstellen an der Rinde erkennbar (s. Abbildung 1a und 2a) und treten vom Stammfuß bis in die Krone auf (SCHMIDT et al. 2008; DUJESIEFKEN et al. 2008; STOBBE et al. 2008; WEBBER et al. 2008). Im weiteren Verlauf äußert sich der Schaden durch zahlreiche Pilzfruchtkörper, die vom Stammfuß bis in die Krone auftreten, außerdem durch die oben genannten Rindenschäden und durch daraus entstehende Rindensrisse (s. Abbildung 2a und b) sowie durch Totäste in der Krone. Nicht alle am Schaden beteiligte Pilze sind äußerlich erkennbar. Vor allem treten die Fruchtkörper des Austernseitlings (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer) und des Samtfußrüblings



Abbildung 2: a) Rindenriss an Sprossachse einer Weißblühenden Rosskastanie und schwarze Leckstellen mit Pilzfruchtkörpern von *F. velutipes*. b) Rindenrisse an einem Stämmeling einer Rotblühenden Rosskastanie.

(*Flammulina velutipes* (Curtis: Fr.) Singer) (s. Abbildung 1b und 2a) an den Stämmlingen und Starkkästen auf. Außerdem tritt vereinzelt auch der Violette Knorpelschichtpilz (*Chondrostereum purpureum* (Pers.: Fr.) Pouzar) auf. Weitere Pilze sind erst durch molekularbiologische Untersuchungen identifiziert worden. Darunter waren die Gattungen *Phomopsis* sp., *Diplodia* sp. und *Nectria* sp., sowie der Angebrannte Rauchporling (*Bjerkandera adusta* (Willd.: Fr.) Karst.) (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014). *P. ostreatus* und *F. velutipes* gelten nach MÜLLER-NAVARRA et al. (2014) als Hauptschadverursacher, durch die das Holz der Kastanien weißfäuleartig abgebaut wird (DUJESIEFKEN et al. 2016). Bleibt der Schaden unbemerkt, wird die Verkehrssicherheit betroffener Bäume rasch herabgesetzt und ist dann häufig nicht mehr gewährleistet. Die Krankheit betrifft Rosskastanien aller Altersklassen.

1.1.1 *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*

Bei dem neuartigen Krankheitsbild handelt es sich um eine Komplexkrankheit (MÜLLER-NAVARRA 2012), die durch den Befall der Rosskastanien mit *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) ausgelöst wird. Das Bakterium ist offenbar in der Lage, durch kleinste Wunden in der Rinde in den Baum einzudringen (SCHMIDT et al. 2014). Möglich scheint auch die Infektion durch Spaltöffnungen oder durch Lenticellen (GREEN et al. 2009; STEELE et al. 2010; MULLETT und WEBBER 2013; LAUE et al. 2014). Hat sich das Bakterium etabliert, verursacht es durch die Abgabe von Stoffwechselprodukten Rindennekrosen (GREEN et al. 2009). Die Schädigung kann bis zum Kambium reichen und wird durch schwärzliche gummiartige Ausflüsse auf der Rinde erkennbar (s. Abbildung 1a). SCHMIDT et al. (2014) isolierten das Psa außerdem auch aus dem Xylem künstlich infizierter Weißblühender Rosskastanien. Das Bakterium wird in diesem Krankheitsbild als Primärschädling eingestuft (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014) und befällt Bäume jeder Altersklasse.

Die durch Psa verursachten Rindennekrosen führen nicht zwangsläufig zu der oben beschriebenen Komplexkrankheit. Erweitern sich die Rindennekrosen auf das Kambium

1 Anlass und Hintergrund der Untersuchung

durch nicht ausreichende Abwehrreaktionen (Bildung nekrophylaktischen Gewebes) besteht die Gefahr einer Folgebesiedlung durch Basidiomyceten (MÜLLER-NAVARRA 2012; DUJESIEFKEN et al. 2016).

Durch Austrocknen der abgestorbenen Rindenbereiche, die dunkel verfärbt sind, entstehen Längsrisse an den betroffenen Ästen, durch die der Holzkörper freigelegt wird (s. Abbildung 2b). Die Abwehrmechanismen der Bäume können die Besiedlung durch Wund- und Schwächeparasiten nicht verhindern. Die Wunden werden zu Eintrittspforten für holzbesiedelnde Asco- und Basidiomyceten (MÜLLER-NAVARRA 2012).

Der Befall der Weißblühenden Rosskastanie mit der Kastanienminiermotte (*Cameraria ohridella*) kann zusätzlich die Vitalität des Baumes schwächen und die Symptome des *Pseudomonas*-Befalls verstärken (PERCIVAL et al. 2014).

Aktuell kann von einer Verbreitung der von Psa in Großbritannien, Belgien, den Niederlanden und Deutschland sowie Irland (SCHMIDT et al. 2009, GREEN et al. 2010, MCEVOY et al. 2016), Norwegen und Tschechien ausgegangen werden (LAUE et al. 2014, MERTELİK et al. 2013).

Zur Identifikation des Bakteriums im Rindengewebe ist von SCHMIDT et al. (2009) ein molekularbiologischer Schnelltest entwickelt worden. Durch die Verwendung taxonspezifischer Primer kann das Bakterium mittels Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden. Dieser Test wird auch von KEHR et al. (2010) in der „Anleitung zur Probennahme für den Schnellnachweis“ von der „*Pseudomonas*-Rindenkrankheit der Rosskastanie“ als nachweislich verwendbar anerkannt.

1.1.2 Hauptschadverursacher

Am auffälligsten innerhalb der Weißfäule bei dem neuartigen Krankheitsbild der Rosskastanien sind a) *Pleurotus ostreatus* und b) *Flammulina velutipes* (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014).

- a) *P. ostreatus* ist als Wund- und Schwächeparasit an der Rosskastanie bekannt und verursacht eine simultane Weißfäule, die als unterschiedlich stark (LICHTENAUER et al. 2013) bis gering aggressiv eingestuft wird (ROLOFF 2005; TERHO et al. 2007). Die oft seitlich gestielten, oberseitig gräulich bis bräunlich gefärbten Pilzfruchtkörper erscheinen an großen Baumwunden häufig in Gruppen (s. Abbildung 3d).
- b) *F. velutipes* ist als Parasit an Straßen- und Parkbäumen bisher nur durch WOLKINGER, (1973) und SEEHANN (1979) beschrieben, weswegen keine aktuelle Untersuchung zu der von ihm verursachten Fäule vorliegt. Er gilt als Saprophyt (SCHLECHTE 1986), der Weißfäule verursacht. Die Weißfäule wird als wenig intensiv und gering zerstörerisch eingestuft (LYR und ZIEGLER 1959). Es liegen keine Informationen über die Form des Weißfäuletyps oder die Abbaurate des Samtfußröhlings vor. Aus der Verwendung als Speisepilz lässt sich ein hohes Fruktifikationspotential vermuten. Die büschelig auftretenden Pilzfruchtkörper sind ockerfarbig bis bräunlich gefärbt und mittig gestielt (s. Abbildung 3b).

Die Fruchtkörper beider Arten erscheinen in den Wintermonaten vereinzelt oder in Gruppen nicht nur entlang der Rindenrisse (s. Abbildung 2a und b), sondern auch an augenscheinlich gesunden Rindenpartien und treten dabei oft dicht benachbart auf (s. Abbildung 1 und 3b, c und d). Die Fruchtkörper dieser Pilze können vom Stammfuß bis in die Krone erscheinen. Beide Pilze sind weltweit beliebte Speisepilze und werden in künstlicher Kultur angebaut (SCHMIDT 2006; LI und LI 2014).



Abbildung 3: a) Vertrocknete Pilzfruchtkörper von *F. velutipes* (Pfeile) an Rotblühenden Rosskastanien, frische Pilzfruchtkörper von *F. velutipes* (b) an Rotblühender Rosskastanie. c) Vertrocknete Pilzfruchtkörper von *P. ostreatus* (Pfeile) direkt neben frischen von *F. velutipes*. d) Pilzfruchtkörper von *P. ostreatus*.

Vereinzelt kommen außerdem der Violette Knorpelschichtpilz (*Chondrostereum purpureum*) und der Angebrannte Rauchporling (*Bjerkandera adusta*) vor. Beide Arten bilden flächig bis konsolenförmige ungestielte Fruchtkörper. *C. purpureum* gilt als parasitärer Erstbesiedler von frischen Wunden und verursacht ebenfalls eine Weißfäule (BUTIN 2011, GROSCLAUDE 1988, DE JONG et al. 1998). Die Fruchtkörper erscheinen oft in der Krone, weswegen sie bei Baumkontrollen leicht übersehen werden. *B. adusta* ruft ebenfalls eine Weißfäule hervor, die laut SEEHANN (1979) verdeckt durch anhaftende Rinde unauffällig ist.

1.1.3 Beteiligte Ascomyceten

Phomopsis sp., *Diplodia* sp. und *Nectria* sp. werden ebenfalls mit den erkrankten Kastanien in Zusammenhang gebracht (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014). Alle drei Gattungen verursachen bei Laub- und/oder Nadelholz Rindennekrosen (*Phomopsis* sp., *Diplodia* sp., KEHR et al. 2003) oder Welke- und Absterbeerscheinungen an Trieben (*Nectria* sp., TELLO et al. 2005).

1.1.4 *Aesculus hippocastanum* und *Aesculus x carnea*

In Deutschland wurden erste Exemplare der Weißblühenden Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum* L.) Anfang bis Mitte des 17. Jahrhunderts gepflanzt (WIMMER 2001, WAGENFÜHR 2006), von wo aus sich der Baum in ganz Mitteleuropa als Park- und

1 Anlass und Hintergrund der Untersuchung

Straßenbaum etablierte. 2005 war sie Baum des Jahres (ROLOFF et al. 2010). Die Art gilt als schwach abschottend (DUJESIEFKEN und LIESE 2015), d.h. Schäden werden meist nicht engräumig eingegrenzt, woraus umfangreiche Fäulen entstehen können. Das Holz weist eine Rohdichte von 0,46 bis 0,55 g/cm³ auf (GROSSER und TEETZ 1985). Die Gefäße der zerstreutporigen Rosskastanie sind etwa 50 µm groß und kommen in radialen Gruppen sowie einzeln in einer Anzahl von 110–150 pro mm² vor. Der Baum wächst meist rechtsdrehwüchsig (WAGENFÜHR 2006). Die Weißblühende Rosskastanie kann ein Alter von ca. 300 Jahren und eine Wuchshöhe von 30 m erreichen.

Die Rotblühende Rosskastanie (*Aesculus x carnea* HAYNE) wird seit 1818 auf Grund ihrer Blüte europaweit als Park- und Straßenbaum verwendet (KRÜSSMANN 1976, WARDA 2001) und ist ein Hybrid der Arten *Aesculus hippocastanum* und *Aesculus pavia*.

Das Holz beider Arten findet keinerlei nennenswerte Verwendung in der Holzindustrie.

1.2 Zielsetzung der Untersuchung

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist, durch die Kombination mykologischer, holzphysikalischer und molekularbiologischer Untersuchungen das von *Pleurotus ostreatus* und *Flammulina velutipes* ausgehende Gefahrenpotential für Rosskastanien innerhalb der neuartigen Rosskastanien-Komplexkrankheit zu bewerten. Dabei liegen die ökologischen Beziehungen der interspezifischen Einflüsse der beiden Pilzarten zueinander und zu *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) im Fokus.

Das Krankheitsbild ist durch die von den Pilzen verursachte Weißfäule charakterisiert. Zwar sind beide Pilze lange an Rosskastanien bekannt, wurden aber bislang als nicht sonderlich aggressiv beschrieben. Da aber innerhalb des Krankheitsbildes eine umfangreiche und schnelle Schädigung der Bruchsicherheit betroffener Rosskastanien durch Holzabbau erfolgt, muss das Gefahrenpotential der beteiligten Pilze untersucht und neu eingeschätzt werden. Die Gründe für den ungewöhnlich schnellen Holzabbau liegen augenscheinlich in der Kombination der beteiligten Basidiomyceten und des Bakteriums.

Um dieser Vermutung nachzugehen und die Interaktion der beteiligten Basidiomyceten zu beschreiben, werden diese in Dual- und Multiplexkulturen *in vitro* beobachtet. Die Untersuchungen dienen der Aufklärung von synergistischen bzw. antagonistischen Beziehungen der Reinkulturen der beteiligten Basidiomyceten zueinander und zu Psa.

Um den Einfluss des Holzabbaus auf die Festigkeit und den Elastizitätsmodul zu bestimmen, werden aus gesunden Rosskastanien Proben für Festigkeitsmessungen (Biegefestigkeit und Bruchschlagarbeit) angefertigt, die über verschieden lange Zeiträume im Labor dem Abbau durch die beteiligten Basidiomyceten ausgesetzt werden. Die Masseverluste, die in unmittelbarem Zusammenhang mit der Biegefestigkeit, dem Elastizitätsmodul und der Bruchschlagarbeit stehen, werden ergänzend als Maß zur Beurteilung des Gefahrenpotentials erhoben.

In vivo werden Kastanien in der Jugendphase mit *F. velutipes* und *P. ostreatus* inokuliert, um dessen Ausbreitung axial, radial und tangential im Stamm beobachten zu können. Dies soll der Aufklärung der Abschottungseffektivität und des Gefährdungspotentials für die Rosskastanien durch die Basidiomyceten dienen.

Der Nachweis von *P. ostreatus* und *F. velutipes* in natürlich infizierten Rosskastanien erfolgt mittels neu entwickelter Taxon-Primer. Eine Beschleunigung des Identifizierungsprozesses soll durch die Entwicklung einer Multiplex-PCR ermöglicht werden.

2 Material

2.1 Aufnahme von Beständen und Einzelbäumen

Für die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden Proben in Deutschland und Süddänemark im Zeitraum von 01.2014 bis 01.2016 genommen. Insgesamt sind an acht Standorten Bäume mit der beschriebenen Komplexkrankheit aufgefallen und in die Untersuchungen aufgenommen worden. Jeder aufgenommene Baum wurde mit Hilfe eines Kontrollbogens beurteilt (s. Anhang). Dieser beinhaltet die Aufnahme von Standort, Art und Brusthöhendurchmesser (Bhd), Vitalität des Baumes nach ROLOFF (2018), das Vorkommen der Pilzfruchtkörper, von Leckstellen, Rindenrissen, den Standort sowie den Pflegezustand des Baumes.

2.1.1 Hamburg

In der Justus-Brinckmann-Straße (Hamburg-Bergedorf) wurden zwei Rotblühende Rosskastanien auf Grund starken Befalls mit *P. ostreatus* und *F. velutipes* im Februar 2015 gefällt. Von diesen wurden je ein Stämmungsabschnitt für molekularbiologische Untersuchungen verwendet. Der erste Baum aus diesem Alleenbestand (Baumnr. 5, aus Hamburger Baumkataster) hatte einen Brusthöhendurchmesser (Bhd) von 62 cm. Zum Zeitpunkt der Baumkontrolle hatte der Baum eine Vitalität von 2. In der Krone waren Einkürzungen erkennbar. Vom Stammfuß bis in die Krone traten Fruchtkörper von *F. velutipes* und Leckstellen auf. Nach der Fällung wurde von diesem ein Stammabschnitt (Probenbezeichnung: R1) für die molekularbiologische Bestimmung der Pilze entnommen (s. Tabelle 1).

Ein weiteres Exemplar (Baumnr. 667, aus Hamburger Baumkataster) stand ebenfalls in der J.-Brinckmann-Str. Mit einem Bhd von 60 cm war er etwas kleiner als Baum Nr. 5. Auch hier war der Befall mit *F. velutipes* und *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) deutlich sichtbar und erstreckte sich über den gesamten Baum bis in die Krone. Hinzu kam der Befall mit *P. ostreatus*. Ebenfalls waren Astungswunden von einer Kroneneinkürzung vorhanden. Aus einem Starkast wurde ein Teil zur Schaderregerbestimmung entnommen (R2, s. Tabelle 1). Der Baum hatte ebenfalls eine Vitalität von 2.

Der Standort Ernst-Henning-Straße (Bergedorf) wurde bereits 2012 in MÜLLER-NAVARRA et al. (2014) beprobt. Im Mai 2014 fiel wieder ein Exemplar einer Rotblühenden Rosskastanie in dieser Straße auf. Dieses stand als Alleebaum am Straßenrand und ragte mit seiner Krone über die Fahrbahn (Baumnummer aus Hamburger Baumkataster: 319). Durch die umstehenden Kastanien verengte sich der Kronenraum für alle benachbarten Bäume der Allee. Der Baum hatte einen Bhd von 56 cm. Die Krone wurde von zwei Stämmlingen gebildet, von denen einer zur Zeit der Begutachtung abgestorben war. Die Vitalität des Baumes wurde auf Grund dessen mit 3 bewertet. Der abgestorbene Stämmling wies sowohl vertrocknete Pilzfruchtkörper, Rindenrisse als auch Leckstellen auf. Aus dem abgestorbenen Kronenteil brach ein Starkast von ca. 15 cm Dicke heraus, worauf hin der gesamte Stämmling entnommen wurde. Dieser wurde in drei Teile geteilt. Im oberen Querschnitt beträgt der gesunde Teil des Holzes weniger als 30 %, im mittleren Teil weniger als 20 % und im unteren Teil ca. 30 %. Die Abschnitte dieses Baumes wurden molekularbiologisch untersucht (R3.1, R3.2 und R3.3, s. Tabelle 1). Während eines Sturmes im Januar 2015 wurde dieser Baum so stark beschädigt, dass er komplett gefällt wurde.

2 Material

Ein weiterer Baum am Standort Lohbrügger Markt (Baumnummer aus Hamburger Baumkataster: 164, W1, *A. hippocastanum*), der im Frühjahr 2014 abgestorbene Kronenteile aufwies und auf Grund dessen eine Vitalität von 3 hatte, wurde im Februar 2015 gefällt. Dieser Baum, der nicht befallen war, wurde zur Herstellung der Prüfkörper für die Abbauversuche und Biege- und Bruchfestigkeitsversuche sowie für die Inokulationsdübel verwendet.

2.1.2 Niedersachsen

In Wulfsode wurden 48 Weißblühende Rosskastanien begutachtet, von denen vier beprobt wurden. Bei diesen Bäumen handelt es sich um Alleebäume verschiedenen Alters an der Kreisstraße 21.

Einer der gefällten Bäume zeigte im Winter (Januar) 2014 Totäste in der Krone und Pilzfruchtkörper von *P. ostreatus* und *F. velutipes*. Die Fruchtkörper erschienen im Stammfußbereich und reichten bis in ca. 4 m Höhe entlang des Stammes. Von den Fruchtkörpern wurde je Art ein Exemplar für Kultivierungszwecke und für die molekulare Bestimmung gesammelt. Die Krone wies keine Fruchtkörper auf. Im Stammfußbereich waren Leckstellen vorhanden. Der Baum hatte einen Bhd von ca. 23 cm. Seine Vitalität wurde mit 2 bewertet. Es wurde kein weiteres Material aus diesem Baum entnommen, weswegen auf eine Nennung in Tabelle 1 verzichtet wird.

Für die molekulare Bestimmung der Schadorganismen wurden im Februar 2014 drei weitere Exemplare gefällt (s. Tabelle 1).

Baum W2 (Durchmesser in Bhd 19,5 cm) war stark geschädigt und wies Fruchtkörper von *P. ostreatus* und Leckstellen sowie Rindenrisse entlang des Stammes auf. Der keilförmige Schaden im Holzkörper umfasst ca. 15% der Gesamtfläche des Querschnitts. Die Vitalität wurde mit 2 bewertet.

Der Baum W3 war zum Zeitpunkt der Fällung vom Stammfuß bis zu den Stämmlingen mit *P. ostreatus* befallen. Außerdem zeigten sich vom Stamm bis zu den Ästen in der Krone teilweise großflächig ausgeprägte Leckstellen. Hinzu kamen Rindenrisse am Stamm und den Stämmlingen. Diesem Baum wurden zwei Abschnitte für die molekulare Untersuchung entnommen (W3.1 und W3.2, s. Tabelle 1). Die Abschnitte liegen 1 m voneinander getrennt übereinander im Stamm. Die Vitalität wurde mit 3 bewertet.

Dem dritten gefällten Baum wurde ein Stammabschnitt entnommen (W4, s. Tabelle 1). Der Baum war entlang des Stammes bis in die Krone mit *P. ostreatus* und *F. velutipes* befallen. Die Leckstellen verteilten sich von Stammfuß bis in die Äste der Krone. Die stark ausgeprägten Rindenrisse zogen sich entlang des Stammes vom Stammfuß bis in die Krone, weswegen seine Vitalität mit 3 bewertet wurde.

2.1.3 Schleswig-Holstein

Auf Helgoland wurde eine Weißblühende Rosskastanie im September 2015 beprobt (W5, s. Tabelle 1). Der Baum stand in der Unterstadt am Jacob-Andresen-Platz. Dieser ca. 15 m hohe Baum wies Leckstellen und Rindenrisse auf. Zum Zeitpunkt der Beprobung waren keine Pilzfruchtkörper sichtbar. Seine Vitalität wurde mit 2 bewertet. Die genommene Probe wurde auf Psa molekularbiologisch untersucht.

Tabelle 1: Tabelle der beprobten Bäume. Herkunft, Probenbezeichnung, entnommener Baumteil mit Durchmesser und Anteil des anatomisch veränderten Gewebes im Querschnitt, Art (Ac=A. x *carnea*, Ah=A. *hippocastanum*), den Brusthöhendurchmesser (Bhd) des Baumes, Symptome und Verwendung in dieser Untersuchung (MolBiol: molekularbiologische Untersuchung). RR=Rindenrisse, LS=Leckstellen, PFK=Pilzfruchtkörper, die nicht makroskopisch identifiziert werden konnten.

Herkunft/ Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Baumteil/ Durchmesser [cm]/ Abgebaut [%]	Art	Bhd [cm]	Symptome	Material für
Hamburg Justus-Brinckmann-Straße/ 02.2015	R1	Stämmeling/35/30	Ac	62	RR, LS, <i>F. velutipes</i>	MolBiol
	R2	Starkast/21/80	Ac	60	RR, LS, <i>P. ostreatus</i> , <i>F. velutipes</i>	MolBiol
Hamburg Ernst-Henning-Straße/ 05.2014	R3.1	Stämmeling/19/70	Ac	56	RR, LS, PFK	MolBiol
	R3.2	Stämmeling/25/20				MolBiol
	R3.3	Stämmeling/31/70				MolBiol
Hamburg Lohbrügger Markt/ 02.2015	W1	Stammabschnitte	Ah	47	keine	Abbau- und Festigkeitsversuche, Inokulations- dübel
Niedersachsen Wulfsode, Kreisstrasse 21/ 02.2014	W2	Stamm/15/15	Ah	19,5	RR, LS, <i>P. ostreatus</i>	MolBiol
	W3.1	Stamm/29/60		30	RR, LS, <i>P. ostreatus</i>	MolBiol
	W3.2	Stämmeling/21/20				MolBiol
	W4	Stamm/24/55		24	RR, LS, <i>P. ostreatus</i> , <i>F. velutipes</i>	MolBiol
Schleswig-Holstein Helgoland, J.-A.-Siemens- Platz/09.2015	W5	Borke	Ah	40	RR, LS	MolBiol
Bayern München, Städt. Baumschule 02.2015	M1	Sprossachse/10	Ac	10	LS	MolBiol
	M2	Sprossachse/9	Ac	9	LS	MolBiol
	M3	Sprossachse/11	Ac	12	LS	MolBiol
	M4	Starkast/14	Ah	35	LS	MolBiol
DK, Fanø, Skolevej/06.2015	F1	Kronenansatz/17	Ah	18	RR, LS	MolBiol

2.1.4 Bayern

In Bayern wurden in der Städtischen Baumschule München vier Rosskastanien im Februar 2015 bebroht und anschließend molekularbiologisch untersucht. Dieser Standort stellt den bislang südlichsten Fundort von infizierten Rosskastanien dar.

Die Bäume M1 (Bhd 10 cm) und M2 (Bhd 9 cm), sowie M3 (Bhd 12 cm) waren Rotblühende Rosskastanien mit einer Höhe von ca. 4 m mit einer Vitalität von 2. Bei M1 und M2 waren kleine Leckstellen und Rindenrisse erkennbar. Nach der Fällung wurden Abschnitte der Sprossachse entnommen, in denen Psa vermutet wurde. Baum M3 war bereits abgestorben. Dieser stand ca. 250 m entfernt von M1 und M2.

Der vierte Baum, eine Weißblühende Rosskastanie (M4, Bhd 35 cm, 6 m Höhe, Vitalität 2) wies am Stammfuß sowie an den Starkästen der Krone Leckstellen auf (s. Tabelle 1).

2.1.5 Dänemark/Fanø

Im Skolevej (Rindby, Fanø, DK) wurde eine stark geschädigte Weißblühende Rosskastanie gefällt im Juni 2015. Der Baum war 4 m hoch und hatte einen Bhd von 18 cm, sowie eine Vitalität von 3. Die Krone des Baumes war zu einem Drittel abgestorben. Weitere Symptome waren vertrocknete Pilzfruchtkörper und Rindenrisse sowie Leckstellen. Dem Baum (F1) wurde ein Stammabschnitt zur molekularbiologischen Untersuchung entnommen (s. Tabelle 1).

3 Methoden

3.1 Probennahme

Bei der Probennahme wurde zwischen Entnahme von Baumabschnitten (Holz), pilzlichem Material (Pilzfruchtkörper oder Mycel) sowie Rindenproben (Teile der Borke) unterschieden.

3.1.1 Holz- und Rindenproben

Die Untersuchung von Stammscheiben ermöglichte nach einer weiteren Aufarbeitung die genaue Lokalisation einzelner Arten im voranschreitenden Fäuleprozess. Dafür wurden diese vor der Einteilung der Stammscheibe in die unten erläuterten Zonen abgeschliffen. Dadurch wurde an Hand der Reaktionszonen erkennbar, welchen Verlauf der Schaden bisher vermutlich genommen hatte. Anschließend erfolgte die Einteilung in Zonen, die von MÜLLER-NAVARRA et al. (2014) bereits angewandt wurde, und durch die grundlegende Erkenntnisse zu dem Schadverlauf der Komplexkrankheit gewonnen werden konnten.

Im Querschnitt wurden acht Zonen definiert, die separat molekularbiologisch untersucht wurden. In Abbildung 4 ist die Definition der Zonen an einem Beispiel dargestellt. Die Zonen richten sich nach dem zum Zeitpunkt der Fällung des Baumes vorhandenen Schaden, der sich durch Verfärbung des Gewebes und die Ausbildung einer oder mehrerer Reaktionszonen erkennen lässt. Entlang der jüngsten Reaktionszone wurden fünf Proben genommen. Jeweils im Inneren des Querschnitts zwei (RS1, RS2) und in der Mitte der Reaktionszone eine Probe (RM).

Im Kambialbereich wurden zwei Probenzonen festgelegt (S1, S2). Eine weitere Probe (M) aus dem Kambialbereich mittig zwischen S1 und S2 gelegen, eine im Zentrum des Fäulebereiches (Z) und eine Probe aus dem augenscheinlich gesunden Querschnittsbereich (G) wurden ebenfalls entnommen. Nicht in allen Stammscheiben war ein so deutliches Schema wie in Abbildung 4 erkennbar, sodass die Definition der Probenzonen teilweise anders ausfiel und

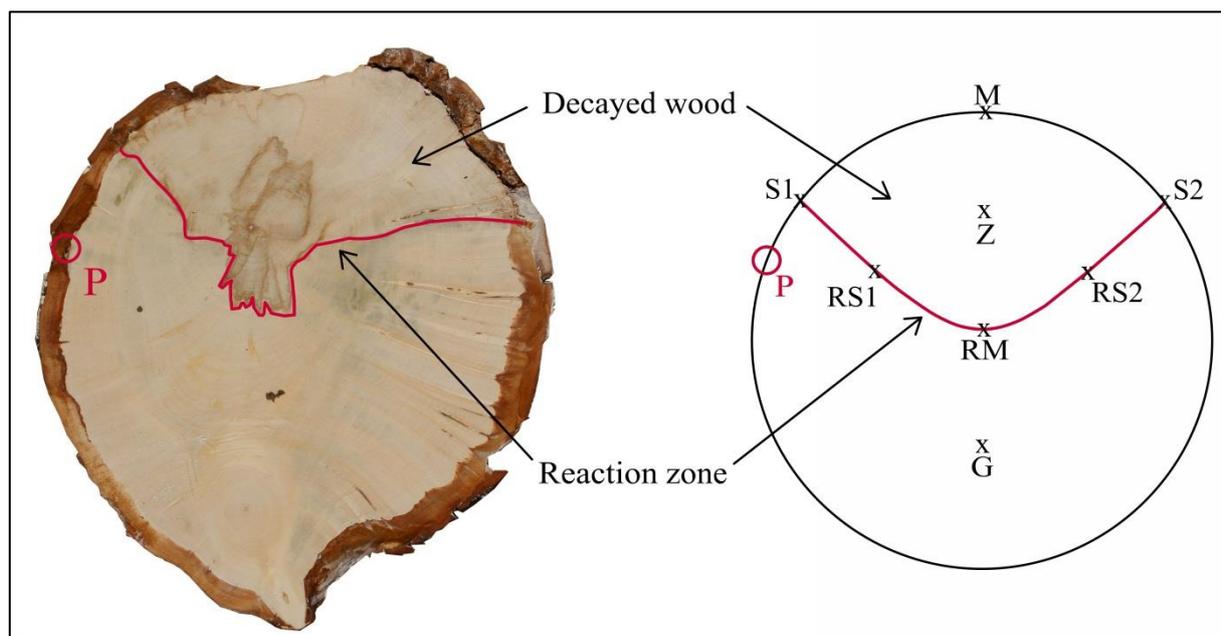


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Einteilung eines Stämmelingsquerschnitts. Decayed wood: Fäulebereich, Reaction zone: Reaktionszone. Quelle: MÜLLER-NAVARRA et al. (2014). Probenzonen: S1, S2=am äußersten Rand der Reaktionszone, im Kambialbereich; RS1, RS2=innere Reaktionszone im Querschnitt zwei; RM=Mitte der Reaktionszone; M=Kambialbereich mittig zwischen S1 und S2; Z=Zentrum des Fäulebereiches; G=augenscheinlich gesunder Querschnittsbereich (Referenzprobe).

nicht alle Zonen definiert werden konnten. Bei der Einteilung solcher Proben erfolgte die Orientierung ebenfalls an den Reaktionszonen. So wird, wenn möglich, jeder einzelne Fäulebereich für sich untersucht und wie oben beschrieben ebenfalls in Zonen eingeteilt.

Jeder Zone wurden durch Bohrungen mit einem Spiralbohrer unter vorheriger Abnahme der äußeren 0,5 mm, zur Vermeidung von oberflächiger Kontamination, Späne entnommen. Die Späne wurden dann in Eppendorftubes für die Extraktion der DNS bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.2 Pilz- und Bakterienproben

3.1.2.1 Pilzproben

Sobald an erkrankten Bäumen Pilzfruchtkörper (PFK) erkennbar waren, wurden diese vor Ort makroskopisch bestimmt, gesammelt und eingelagert. Zur Gewinnung von pilzlichen Reinkulturen werden Tramateile benötigt, die, wenn eine Aufarbeitung zu Reinkulturen nicht direkt nach dem Sammeln möglich war, im Kühlschrank bei 4 °C bis zu 24 h gelagert wurden. Im Labor erfolgte die Lagerung von Tramateilen, die aus dem Pilz unter sterilen Bedingungen entnommen werden, in 2-ml-Eppendorftubes bei -20 °C bis zur molekularen Bestimmung der Art über die DNS.

3.1.2.2 Bakterienproben

Bei Auftreten frischer Leckstellen auf der Borke wurden den Bäumen Borkenproben entnommen, die auch Teile von Xylem umfassen konnten. Die Entnahme der Proben erfolgte oberhalb der Leckstelle durch Herausstechen mit einem Stecheisen. Dieses wurde nach jedem Schnitt mit 96 %igem Alkohol sterilisiert. Zur Isolierung von Psa wurden die Proben frisch weiterverarbeitet; die Lagerung befallenen Gewebes bis zur molekularen Untersuchung erfolgte ebenfalls in 2-ml-Eppendorftubes bei -20 °C.

3.2 Molekularbiologische Identifizierung der Schadorganismen

Da bei einer Sichtkontrolle eines Baumes nicht alle beteiligten Schadorganismen erkannt werden können, besteht die Möglichkeit, diese über ihre DNS zu identifizieren. Die Identifizierung der Schadorganismen umfasst in dieser Untersuchung mehrere Schritte, die wie in Abbildung 5 dargestellt, gegliedert werden. Die ITS-Region (Internal Transcribed Spacer) eignet sich für die Identifizierung der Pilze auf Grund der Artunterschiede, die im ITS1- und ITS2-Bereich lokalisiert sind (SCHMIDT et al. 2012, s. Abbildung 6). Diese Region der ribosomalen DNS (rDNS) kann nachweislich auch für die Identifizierung von Holzarten verwendet werden (HANSEN et al. 2011) und eignet sich auch für die Entwicklung von Taxon-Primern. Die taxonspezifischen Primer werden in dieser Arbeit aus Bereichen der ITS2-Region entwickelt (HORISAWA et al. 2009).

Der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den universellen Primern ITS1.1 und ITS4 folgte die Sequenzierung der amplifizierten DNS-Abschnitte und anschließend eine Identifizierung mittels Sequenzabgleich. Die basidiomycetenspezifischen Primer ITS2.2 und ITS3.2 wurden für die Identifizierung von Pilz aus Holz verwendet (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014). Diese amplifizieren nur pilzliche DNS, dessen Sequenzen ebenfalls durch Abgleich mit Datenbanksequenzen identifiziert werden.

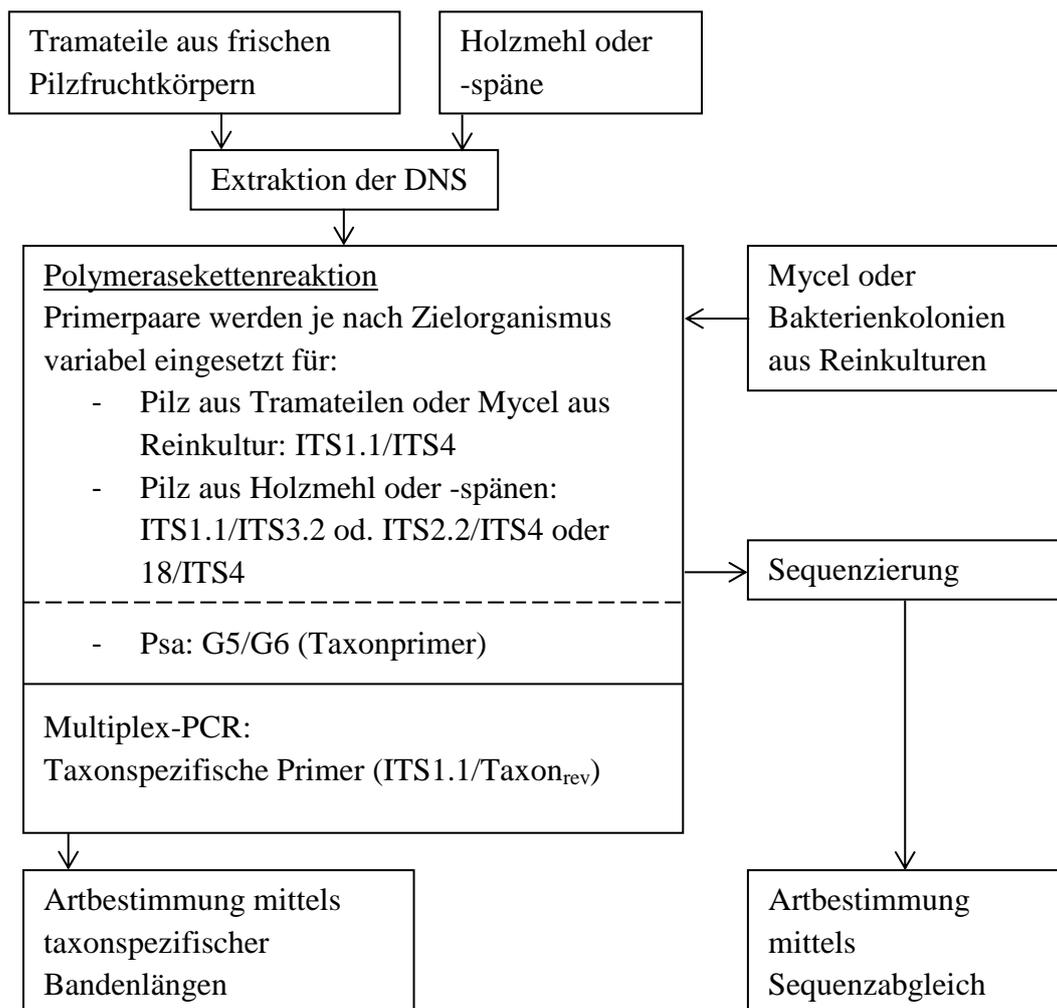


Abbildung 5: Flussdiagramm zur Übersicht über den Ablauf der Schadorganismenidentifizierung aus Pilzfruchtkörpern, Holz oder Reinkulturen.

3.2.1 DNS-Extraktion

Die Extraktion der DNS der Pilze sowie des Bakteriums Psa erfolgte nach Herstelleranweisung (DNeasy Plant Extraction Kit, Qiagen).

Die Pilz-DNS wurde aus bis zu 40 mg Holzmehl, die DNS des Bakteriums Psa aus bis zu 50 mg Xylem/Phloemgemisch (Gewebspäne) extrahiert. Der Zelllyse (Lysispuffer 1) folgte das Ausfällen der Proteine und Zucker (Puffer 2). Nach der Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (Heraus Centrifuge PICO, Thermo Fisher Scientific) wurde die DNS gefällt und auf eine Bindsäule gebunden. Mit einem weiteren Puffer wurde die an die Säule gebundene DNS gewaschen und anschließend mittels eines weiteren Puffers eluiert. Die Lagerung der extrahierten DNS erfolgte bis zum Einsatz in der Polymerasekettenreaktion bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Volumen von $30\text{ }\mu\text{l}$.

Es ist ebenfalls möglich, pilzliche Mycelien oder Bakterienkolonien aus Reinkultur direkt ohne Extraktion in einer PCR einzusetzen. Hierfür muss das Mycel in Wasser mittels Pistill zerdrückt und die Kolonien gelöst werden. Das so erhaltene Template kann an Stelle eines aufwendig hergestellten Extraktes eingesetzt werden.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Für die Identifizierung der Schadorganismen über Sequenzabgleich oder auch durch taxonspezifische Primer wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Die Primer wurden von biomers hergestellt (biomers.net GmbH). Die Identifizierung der Basidiomyceten erfolgte über die ITS-Region (SCHMIDT et al. 2012, MÜLLER-NAVARRA et al. 2014), die von Psa über das Gyrase-B-Gen (SCHMIDT et al. 2009). Der PCR-Mastermix (Qiagen Taq Core Kit, Qiagen) setzte sich entsprechend Tabelle 2 und abhängig vom Zielorganismus zusammen. Die PCRs wurden in einem Thermocycler durchgeführt (T Gradient, Biometra).

Tabelle 2: Zusammensetzung eines Mastermixes (Qiagen Taq Core Kit, Qiagen) einer PCR für eine Probe (Gesamtvolumen $12,5\text{ }\mu\text{l}$).

Komponente	Endkonzentration	Volumen/Probe [μl]
Wasser, autoklaviert		7,775
Q-Solution	einfach	2,5
10x	einfach; beinhaltet 15 mM MgCl_2	1,25
dNTP	200 mM/dNTP	0,25
Primer forward	$0,6\text{ }\mu\text{M}$	0,075
Primer reverse	$0,6\text{ }\mu\text{M}$	0,075
Taq	$2,5\text{ U}$	0,075
Template	$5\text{--}20\text{ ng DNS}/\mu\text{l}$	$0,5\text{--}1$

Tabelle 3: Primersequenzen der verwendeten Primer mit zugehörigem Cyclerprogramm.

Primer	Primersequenz ($5'\dots 3'$)	Cyclerprogramm, Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] und zugehörige Zeit [s] in Klammern				Fragmentlänge [bp]
		Anfangsdenaturierung	Denaturierung	Annealingtemperatur	Elongation	
ITS1.1	GAACCTGCGGAAGGATCAT	94 (240)	94 (30)	55 (30–45)	72 (30)	Abhängig vom Zielorganismus
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC					
ITS2.2	AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT					
ITS3.2	AACTTTCAACAACGGATCTCTT					
18	CGCTACTACCGATTGAATG	98 (240)	94 (30)	59 (45)	72 (30)	224
G5	ATACCACCGGTACTIONCAGATCC					
G6	AATGCCGTCGTCGCGTTGAAT					

3 Methoden

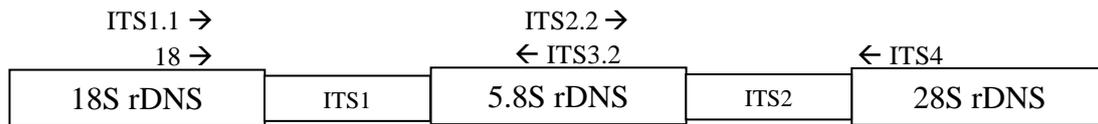


Abbildung 6: ITS-Region höherer Pilze mit Lokalisierung der Primer ITS1.1, ITS4, ITS2.2 und ITS3.2. Die Pfeile zeigen die Amplifikationsrichtung an.

3.2.2.1 Pilze

Unter Verwendung der in Tabelle 3 aufgeführten Primer (ITS1.1, ITS4, ITS2.2 und ITS3.2), die auf dem „Internal Transcribed Spacer-Gen“ liegen (s. Abbildung 6), wurden sowohl die Pilzfruchtkörper, die Pilze im Holz als auch die Mycelien der Reinkulturen identifiziert. Dabei wurden für die Reinkulturen und Pilzfruchtkörperidentifizierungen die Primer ITS1.1 und ITS4 kombiniert. Für die Identifizierung der Pilze im Holz wurde die ITS-Region in zwei Abschnitten durch zwei Primerpaarungen amplifiziert (ITS1.1 und ITS3.2, sowie ITS2.2 und ITS4), sequenziert und anschließend mit dem Programm MEGA 7 (KUMAR et al. 2016) zusammengesetzt.

Die ITS-Region gliedert sich in die Abschnitte 18S rDNS, ITS1 (nicht codierend), 5,8S rDNS, ITS2 (nicht codierend) und 28S rDNS. In der 18S-Region liegt der Forward-Primer ITS1.1. Der Reverse-Primer ITS4 liegt in der 28S-Region (WHITE et al. 1990). Diese Region eignet sich laut GARDES und BRUNS (1993) auch für die Entwicklung basidiomycetenspezifischer Primer. MORETH und SCHMIDT (2005) entwickelten ebenfalls einen weiteren Forwardprimer (18), der mit ITS4 kombiniert wird. Die basidiomycetenspezifischen Primer ITS2.2 und ITS3.2 liegen in der 5,8S-Region und sind zueinander komplementär invertiert (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014). ITS2.2 wird mit ITS4 und ITS3.2 mit ITS1.1 in einer PCR kombiniert, sodass für die Sequenzanalysen zwei Teile der ITS-Region zusammengeführt werden müssen (s. Abbildung 6). Diese drei Primerkombinationen eignen sich auf Grund ihrer Spezifität für die Identifizierung von Pilz-DNS in Holz. Die Gesamtlänge der ITS-Region von *P. ostreatus* liegt bei 670 Basenpaaren (bp), von *F. velutipes* bei 797 bp, von *C. purpureum* bei 701 bp und für *B. adusta* bei 620 bp. Für die Entwicklung der taxonspezifischer Primer für die Basidiomyceten wurde die ITS2-Region verwendet. In diesen Genabschnitten sind die artspezifischen Unterschiede lokalisiert.

3.2.2.2 *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*

Pseudomonas syringae pv. *aesculi* wurde über das Gyrase-B-Gen identifiziert (SCHMIDT et al. 2009). Die 16S-Region, die zur Identifizierung von Bakterien genutzt wird (STACKEBRANDT et al. 1993), eignet sich auf Grund der Homologien verschiedener *Pseudomonaden* nicht. SCHMIDT et al. (2009) entwarfen ein taxonspezifisches Primerpaar (G5 und G6, s. Tabelle 3), welches die Identifizierung des Bakteriums ohne eine an die PCR anschließende Sequenzierung möglich macht. Die Länge des PCR-Produktes, welches mit G5/G6 amplifiziert wird, beträgt ca. 224 bp.

3.2.3 Multiplex-PCR und Taxon-Primer

Aus den durch die Sequenzierung der gesamten ITS-Region erhaltenen Sequenzen der Basidiomyceten wurden die artspezifischen Primer (Taxon-Primer) für die Multiplex-PCR entwickelt. Diese vereinfacht die Identifizierung der beteiligten Pilze in den untersuchten Zonen der Fäulebereiche (s. Abschnitt 3.1.1). In einer Multiplex-PCR werden mehrere

taxonspezifische Primer-Paarungen eingesetzt. Dies führt zu einer Reduzierung der Anzahl von PCRs, da diese nicht für jeden Zielorganismus einzeln prozessiert werden müssen. Außerdem entfallen die Arbeitsschritte „Aufreinigung“; „Sequenzierung“ und „Artbestimmung“ (s. Abbildung 5). Die Identifizierung erfolgte über die Auswertung der Gelbilder, an Hand derer sich die Banden der Zielorganismen zuordnen lassen (DEAN et al. 2004).

Die Anwendung von Multiplex-PCRs eignet sich laut GUGLIELMO et al. (2007) und NICOLETTI et al. (2009) für die Identifizierung von Basidiomyceten in lebenden Bäumen. Im Falle der Komplexkrankheit der Rosskastanien wurde diese für *P. ostreatus*, *F. velutipes*, *B. adusta* und *C. purpureum* in dieser Untersuchung entwickelt. Die notwendigen taxonspezifischen Primer wurden mit dem online-verfügbaren Primer-Programm Primer3 erarbeitet (YE et al. 2012) und anschließend mit NCBI blastn (Programm: ALTSCHUL et al. 1990) überprüft (PARFITT et al. 2010). Es wurde weiterhin in PCRs, die die genannten Zielorganismen enthalten, geprüft, ob die Primer spezifisch binden, so dass eine falsch positive Reaktion ausgeschlossen werden konnte.

3.2.4 Gelelektrophorese und Aufreinigung

Die Überprüfung der PCRs erfolgte durch Gelelektrophorese. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit einem Loading-Buffer und einem Marker (100 bp, 0,4 µl, Konzentration: 0,1 µg/µl, Fermentas O'Generuler™), der Fragmente bestimmter Länge enthält, auf ein Agarosegel (1,5 %, Serva Electrophoresis GmbH) aufgetragen und durch eine Spannung von 135 Volt 20 min elektrophoretisch aufgetrennt (Cosmobio Co., Ltd). Dies ermöglichte die Trennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe. Das Färben des Gels mit Ethidiumbromid (0,00015 %) ließ eine Detektion des PCR-Produktes durch UV-Licht zu (Geldokumentation: BIORAD Universal Hood II). Ist die PCR mit taxonspezifischen Primern durchgeführt worden, konnte an Hand des Markers die Längen der PCR-Produkte bestimmt und einer Art zugeordnet werden.

3.2.5 Sequenzierung und Artbestimmung

Die Aufreinigung, die notwendig ist, um die Amplifikationsprodukte sequenzieren zu lassen, erfolgte mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Nach Bindung der DNS an eine Säule wurde diese gewaschen und dann mit einem Puffer eluiert. Das Eluat wurde zur Sequenzierung eingeschickt (Eurofins Genomics Germany GmbH). Die erhaltenen Sequenzen wurden online bei NCBI (National Center for Biotechnology Information³) mit blastn (ALTSCHUL et al. 1990) mit den hinterlegten Sequenzen verglichen und mittels Übereinstimmung einer Art zugeordnet.

Unter Verwendung der in Abschnitt 3.2.2 gelisteten und für die Multiplex-PCR entwickelten artspezifischen Primer konnte die Artbestimmung ohne anschließende Sequenzierung, einen Sequenzabgleich mit in Sequenzdatenbanken hinterlegten Sequenzen oder eigens erarbeiteten Sequenzen vorgenommen werden. Dies beschleunigte den Identifizierungsprozess.

³ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

3.3 Isolation der Reinkulturen

Es wurden Kulturen vom *P. ostreatus*, *F. velutipes*, *B. adusta* und *C. purpureum* sowie von *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* angelegt. Die Kulturen wurden sowohl für die Identifizierung der Organismen als auch für die Dual- und Multiplexkulturen sowie die Abbau- und Festigkeitsversuche verwendet.

3.3.1 Basidiomyceten

Um Reinkulturen von den Pilzen zu gewinnen, wurden diese unter sterilen Bedingungen auf HA-Medium überimpft (Hefeextrakt-Medium, Zusammensetzung s. Tabelle 4). Die frischen Fruchtkörper wurden aufgebrochen, dann Teile des Tramas entnommen und auf das Medium gelegt. Sobald aus den Tramateilen Mycel wuchs, wurden aus der Kultur mit dem hinteren Ende einer sterilen Pasteurpipette Inokuli (Durchmesser von 5 mm) ausgestochen, die auf neue Agarplatten aufgebracht wurden. Das von diesen Plugs wachsende Mycel wurde mittels Sequenzabgleich der DNS identifiziert (s. Abschnitt 3.2). Konnte der Zielorganismus so in Reinkultur gebracht werden, stand dieser für weitere Versuche zur Verfügung.

3.3.1.1 Kulturbedingungen

Die Reinkulturen wurden bei Raumtemperatur (20–25 °C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 ± 5 % inkubiert und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.1.2 Wachstumsverhalten der Reinkulturen

Für die Beobachtungen des Wachstumsverhaltens wurde bei allen Reinkulturen jeden Tag das Wachstum des Mycels dokumentiert, indem der Mycelrand auf der Unterseite der Petrischale eingekreist wurde. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (BD 53, Binder GmbH) bei 26 °C im Dunklen. Das Wachstum wurde in drei Richtungen mit Hilfe eines Koordinatensystems in einem 45°-Winkel zueinander gemessen und anschließend gemittelt (s. Abbildung 7, Software ImageJ; AMBRAMOFF et al. 2004). Die Nulllinie des Koordinatensystems tangiert das Inokulum und die Messung erfolgt in Richtung des Schalenrandes.

Das Inokulum wurde, wie in Abbildung 7 dargestellt, 2,25 cm vom Rand der Petrischale auf den Nähragar ohne Zugabe eines weiteren Inokulums oder anderen Organismus aufgebracht. Die Messung wurde beendet, sobald die Oberfläche des Mediums vollständig mit Mycel bewachsen war.

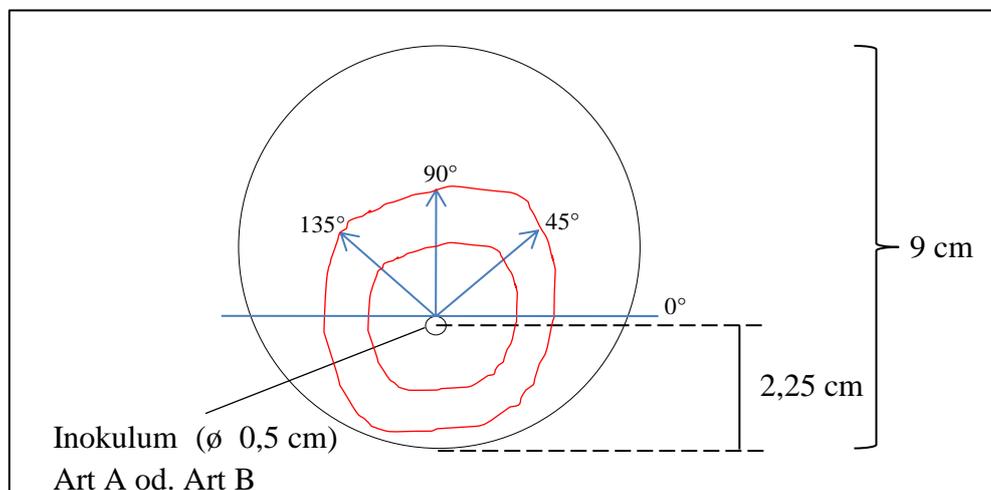


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Reinkultur. Beispielhafte Messung (blaue Pfeile) des Wachstums nach zwei Tagen (äußerer roter Kreis).

3.3.1.3 Anlegen einer Stammsammlung

Das Anlegen einer Stammsammlung der Pilze erfolgte durch regelmäßiges Überimpfen der Reinkulturen auf HA-Medium. Die Reinkulturen wurden in Petrischalen, die mit Parafilm (BEMIS) verschlossen waren, bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*

Die Gewinnung von *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) erfolgte über die Eluierung von Borkenteilen, die mit einem sterilen Stecheisen von befallenen Bäumen gelöst wurden. Ein direkt nach der Probennahme angeschlossener Isolierungsprozess erhöhte die Wahrscheinlichkeit, lebende Bakterien eluieren zu können. Es wurden zwei Medien KB- (KING et al. 1954, WEBBER et al. 2008, LAUE et al. 2014) und P-Medium nach BRAUN-KIEWNICK und SANDS (2001)) verwendet, die sich für die Isolierung von Bakterien eignen (s. Tabelle 4).

Im Labor wurden die entnommenen Borkenteile, die auch Xylem umfassen können, für die Eluierung weiter auf ca. 1 cm² mit einer sterilen Rasierklinge verkleinert. Für den Isolierungsprozess wurden nur deutlich verfärbte Borken- bzw. Xylemteile verwendet.

Die Eluierung der Bakterien erfolgte in 5 ml sterilem Wasser. Die ausgewählten Teile wurden 5 min mit Hilfe eines Vortexers (IKA Works) geschüttelt. Die Auswaschungslösung wurde in vier Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100 und 1:1000) und jeweils in drei Wiederholungen auf die Nährmedien ausgestrichen. Es wurden jeweils 50 µl auf die Medien aufgebracht und mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert.

Tabelle 4: Nährmedien für die Kultivierung, Stammsammlung und Wachstumsversuche. Zusammensetzung und Verwendungsbereich. Die Nährmedien werden in 750 ml bidest Wasser 20 Minuten bei 121 °C autolaviert. Für Flüssigmedien wird kein Agar zugesetzt.

Agartyp	Zusammensetzung	Hersteller	Verwendung
HA (Hefeextrakt-Agar)	CaCl ₂ 10 mM	Merck KGaA	Pilzkultivierung, Rein-, Dual- und Multiplexkulturen, Abbauprobieren
	0,4 % C ₆ H ₁₂ O ₆	Carl Roth GmbH+Co. KG	
	0,4 % Hefeextrakt	Carl Roth GmbH+Co. KG	
	1 % Malzextrakt	Merck KGaA	
	2 % Agar	Oxoid Deutschland GmbH	
KB (King B) KING et al. (1954)	0,15 % K ₂ HPO ₄	Merck KGaA	Bakterienisolierung
	0,15 % MgSO ₄ ·H ₂ O	Merck KGaA	
	1 % Glycerol	Carl Roth GmbH+Co. KG	
	1,5 % Agar	Oxoid Deutschland GmbH	
	2 % Proteosepepton	Carl Roth GmbH+Co. KG	
P (Pepton) BRAUN-KIEWNICK und SANDS (2001)	0,5 % Pepton	Carl Roth GmbH+Co. KG	Bakterienisolierung
	0,3 % Fleischextrakt	Carl Roth GmbH+Co. KG	
	0,05 % Hefeextrakt	Carl Roth GmbH+Co. KG	
	1,5 % Agar	Oxoid Deutschland GmbH	

3.3.2.1 Kulturbedingungen

Das von KING et al. (1954) für die Demonstration von Pyocyanin und Fluoreszin vorgestellte KB-Medium, welches sich besonders für die Kultivierung von fluoreszierenden Bakterien eignet, das Pepton-Medium (P-Medium) und Hefeextrakt-Agar (HA-Medium) wurden zur Inkubation der Bakterienlösungen verwendet (s. Tabelle 4). Mit der Verwendung dieser Medien sollte die Isolierung von Psa sichergestellt werden. Die Petrischalen mit den Nährmedien wurden bei Raumtemperatur bis zum Wachstum einzelner Bakterienkolonien inkubiert. Die Verwendung von ultraviolettem Licht (366 nm) ermöglichte die Selektion fluoreszierender Bakterien und somit die Auswahl des gesuchten Bakteriums Psa.

Einzelne fluoreszierende Kolonien wurden auf HA-Medium in Reinkultur gebracht und weiter bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Kolonien wurden dann unter Anwendung einer taxonspezifischen PCR identifiziert (s. Abschnitt 3.2.2). Die taxonspezifische PCR ermöglichte die Identifizierung des Psa ohne anschließenden Sequenzabgleich.

Zur Gewinnung einer Psa-Reinkultur wurden alle Versuche bei Raumtemperatur und 70 ± 5 % Luftfeuchte durchgeführt.

3.3.2.2 Anlegen einer Stammkultur

Auch bei der Konservierung des Bakteriums wurde als Methode das Ausstreichen von Kulturen auf neue Agarplatten nach spätestens vier Wochen gewählt. Nach Etablierung des Bakteriums wurde vor Anlage neuer Kolonien stichprobenartig eine Identifizierung der Kulturen über das Gyrase-B-Gen durchgeführt (s. Abschnitt 3.2.2 und SCHMIDT et al. 2009).

Die Konservierung der Psa-Kulturen erfolgte parallel auch in flüssigem Medium. Es sollte geprüft werden, welche Konservierungsbedingungen sich für die Stammkulturerhaltung eignen.

Dafür wurde das Medium ohne Agar angesetzt und anschließend autoklaviert (s.o.). Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Kolonien vom Agar „gepickt“ und in 1 ml Flüssigmedium (KB-, P- und HA-Medium) suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in einem klimatisierten (ca. 37 °C) Schüttler bei 100 min^{-1} 24 h inkubiert. Darauf wurden 300 µl Flüssigkultur in 700 µl steriles Glycerin (30 %) gegeben.

Die Suspensionen wurden bei -20 °C und 4 °C gelagert und zehn Tage später ausgestrichen. Dabei wurde jedes Medium für jede Art in drei Wiederholungen verwendet und jeweils 50 µl auf festes Medium ausplattiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Nährmedien wurde ebenfalls eine Kontrolle, die aus reinem Flüssigmedium und Glycerin besteht (ohne Zugabe einer Bakterienkultur) ausplattiert.

3.4 Dual- und Multiplexkulturen

Da es sich bei dem untersuchten Schadbild um einen Komplexschaden handelt, liegt es nahe, dass die beteiligten Organismen sich entweder synergistisch oder antagonistisch zueinander verhalten. Zur Beurteilung dieser Verhaltensweisen wurden die Organismen in Dual- und Multiplexkulturen beobachtet (LOHWAG 1966, HENNINGSSON 1967b). Um den gegenseitigen Einfluss der Organismen in Dual- und Multiplexkultur zueinander besser beurteilen zu können, wurden stets zwei verschiedene Ansätze pro Variante parallel beobachtet. Entweder wurden zuerst die Basidiomyceten aufgebracht und erst nach dreitägiger Etablierungsphase das Bakterium ausgestrichen (Variante A). Oder es wurde erst das Bakterium ausgestrichen, und nach drei Tagen die Basidiomyceten aufgebracht (Variante B). Jede Variante wurde in drei Wiederholungen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (BD 53, Binder GmbH) bei 26 °C im Dunklen.

3.4.1 Dualkulturen

Die Dualkulturen umfassten zwei artverschiedene Organismen, also zwei Basidiomyceten aus Reinkultur oder einen Basidiomyceten und Psa. Die Pilze wurden in Form von Inokuli mit 0,5 cm Durchmesser und Psa in Form eines Striches mittels Impföse (0,3 cm Breite) aufgebracht. Die Organismen wurden im Abstand von 4 cm zueinander auf HA-Medium in einer Petrischale von 9 cm Durchmesser inkubiert (s. Abbildung 8). Bei den Dualkulturen, die mit Psa angelegt wurden, wurde dem Organismus, der zuerst aufgetragen wurde, eine Vorinkubationszeit von drei Tagen gewährleistet. Der zuerst aufgetragene Organismus konnte sich so etablieren. Die Messung des Mycelwachstums erfolgte ab dem Tag, an dem Psa aufgebracht wurde. Bei den Dualkulturen der Basidiomyceten wurden die Inokuli zeitgleich aufgebracht und die erste Messung des Wachstums erfolgte nach 24 h.

3.4.2 Multiplexkulturen

Die Multiplexkulturen umfassten zwei artverschiedene Basidiomyceten und Psa. Die Organismen wurden im Abstand von 4 cm getrennt als Inokuli (Pilze, 0,5 cm Durchmesser) oder als Strich 2 cm entfernt von diesen (Psa, 0,3 cm Breite) auf HA-Medium aufgebracht (s. Abbildung 8).

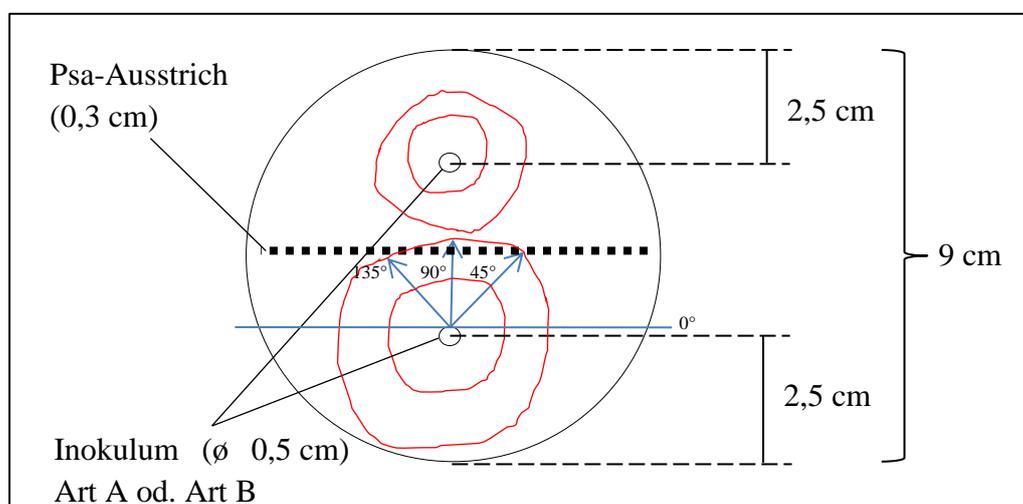


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Dual- und Multiplexkultur, wobei zwei Inokuli derselben Art (Dualkultur) mit Psa (gestrichelte Linie) oder zwei verschiedene Arten zusammen mit Psa (Multiplexkultur) aufgebracht wurden.

3.4.3 Wachstumsdokumentation der Dual- und Multiplexkulturen

Der äußere Wachstumsrand des Mycels wurde täglich dokumentiert, indem der Mycelrand auf der Unterseite der Petrischale eingekreist und anschließend fotografiert und digital mit Image J (AMBRAMOFF et al. 2004) gemessen wurde.

Die Messungen der Ausbreitung des Mycels erfolgte in drei Richtungen in einem Winkel von 45° zueinander (s. Abbildung 8). Die Werte wurden nachfolgend gemittelt. Um die Messwinkel bestimmen zu können, wurde ein Koordinatensystem über die Petrischale gelegt (s. auch Abschnitt 3.3.1.2). Die Nulllinie tangiert dabei das Inokulum. Die Messung erfolgte in Richtung des jeweils anderen Inokulums (90°) und jeweils 45° davon rechts und links abweichend (45° bzw. 135°). Zur Messung des Mycelwachstums der zweiten Art wurde das Koordinatensystem gespiegelt und die Messungen erfolgten entsprechend in Richtung der ersten Art. Dies sollte die Abweichungen von dem Wachstum in Reinkultur, das unter gleichen Bedingungen stattgefunden hat und ebenfalls in drei Richtungen gemessen wurde, möglich machen.

3.5 Abbaueversuche

Die Abbaueversuche dienen der Aufklärung der Abbauraten des Rosskastanienholzes durch die am Komplexschaden beteiligten Basidiomyceten und wurden nach DIN EN 113/A1:2004-04 durchgeführt. Der Masseverlust⁴ (angegeben in Prozent) kann durch im Anschluss stattfindende Biege- und Bruchfestigkeitsmessungen Aufschluss über die Bruchsicherheit betroffener Bäume geben. Um den Verlauf der Masseabnahme durch Abbau des Holzes darzustellen, wurden die Proben in Abständen von vier Wochen geprüft. Da der untersuchte Schaden durch Beteiligung mehrerer Basidiomyceten zustande kommt, wurden die Abbaueversuche sowohl mit Rein- als auch mit Dualkulturen durchgeführt. Die Auswertung des Abbaueversuchs erfolgte in Anlehnung an die DIN EN 350:2016-12, die zur Beurteilung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz herangezogen wird.

3.5.1 Vorversuch

In einem Vorversuch, der das Abbauverhalten der kultivierten Basidiomyceten bei Weiß- und Rotblühender Rosskastanie aufklären sollte, wurden jeweils sechs Proben der Rosskastanien sowie Splint- und Kernholz der Kiefer (*Pinus sylvestris*) und Buche (*Fagus sylvatica*) einem achtwöchigen Abbau durch *P. ostreatus* und *F. velutipes* ausgesetzt. Auf Grundlage des Vorversuches sollte geklärt werden, ob es Unterschiede im Abbau bei Rot- und Weißblühender Rosskastanie sowie der anderen Holzarten gibt.

3.5.2 Langzeit-Abbaueversuch

Ein Langzeit-Abbaueversuch sollte durch Festlegung definierter Ausbaueiträume Aufschluss über die Zunahme des Masseverlustes durch Holzabbau geben. Er wurde für neun Ausbaetermine angesetzt. Bereits HARTLEY (1958) erläutert, dass sich der Masseverlust als Vergleichswert zur Beurteilung holzerstörender Pilze eignet.

Hierfür wurden je Ausbauezeitpunkt vier Wiederholungen und vier Kontrollen eingebaut. Die Entnahme der Prüfkörper erfolgte in Abständen von bis zu vier Wochen. Anschließend wurden folgenden Werte ermittelt:

1. Volumina der Prüfkörper vor dem Pilzangriff,
2. Darrdichte (vor Pilzangriff) und Enddarrdichte (nach Pilzangriff),
3. Anfangs- (vor Pilzangriff) und Enddarrgewicht⁴ (nach Pilzangriff),
4. Ausbaufeuchtegewicht und Ausbaufeuchte (nach Pilzangriff) und
5. Masseverlust (nach Pilzangriff).

3.5.3 Probenauswahl und -vorbereitung

3.5.3.1 Holz

Für die Beurteilung des Gefahrenpotentials der Pilze wurden, abhängig von den Ergebnissen aus dem Vorversuch, für die Proben Starkäste der Weiß- und der Rotblühenden Rosskastanie und von Buche verwendet. Je Zeitpunkt wurden vier Wiederholungen und vier Kontrollen, die

⁴ Nach DIN 1305:1988-01 können der Begriff Masse und der Begriff Gewicht als Benennung eines Wäageergebnisses [in g, mg etc.] synonym verwendet werden. Weiterhin erfolgt keine Unterscheidung der Begriffe.

3 Methoden

auf nicht infizierten Nährmedien platziert wurden, ausgebaut. Die Prüfkörper hatten folgende Abmessungen:

$$0,5 \text{ cm axial} * 3 \text{ cm radial} * 3 \text{ cm tangential}$$

In der DIN EN 113/A1:2004-04 wird diese Art von Prüfkörpern für die Überprüfung der Virulenz von Prüfpilzstämmen verwendet. Diese Abmessungen werden auch von BRISCHKE et al. (2012) für Holzabbauversuche an *Quercus robur* und *Fagus sylvatica* durch *Donkioporia expansa*, *Coniphora puteana*, *Trametes versicolor* und Bodenmikroorganismen als geeignet befunden.

Vor dem Versuchseinbau wurden alle Prüfkörper bei 103 °C 18 h gedarrt (Darrofen: Modell 500, Memmert GmbH & Co KG), mit einer Schieblehre (Mitotoyo GmbH) vermessen und gewogen (sartorius excellence, Sartorius AG). Dies diente der Bestimmung der Abmessungen (in mm, zur Bestimmung des Volumens, Formel i.) und des Anfangsdarrgewichtes (in g) zur Berechnung der Darrdichte (in g/cm³, Formel ii.).

$$i. \quad \text{Volumen} = \text{Höhe} * \text{Breite} * \text{Länge} [\text{cm}^3]$$

$$ii. \quad \text{Darrdichte} = \frac{\text{Anfangsdarrgewicht}}{\text{Volumen}} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]$$

Die Prüfkörper wurden vor dem Versuchseinbau im Autoklav (VE-150, Systec GmbH) sterilisiert (121 °C, 20 min).

3.5.3.2 Basidiomyceten

Die Abbauversuche wurden mit den am Schadbild beteiligten Basidiomyceten, die in Reinkultur gebracht werden konnten, durchgeführt (s. Abschnitt 3.3). Sowohl die Rein- als auch die Dualkulturen wurden nach dem in Abbildung 9 dargestellten Schema auf HA-Medium (s. Tabelle 4) inkubiert, bis der Agar komplett mit Mycel überwachsen war. Anschließend folgte der Einbau der Prüfkörper unter sterilen Bedingungen. Die Prüfkörper wurden auf Edelstahlunterlegscheiben platziert, um einen Abstand zwischen Prüfkörper und Mycel zu gewähren.

3.5.4 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden nach folgendem Schema aufgebaut (s. Abbildung 9):

- Für den Abbau durch nur eine Pilzart wurde ein mit Mycel bewachsenes Inokulum in die Mitte einer Petrischale (9 cm Durchmesser) gelegt. Anschließend wurde die Petrischale mit Parafilm (BEMIS) vor dem Austrocknen geschützt.
- Für den Abbau durch zwei artverschiedene Pilze wurde jeweils ein Inokulum einer Art der anderen Art gegenüber (2,5 cm zum Rand, 4 cm Abstand zueinander) platziert. Sobald der Nährboden komplett mit Mycel bewachsen ist, wurden die Prüfkörper auf sterilen Edelstahlringen mit gleichem Abstand zueinander und zu den Inokuli eingebaut. Die Prüfkörper wurden möglichst mittig auf die Berührungslinie der beiden Pilze (unter Berücksichtigung der oben angegebenen Voraussetzungen) gelegt.

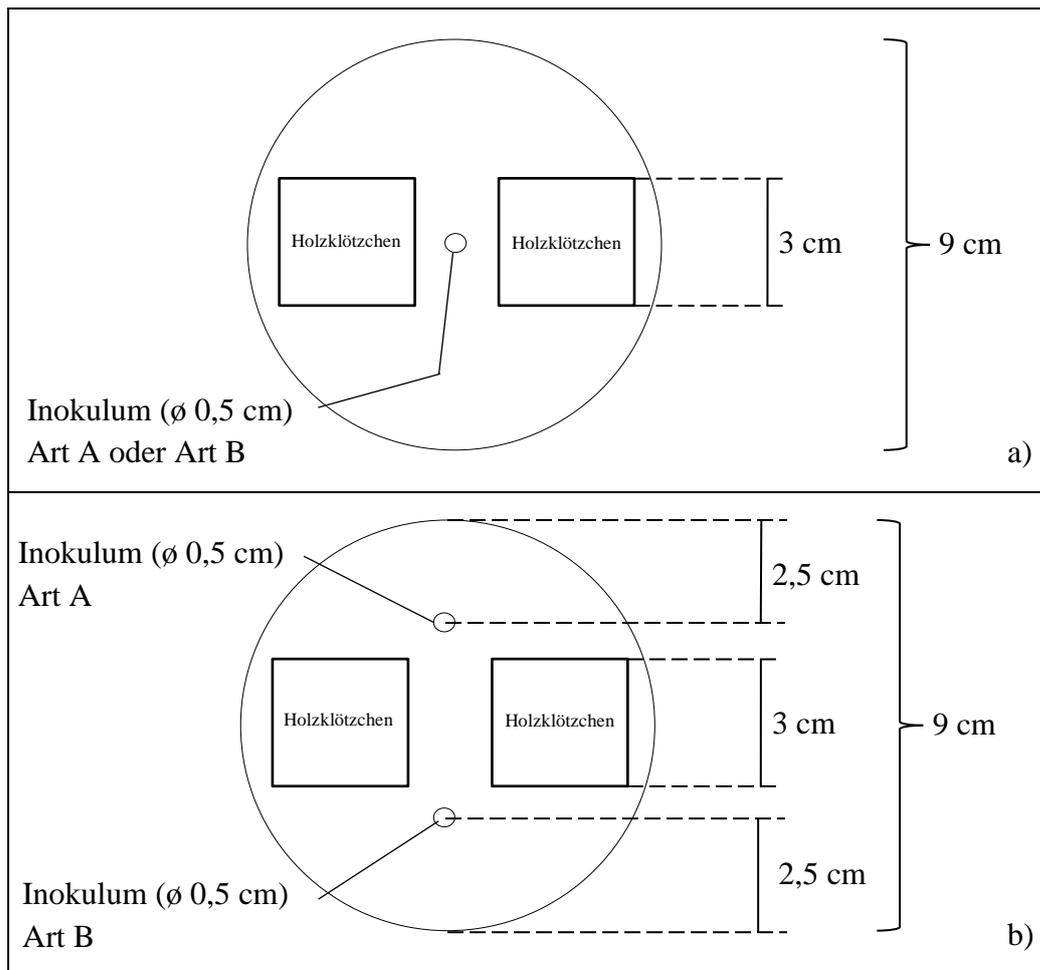


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Abbauversuche. a) Versuchsaufbau für den Abbau durch einen Basidiomyceten. b) Versuchsaufbau für den Abbau durch zwei artverschiedene Basidiomyceten (Art A und Art B).

Die Inkubation erfolgte im Dunklen bei Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $70 \pm 5 \%$.

Nach Versuchsende wurde das Mycel von den Prüfkörpern entfernt und es folgte das Darren der Proben bei 103°C für 18 h (Darrofen: Modell 500, Memmert GmbH & Co KG), die Wägung des Enddarrgewichtes in g und die Ermittlung der Ausbaufeuchte in Prozent (s. Formel iii., Abschnitt 3.5.3.1)

$$\text{iii. } \text{Ausbaufeuchte } u = \left(\frac{100 \cdot \text{Ausbaufeuchtegewicht}}{\text{Enddarrgewicht}} \right) - 100 \text{ [\%]}$$

Für die Berechnung des Masseverlustes nach Pilzangriff wird Formel iv angewandt.

$$\text{iv. } \text{Masseverlust} = 100 - \left(\frac{100 \cdot \text{Enddarrgewicht}}{\text{Anfangsdarrgewicht}} \right) \text{ [\%]}$$

Die Berechnung der Enddarrdichte erfolgte mittels Formel v.

$$\text{v. } \text{Enddarrdichte} = \frac{\text{Enddarrgewicht}}{\text{Volumen}} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]$$

3.6 Festigkeitsversuche

Als Folge der Besiedlung von Holz durch Basidiomyceten verändern sich lokal die physikalischen Eigenschaften der betroffenen Sprossachsenabschnitte und die Bruchsicherheit wird herabgesetzt (GUGLIELMO et al. 2006). Um die physikalischen Eigenschaften des durch *P. ostreatus* und *F. velutipes* abgebauten Rosskastanienholzes zu beurteilen und das von ihnen ausgehende Gefahrenpotential zu bewerten, wurden zwei Versuche durchgeführt:

1. ein 4-Punkt-Biegeversuch (DIN 52186:1978-06)
2. ein Schlagbiegeversuch (DIN 52189-1:1981-12)

Die Prüfung der Biegefestigkeit und Bruchschlagarbeit der abgebauten Proben erfolgte in ca. 28-tägigen Abständen über einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten. Ebenso wurden der Masseverlust und die Enddarrdichte ermittelt (s. Abschnitt 3.5.3.1). Ziel dieses Versuches war es, eine Aussage über das Gefahrenpotential bezogen auf eine Festigkeitsänderung, welche von beiden Pilzen, getrennt voneinander und gemeinsam ausgeht, treffen zu können.

3.6.1 Versuchsaufbau

3.6.1.1 Basidiomyceten

Die Reinkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* dienten als Ausgangskulturen. Die Kultivierung der Basidiomyceten erfolgte auf HA-Medium (s. Tabelle 8) in quadratischen Einwegpetrischalen (12 cm Seitenlänge) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Dualkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* wurden, wie in Abbildung 10 dargestellt, so angelegt, dass die Mycelien in der Mitte der Schale aufeinandertrafen. Aus den Ergebnissen der Dualkulturen (s. Abschnitt 4.2.1 und Tabelle 13) ergab sich ein mittlerer Vorsprung im radialen Wachstum von 0,62 cm/Tag von *F. velutipes* im Vergleich zu *P. ostreatus*. Aus diesem Grund wurden die Mycelinokuli des *P. ostreatus* um ca. 0,62 cm weiter vom Rand der Schale entfernt platziert. Die Inokuli bestanden aus 0,5 cm breiten Agarstreifen, die auf der Oberseite mit Mycel bewachsen waren. Sobald das Mycel den Agar vollständig bewachsen hatte, wurden die Prüfkörper eingesetzt.

3.6.1.2 Probenkörper und Versuchsanordnung

Das Holz für die Prüfkörper wurde aus einer *A. hippocastanum* (s. Tabelle 1) gewonnen. Der Sprossachse wurden fünf 20 cm hohe Querschnitte entnommen, der Splint jeweils in zwölf 7 cm * 7 cm große Blocks geteilt. Diese Blocks wurden bei Raumtemperatur 6 Monate getrocknet und anschließend auf die Prüfkörpergröße geschnitten.

Die Dimensionen der Prüfkörper hatten gemäß DIN EN ISO 178:2013-09 folgende Abmessungen:

8 cm axial * 1 cm radial * 0,5 cm tangential

Vor Versuchsbeginn wurden die Prüfkörper bei 103 °C 18 h gedarrt, vermessen und gewogen. Dies diente der Bestimmung der darrgetrockneten Holzdimensionen (in mm, zur Bestimmung des Volumens, Formel i., s. Abschnitt 3.5.3.1) und des Anfangsdarrgewichtes (in g) zur Berechnung der Darrdichte (in g/cm³, Formel ii., s. Abschnitt 3.5.4). Die Sterilisation erfolgte bei 120 °C für 30 min (Autoklav: VE-150, Systec GmbH).

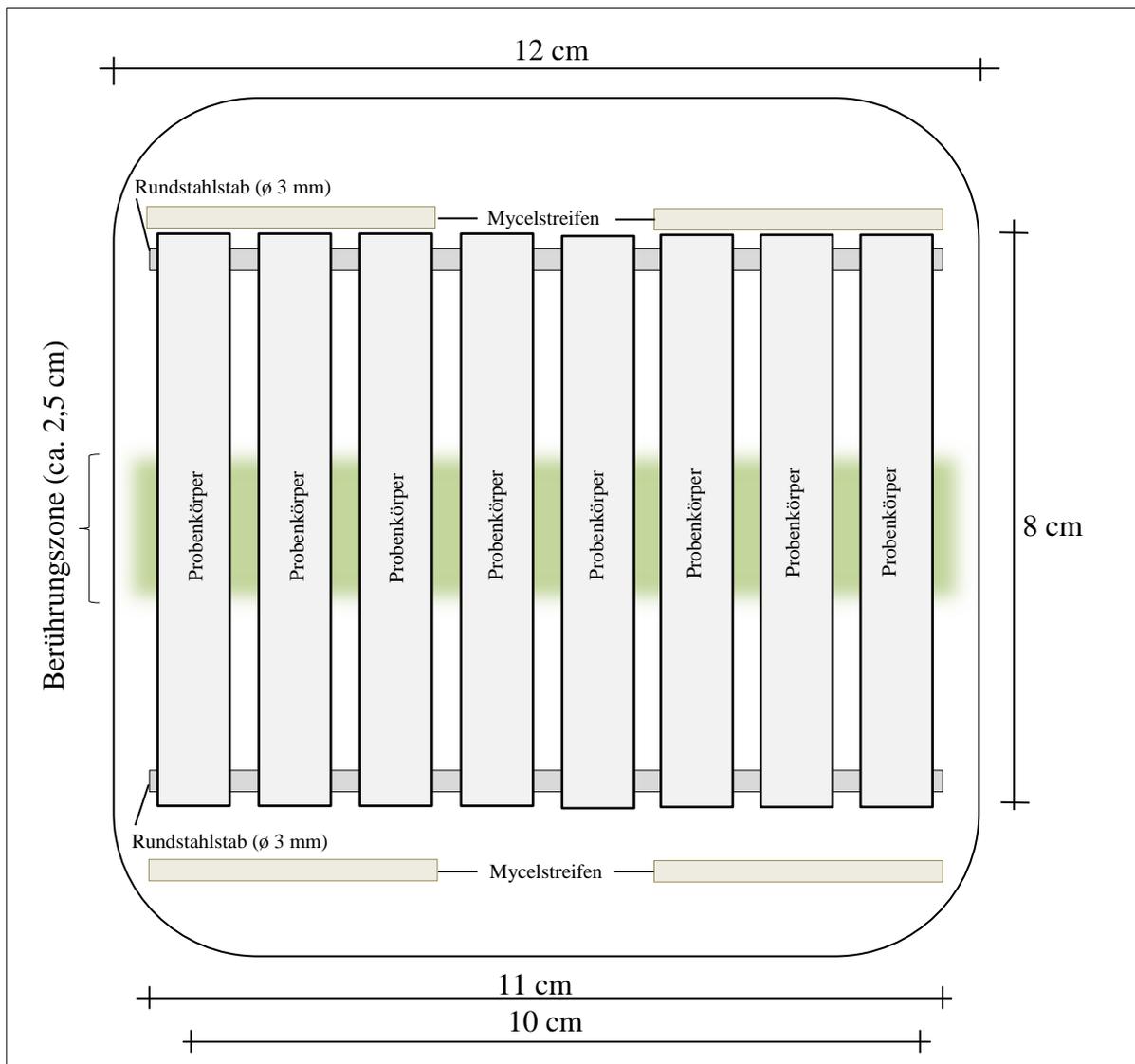


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Inkubationsanordnung zur Vorbereitung der Biegefestigkeit- und Bruchschlagarbeitsuntersuchungen. In die 12 cm * 12 cm große Petrischale wurden je acht 1 cm breite Prüfkörper so angeordnet, dass ca. 0,4 cm Abstand zwischen ihnen lag. Der Abstand zwischen den Rundstäben, die als Auflager dienten, betrug ca. 7 cm.

Um einen möglichst gleichmäßigen Holzabbau zu gewährleisten, wurden die Prüfkörper nicht direkt auf das Mycel gelegt (LIESE und AMMER 1964). Durch 3 mm Stahl-Rundstäbe wurde ein Abstand zu dem Mycel hergestellt und so der Kontakt zum Nährsubstrat verhindert, der laut LIESE und AMMER (1964) eine Steigerung der Abbaurate hervorrufen kann und ein gleichmäßigeres Durchwachsen des Holzes durch die Mycelien ermöglicht. Die Stahlstäbe wurden in einem Abstand von 7 cm zueinander und einem Abstand von 2,5 cm vom Rand der Schale in den Petrischalen platziert. Es wurden parallel acht Prüfkörper pro Schale eingebaut. Die Prüfkörper lagen in einem Abstand von ca. 0,4 cm zueinander und zum Schalenrand (s. Abbildung 10). Um einem Austrocknen des Agars vorzubeugen, wurden nach dem vollständigen Bewachsen der Prüfkörperoberfläche mit Mycel die Schalen mit Parafilm (BEMIS) verschlossen und anschließend in einer Klimakammer bei einer relativen Luftfeuchte von $70 \pm 5 \%$ und einer Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubiert.

Es wurden je 24 Proben pro Pilzart (*P. ostreatus* oder *F. velutipes*) und -Kombination *P. ostreatus* + *F. velutipes*) nebst jeweils 24 Kontrollen für die Festigkeitsprüfung und

Abbauzeitraum in den Versuch einbezogen. Nach Entfernen des anhaftenden Mycels wurde die Probe gewogen. Es folgte ein erneutes Darren bei 103°C für 18 h und ein Wiegen zur Bestimmung des Enddarrgewichtes (LIESE und PECHMANN 1959, KIRK und SCHULTZ-DEWITZ 1968). Das Enddarrgewicht wurde zur Berechnung des Masseverlustes herangezogen. Die Prüfkörper wurden vor der Ermittlung der Festigkeit bei 65 % rel. Luftfeuchte und 20°C bis zur Gewichtskonstanz klimatisiert und erneut gewogen, um die Prüffeuchte ermitteln zu können (HENNINGSON 1967a). Insgesamt umfasste die Prüfung des Festigkeitsverlustes 1152 Proben.

3.6.2 4-Punkt-Biegefestigkeit und Biege-Elastizitätsmodul nach DIN 52186:1978-06

Zweck der DIN 52186:1978-06 ist die „Bestimmung des Biege-Elastizitätsmoduls und der Biegefestigkeit von Holz an kleinen, fehlerfreien Proben [...]“. Gleichzeitig werden durch sie die Begriffe der Biegespannung, der Durchbiegung, des Biege-Elastizitätsmoduls und der Biegefestigkeit definiert. Der Biege-Elastizitätsmodul (E_B) bezeichnet die „Kenngröße für die Verformungssteifigkeit der Probe im elastischen Bereich“. Die elastische Durchbiegung wird zur Berechnung des Biege-Elastizitätsmoduls herangezogen. Als Biegefestigkeit (β_B) wird die „bis zum Bruch der Probe auftretende größte rechnerische Biegespannung“ verstanden. Alle Prüfstäbe wurden mit der Zwick Universalprüfmaschine⁵ (Zwick Roell GmbH & Co. KG) geprüft, an der ein Wegaufnehmer⁶ zur Ermittlung der Durchbiegung in der Mitte des Prüfkörpers gekoppelt war. Der Wegaufnehmer wurde unter dem Prüfkörper montiert.

Bei einem 3-Punkt-Biegeversuch erfolgt die maximale Krafteinwirkung in der Mitte der Prüfkörper. Die Mitte des Prüfkörpers ist aber nicht zwangsläufig der Bereich des größten vermuteten Holzabbaus, weswegen die Ermittlung der Biegefestigkeit des abgebauten *Aesculus*-Holzes in Anlehnung an die Norm 52 186 mit Kraftangriff an zwei Punkten durchgeführt wird (4-Punkt-Biegeversuch, WINANDY und MORRELL 1993; VAN ACKER et al. 1999, s. Abbildung 11). Um einen Bruch der Probe im tatsächlich am stärksten abgebauten Bereich des Prüfkörpers herbeizuführen (CURLING et al. 2002a, RÅBERG et al. 2005), wird die Berührungs-Zone der Mycelien mittig unter der Probe angelegt (s. Abbildung 10). Zwischen den Druckstempelauflagern liegen 2,5 cm, in denen der höchste Holzabbau vermutet werden kann. Im Folgenden werden die Abweichungen von der Norm erläutert.

Für eine möglichst kurze Versuchsdauer sind die Prüfkörperabmessungen (s. Abschnitt 3.6.1.2), anders als in der Norm, im Querschnitt nicht quadratisch und wesentlich kleiner (8 cm axial * 1 cm radial * 0,5 cm tangential). Für eine Abkürzung der Versuchsdauer zur Prüfung von Holzschutzmitteln hat TRENDELENBURG (1940) die Verwendung von kleineren Prüfkörpern als in der Norm vorgeschrieben, vorgeschlagen. Dadurch sollte der Effekt des Holzabbaus schneller eintreffen und bewertbar werden.

⁵ Zwick Roell, Universal Prüfmaschine Typ BT-FR050TWE.A1K

⁶ Zwick Roell, Wegaufnehmer Typ BTC-EXMACRO.011

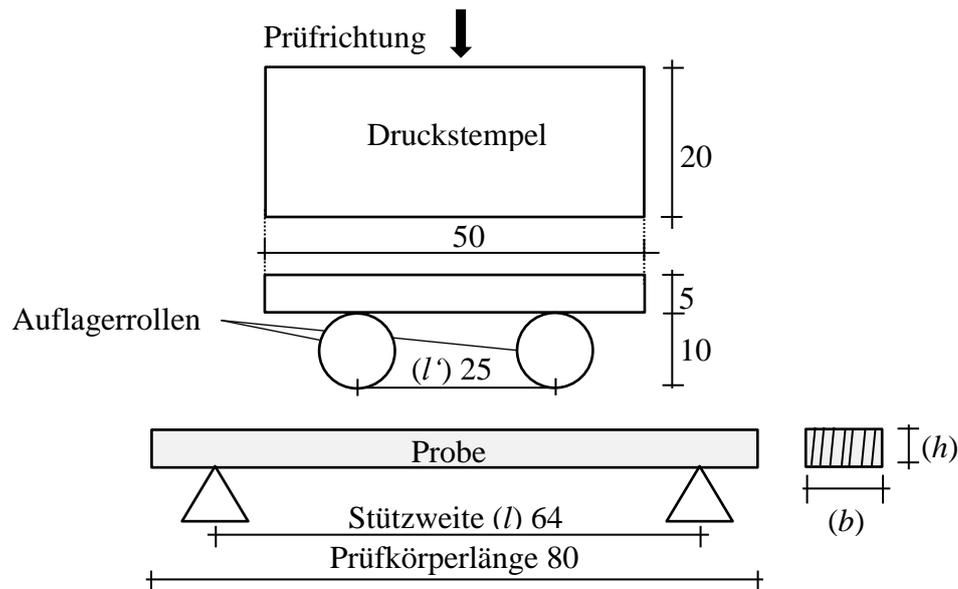


Abbildung 11: Vorderansicht der Prüfeinrichtung für den 4-Punkt-Biegeversuch. Zahlenangaben in mm.

1966 wählte SCHULTZE-DEWITZ für die Ermittlung eines Dyn-Stat-Quotienten die Abmessungen 12 cm axial * 1 cm radial * 1 cm tangential, um daraus die Festigkeitsminderung bei *Pinus* durch Braunftäule zu ermitteln.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, wurde die Stützweite mit 6,4 cm gewählt. Die Entfernung der Rollen lag bei 2,5 cm. Der Durchmesser der Rollen betrug 1 cm. Die Holzfeuchte während der Prüfung wurde vor der Prüfung ermittelt (s. dazu Formel iii., Abschnitt 3.5.4). Die Prüfgeschwindigkeit betrug für die Kontrollen 3 mm/min. Die Belastung der Prüfkörper bis zum Bruch erfolgte über eine Zeit von $60 \text{ s} \pm 30 \text{ s}$.

3.6.2.1 Auswertung 4-Punkt-Biegeversuch

Zur Berechnung der Biegefestigkeit wird „die bis zum Bruch der Probe auftretende größte rechnerische Biegespannung“ (DIN 52186:1987-06) herangezogen (s. Formel vii.). Laut Norm wird zur Berechnung der Biegefestigkeit für F die Höchstkraft F_{\max} in die Formel vi. eingesetzt, sodass sich daraus Formel vii ergibt.

$$\text{vi.} \quad \text{Biegespannung } (\sigma_B) = \frac{3 \cdot F \cdot (l - l')}{2 \cdot b \cdot h^2} = \frac{3 \cdot F \cdot (64 - 25) \text{ mm}}{2 \cdot b \cdot h^2} \quad [\text{N/mm}^2]$$

$$\text{vii.} \quad \text{Biegefestigkeit } (\beta_B) = \frac{3 \cdot F_{\max} \cdot (l - l')}{2 \cdot b \cdot h^2} = \frac{3 \cdot F_{\max} \cdot (64 - 25) \text{ mm}}{2 \cdot b \cdot h^2} \quad [\text{N/mm}^2]$$

Wobei:

F bzw. F_{\max} = Kraft bzw. Maximalkraft, die zum Bruch des Prüfkörpers führt [N];

l = Stützweite [mm]; l' = Entfernung Druckpunkte [mm]; b = Breite des Prüfkörpers [mm];

h = Höhe des Prüfkörpers [mm]

Die Berechnung des Biegeelastizitätsmoduls (E_β , Biege-E-Modul) erfolgt nach Formel viii.

$$\text{viii. Biege-E-Modul } (E_\beta) = \frac{(2 \cdot l^3 - 3 \cdot l \cdot l'^2 + l'^3)}{8 \cdot b \cdot h^3} \cdot \frac{\Delta F}{\Delta f} = \frac{(2 \cdot 64^3 - 3 \cdot 64 \cdot 25^2 + 25^3) \text{ mm}^3}{8 \cdot b \cdot h^3} \cdot \frac{\Delta F}{\Delta f} \text{ [N/mm}^2\text{]}$$

Wobei:

l =Stützweite [mm]; l' =Entfernung Druckpunkte [mm]; b =Breite des Prüfkörpers [mm]; h =Höhe des Prüfkörpers [mm]; ΔF =beliebige Kraftdifferenz in N im elastischen Verformungsbereich der Probe; Δf =der Kraftdifferenz ΔF entsprechende Durchbiegung in der Probenmitte [mm]

Die Ermittlung der Enddarrdichte und des Masseverlustes erfolgte nach Formel iv. und v. (s. Abschnitt 3.5.4).

Um einen Vergleich der unterschiedlichen Inkubationsvarianten über den gesamten Versuchszeitraum zu ermöglichen, wurden die Ausbauzeitpunkte mit Hilfe der Kontrollgruppen normiert. Anschließend wurde die prozentuale Abnahme der Biegefestigkeit und des Biege-E-Moduls berechnet und verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit „R“ (WICKHAM (2016), DOWLE und SRINIVASAN (2018), HENRY und WICKHAM (2018), R CORE TEAM (2018), WICKHAM et al. (2018a), WICKHAM et al. (2018b), HENRY und WICKHAM (2019)).

Der Variationskoeffizient wurde wie folgt bestimmt (Formel ix.):

$$\text{ix. VarK} = \frac{\text{Standardabweichung } (sd)}{\text{Erwartungswert } (x)} \cdot 100 \text{ [\%]}$$

3.6.3 Schlagbiegeversuch nach DIN 52189-1:1981-12

Durch DIN 52189-1:1981-12 wurde die Bruchschlagarbeit bestimmt. Dabei gilt die Bruchschlagarbeit „als eine Kenngröße für das Verhalten des Holzes bei schlagartiger Beanspruchung“. Die Bruchschlagarbeit (ω) wird als Arbeit (W) bezogen auf den Querschnitt (A) definiert, „die zum Durchschlagen eines Probestabes erforderlich ist“.

Der Kraftangriff erfolgte in der Mitte der Widerlager mittels eines 5-Joule-Pendelhammers mit dem Pendelschlagwerk HIT5.5P (Zwick Roell GmbH & Co. KG). Die Prüfkörper wurden in der Prüfeinrichtung so platziert, dass die Belastung durch den Pendelhammer senkrecht zu den Jahrringen und in der Mitte erfolgte (s. Abbildung 12).

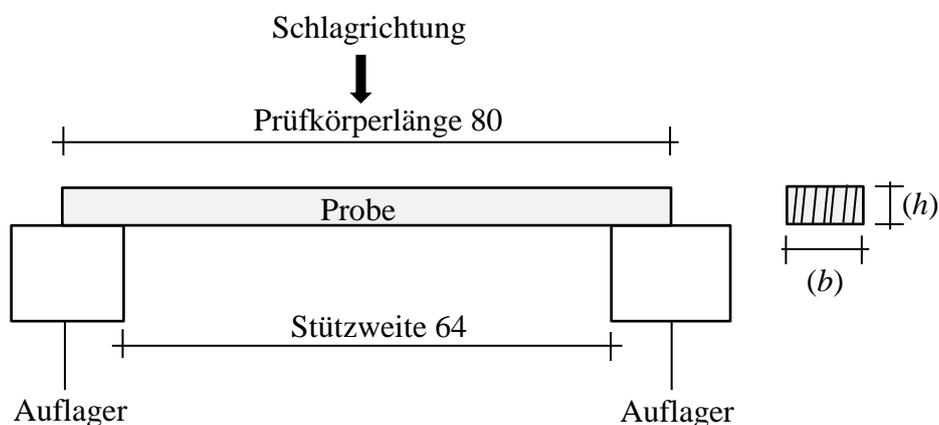


Abbildung 12: Schema der Prüfeinrichtung der Schlagbiegeprüfung (Blick von oben). Zahlenangaben in mm. Die Schlagbiegebelastung erfolgt horizontal.

Die Anwendung des Schlagbiegeversuchs zur Beurteilung der Wirksamkeit von Holzschutzmitteln zur Abkürzung der Versuchsdauer laut Norm, wie TRENDELENBURG (1940) sie vorschlug, wird von VON PECHMANN und SCHAILE (1950) aufgegriffen und als geeignet eingeordnet.

Die Holzfeuchte wurde vor der Prüfung bestimmt.

3.6.3.1 Auswertung Schlagbiegeversuch

Die Bruchschlagarbeit (ω) berechnet sich nach Formel x. und wird hier in kJ/m² angegeben.

$$x. \quad \text{Bruchschlagarbeit } (\omega) = \frac{1000 \times W}{A} \text{ [kJ/m}^2\text{]}$$

Wobei:

A =Querschnittsfläche der Probe [mm²]; W =Arbeit, die zum Durchschlagen der Probe erforderlich ist“ [J]

Die statistische Auswertung des Schlagbiegeversuches erfolgte ebenfalls mit „R“ (WICKHAM (2016), DOWLE und SRINIVASAN (2018), HENRY und WICKHAM (2018), R CORE TEAM (2018), WICKHAM et al. (2018a), WICKHAM et al. (2018b), HENRY und WICKHAM (2019)). Um einen Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsvarianten über den gesamten Versuchszeitraum zu ermöglichen, wurden die Ausbauzeitpunkte mit Hilfe der Kontrollgruppen normiert. Anschließend konnte die prozentuale Abnahme der Bruchschlagarbeit berechnet und verglichen werden.

Der Variationskoeffizient berechnete sich nach Formel ix. (s. Abschnitt 3.6.2.1).

3.7 Inokulationsversuch

Die Ausbreitung von holzerstörenden Pilzen in Bäumen ist von vielen Faktoren abhängig. Zunächst ist das Gefahrenpotential des Pilzes entscheidend. Die Abschottungseffektivität des angegriffenen Baumes und somit auch dessen Vitalität sind ebenfalls von großer Bedeutung. Im Falle der Rosskastanien-Komplexkrankheit stellt sich die Frage, wie das Gefahrenpotential von *P. ostreatus* und *F. velutipes* einzeln oder als Gemeinschaft zu bewerten ist. Es ist bekannt, dass es sich bei *Aesculus* um eine schwach effektiv abschottende Gattung handelt (DUJESIEFKEN und LIESE 2015). Bei einer allgemein besseren Vitalität eines Baumes kann die Abschottungseffektivität besser sein als bei Bäumen schwacher Vitalität (KEHR 2007).

Zur Aufklärung des Gefahrenpotentials von *P. ostreatus* und *F. velutipes* wurden vier gesunde *A. hippocastanum* mit den Pilzen separat und gemeinsam inokuliert. Über die Messung der Ausbreitung der Verfärbungen, die die Wundreaktion des Baumes widerspiegelt, entlang der Sprossachse in axialer, tangentialer und radialer Richtung wird ein Vergleich möglich (DEFLORIO et al. 2008). Die Verfärbung des Gewebes zeigt zunächst die Reaktion des Baumes auf den Lufteintritt durch die Inokulationswunde an. Die verfärbten Gewebeteile stellen potentielle Lebensräume für holzerstörende Pilze dar (SHORTLE et al. 1995). Da bei der Rosskastanien-Komplexkrankheit auch beide Pilze in direkter Nachbarschaft auftreten und *F. velutipes* bislang keine starke Aggressivität zugesprochen wird (LYR und ZIEGLER 1959), soll ein Vergleich der Ausbreitung Aufschluss über die Gefahrenpotentiale geben.

Auf die Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* wurde aus umwelthygienischen Gründen verzichtet.

3.7.1 Inokulierte *A. hippocastanum*

Im Mai 2015 wurden vier *A. hippocastanum* (K1, K2, K3, K4) mit infizierten Holzdübeln inokuliert (s. Tabelle 5). Die Bäume standen in der Gärtnerei des TI⁷ und waren zum Zeitpunkt der Inokulation ca. 10–15 Jahre alt. Alle Bäume wiesen zum Zeitpunkt der Inokulation eine Vitalität von 1–2 auf. In der Vegetationsphase 2015 waren alle Bäume von der Rosskastanienminiermotte (*Cameraria ohridella*) befallen.

Tabelle 5: Inokulierte *A. hippocastanum* (K1-K4), Höhe [m], Höhe bis Kronenansatz [m], Abstand der Inokulationsebenen und Umfang in Höhe der Inokulationsebenen [cm].

Baumnummer	Höhe [m]	Höhe bis Kronenansatz [m]	Höhe von Stammbasis bis E1...Abstand der Inokulationsebenen [cm]	Umfang der Ebene [cm]	
K1	4	1,5	50(E1)...75(E2)	E1	31,5
				E2	23,5
K2	7	1,8	6 (E1)...90(E2)	E1	42
				E2	37
K3	5	1,85	60(E1)...90(E2)	E1	34,5
				E2	28
K4	5	1,90	59(1)...30(E2)...31(E3)...36(E4)	E1	25
				E2	23
				E3	20
				E4	18

⁷ Gärtnerei Thünen Institut für Holzforschung, Leuschnerstraße 91, 21031 Hamburg

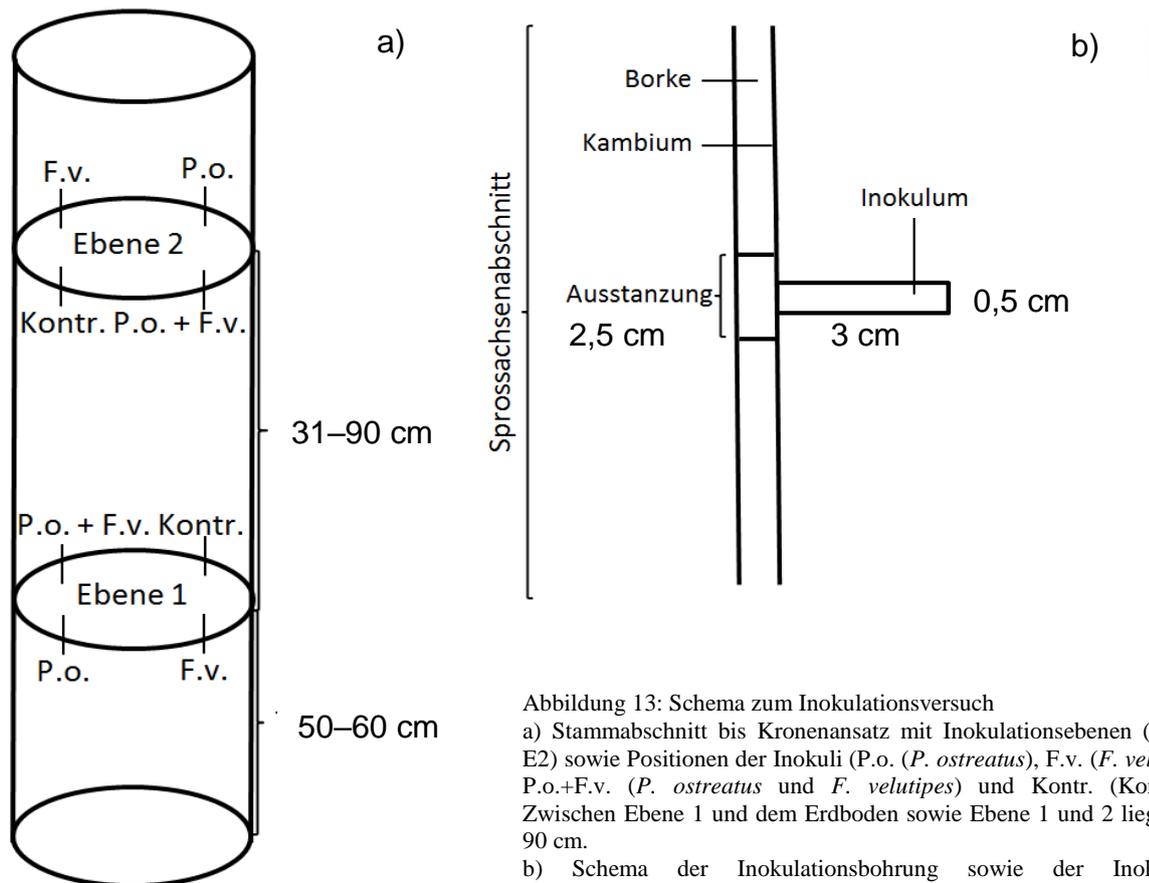


Abbildung 13: Schema zum Inokulationsversuch

a) Stammabschnitt bis Kronenansatz mit Inokulationsebenen (E1 und E2) sowie Positionen der Inokuli (P.o. (*P. ostreatus*), F.v. (*F. velutipes*), P.o.+F.v. (*P. ostreatus* und *F. velutipes*) und Kontr. (Kontrolle)). Zwischen Ebene 1 und dem Erdboden sowie Ebene 1 und 2 liegen 75–90 cm.

b) Schema der Inokulationsbohrung sowie der Inokulation (Seitenansicht).

Vor der Inokulation erfolgte eine Aufastung der Bäume auf Kronenansatz. Kastanie K1 war 4 m hoch und hatte eine Stammhöhe bis Kronenansatz von 1,5 m. Die Inokulationsebene E1 lag 50 cm über der Stammbasis die zweite Ebene 75 cm darüber. K2 hatte eine Höhe von 7 m und eine Höhe des Kronenansatzes von 1,8 m. Die Ebene 1 lag 60 cm über der Stammbasis, die zweite Ebene 90 cm darüber. K3 und K4 waren beide 5 m hoch und hatten nach Aufastung Kronenansätze von 1,85 m und 1,9 m. In K3 lag die erste Inokulationsebene 60 cm über der Stammbasis, die zweite Ebene 90 cm darüber. In den Bäumen K1 bis K4 wurde in jeder Ebene jeweils *P. ostreatus*, *F. velutipes* und beide Pilze gemeinsam sowie ein Kontrolldübel inokuliert. In K4 wurde in vier Ebene inokuliert. 59 cm über der Stammbasis wurde der Kontrolldübel, 30 cm darüber *P. ostreatus*, 31 cm darüber *F. velutipes* und 36 cm darüber beide Pilze gemeinsam inokuliert.

3.7.2 Versuchsaufbau

3.7.2.1 Inokulationsdübel und Basidiomyceten

Zur Herstellung der Inokulationsdübel wurden insgesamt 2,6 m Bohrkern mit einem Durchmesser von 0,5 cm aus einer gesunden *A. hippocastanum* gewonnen. Diese wurden in 3 cm lange Dübel geteilt. Vor der Infektion mit den Basidiomyceten *P. ostreatus* und *F. velutipes* wurden die Dübel durch autoklavieren (20 min, 121 °C) sterilisiert. Es wurden je drei Dübel in eine mit Mycel (Nährmedium: HA, s. Tabelle 4) bewachsene Petrischale 30 Tage inkubiert. Die Platzierung der Dübel in den Dualkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* erfolgte mittig auf die Berührungszone der Mycelien.

3.7.2.2 Inokulation

Die infizierten Inokulationsdübel wurden in 0,5 cm dicke Löcher (Tiefe 3 cm) in den Holzkörper der Bäume eingebracht. Vorher wurde die Borke durch Ausstanzen mit einem sterilen Locheisen (Durchmesser 2,5 cm) entfernt (s. Abbildung 13). Die ausgestanzte Borke wurde nach Einbringen der Inokulationsdübel wieder eingesetzt. Um ein Herausfallen der Borkenteile zu verhindern, wurde die Inokulationswunde mit Parafilm umwickelt. Insgesamt wurden je sieben Inokuli pro Variante in vier Bäume in je zwei Ebenen (bzw. einmal (K4) in vier Ebenen) inokuliert.

3.7.3 Messung der Verfärbungen durch Inokulation

Nach der Fällung der Probenbäume nach 789 Tagen (K4), 790 Tagen (K1 und K3) und 791 Tagen (K2) wurden die Stammabschnitte in den Inokulationsebenen mit einer Bandsäge aufgetrennt. So wurden die anatomischen Richtungen (axial, tangential und radial) der Sprossachse sichtbar. Die Verfärbungen, die durch die Inokulation der pilzbeimpften Dübel in den Wunden entstanden, wurden digital mit der Software ImageJ (AMBRAMOFF et al. 2004) gemessen und anschließend bewertet.

Jede Verfärbung (Ausbildung des Reaktionsgewebes) in den Inokulationsebenen (Ebene E1 und Ebene E2) wurde wie folgt an den Schnittflächen gemessen (s. Abbildung 14):

- oben und unten jeweils die Fläche im Querschnitt [cm²] und axial [cm²], die Längen der Ausbreitung axial, radial und tangential [cm]

Die Auftrennung direkt mittig in den Inokulationswunden hatte zur Folge, dass je Schnitt zwei Seiten gemessen wurden. D. h. es gab eine obere und eine untere Hälfte im Querschnitt und eine linke bzw. rechte Seite in axialer Schnittrichtung. Um alle Flächen bzw. Längen zu berücksichtigen, wurden diese addiert und anschließend durch zwei dividiert. Der erhaltene Wert war derjenige, der bewertet wurde.



Abbildung 14: Beispiel für axiale (gelber Pfeil (a)), tangentiale (roter Pfeil) und radiale (grüner Pfeil) (b), Verfärbungen in Baum K2. Flächenverfärbungen axial (a) und im Querschnitt blau (b) umrahmt.

4 Ergebnisse

4.1 Molekularbiologische Identifizierung der Schadorganismen

4.1.1 Entwicklung der Taxonprimer und der Multiplex-PCR

Die für die Multiplex-PCR notwendigen Taxonprimer konnten mit Hilfe des Programms Primer3 für die Zielorganismen *P. ostreatus*, *F. velutipes*, *B. adusta* und *C. purpureum* entwickelt werden (s. Tabelle 6). Um sicher zu gehen, dass durch die Taxonprimer nur die Zielorganismen amplifiziert werden, wurden diese bei NCBI mit dem blastn-Programm vor der Entwicklung der Multiplex-PCR auf ihre Spezifität geprüft (Aufruf der Datenbank 2014 und 2015). Zusätzlich wurden die Primer mit Proben auf ihre Spezifität überprüft, bei denen durch MÜLLER-NAVARRA et al. (2012) die Zielorganismen durch Klonierung nachgewiesen wurden. Die Primer, die spezifisch für die Gattungen *P. ostreatus* und *F. velutipes* binden, wurden außerdem mit ihren Reinkulturen überprüft. Die Spezifität der Primer wurde ebenfalls durch Kreuztests bestätigt. Durch die nachgewiesene Spezifität entfallen eine der PCR anschließende Sequenzierung und die Artbestimmung durch Sequenzabgleich. Da es weltweit zahlreiche Arten der Gattung *Pleurotus* und *Flammulina* gibt, besteht die Möglichkeit, dass außerhalb der hier untersuchten Komplexkrankheit auch andere Arten dieser Gattungen bei der Verwendung der hier entwickelten Primer amplifiziert werden.

Alle Taxonprimer liegen im DNS-Abschnitt des ITS im Bereich des ITS2 (s. Abbildung 15). In der Multiplex-PCR wurden die Taxonprimer mit dem ITS1.1 Primer kombiniert, um die Zielorganismen durch ihre Bandenlänge unterscheiden zu können. Bei der PCR wurde für *P. ostreatus* ein DNS-Abschnitt mit 564 bp (Primer ITS2.ple), für *F. velutipes* ein Abschnitt mit 684 bp (Primer ITS2 fla), für *C. purpureum* ein Abschnitt mit 492 bp (Primer ITS2.con) und für *B. adusta* ein Abschnitt mit 410 bp (Primer ITS2.bje) amplifiziert. Die Bandenlängen der Zielorganismen unterscheiden sich demnach um bis zu 300 bp (s. Tabelle 6). Abbildung 16 zeigt die Gelbilder zur Überprüfung der Spezifität der Primer und Entwicklung der Positivkontrolle. Die Verwendung der Forward-Taxonprimer in Kombination mit dem ITS4-Primer liefert kürzere DNS-Abschnitte (s. Abbildung 15 und 16), die sich auf Grund ihrer Länge für eine Differenzierung auf einem Gelbild weniger eignen, obwohl auch hier die Spezifität nachgewiesen wurde. Es handelt sich bei diesen um revers-komplementäre Stränge der Reverse-Taxonprimer.



Abbildung 15: Lokalisation der Taxonprimer (¹ITS2.ple, ITS2 fla, ITS2.con, ITS2.bje) für die Multiplex-PCR.

Tabelle 6: Mit Primer3 entwickelte Taxonprimer (Tax_{rev}) für die Multiplex-PCR. Bandenlänge angegeben in Basenpaaren [bp] in Kombination mit dem ITS1.1-Primer.

Art	Sequenz (5'...3')	Bandenlänge [bp]	Primer-Name
<i>P. ostreatus</i>	TGGACTCTATTCATGCGTGTC	564	ITS2.ple
<i>F. velutipes</i>	TCGCGTCACAGGTATCTCTC	684	ITS2 fla
<i>C. purpureum</i>	CCTGCAACTCCCAAAATCCAA	492	ITS2.con
<i>B. adusta</i>	CCAAGCCTCCGACAACAAA	410	ITS2.bje

4 Ergebnisse

Tabelle 7: Zusammensetzung der Multiplex-PCR für eine Reaktion (25µl Volumen). Der KAPA Mix enthält 3 mM MgCl₂.

Komponente	Endkonzentration für 25 µl Reaktionsvolumen	Volumen/Probe [µl]
Wasser, autoklaviert	N/A	8
KAPA Mix	1x	12,5
ITS 1.1	1,25 µM	2
Primer reverse		
ITS2.ple	1,25 µM	0,5
ITS2.flu	1,25 µM	0,5
ITS2.con	2,00 µM	0,5
ITS2.bje	1,25 µM	0,5
Template	0,1–1 ng DNA/µl	0,5

Tabelle 8: Cyclerprogramm für die Multiplex-PCR. Der Zyklus (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird 25 mal wiederholt.

Cyclersschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Heizdeckel	98	-
Pause	95	-
Anfangsdenaturierung	95	180
Denaturierung	95	15
Annealing	57	30
Elongation	72	30
Endelongation	72	60
Pause	4	-

Die Multiplex-PCR wurde mit dem KAPPA2G Fast Multiplex PCR Kit (peqlab) durchgeführt. Entsprechend der Herstelleranweisungen wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Komponenten mit entsprechenden Konzentrationen und dem in Tabelle 8 aufgeführten Cyclerprogramm eingesetzt. Die Funktionalität des PCR Kits wurde mit einem DNS-Mix, der DNS aller gesuchten Basidiomyceten enthält, positiv getestet (s. Abbildung 16).

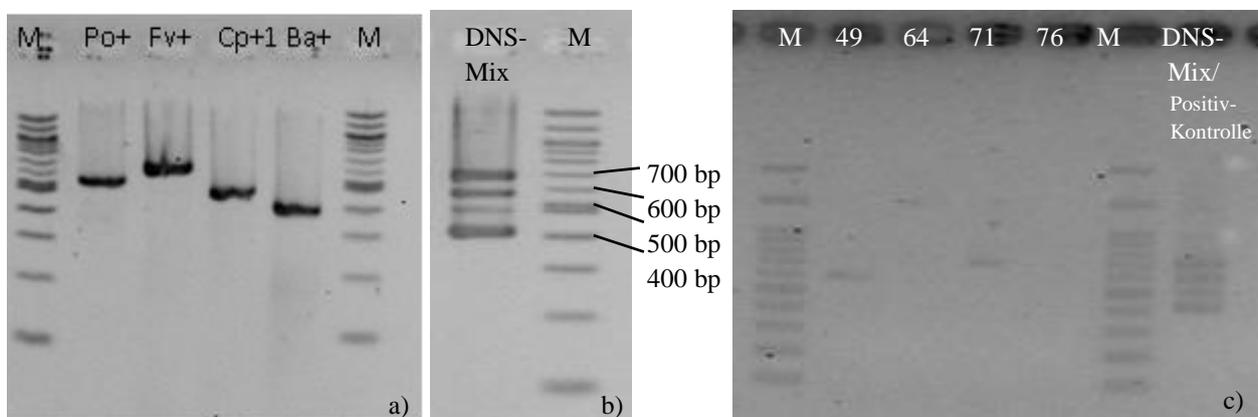


Abbildung 16: Gelbild mit spezifischen Bandenlängen. a) M = Marker 100 bp, Po+ = *P. ostreatus*, 564 bp; Fv+ = *F. velutipes*, 684 bp, Cp+1 = *C. purpureum*, 492 bp; Ba+ = *B. adusta*, 410 bp. b) Gelbild des DNS-Mixes, der als Positivkontrolle verwendet wurde. c) Beispiel für eine Multiplex-PCR mit dem KAPPA2G Fast Multiplex Kit. M = Marker, Probenr. 49, 64, 71 und 76, sowie Positivkontrolle. In Probe 49 wurde *P. ostreatus* und in Probe 71 *F. velutipes* nachgewiesen.

Dieser DNS-Mix wurde auf Grund dessen für die folgenden PCRs als Positivkontrolle verwendet. Beispielhaft dargestellt in Abbildung 16c ist der Nachweis von *P. ostreatus* (Probe 49 aus Baum W3) und von *F. velutipes* (Probe 71 aus Baum R2), sowie die Positivkontrolle (DNS-Mix) zur Überprüfung der Funktionalität der PCR.

4.1.2 Nachweis der Basidiomyceten mittels Multiplex-PCR

Die vorliegenden Stammscheiben wurden mit der Multiplex-PCR auf das Vorkommen der Hauptschadverursacher getestet. Sechs der Stammscheiben stammen von Weißblühenden Rosskastanien aus Hamburg und Dänemark, vier von Rotblühenden Rosskastanien aus Hamburg (s. Tabelle 1). Die in Abschnitt 3.1.1 beschriebene Aufteilung der Stammscheiben war nicht bei allen Bäumen möglich (Probenbezeichnung s. Tabelle 1, Zonenbezeichnung s. Abbildung 4). Auf Grund der unterschiedlichen Ausprägung der Fäule im Querschnitt der beprobten Bäume folgte, dass nicht alle Bereiche in jedem Querschnitt abgrenzbar waren. Die Probenbereiche wurden entsprechend angepasst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Aus Hamburg wurden die Proben von einer Rotblühenden Rosskastanie aus der Ernst-Henning-Straße (Bergedorf), sowie Proben der Rotblühenden Rosskastanien aus der Justus-Brinckmann-Straße (Bergedorf) verwendet.

Im Stämmingsabschnitt R1 ergab die Multiplex-PCR ein Vorkommen von *F. velutipes* in allen Fäulezonen und zusätzlich *P. ostreatus* in Zone Z.

Im Querschnitt R2 wurde ebenfalls in allen Zonen *F. velutipes* nachgewiesen. In der Zone S1 konnten *F. velutipes* und *P. ostreatus* identifiziert werden.

Im Stämmingsabschnitt R3.1 konnte *F. velutipes* in den Zonen M, S1, RS1 und Z nachgewiesen werden. Im mittleren Abschnitt dieses Stämmings (R3.2) wurden *F. velutipes* in den Zonen M, S2, RS1, RM und Z nachgewiesen. In der Zone RS2 und im gesunden Bereich des Querschnitts (G) wurde *P. ostreatus* detektiert. Der untere Abschnitt dieses Stämmings R3.3 ergab folgende Nachweise: in der Zone M wurden *P. ostreatus* und *F. velutipes* zusammen, in S1 und S2 *P. ostreatus* und RS2 sowie Zone Z *F. velutipes* nachgewiesen.

In den Weißblühenden Rosskastanien aus Wulfsode wurde in der Probe W2 in den Zonen M, S1, RM und Z jeweils *P. ostreatus* und in der Zone RS2 *F. velutipes* nachgewiesen.

Das Vorkommen von *F. velutipes* in den Proben des Abschnitts W3.1 beschränkt sich auf den Bereich S1. Im Abschnitt W3.2 konnte *P. ostreatus* in der Zone RS2 nachgewiesen werden.

Der Querschnitt von W4 ergab sich das Vorkommen von *P. ostreatus* in Zone M, sowie das Vorkommen von *F. velutipes* in den Zonen S1, RS1, RS2, RM sowie Z.

Aus Dänemark konnte eine Weißblühende Rosskastanie untersucht werden (F1). Bei diesem Exemplar wurde in den Zonen M, S1, S2 und RS1 *F. velutipes* nachgewiesen.

Insgesamt wurden durch die Multiplex-PCR 37 Nachweise für *F. velutipes* und 13 Nachweise für *P. ostreatus* geführt. Das Vorkommen von *C. purpureum* und *B. adusta* konnte nicht festgestellt werden (s. Tabelle 9).

4 Ergebnisse

Tabelle 9: Ergebnisse der Multiplex-PCRs. P. o. = *P. ostreatus*, F. v. = *F. velutipes*, # = keine Probe vorhanden, --- = kein Ergebnis mit Multiplex-PCR, + = Ergebnis mit herkömmlicher PCR (s. Tabelle 10).

Stammscheibe/ Standort	M	S1	S2	RS1	RS2	RM	Z	G
Hamburg								
R1	F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	P.o., F.v.	---
R2	F.v.	P.o., F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	---
R3.1	F.v.	F.v.	+	F.v.	+	---	F.v.	---
R3.2	F.v.	+	F.v.	F.v.	P.o.	F.v.	F.v.	P.o.
R3.3	P.o., F.v.	P.o.	P.o.	#	F.v.	---	F.v.	---
Wulfsode								
W2	P.o.	P.o.	---	---	F.v.	P.o.	P.o.	---
W3.1	+	F.v.	+	+	+	+	+	---
W3.2	+	---	#	---	P.o.	---	---	---
W4	P.o.	F.v.	#	F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	---
Dänemark								
F1	F.v.	F.v.	F.v.	F.v.	#	#	#	---
Gesamt								
<i>P. ostreatus</i>	3	3	1	0	2	1	2	1
<i>F. velutipes</i>	6	6	4	6	5	4	6	0
<i>C. purpureum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. adusta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

M = Probe am äußeren Rand des Querschnitts, mittig zwischen S1 und S2

S1 = Probe am äußeren Rand des Querschnitts im Kambialbereich an der Rektionszone, Seite 1

S2 = Probe am äußeren Rand des Querschnitts im Kambialbereich an der Rektionszone, Seite 2

RS1 = Probe an der Reaktionszone, im Innern des Querschnitts, Seite 1

RS2 = Probe an der Reaktionszone, im Innern des Querschnitts, Seite 2

RM = Probe in der Mitte der Reaktionszone im Innern des Querschnitts

Z = Probe im Zentrum des Fäulebereiches

G = Referenzprobe aus augenscheinlich gesundem Querschnittsbereich

4.1.3 Nachweis weiterer Organismen mittels herkömmlicher PCR

Durch die Anwendung weiterer Primer-Kombinationen wurden die in Tabelle 10 gelisteten Organismen nachgewiesen. Um durch mögliche Störfaktoren falsch negativ erhaltene Ergebnisse auszuschließen, wurden die pilzspezifischen Primer 18 (SCHMIDT et al. 2012) mit Pilz_{rev} (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014) sowie ITS3.2 mit ITS1.1 und ITS2.2 (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014) mit ITS4 (WHITE et al. 1990) in herkömmlichen PCRs angewendet. Durch die Primerkombination ITS1.1 und ITS4 wurde einmal *Cadophora* sp., einmal *Mucor racemosus* und einmal *Eutypa lata* detektiert. Die Kombination von 18S und ITS3.2 brachte den Nachweis über *Eutypa maura*. Durch die Kombination von ITS2.2 und ITS4 wurden, *Eutypa lata* und *E. maura*, zweimal *Neonectria punicea* *Ascocoryne sarcoides* und *Sarcomyxa serotina* nachgewiesen. Die Primerkombination ITS1.1 und ITS3.2 konnte außerdem einmal *Cadophora malorum* identifiziert werden. Die Homologien mit den bei NCBI hinterlegten Sequenzen zur Bestimmung der Art sind in Prozent in der Tabelle 10 dargestellt. Es konnte keine spezifische Verteilung der Arten über den Probenquerschnitt hinweg beobachtet werden. In den Proben R3.1 RM, R3.3 RM, W2 S2 und RS1 sowie in den Proben W3.2 S1, RS1, RM und Z konnte mittels PCR-Verfahren kein Organismus durch pilzspezifische Primer nachgewiesen werden. Durch die Primer Kombination ITS1.1 und ITS4 wurde außerdem die DNS der Gattung *Aesculus* detektiert.

Tabelle 10: Ergebnisse aus herkömmlichen PCRs. Angaben zur Probennummer, der untersuchten Zone, des identifizierten Organismus und der zugehörigen Accession Number in NCBI.

Probe	Zone	Primerkombination	Organismus	Homologie [%] zu Accession Number in NCBI
R3.1	RS2	18/ITS3.2	<i>Eutypa maura</i> (Ahorn Kohlenkrustenzpilz)	84, KT692592.1
	S2	ITS2.2/ITS4	<i>Eutypa maura</i> (Ahorn Kohlenkrustenzpilz)	99, KP713862.1
R3.2	RS2	ITS2.2/ITS4	<i>Neonectria punicea</i>	93, HM534901.01
	S1	ITS2.2/ITS4	<i>Neonectria punicea</i>	95, HM534901.01
W3.1	RS1	ITS1.1/ITS4	<i>Cadophora sp.</i>	70, KY549800.2
	RS2	ITS2.2/ITS4	<i>Ascocoryne sarcoides</i> (Fleischroter Gallertbecher)	99, KX099665.1
	S2	ITS2.2/ITS4	<i>Sarcomyxa serotina</i> (Gelbstieliger Muschelseitling)	27, AB819090.1
	Z	ITS1.1/ITS4	<i>Mucor racemosus</i> (Köpfchenschimmel)	86, KP411577.1
	M	ITS2.2/ITS4	<i>Eutypa lata</i>	100, GU071109.1
	RM	ITS1.1/ITS3.2	<i>Cadophora malorum</i>	70, KY549800.1
W3.2	M	ITS1.1/ITS4	<i>Eutypa lata</i>	98, GU071109.1

M = Probe am äußeren Rand des Querschnitts, mittig zwischen S1 und S2

S1 = Probe am äußeren Rand des Querschnitts im Kambialbereich an der Reaktionszone, Seite 1

S2 = Probe am äußeren Rand des Querschnitts im Kambialbereich an der Reaktionszone, Seite 2

RS1 = Probe an der Reaktionszone, im Innern des Querschnitts, Seite 1

RS2 = Probe an der Reaktionszone, im Innern des Querschnitts, Seite 2

RM = Probe in der Mitte der Reaktionszone im Innern des Querschnitts

Z = Probe im Zentrum des Fäulebereiches

4.1.4 Nachweis von Psa über das Gyrase-B-Gen

4.1.4.1 Schleswig-Holstein

Auf Helgoland (Landkreis Pinneberg, s. Tabelle 11) wurde eine Weißblühende Rosskastanie, die Rindenrisse und Leckstellen zeigte, positiv auf Psa getestet.

4.1.4.2 Bayern

In München wurde an einer Weißblühenden und zwei Rotblühenden Rosskastanien Psa nachgewiesen (s. Tabelle 11). Neben Rindenrissen und Leckstellen traten keine weiteren Symptome auf.

Tabelle 11: Ergebnisse der molekularbiologischen Identifizierung von *P. syringae* pv. *aesculi* (Psa) über das Gyrase-B-Gen (*P. syringae* pv. *aesculi*, Psa).

Ort	Probe	makroskopisch identifizierte Art	Herkunft	Ergebnis	Primer
Schleswig Holstein, Helgoland	HL	Psa	J.-A.-Siemens-Platz	Psa	G5/G6
Bayern, München	M1	Psa	Städtische Baumschule	Psa	G5/G6
	M2	Psa		Psa	G5/G6
	M4	Psa		Psa	G5/G6

4.2 Reinkulturen

4.2.1 Basidiomyceten

Wie in Abschnitt 3.3.1 erläutert, konnten *P. ostreatus* und *F. velutipes* in Reinkultur gebracht werden. Ein Isolat je Art wurde zufällig ausgewählt. Die Pilzfruchtkörper, aus denen die Isolate gewonnen wurden stammten von Weißblühenden Rosskastanien (Baum W4, *P. ostreatus*; Baum W3.1 *F. velutipes*). Diese lagen für die Dual- und Multiplexkulturen und Abbauprobieren vor. *Bjerkandera adusta* konnte nicht in Reinkultur gebracht werden, da nur einmal Fruchtkörper gefunden wurden und der anschließende Kultivierungsversuch misslang. Auf Grund der flachen verwachsenen Fruchtkörper konnten keine nicht kontaminierten Trameteile zur Gewinnung der Reinkultur gewonnen werden. *Chondrostereum purpureum* konnten nicht in Reinkultur gebracht werden, weil während der Aufnahme der Probenbäume keine Pilzfruchtkörper vorhanden waren. Somit standen diese nicht für weitere Versuche zur Verfügung.

Alle Basidiomyceten-Kulturen wurden mittels DNS-Abgleich positiv identifiziert.

4.2.1.1 Wachstumsverhalten

Die Reinkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* wurden bei 26 °C im Brutschrank (BD 53, Binder GmbH) im Dunkeln inkubiert. Nach vollständigem Bewachsen des Nährmediums in der Petrischale und täglichem Einkreisen des äußeren Mycelrandes auf der Unterseite der Schale, wurden diese photographiert und vermessen. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist der Tabelle 12 zu entnehmen.

Die Werte stellen einen gemittelten Wert des radialen Wachstums dar, das in drei Richtungen im Abstand von 45° zueinander gemessen wurde (s. Abschnitt 3.3.1.2). Das Wachstum des Mycels von *P. ostreatus* war nach drei und das Wachstum von *F. velutipes* nach zwei Tagen messbar. Ab diesem Zeitpunkt verlief das Wachstum von *P. ostreatus* rascher als das von *F. velutipes*, so dass das radiale Wachstum bis Erreichen des Schalenrandes nach acht bzw. neun Tagen abgeschlossen war.

Tabelle 12: Arithmetisches Mittel des radialen Wachstums von *P. ostreatus* und *F. velutipes* [cm]. Das Mycel von *P. ostreatus* hatte nach spätestens 8 Tagen die komplette Oberfläche des Nährbodens bewachsen, *F. velutipes* nach spätestens 9 Tagen.

Tage	Pilzart	Mycelwachstum [cm]	
		<i>P. ostreatus</i>	<i>F. velutipes</i>
1		0,76	0,81
2		1,56	1,54
3		2,57	2,37
4		3,44	3,18
5		4,63	3,97
6		5,60	4,74
7		6,56	5,52
8		6,84	6,35
9			6,58

4.2.1.2 Erhaltung der Stammsammlung

Die Konservierung der Basidiomyceten erfolgte durch das regelmäßige Überimpfen unter sterilen Bedingungen auf HA-Medium (s. Abschnitt 3.3.1, Tabelle 4).

4.2.2 *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*

Die Isolierung von *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* gelang nach den in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Methoden. Das Bakterium wurde aus zwei erkrankten Weißblühenden Rosskastanien (Standort: Wulfsode, Niedersachsen) isoliert. Dabei wurde kein Unterschied bei der Verwendung der drei Nährmedien festgestellt (KB-, P- und HA-Medium, s. Tabelle 4). Die fluoreszierenden Bakterienstämme wurden mittels DNS unter Verwendung der taxonspezifischen Primer G5 und G6 identifiziert, lagen in Reinkulturen vor und konnten für die Dual- und Multiplexkulturen verwendet werden.

4.2.2.1 Konservierung

Die Konservierung des Bakteriums erfolgte in Flüssigkultur (KB-Medium, s. Abschnitt 3.3.2.2). Eine Rekultivierung war nur einmalig nach 11 Tagen in zwei Lagerungsvarianten erfolgreich. Die Lagerung bei 4 °C und bei -20 °C ermöglichte eine Rekultivierung auf KB- und HA-Medium. Nach 48 Stunden waren fluoreszierende Bakterienkolonien erkennbar, die in einer anschließenden DNS-Identifikation als Psa identifiziert werden konnten. Über einen weiteren Zeitraum von 31 Tagen war die Lagerung bei -20 °C nicht erfolgreich, d.h. auf keinem der Medien war ein Wachstum von Kolonien zu beobachten.

4.3 Dualkulturen

Um die gegenseitige Beeinflussung der am Komplexschaden der Rosskastanien beteiligten Organismen zu untersuchen, wurden diese in Dualkulturen in Petrischalen von 9 cm Durchmesser einander gegenübergestellt (s. Abschnitt 3.4.1). Da die Kultivierung von *P. ostreatus*, *F. velutipes* und *P. syringae* pv. *aesculi* (Psa) gelang, wurde deren bzw. dessen Verhalten zueinander in Dualkulturen untersucht.

4.3.1 *P. ostreatus* und *F. velutipes*

P. ostreatus und *F. velutipes* wurden zeitgleich auf HA-Medium in Form von Inokuli (Durchmesser 0,5 cm) kultiviert. Das radiale Wachstum der Mycelien wurde, wie bei den Reinkulturen, täglich dokumentiert und nach Stagnierung des Wachstums ausgewertet. Grundsätzlich ist zu vermerken, dass keiner der Pilze den anderen vollständig überwuchs. Nach erstem Mycelkontakt wuchsen beide Mycelien langsam ineinander und verfärbten sich gelblich. Das Wachstum stagnierte acht (*F. velutipes*) und sieben Tage (*P. ostreatus*) nach Inokulation. Es bildete sich eine ca. einen Zentimeter breite Zone, in der das Mycel beider Pilze übereinander wuchs (s. Abbildung 17). Das seitlich wachsende Mycel stagnierte ebenfalls erst nach Kontakt mit dem artfremden Mycel, sodass das Wachstum der Kulturen nach spätestens neun Tagen gänzlich stoppte.

In Tabelle 13 ist neben dem Wachstum der Dualkultur auch das Wachstum der Reinkulturen beider Arten zusammengefasst. Die Differenzen des Wachstums der Reinkulturen zu den Dualkulturen macht eine Verlangsamung des Wachstums erkennbar.

P. ostreatus zeigte in Dualkultur (3,55 cm) mit *F. velutipes* in derselben Zeit (nach acht Tagen) etwa halb so viel Wachstum, wie in Reinkultur (6,84 cm).

F. velutipes wuchs in Dualkultur mit *P. ostreatus* auch verlangsamt, was aber erst nach fünf Tagen auffiel. In Reinkultur wuchs das Mycel nach fünf Tagen ca. 3,97 cm, in Dualkultur 3,39 cm.

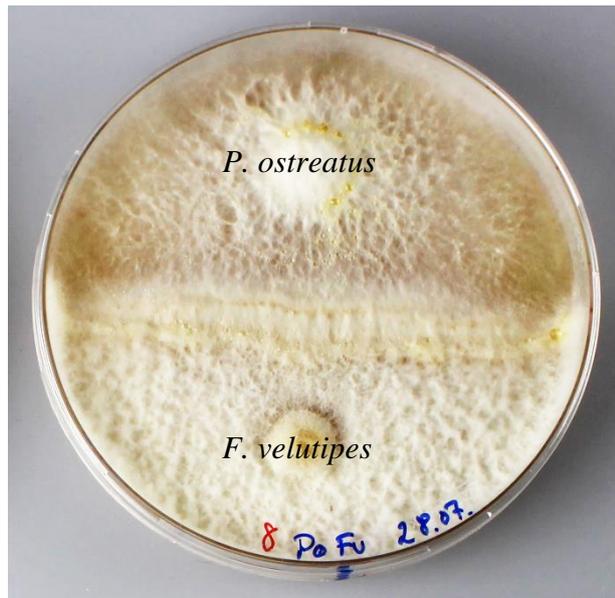


Abbildung 17: Exemplarisches Beispiel einer Dualkultur von *P. ostreatus* und *F. velutipes*. Im oberen Teil der Petrischale (9 cm Durchmesser) ist *P. ostreatus* und im unteren Teil *F. velutipes* auf HA-Medium kultiviert. In der Mitte ist die Berührungszone deutlich erkennbar. Start des Versuches 28.07.2014.

Tabelle 13: Vergleich der arithmetischen Mittelwerte des radialen Wachstums der Rein- und Dualkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* [cm]. Negative Werte zeigen Verlangsamung an, positive eine Beschleunigung des Mycelwachstums.

Tage	Mittleres Wachstum [cm] der Rein- und Dualkulturen				Vergleich des Wachstums der Rein- mit der Dualkultur, negativ: Verlangsamung positiv: Beschleunigung	
	<i>P. ostreatus</i>		<i>F. velutipes</i>		<i>P. ostreatus</i>	<i>F. velutipes</i>
	Reinkultur (s. Tabelle 12)	Dualkultur	Reinkultur (s. Tabelle 12)	Dualkultur	+	++
1	0,76	0,49	0,81	0,83	-0,27	0,02
2	1,56	0,99	1,54	1,52	-0,57	-0,02
3	2,57	1,68	2,37	2,24	-0,89	-0,13
4	3,44	2,39	3,18	2,91	-1,05	-0,27
5	4,63	2,81	3,97	3,39	-1,82	-0,58
6	5,60	3,02	4,74	3,73	-2,58	-1,01
7	6,56	3,23	5,52	4,37	-3,33	-1,15
8	6,84	3,55	6,35		-3,29	
9		3,79	6,58			

$P. ostreatus+$ =Differenz des mittleren Wachstums von *P. ostreatus* in Dualkultur mit *F. velutipes* und des Wachstums der *P. ostreatus*-Reinkultur

$F. velutipes++$ = Differenz des Mittleren Wachstums von *F. velutipes* in Dualkultur mit *P. ostreatus* und des Wachstums der *F. velutipes*-Reinkultur

4.3.2 *P. ostreatus* und *P. syringae* pv. *aesculi*

Für die zwei Dualkultur-Varianten von *P. ostreatus* und *P. syringae* pv. *aesculi* (Psa) lagen jeweils drei Wiederholungen vor. Variante A (erst *P. ostreatus*, dann Psa) und Variante B (erst Psa, dann *P. ostreatus*) unterscheiden sich im beidseitigem Wachstumsverhalten.

Wurde zunächst *P. ostreatus* inkubiert und anschließend Psa (Variante A), wuchs das Mycel nach drei Tagen bis an die Psa-Kultur heran. Das Wachstum fand nach dem Kontakt hauptsächlich in Richtung Schalenrand und entlang des Psa-Streifens statt (s. Abbildung 18). Nach elf Tagen war die Oberfläche des Nährbodens komplett mit Mycel bedeckt. In den ersten drei Tagen nach der Etablierungsphase war das Mycelwachstum gegenüber dem in Reinkultur um 1,42 cm, 1,29 cm und 2,68 cm verringert (s. Tabelle 14) gewachsen.

Gegenteilig war bei Variante B (erst Psa, dann *P. ostreatus*) zu beobachten, dass sich das Wachstum des Mycels deutlich verlangsamt. In Reinkultur wuchsen die Hyphen im Vergleich zu der Dualkultur in Variante B um bis zu 3,3-fach schneller (s. Tabelle 14). Die Hyphen wuchsen, obwohl langsam, nach sechs bis sieben Tagen ungestört über Psa hinweg. Auch der Kontakt beider Pilz-Kolonien auf der Psa-Kultur verlief ohne sichtbare Beeinflussung. Nach etwa neun Tagen war der Nährboden komplett mit Mycel überzogen.

4.3.3 *F. velutipes* und *P. syringae* pv. *aesculi*

Für die Dualkultur *F. velutipes* und *P. syringae* pv. *aesculi* (Psa) lagen ebenfalls die Varianten A (erst *F. velutipes*, dann Psa) und B (erst Psa, dann *F. velutipes*) vor. Auch hier gab es deutlich erkennbare Unterschiede im Wachstumsverhalten.

In Variante A erreichte das Mycel des *F. velutipes* nach zwei Tagen das Bakterium (s. Tabelle 14). Nach Kontakt mit dem Bakterium wuchs das Mycel nur sehr spärlich über die streifenförmige Kolonie und richtete sich seitlich aus. Nach fünf Tagen war das Mycel komplett über den Nährboden gewachsen und auch die Myceldichte im Bereich des Psa nahm

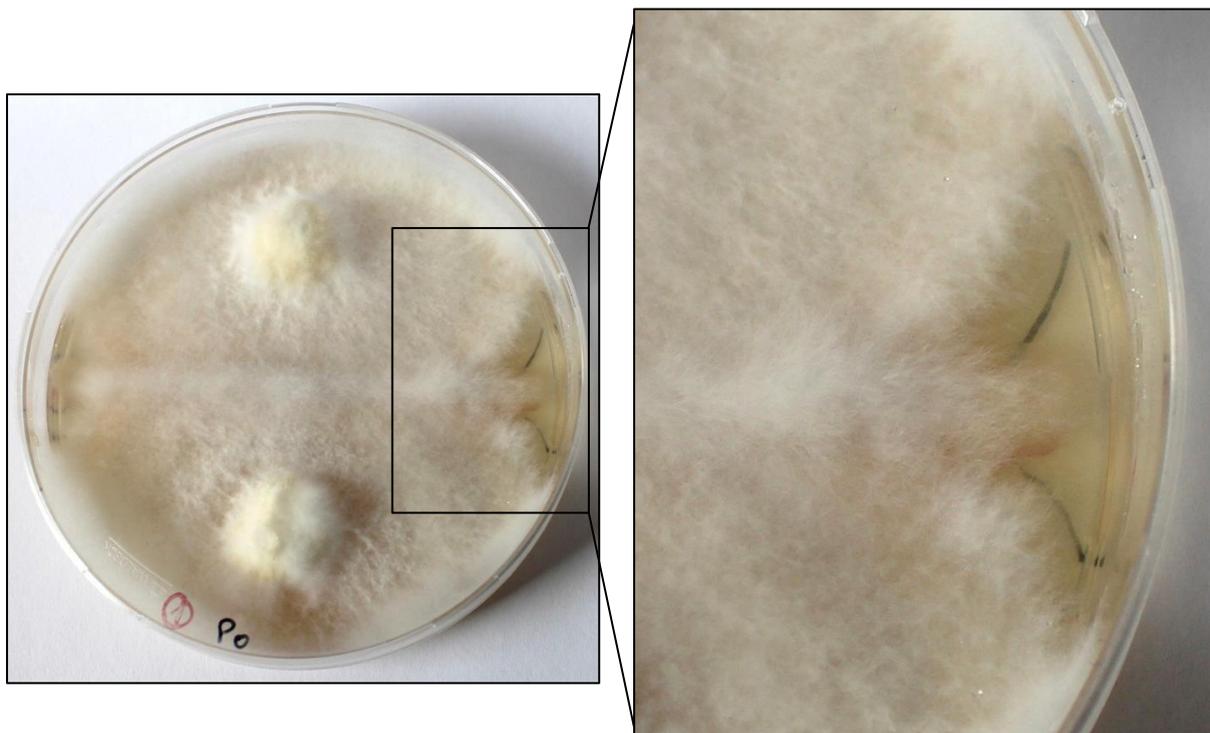


Abbildung 18: Dualkultur von *P. ostreatus* und Psa in Variante A nach sieben Tagen Mycelwachstum. Rechts: Vergrößerung des Kontaktbereiches der Organismen. Deutlich wächst das Mycel auf dem Bakteriumstreifen. Start des Versuchs

19.09.2014

zu (s. Abbildung 19). Nach 29 Tagen ist der Bakterienstreifen noch immer erkennbar (deutlich geringere Myceldichte) und es haben sich Fruchtkörper – konzentriert am Rand der Schale – gebildet.

In Variante B kamen die Hyphen des *F. velutipes* und die Bakterienkolonie erstmalig nach zwei Tagen in Kontakt. Das Mycel wuchs nach Ausstreichen des Bakteriums 0,33 cm, 0,55 cm und 0,7 cm schneller als in Reinkultur. Die Hyphen schienen sich seitlich zu orientieren. Unter dem Mycel war die Lage (Länge und Breite) des Bakteriums durch spärliches Wachstum des Mycels erkennbar (s. Abbildung 19). Ein erster Fruchtkörper war nach einem Monat sichtbar.

4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Rein- und Dualkulturen

In Tabelle 14 sind die Mittelwerte von drei parallelen Ansätzen dargestellt. Es werden Unterschiede im Wachstumsverhalten der einzelnen Kulturzusammenstellungen im Vergleich zu den Reinkulturen deutlich.

Die Dualkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* zeigten jeweils ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu den jeweiligen Reinkulturen. Gleiches galt für die Dualkultur von *P. ostreatus* mit *P. syringae* pv. *aesculi*. In Variante B war ein verstärktes Wachstum von *F. velutipes* um im Mittel 35 % pro Tag zu beobachten.

Tabelle 14: Vergleich des radialen Wachstums der Rein- und Dualkultur der Pilze mit Psa (arithmetisches Mittel, [cm]). Negative Werte bedeuten eine Verlangsamung, positive eine Beschleunigung des Mycelwachstums.

Tage	Radiales Wachstum [cm] der Pilzkulturen der Rein- und Dualkultur mit Psa (Variante A und B)						Vergleich des radialen Wachstums der Rein- mit dem der Dualkultur negativ : Verlangsamung positiv : Beschleunigung			
	<i>P. ostreatus</i>			<i>F. velutipes</i>			<i>P. ostreatus</i>		<i>F. velutipes</i>	
	Reinkultur (s. Tabelle 12)	Dualkultur mit Psa Variante		Reinkultur (s. Tabelle 12)	Dualkultur mit Psa Variante		Dualkultur mit Psa Variante		Dualkultur mit Psa Variante	
		A	B		A	B	A	B	A	B
1	0,76		0,44	0,81		1,14		-0,32		+0,33
2	1,56		0,96	1,54		2,09		-0,60		+0,55
3	2,57	1,51	1,22	2,37	2,27	3,07	-1,06	-1,35	-0,1	+0,7
4	3,44	2,15	1,49	3,18	2,73		-1,29	-1,95	-0,45	
5	4,63	2,92	1,62	3,97			-1,71	-3,01		
6	5,60		1,79	4,74				-3,81		
7	6,56		1,98	5,52				-4,58		
8	6,84			6,35						
9				6,58						

4 Ergebnisse

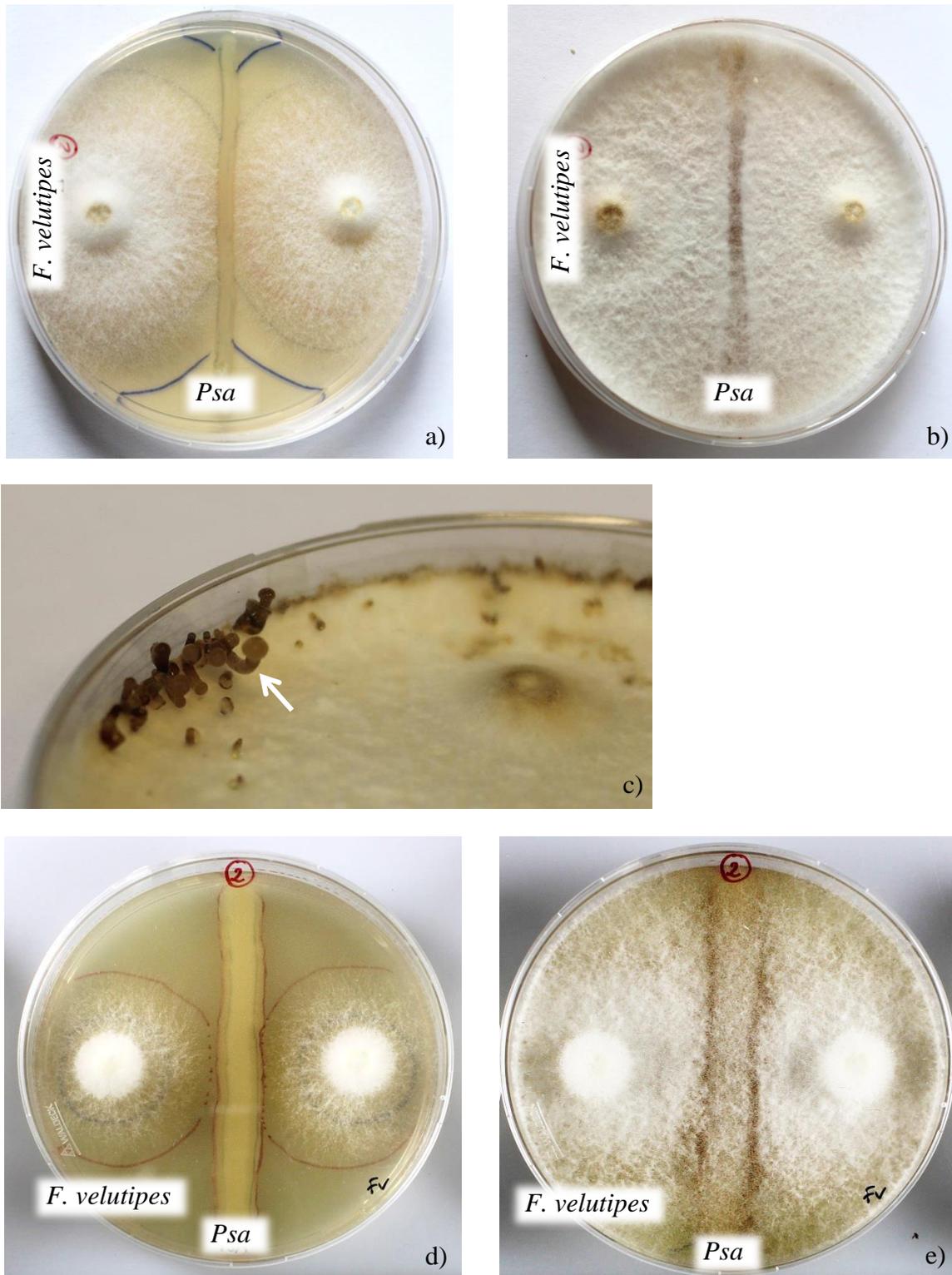


Abbildung 19: Dualkulturen von *F. velutipes* und *Psa* (Start der Versuche 19.09.2014). Variante A, Kultur nach drei Tagen (a), Kultur nach fünf Tagen (b). Fruchtkörper des *F. velutipes*, gebildet nach ca. 21 Tagen (Pfeil, c). Dualkultur von *F. velutipes* und *Psa* in Variante B nach drei Tagen (d) und nach fünf Tagen (e).

4.4 Multiplexkulturen

Die Beobachtung von Multiplexkulturen, in denen *P. ostreatus*, *F. velutipes* und Psa zusammengebracht wurden, diente der Aufklärung des synergistischen oder antagonistischen Verhaltens der Organismen zueinander.

4.4.1 *P. ostreatus*, *F. velutipes* und *P. syringae* pv. *aesculi*

In Variante A und B der Multiplexkulturen, die in drei parallelen Ansätzen beobachtet (s. Abschnitt 3.4.2) wurden, waren ebenfalls deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der Pilze erkennbar (s. Tabelle 15).

In Variante A, in der zuerst *P. ostreatus* und *F. velutipes* drei Tage inkubiert wurden, bevor *P. syringae* pv. *aesculi* (Psa) hinzugefügt wurde, haben nach zwei Tagen beide Pilze den Bakterienstreifen erreicht. Im Verlauf der nächsten drei Tage, bis zum kompletten Bewuchs des Nährbodens durch das Mycel, stellte sich ein etwas stärkeres Wachstum des *F. velutipes* ein. Dieser wuchs über den Bakterienstreifen hinweg und erst bei Kontakt mit dem Mycel des *P. ostreatus* stagnierte dessen Wachstum. Es bildete sich wiederum eine Zone, ähnlich wie in den Dualkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes*, in der das Mycel beider Pilzarten augenscheinlich ineinander wuchs. Die Mycelien wuchsen in dieser Zone etwas erhöht und bildeten Luftmycel. *F. velutipes* nahm nach Stagnation des Wachstums etwa 60 % der Grundfläche ein. Auch hier erschien 29 Tage nach Inokulation der erste Fruchtkörper (Pfeil in Abbildung 20). In Variante A zeigten alle Basidiomyceten im Vergleich zum Mycelwachstum in Reinkultur ein verlangsamtes Mycelwachstum.

Anders dagegen war bei Variante B, in der erst das Bakterium aufgetragen wurde, eine deutliche Dominanz von *F. velutipes* gegenüber *P. ostreatus* zu beobachten. Nach zwei Tagen hatte dieser den Bakterienstreifen erreicht. *P. ostreatus* hingegen war zu diesem Zeitpunkt einen knappen Zentimeter gewachsen und erreichte auch im weiteren Verlauf nicht den Bakterienstreifen. Das Wachstum stagnierte bei 1,48 cm. Die Mycelien der Pilze berührten sich durch das Wachstum des *F. velutipes* nach vier Tagen und es bildete sich eine Zone, die der von Variante A gleicht. Nach spätestens sieben Tagen war die komplette Oberfläche des Nährbodens mit Mycel des *F. velutipes* (ca. 80 %) überwachsen.

4.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Rein- und Multiplexkultur

Die Variante A, bei der zunächst die Basidiomyceten und anschließend *P. syringae* pv. *aesculi* (Psa) aufgetragen wurden, zeigte in jedem Fall im Vergleich zu den Reinkulturen ein verlangsamtes Mycelwachstum.

In Variante B, bei der erst nach Inkubation von Psa die Basidiomyceten aufgetragen wurden, folgte für *F. velutipes* eine deutliche Zunahme der Dominanz gegenüber *P. ostreatus*. Diese wurde in dem beschleunigten Mycelwachstum sichtbar. Insgesamt beschleunigte sich das Wachstum von *F. velutipes* um ca. 25 %, ausgenommen Tag 6, bei dem nur eine Steigerung von unter 1 % zu beobachten war. In dieser Variante verlangsamte sich das Mycelwachstum von *P. ostreatus* (s. Tabelle 15).

4 Ergebnisse

Tabelle 15: Vergleich des arithmetischen Mittels des radialen Wachstums [cm] der Rein- und Multiplexkulturen in Variante A und Variante B von *P. ostreatus*, *F. velutipes* und Psa. Negative Werte bedeuten ein verlangsames Wachstum, positive eine Beschleunigung des Mycelwachstums.

Tage	Radiales Wachstum [cm] der Pilzkulturen in Rein- und Multiplexkultur mit Psa (Variante A und B)						Vergleich des radialen Wachstums der Rein- mit dem der Multiplexkultur Negativ: Verlangsamung Positiv: Beschleunigung			
	<i>P. ostreatus</i>			<i>F. velutipes</i>			<i>P. ostreatus</i>		<i>F. velutipes</i>	
	Reinkultur (s. Tabelle 12)	Multiplexkultur mit Psa Variante		Reinkultur (s. Tabelle 12)	Multiplexkultur mit Psa Variante		Variante		Variante	
		A	B		A	B	A	B	A	B
1	0,76		0,33	0,81		0,96		-0,43		+0,16
2	1,56		0,67	1,54		2,04		-0,89		+0,50
3	2,57	1,24	0,91	2,37	1,88	2,95	-1,33	-1,65	-0,49	+0,58
4	3,44	1,99	1,08	3,18	2,66	4,05	-1,45	-2,35	-0,52	+0,87
5	4,63	2,85	1,28	3,97	3,54	4,90	-1,78	-3,35	-0,43	+0,93
6	5,60	3,19	1,41	4,74		4,78	-2,41	-4,18		+0,04
7	6,56		1,48	5,52				-5,08		
8	6,84			6,35						
9				6,58						

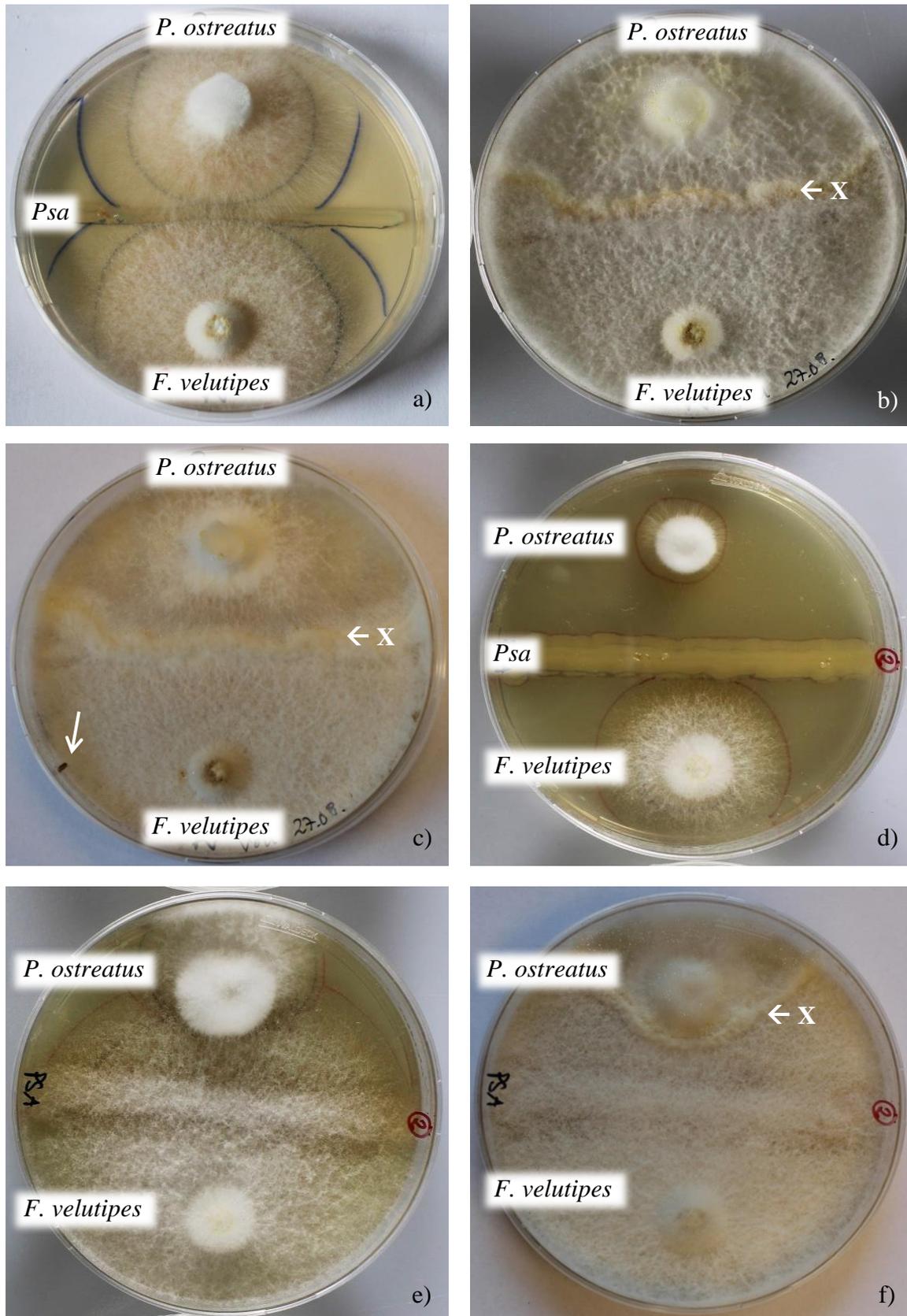


Abbildung 20: *P. ostreatus*, *F. velutipes* und *Psa* in Multiplexkultur nach Variante A. a) Kultur nach drei Tagen, b) nach acht Tagen und c) nach einem Monat, mit Pilzfruchtkörper (Pfeil). Variante B, d) nach zwei Tagen, e) nach sechs Tagen und f) nach einem Monat. In allen Bildern ist *P. ostreatus* oben und *F. velutipes* unten angeordnet, die Mycelberührungszone ist mit einem weißen Pfeil und X markiert. Start der Versuche 19.09.2014.

4.5 Abbauprobungen

4.5.1 Vorversuch

In einem Vorversuch konnten erste Erkenntnisse über das Abbauverhalten an Holz der in Reinkultur vorliegenden Basidiomyceten gewonnen werden. Das Abbauverhalten des *P. ostreatus* und des *F. velutipes* wurde durch Inkubation an verschiedenen Holzarten geprüft. Die Prüfkörper (je 6 pro Art) wurden aus Splintholz der Rot- und Weißblühenden Rosskastanie, sowie Splint- und Kernholz der Kiefer (*Pinus sylvestris*) und Buche (*Fagus sylvatica*) hergestellt.

4.5.1.1 Masseverlust

Aus Tabelle 16 und Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass *P. ostreatus* und *F. velutipes* einen wesentlich höheren Masseverlust bei *A. hippocastanum* und *A. x carnea* hervorrufen, als bei der geprüften Nadelholzart Kiefer. Nach Inokulation verlor *A. hippocastanum* durch *P. ostreatus* 3,6 % und durch *F. velutipes* 7,6 % an Masse. Bei *A. x carnea* wurde durch *P. ostreatus* 3 % und durch *F. velutipes* 7,7 % Masse abgebaut. Weil der Holzabbau bei *A. hippocastanum* und *A. x carnea* durch die Pilze nahezu gleich ist, wurden der Langzeitabbauversuch und die Festigkeitsversuche ausschließlich mit Splint der Weißblühenden Rosskastanie durchgeführt. *P. ostreatus* verursacht bei Kiefersplintholz 1,8 %, bei Kieferkernholz 1 % und bei Buche 11,1 % Masseverlust. Der Masseverlust, der durch *F. velutipes* verursacht wird liegt bei Kiefersplintholz bei 0 %, bei Kieferkernholz bei 0,2 % und bei Buchenholz bei 4,8 %.

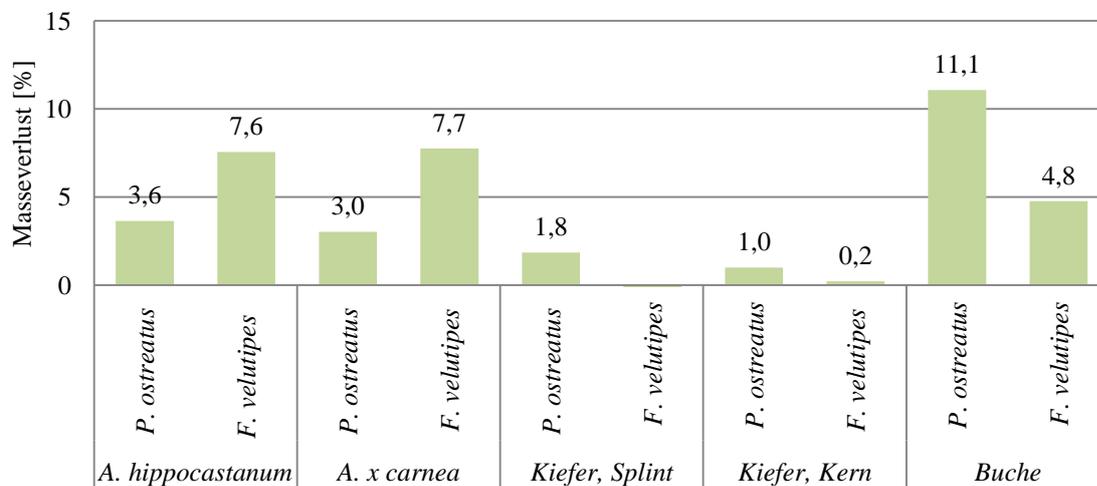


Abbildung 21: Arithmetisches Mittel des Masseverlusts [%] nach achtwöchiger Inkubation mit Reinkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* (n = 6).

Tabelle 16: Prozentuale Abnahme der Darrdichte in Abhängigkeit von der Holzart. Werte aus dem Vorversuch nach achtwöchigem Abbau (Ah = *A. hippocastanum*, Ac = *A. x carnea*). Die Kontrolle umfasst jeweils nicht infiziertes Holz.

Pilzart	Abnahme der Darrdichte in Abhängigkeit der Holzart [%]				
	<i>A. hippocastanum</i>	<i>A. x carnea</i>	Kiefer, Splint	Kiefer, Kern	Buche
<i>P. ostreatus</i>	5,78	8,81	3,04	1,44	12,56
<i>F. velutipes</i>	11,69	12,53	1,62	0,52	8,00
Kontrolle	1,9	1,12	0,73	0,77	4,5

4.5.1.2 Abnahme der Darrdichte

A. hippocastanum und *A. x carnea* verloren durch *P. ostreatus* nach achtwöchigem Abbau 5,78 und 8,81 % und durch *F. velutipes* 11,69 und 12,53 % an Darrdichte (s. Tabelle 16). Kiefernspint- und kernholz nahmen nach dem Abbau durch *P. ostreatus* 3,04 und 1,44 %, für *F. velutipes* bei 1,62 und 0,52 % ab. Für Buche ergaben sich Werte von 12,56 % Darrdichteabnahme durch *P. ostreatus* und 8 % durch *F. velutipes*. Die Abnahme der Darrdichte bei den nicht infizierten Kontrollgruppen ist auf Messungenauigkeiten zurückzuführen.

4.5.2 Langzeitabbauversuch

Auf Grundlage der Ergebnisse aus dem Vorversuch wurde der Langzeitabbauversuch wie folgt durchgeführt:

- in der Prüfung wurde Holz von *A. hippocastanum* verwendet (Darrdichte: 0,52 g/cm³);
- um einen Vergleich der Abbauintensität möglich zu machen, wurde parallel der Holzabbau durch beide Basidiomyceten bei *F. sylvatica* beobachtet (Darrdichte: 0,67 g/cm³);
- die Ausbauzeiträume wurden auf ca. 30 Tage festgelegt;
- der Inkubationszeitraum betrug 30 bis 196 Tage und
- der Versuch umfasste jeweils vier Prüfkörper pro Abbauzeitraum.

4.5.2.1 Masseverlust und Abnahme der Darrdichte bei *A. hippocastanum*

In der Abbildung 22 ist der Masseverlust durch Einzel- und Dualinkubation der Pilze *F. velutipes* und *P. ostreatus* graphisch im Verlauf des gesamten Versuches im Zeitraum von 31–196 Tagen dargestellt. Im Folgenden werden einige Ergebnisse beschrieben.

a. *P. ostreatus*

P. ostreatus verursachte über den Inkubationszeitraum von 196 Tagen einen Masseverlust bei *A. hippocastanum* von höchstens 19,07 %. Über den gleichen Zeitraum nahm die Darrdichte auf 0,43 g/cm³ ab (Abbildung 22a).

b. *F. velutipes*

Bei *A. hippocastanum* verursachte *F. velutipes* insgesamt einen etwa gleich hohen Masseverlust in der gleichen Inkubationszeit wie *P. ostreatus*. Er reduziert aber bereits nach 129 Tagen die Masse des Holzes um 19,01 %, was dem Verlust der Masse durch *P. ostreatus* nach 196 Tagen entspricht (s. Abbildung 22b). Über die vier folgenden Ausbautermine lagen die Abbauraten zwischen 18,35 % und 19,69 % und damit höher als bei *P. ostreatus*. Die Darrdichte lag zwischen 0,42 und 0,43 g/cm³.

c. *P. ostreatus* und *F. velutipes*

Die Inkubation von *P. ostreatus* und *F. velutipes* auf Holz von *A. hippocastanum* ergab den höchsten Masseverlust nach 143 Tagen (26,41 %) (s. Abbildung 22c). Nach 31 Tagen erreichte der Masseverlust bereits 11,26 %, was die Addition der beiden Werte der Einzelinkubationen der Pilze überschreitet. Anschließend stieg der Masseverlust bis zu einem Einbruch nach 129 Tagen. In den drei folgenden Inkubationszeiträumen lagen die Werte zwischen 22,79 % und 25,86 %. Die Darrdichte lag zwischen 0,39 und 0,41 g/cm³.

4 Ergebnisse

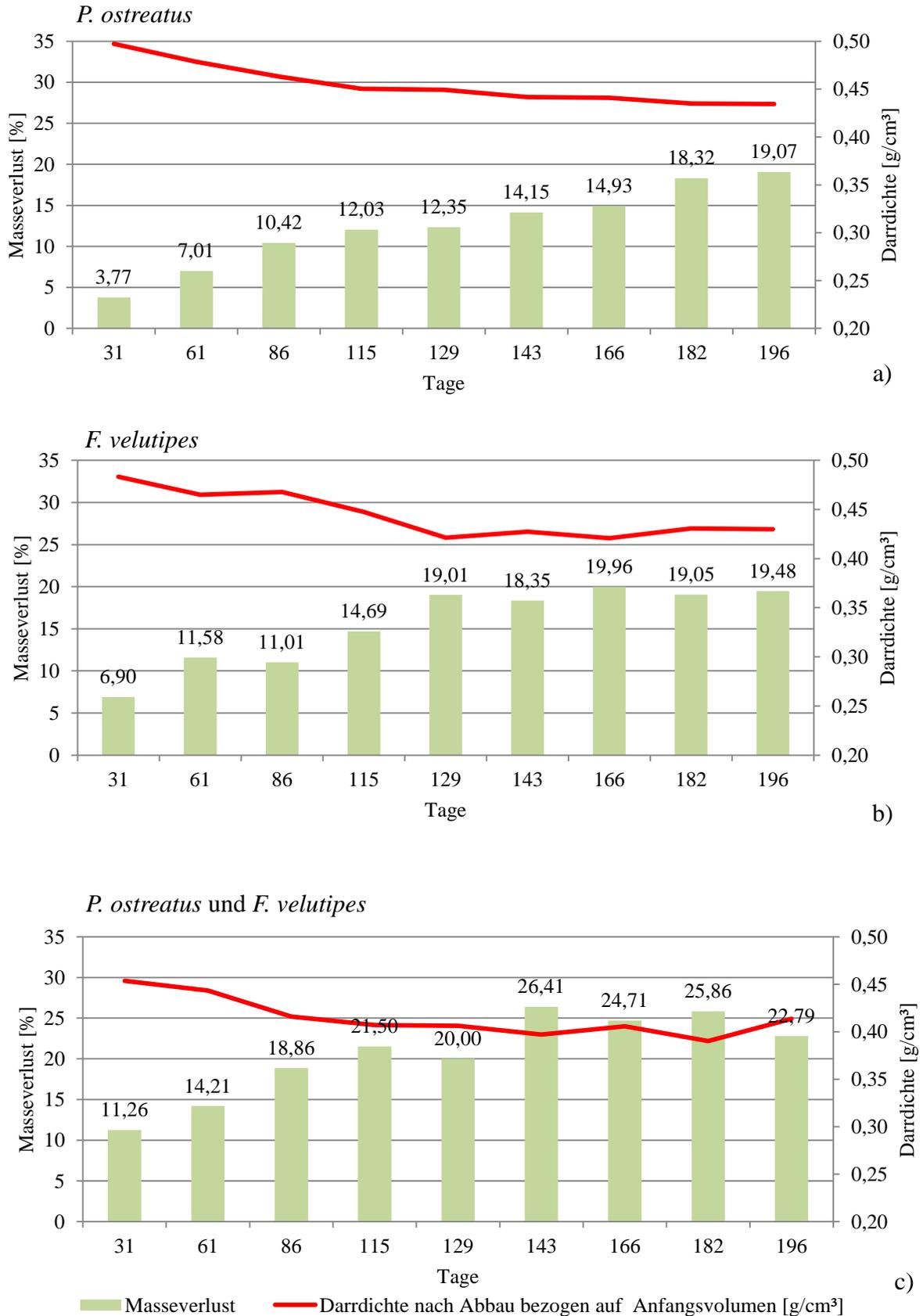


Abbildung 22: Masseverlust und Abnahme der Darrdichte bei *A. hippocastanum* in einem Zeitraum von 31–196 Tagen.

a) Masseverlust und Darrdichte durch *P. ostreatus*.

b) Masseverlust und Darrdichte durch *F. velutipes*.

c) Masseverlust und Darrdichte durch *P. ostreatus* zusammen mit *F. velutipes*.

4.5.2.2 Masseverlust und Abnahme der Darrdichte bei *F. sylvatica*

Ein Vergleich von den Abbauraten, die bei *A. hippocastanum* und *F. sylvatica* erreicht werden können, kann Aufschluss über eine eventuelle Wirtsspezifität von *P. ostreatus* und *F. velutipes* geben. Der Versuch wurde deswegen mit demselben Aufbau parallel mit Holz von *F. sylvatica* durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 23 und sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

a. *P. ostreatus*

Bei *F. sylvatica* lagen die Werte für den Masseverlust höher als bei *A. hippocastanum* (s. Abbildung 23a). Bereits nach 86 Tagen Versuchszeitraum wurde ein Masseverlust von über 18 % erreicht. Über den gesamten Versuchszeitraum stieg der Masseverlust auf 29 %. Dieser Wert wurde bei *A. hippocastanum* durch *P. ostreatus* nicht erreicht. Die Dichte nimmt bis auf 0,47 g/cm³ ab.

b. *F. velutipes*

Bei *F. sylvatica* verursachte *F. velutipes* nach 182 Tagen den höchsten Masseverlust mit 14,46 % (s. Abbildung 23b). Diesen Wert erreichte *F. velutipes* bei *A. hippocastanum* bereits nach 115 Tagen. Die Darrdichte nahm auf 0,6 g/cm³ ab.

c. *P. ostreatus* und *F. velutipes*

Bei *F. sylvatica* wurde nach 143 Tagen ein Höchstwert von 40,5 % Masseverlust erreicht (s. Abbildung 23c). Die Darrdichte nahm auf mehr als 0,41 g/cm³ ab. Zu den fünf vorherigen Ausbauzeitpunkten lagen die Werte immer über denen der Einzelinkubationen in Reinkultur sowohl bei *A. hippocastanum*, als auch bei *F. sylvatica*.

4 Ergebnisse

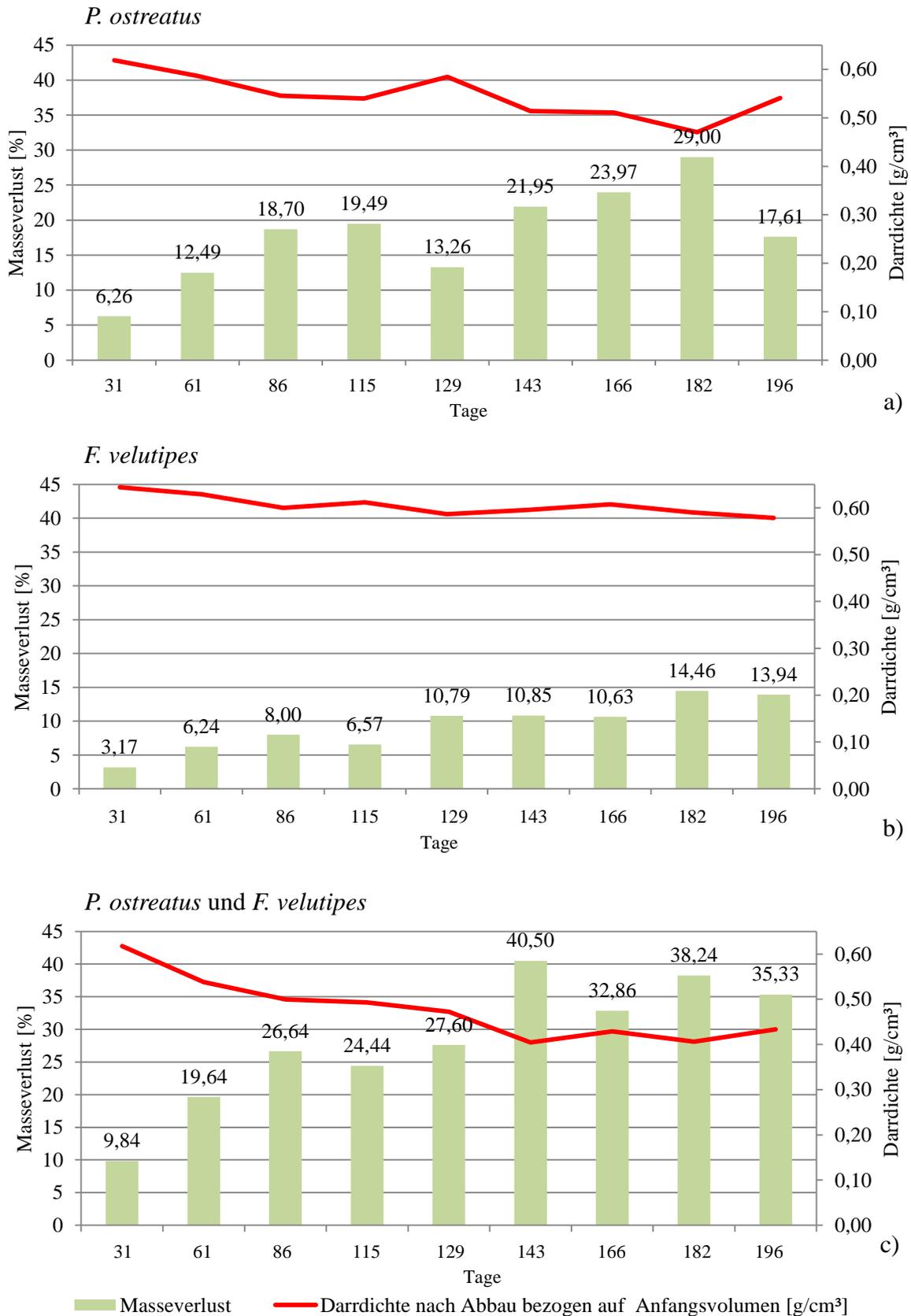


Abbildung 23: Masseverlust und Abnahme der Darrdichte bei *F. sylvatica* in einem Zeitraum von 31–196 Tagen.

a) Masseverlust und Darrdichte durch *P. ostreatus*.

b) Masseverlust und Darrdichte durch *F. velutipes*.

c) Masseverlust und Darrdichte durch *P. ostreatus* zusammen mit *F. velutipes*.

4.5.3 Beobachtungen an Prüfkörpern

Beim Ausbau nach vierwöchiger Inkubationszeit ist aufgefallen, dass durch die Inkubation beider Basidiomyceten auf den Prüfkörpern Demarkationslinien entstanden sind (s. Abbildung 24). Die Demarkationslinien traten über den gesamten Versuchszeitraum auf und wurden nach dem Darren der Proben undeutlich und waren kaum noch sichtbar.

Die Fruchtkörperbildung begann bei *F. velutipes* nach acht Wochen Inkubationszeit. Die Häufigkeit stieg über die Dauer des Versuches an (s. Abbildung 25). Ab einer Versuchszeit von 143 Tagen traten auch Fruchtkörper bei den Buchenprüfkörpern auf (s. Abbildung 26). Im weiteren Versuchsverlauf konnte die Fruchtkörperbildung nicht mehr beobachtet werden.

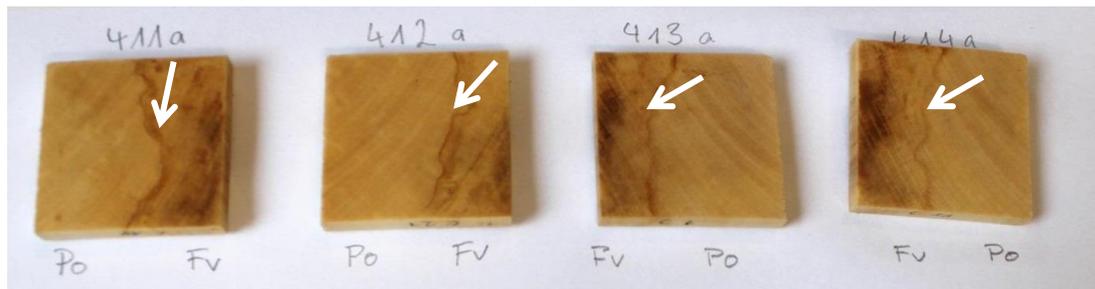


Abbildung 24: Roskastanienprüfkörper nach Ausbau. Inkubationszeit: 31 Tage. Abbau durch *P. ostreatus* (Po) und *F. velutipes* (Fv). Die weißen Pfeile deuten auf die Demarkationslinien.

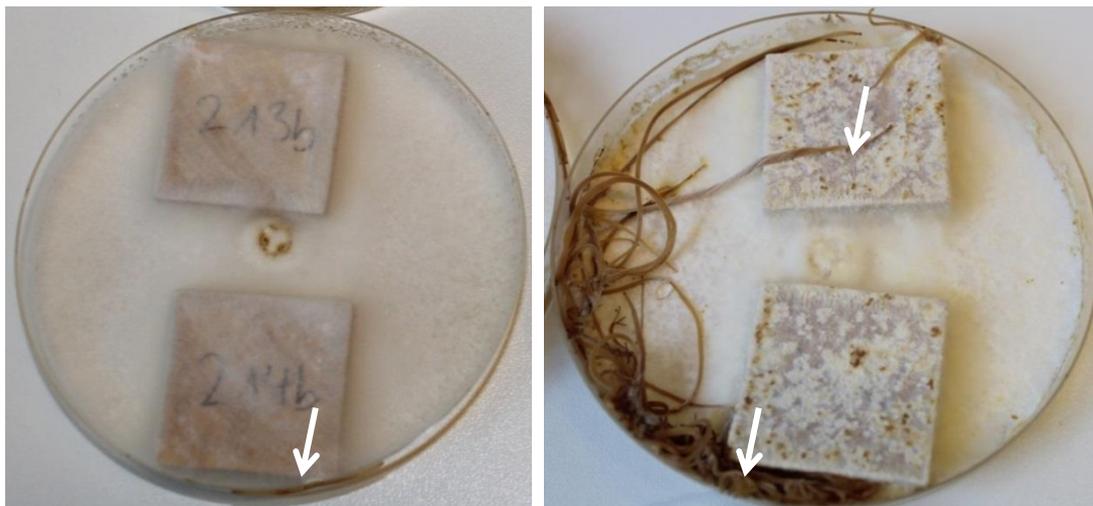


Abbildung 25: Fruchtkörperbildung (weiße Pfeile) nach 61 Tagen (a) und 143 Tagen (b) Inkubationszeit von *F. velutipes* auf Roskastanie.

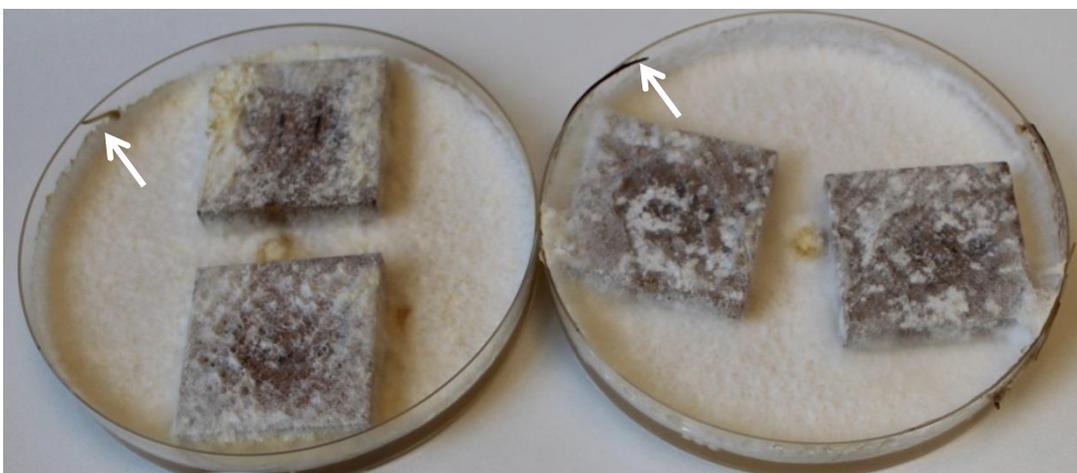


Abbildung 26: Buchenprüfkörper nach 143 Tagen Inkubationszeit mit *F. velutipes*. Die weißen Pfeile weisen auf Pilzfruchtkörper.

4.6 Festigkeitsversuche

Zur statistischen Auswertung der Festigkeitsversuche wurden die Mediane der einzelnen Inkubationsvarianten herangezogen.

4.6.1 4-Punkt-Biegefestigkeit

Dem Biegeversuch ging ein Abbauersuch voran, aus dem zu sechs Zeitpunkten (nach 28, 56, 84, 117, 140 und 162 Tagen) Prüfstäbe entnommen wurden. Die Prüfstäbe waren dem Holzabbau durch *P. ostreatus* und *F. velutipes* und beiden gemeinsam ausgesetzt. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Masseverlustes, der Darrdichte, der Biegefestigkeit und des Elastizitätsmoduls (s. Tabelle 17), die entsprechend Abschnitt 3.6 ermittelt wurden, beschrieben.

4.6.1.1 Masseverlust

Für die unterschiedlichen Inkubationsvarianten wurden die in Abbildung 27 und Tabelle 17 dargestellten Masseverluste ermittelt. Die Kombination von *P. ostreatus* mit *F. velutipes* erreichte hierbei den höchsten Masseverlust über den gesamten Versuchszeitraum. Es folgte der Masseverlust durch *P. ostreatus* und der durch *F. velutipes* getrennt voneinander. Hierbei ist zu notieren, dass bei dem Langzeitabbauersuch (s. Abschnitt 4.5.2) der Masseverlust, der durch *F. velutipes* verursacht wurde, höher war, als der durch *P. ostreatus* verursachte. Dabei war der durch *F. velutipes* verursachte Masseverlust nahezu doppelt so hoch wie in diesem Versuchsteil.

4.6.1.2 Dichte

Die Dichte, sowie dessen Änderung über den Versuchszeitraum von 162 Tagen, die durch den Holzabbau von *P. ostreatus* und *F. velutipes* gesondert sowie beiden gemeinsam verursacht wurde, ist in Abbildung 28 dargestellt und in Tabelle 17 aufgelistet. Zu Beginn des Versuches

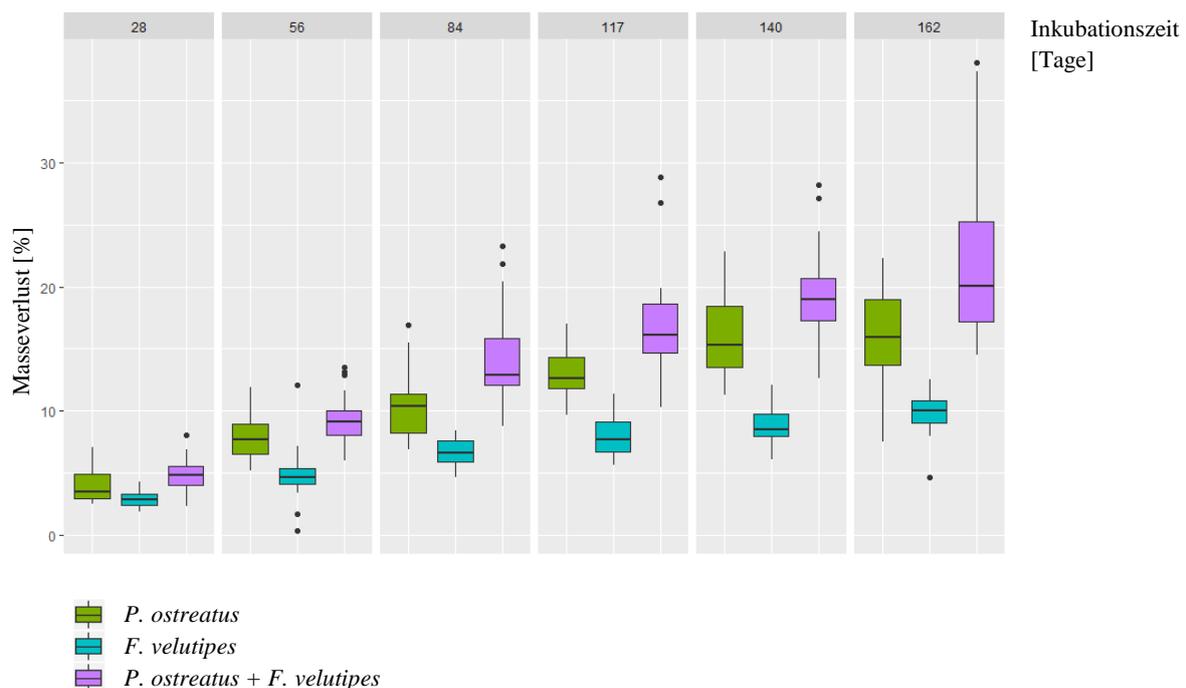


Abbildung 27: Box-Whisker-Plot des Masseverlustes [%] bei Roskastanienprüfkörpern durch *P. ostreatus* (grün), *F. velutipes* (blau) und beide gemeinsam (lila). Der Inkubationszeitraum betrug 28, 56, 84, 117, 140 und 162 Tage.

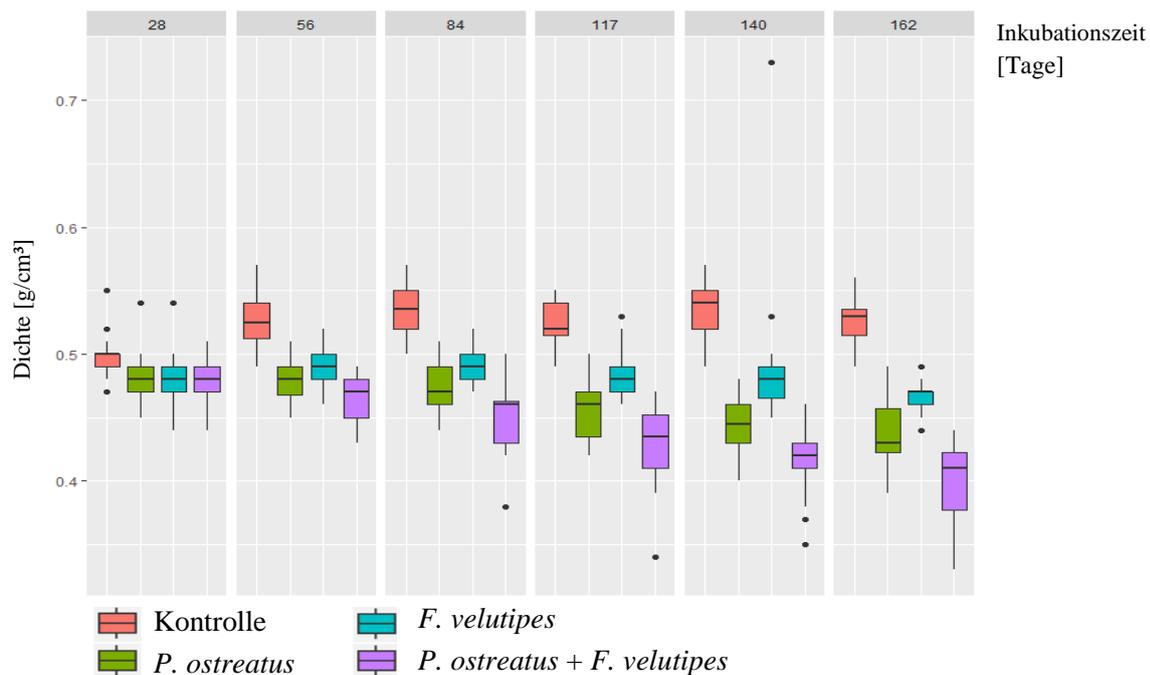


Abbildung 28: Box-Whisker-Plot der Dichte [g/cm³] und dessen zeitliche Änderung innerhalb des Versuches nach 28, 56, 84, 117, 140 und 162 Tage bei Rosskastanienprüfkörpern. Kontrollprüfkörper (rot), *P. ostreatus* (grün), *F. velutipes* (blau) und beide gemeinsam (lila).

waren zwischen den Inkubationsvarianten noch keine Unterschiede erkennbar. Entsprechend der Masseverluste (s. Abbildung 28 und Tabelle 17) wurde die Dichte ab 56 Tagen durch die Inkubation beider Pilze gemeinsam am stärksten beeinflusst. Die Dichte nahm durch *P. ostreatus* am zweitstärksten ab, gefolgt durch die Änderung, die durch *F. velutipes* verursacht wurde.

4.6.1.3 Festigkeitsänderungen

Über den gesamten Versuchszeitraum wurde für die Kontrollgruppen im Median eine Festigkeit zwischen 67,55–94,87 N/mm² ermittelt. Die Biegefestigkeitswerte wurden mit Hilfe der Kontrollgruppen normiert (als 100 % Festigkeit) und anschließend die prozentualen Änderungen durch die Inkubation der Pilze ermittelt. *F. velutipes* erreichte bereits nach 84 Tagen den für ihn höchsten Festigkeitsverlust von 37,98 % bei einem Masseverlust von 6,6 %. Durch beide Pilze gemeinsam wurde der höchste Festigkeitsverlust (39,02 %) nach 140 Tagen bei einem Masseverlust von 19 % erreicht. Auch *P. ostreatus* erreichte seinen höchsten Festigkeitsverlust (34,08 %) bei 15,35 % Masseverlust nach 140 Tagen (s. Abbildung 29 und Tabelle 17).

Die Biegefestigkeit nach Holzabbau der einzelnen Inkubationsvarianten unterscheidet sich in jedem Fall signifikant von den unbehandelten Kontrollen (Tukey-Test, $p > 0,05$; s. Tabelle 18). Zwischen den Inkubationsvarianten konnten nicht immer signifikante Unterschiede ermittelt werden.

F. velutipes verursachte im Vergleich zur Inkubation von *P. ostreatus* und beiden Pilzen gemeinsam die größten Festigkeitsverluste bei geringstem Masseverlust. Unabhängig von der Inkubationszeit nahm die Biegefestigkeit durch *F. velutipes* bereits bei einem Masseverlust von unter 10 % um ca. 12 % mehr ab, als durch *P. ostreatus* und beide Pilze gemeinsam (s. Abbildung 30).

4 Ergebnisse

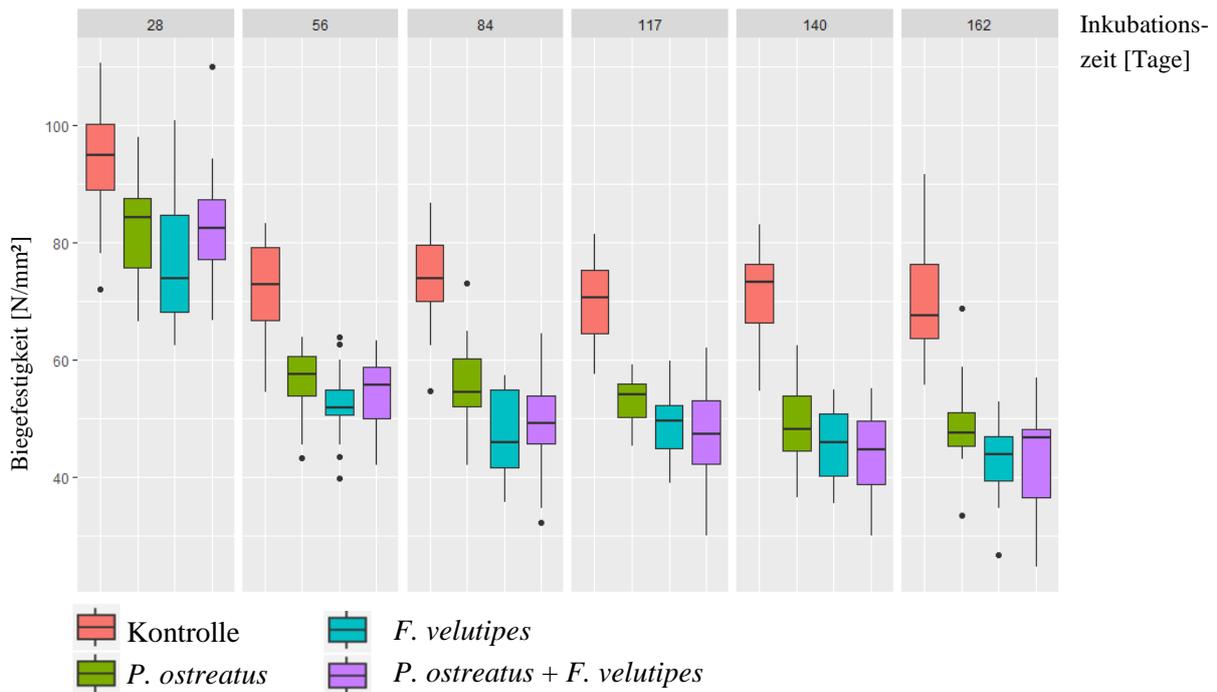


Abbildung 29: Box-Whisker-Plot der 4-Punkt-Biegefestigkeit [N/mm²] von Holz der Weißblühenden Rosskastanie (Kontrolle: (Kontrolle: rot) nach Abbau durch *P. ostreatus* (grün) und *F. velutipes* (blau) und beiden gemeinsam (lila). Dargestellt ist die zeitabhängige Biegefestigkeit nach 28, 56, 84, 117, 140 und 162 Tagen.

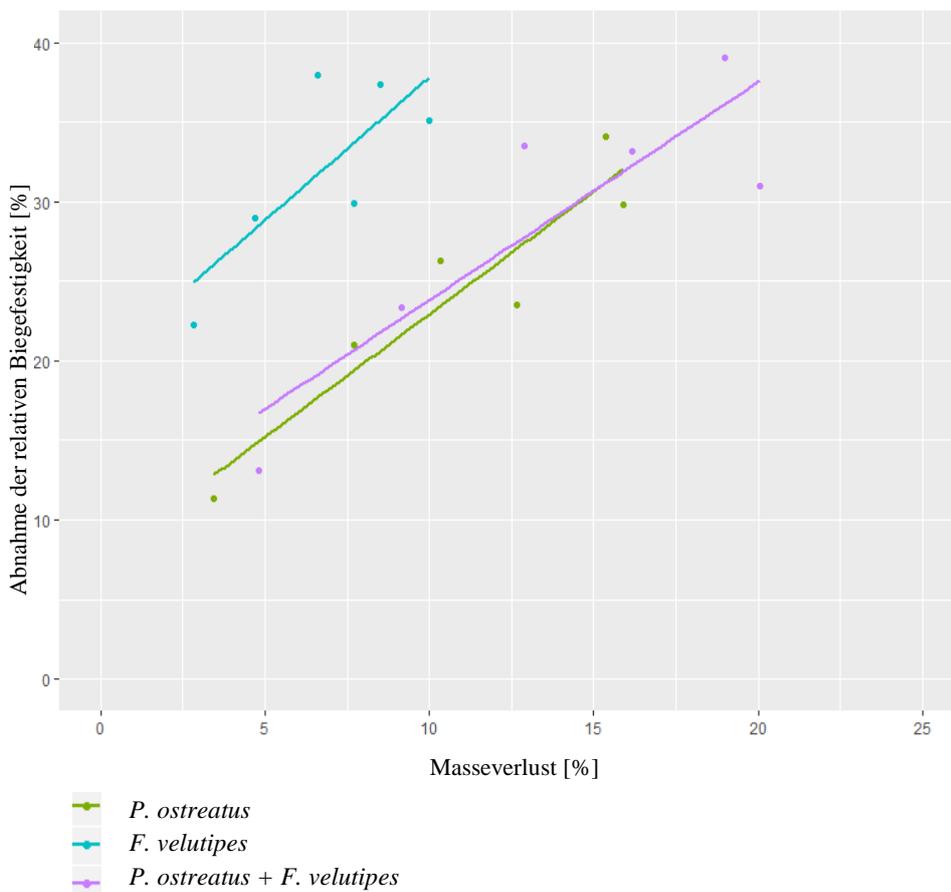


Abbildung 30: Abnahme der Biegefestigkeit [%] bezogen auf die Kontrolle im Zusammenhang mit dem prozentualen Masseverlust unabhängig von der Zeit. Grün: *P. ostreatus*, blau: *F. velutipes*, lila: *P. ostreatus + F. velutipes*.

Ab einem Masseverlust von ca. 14 % glich sich der Festigkeitsverlust durch *P. ostreatus* und beide Pilze gemeinsam an (s. Abbildung 30). Da nur durch beide Pilze gemeinsam ein höherer Masseverlust als 16 % verursacht wurde, kann ab diesem Masseverlust kein Vergleich mit den Einzelinkubationen stattfinden. Die Variationskoeffizienten liegen aber unter den zu erwartenden 16 % (zusammengefasst in NIEMZ 2008). Lediglich bei der Inkubation beider Pilze gemeinsam wird dieser Wert nach 117, 140 und 162 Tagen überschritten.

4.6.1.4 Elastizitätsmoduländerungen

Der Median des Biege-E-Moduls lag nach Prüfung der Festigkeit bei den Kontrollprüfkörpern zwischen 5945 und 8975 N/mm² über den gesamten Versuchszeitraum (s. Tabelle 17). Für den jeweiligen Versuchszeitraum gelten die entsprechenden E-Moduln der Kontrollgruppen als 100 %. Ausgehend von den normierten Kontrollgruppen ergaben sich nach Holzabbau unterschiedlich hohe prozentuale Abnahmen in der Steifigkeit. Ähnlich wie bei der Biegefestigkeit, wurde wieder durch die Inkubation von *F. velutipes* bei geringstem Masseverlust verhältnismäßig der größte Elastizitätsverlust erreicht. Bei nahezu doppelt so hohen Masseverlusten erreichte weder *P. ostreatus* noch die Inkubation beider Pilze gemeinsam den höchsten durch *F. velutipes* verursachten Elastizitätsverlust von 30,9 % bei einem Masseverlust bis 10 %.

Mit Ausnahme von der Inkubation von *P. ostreatus* zu den Zeitpunkten 28 und 140, sowie der Inkubation beider Pilze gemeinsam zu den Zeitpunkten 28 und 162 wurden durch den Tukey-Test bei einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ signifikante Unterschiede zu den Kontrollgruppen ermittelt (s. Abbildung 31 und Tabelle 18).

Die Variationskoeffizienten übersteigen in keinem Fall die von NIEMZ (2008) vorgeschlagenen 22 %.

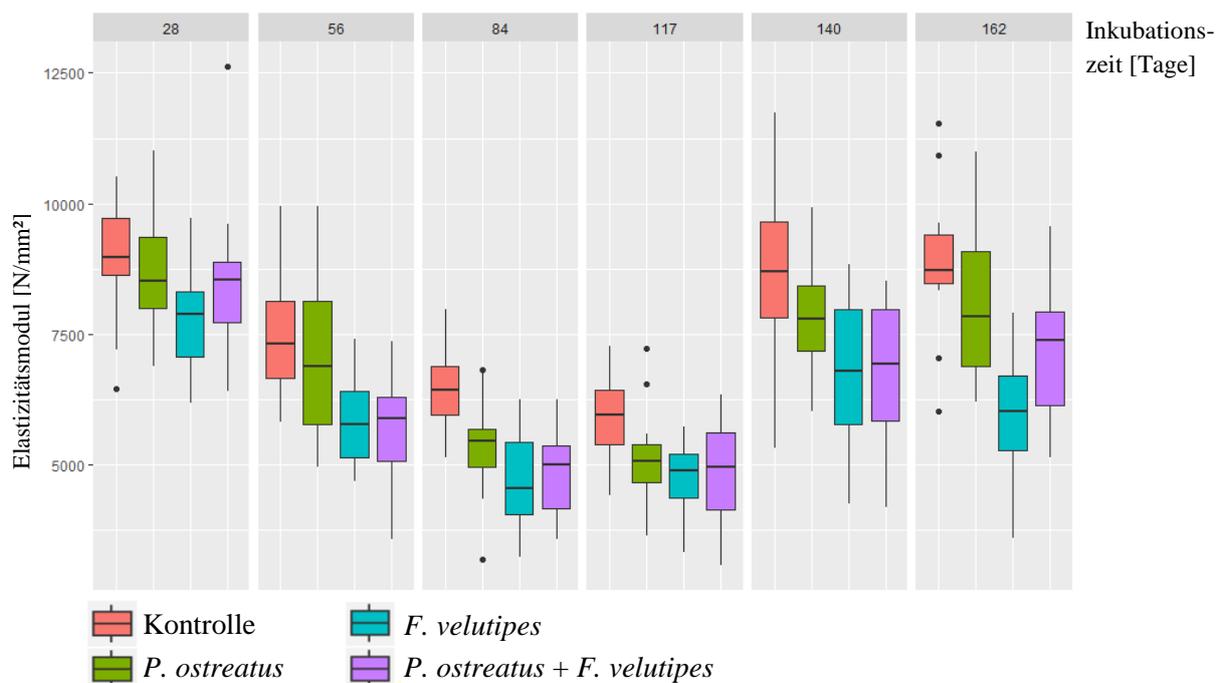


Abbildung 31: Box-Whisker-Plot des Biege-E-Moduls [N/mm²] von Holz der Weißblühenden Rosskastanie (Kontrolle: rot) nach Abbau durch *P. ostreatus* (grün) und *F. velutipes* (blau) und beiden gemeinsam (lila). Dargestellt ist die zeitabhängige Änderung des Biege-E-Moduls nach 28, 56, 84, 117, 140 und 162 Tagen.

4 Ergebnisse

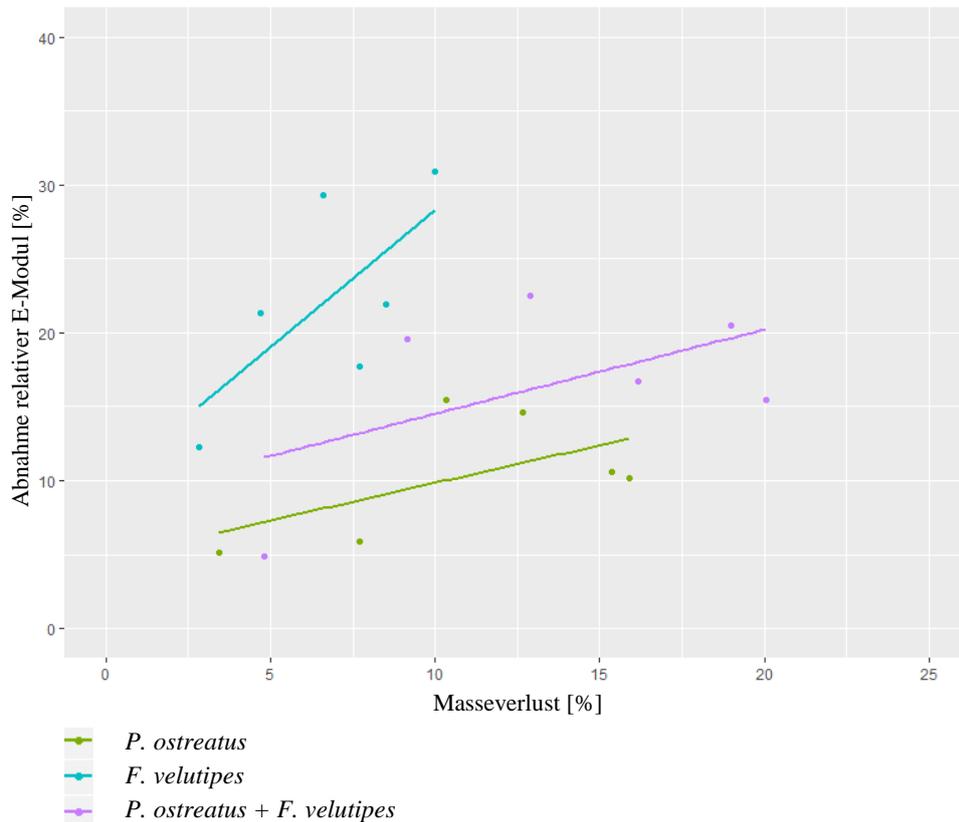


Abbildung 32: Abnahme des E-Moduls in [%] bezogen auf die Kontrolle im Zusammenhang mit dem prozentualen Masseverlust unabhängig von der Zeit. Grün: *P. ostreatus*, blau: *F. velutipes*, lila: *P. ostreatus + F. velutipes*.

Der Einfluss des Masseverlustes auf den E-Modul ist in Abbildung 32 dargestellt. Es wird deutlich, dass auch hier *F. velutipes* den größten negativen Einfluss auf den E-Modul hat. Bei verhältnismäßig geringem Masseverlust (unter 10 %) hat der E-Modul bereits um 50 % mehr abgenommen als durch *P. ostreatus* und etwa um 3 % mehr als durch beide Pilze gemeinsam. Bei höheren Masseverlusten als 10 % wird deutlich, dass beide Pilze gemeinsam einen vergleichsweise stärkeren negativen Einfluss auf den E-Modul haben, als *P. ostreatus* alleine. Ein Vergleich mit dem Einfluss von *F. velutipes* kann auch hier nicht weiter als bis zu einem Masseverlust von 10 % erfolgen.

Tabelle 17: Ergebnisse der 4-Punkt-Biegeprüfung, des E-Moduls [N/mm²], des Masseverlusts [%] und der Dichte [g/cm³], jeweils mit Standardabweichung (sd), sowie der Prüfkörperanzahl [1] in Abhängigkeit des inkubierten Pilzes und der Zeit.

Pilz	Tage	4-Punkt-Biegefestigkeit [N/mm ²]		E-Modul [N/mm ²]		Masseverlust [%]		Dichte [g/cm ³]		Anzahl [1]
		Median	sd	Median	sd	Median	sd	Median	sd	n
Kontrolle	28	94,87	9,99	8975,03	1038	0,11	0,12	0,5	0,02	20
	56	72,72	8,53	7324,39	1029,28	0,2	0,18	0,53	0,02	23
	84	73,9	7,6	6436,89	733,09	0,4	0,11	0,54	0,02	24
	117	70,63	7,39	5945,03	796,19	0,6	2,44	0,52	0,02	23
	140	73,12	7,57	8704,6	1557,91	0,5	0,14	0,54	0,02	22
	162	67,55	10,5	8728,15	1332,19	0,5	0,25	0,53	0,01	15
<i>P. ostreatus</i>	28	84,12	8,73	8515,33	947,92	3,45	1,18	0,48	0,02	23
	56	57,48	5,55	6893,26	1360,57	7,7	1,89	0,48	0,02	24
	84	54,49	6,58	5443,49	839,68	10,35	2,45	0,47	0,02	24
	117	54	3,74	5074,12	766,81	12,65	1,9	0,46	0,02	23
	140	48,2	6,48	7781,76	986,9	15,35	3,07	0,44	0,01	24
	162	47,43	6,84	7844,11	1398,44	15,9	3,72	0,44	0,03	21
<i>F. velutipes</i>	28	73,77	10,05	7875,56	1060,02	2,84	0,65	0,48	0,02	22
	56	51,67	5,69	5760,35	805,89	4,7	2,14	0,49	0,02	23
	84	45,83	6,9	4550,66	860,25	6,6	1,04	0,49	0,02	21
	117	49,49	5,65	4889,26	606,2	7,7	1,55	0,48	0,03	20
	140	45,77	6,4	6799,78	1360,77	8,5	1,61	0,49	0,02	22
	162	43,83	6,4	6031,32	1097,29	10	1,65	0,47	0,02	24
<i>P. ostreatus</i> + <i>F. velutipes</i>	28	82,45	9,52	8537,28	1256,5	4,81	1,25	0,48	0,05	24
	56	55,72	5,96	5888,36	992,4	9,15	1,96	0,47	0,02	24
	84	49,15	7,77	4989,17	748,34	12,9	3,91	0,45	0,02	24
	117	47,19	7,86	4952,66	881,94	16,15	4,16	0,43	0,02	24
	140	44,59	7,42	6917,25	1266,08	19	3,71	0,42	0,03	22
	162	46,61	8,87	7378,96	1176,79	20,05	6,83	0,4	0,03	24

Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der prozentualen Abnahme der Biegefestigkeit und des E-Moduls sowie des Masseverlusts und der Dichte aus dem 4-Punkt-Biegeversuch.

Pilz	Tage	Prozentuale Abnahme im Vergleich zur Kontrolle [%]		Masseverlust [%]	Dichte [g/cm ³]
		Festigkeit	E-Modul		
<i>P. ostreatus</i>	28	11,33 ^{c,d}	5,12 ^{a,d}	3,45	0,48
	56	20,96 ^{c,d}	5,89 ^d	7,7	0,48
	84	26,27	15,43 ^c	10,35	0,47
	117	23,55 ^c	14,65 ^d	12,65	0,46
	140	34,08 ^{c,d}	10,60 ^{a,c}	15,35	0,44
	162	29,79 ^c	10,13 ^d	15,9	0,44
<i>F. velutipes</i>	28	22,24 ^{b,d}	12,25 ^d	2,84	0,48
	56	28,95 ^{b,d}	21,35 ^d	4,7	0,49
	84	37,98 ^d	29,30 ^d	6,6	0,49
	117	29,93 ^{b,d}	17,76 ^{b,d}	7,7	0,48
	140	37,40 ^{b,d}	21,88 ^d	8,5	0,49
	162	35,11 ^{b,d}	30,90	10	0,47
<i>P. ostreatus</i> + <i>F. velutipes</i>	28	13,09 ^{c,b}	5,56 ^{a,b,c}	4,81	0,48
	56	23,38 ^{c,b}	24,93 ^c	9,15	0,47
	84	33,49 ^c	31,81 ^c	12,9	0,45
	117	33,19 ^c	20,30 ^{c,b}	16,15	0,43
	140	39,02 ^{b,c}	26,29 ^{b,c}	19	0,42
	162	31,00 ^{b,c}	22,37 ^{a,b}	20,05	0,4

a: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle

c: kein signifikanter Unterschied zu *F. velutipes*b: kein signifikanter Unterschied zu *P. ostreatus*d: kein signifikanter Unterschied zu *P. ostreatus* + *F. velutipes*

4.6.2 Bruchschlagarbeit

Auf Grund anfänglich fehlerhafter Bedienung der Prüfeinrichtung konnte nur der letzte Ausbaupunkt (162 Tage) ausgewertet werden. Dadurch konnte kein Vergleich zu früheren Ausbaupunkten stattfinden. Die Kontrollprüfstäbe, die keinem Holzabbau ausgesetzt waren, wiesen eine Bruchschlagarbeit von 10,99 kJ/m² auf. Durch *P. ostreatus* nahm der Wert um 43,41 % auf 5,15 kJ/m² ab, durch *F. velutipes* 57,25 % auf 3,89 kJ/m² und durch beide Pilze gemeinsam um 53,73 % auf 4,21 kJ/m² ab (s. Tabelle 19 und Abbildung 33).

Alle pilzlich abgebauten Prüfstäbe unterscheiden sich nach dem Tukey-Test in ihrer Bruchschlagarbeit und im Masseverlust signifikant von den Kontrollgruppen ($p > 0,05$). Zwischen der von *P. ostreatus* und *F. velutipes* und beiden gemeinsam abgebauten Prüfkörpern konnten keine signifikanten Unterschiede in der Bruchschlagarbeit festgestellt werden (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Abnahme der Bruchschlagarbeit [kJ/m²] nach 162 Tagen Versuchsdauer. Angegeben sind der Median und der Masseverlust, sowie dessen Standardabweichung (sd) und die zugehörige Prüfkörperanzahl [1].

Pilz	Bruchschlagarbeit [kJ/m ²]			Masseverlust [%]		Darrdichte [g/cm ³]		Anzahl [1]
	Median	sd	Änderung [%]	Median	sd	Median	sd	
Kontrolle	10,99	2,79	-	0,5	0,25	0,5	0,02	15
<i>P. ostreatus</i>	5,15 ^{c,d}	1,33	43,41	16,8	4,21	0,42	0,03	23
<i>F. velutipes</i>	3,89 ^{b,d}	1,52	57,25	9,3	1,81	0,45	0,02	23
<i>P. ostreatus</i> + <i>F. velutipes</i>	4,21 ^{b,c}	1,05	53,73	20,7	5,09	0,38	0,03	24

a: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle

b: kein signifikanter Unterschied zu *P. ostreatus*

c: kein signifikanter Unterschied zu *F. velutipes*

d: kein signifikanter Unterschied zu *P. ostreatus* + *F. velutipes*

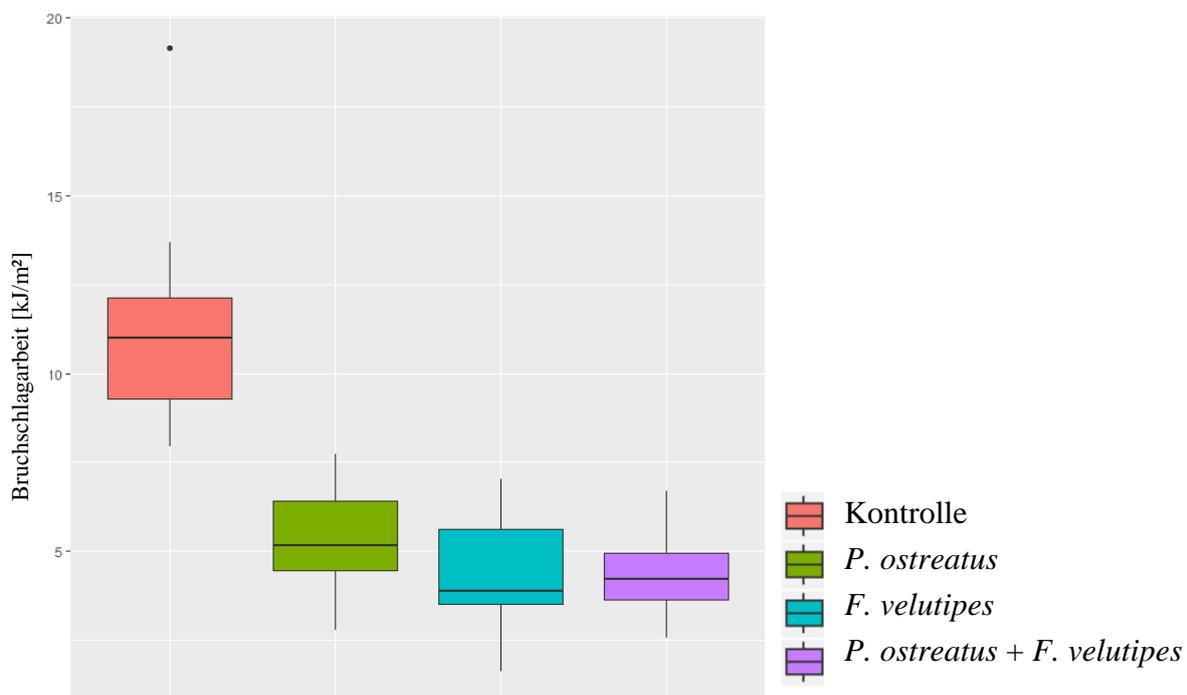


Abbildung 33: Box-Whisker-Plot der Bruchschlagarbeit [kJ/m²] nach 162 Tagen Versuchsdauer. Änderung der Bruchschlagarbeit durch Inkubation von *P. ostreatus* (grün), *F. velutipes* (blau) und beide gemeinsam (lila) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (rot).

4.7 Inokulation

Die am Komplexschaden beteiligten Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. ostreatus* wurden getrennt voneinander und gemeinsam in Weißblühende Rosskastanien inokuliert (s. Abschnitt 3.7). Baum K1 (s. Tabelle 5) konnte nicht ausgewertet werden, da die Verfärbungen im Holz ineinander übergingen und nicht eindeutig einer Inokulationsvariante zugeordnet werden konnten.

Die Messung der Verfärbungen erwies sich in einigen Fällen als schwierig, da durch die Bandsäge eine sägerauhe Oberfläche beim Schneiden entstand. Außerdem musste teilweise eine Schnittfuge von 3 mm berücksichtigt werden. Bei der Messung der tangentialen Ausbreitung in der Querschnittsfläche wurden dementsprechend jeweils 3 mm addiert.

Beim Auftrennen der einzelnen Ebenen konnte weiterhin festgestellt werden, dass bereits Unterschiede in der Ausbreitung der Verfärbung links- und rechtsseitig der Sägefläche auftreten können. Dies wurde besonders bei der Messung der Flächenausbreitung in axialer Richtung deutlich.

Die arithmetischen Mittel der Messungen sind in Abbildung 34 zusammenfassend dargestellt. Die Mittelwerte der einzelnen Bäume und Ebene finden sich in Tabelle 20.

4.7.1 Kallusbildung

Bei allen Bäumen waren nach Ende des Versuches die Inokulationswunden durch Wundkalli verschlossen. Da die Wunden mit den „Rindenplugs“ teilweise verschlossen waren, kann der Beginn der Kallusbildung nicht überall nachvollzogen werden.

4.7.2 Verfärbte Fläche axial und in der Dübelebene im Querschnitt

4.7.2.1 Baum K2

Die axiale Ausbreitung der verfärbten Fläche in Baum K2 in Ebene 1 war bei *F. velutipes* die größte. Die nächst größere Verfärbung wurde durch *P. ostreatus*, gefolgt durch beide Pilze gemeinsam und der Kontrolle verursacht. In der Ebene 2 verursachte *P. ostreatus* die größten Verfärbungen. Die Verfärbungen durch *F. velutipes* waren am zweitgrößten und die durch beide Pilze gemeinsam kleiner als diese.

Die Verfärbungen waren lediglich bei *F. velutipes* und *P. ostreatus* oberhalb der Dübelebene größer.

Im Querschnitt verfärbten sich die Gewebeteile in unmittelbarer Nähe der Inokulationsdübel bei *F. velutipes* in beiden Ebenen am stärksten, gefolgt von *P. ostreatus*, beiden Pilzen gemeinsam und der Kontrollinokulation.

4.7.2.2 Baum K3

Die Flächen der axialen Verfärbungen in Baum K3 in der Ebene 1 zeigten das gleiche Bild wie bei Baum K2 in der Ebene E1. Durch *F. velutipes* wurde die größte Verfärbung verursacht. *P. ostreatus* und beide Pilze gemeinsam verursachten eine fast gleichgroße Verfärbung. Die Kontrollinokulation rief die kleinste Verfärbung hervor.

In Ebene 2 konnte *P. ostreatus* die größte Verfärbung verursachen, gefolgt von *F. velutipes*, beiden gemeinsam und der Kontrollinokulation. Die Verfärbungen waren in jedem Fall oberhalb der Dübelebene größer als unterhalb.

4 Ergebnisse

In den Dübelebenen im Querschnitt verursachte *F. velutipes* die größte Verfärbung. *P. ostreatus* zusammen mit *F. velutipes* verursachte die zweitgrößte Verfärbung, gefolgt von *P. ostreatus* und der Kontrollinokulation.

4.7.2.3 Baum K4

In Baum K4 breitete sich die durch *F. velutipes* verursachte Verfärbung axial und im Querschnitt am stärksten aus. Die Verfärbungen durch *P. ostreatus* und beiden Pilzen gemeinsam waren in axialer Richtung nahezu gleich groß. Am wenigsten breitete sich die Verfärbung durch die Kontrollinokulation aus. In der verfärbten Querschnittsfläche breitete sich nach *F. velutipes* die Verfärbung durch beide Pilze gemeinsam stärker aus als durch *P. ostreatus* und die Kontrolle.

4.7.3 Länge der axialen Verfärbung

4.7.3.1 Baum K2

Die Verfärbungen durch *P. ostreatus* sind in beiden Ebenen länger als die durch *F. velutipes* und die von beiden Pilzen gemeinsam verursachten. Die geringste Verfärbung wurde durch die nicht infizierten Dübel hervorgerufen. Die Verfärbungen oberhalb des Inokulationsdübels waren in jedem Fall länger als unterhalb.

4.7.3.2 Baum K3

In Ebene 1 waren die durch *P. ostreatus* verursachten Verfärbungen am längsten, gefolgt von denen, die durch *F. velutipes* verursacht wurden. Es folgten die Verfärbungen, die durch beide Pilze gemeinsam und dann die, die durch die Kontrolle verursacht wurden.

In Ebene 2 verursachte *F. velutipes* die längsten Verfärbungen, gefolgt von *P. ostreatus*. Die Verfärbung, die durch beide Pilze gemeinsam hervorgerufen wurde, folgte der durch *P. ostreatus*. Diese war größer als die Verfärbung durch die Kontrolle. Auch hier waren die Verfärbungen oberhalb des Dübels länger als unterhalb.

4.7.3.3 Baum K4

Insgesamt war die Verfärbung, die durch beide Pilze gemeinsam verursacht wurde, in K4 am größten. Es folgten die Verfärbungen durch *F. velutipes*, darauf die durch *P. ostreatus* und die durch die Kontrolle verursachte Verfärbung. Die Verfärbungen der Kontrollinokulation waren oberhalb kürzer als unterhalb. Die anderen Inokulationsavarianten zeigten dasselbe Bild wie in K2 und K3.

4.7.4 Länge der tangentialen und radialen Verfärbung in Querschnitt

4.7.4.1 Baum K2

In tangentialer Richtung breitete sich *F. velutipes* in beiden Ebenen am stärksten aus. Es folgten *P. ostreatus*, beide Pilze gemeinsam und die Kontrollinokulation.

In radialer Richtung war dieses Muster ebenfalls zu erkennen.

4.7.4.2 Baum K3

In K3 stellte sich in Ebene 1 dasselbe Bild wie in K2 ein. Sowohl in tangentialer, als auch in radialer Richtung breitete sich *F. velutipes* stärker aus als *P. ostreatus* und beide gemeinsam.

In Ebene 2 wurden durch *P. ostreatus* in tangentialer und radialer Richtung die größten Verfärbungen ausgelöst. Beide Pilze gemeinsam und *F. velutipes* verursachten geringere Verfärbungen.

Die Kontrollinokulation breitet sich auch hier in beiden Ebenen am geringsten aus.

4.7.4.3 Baum K4

In tangentialer Richtung konnte sich *F. velutipes* am stärksten ausbreiten, gefolgt von beiden Pilzen gemeinsam und *P. ostreatus*. Die radialen Verfärbungen waren durch beide Pilze gemeinsam größer als durch *F. velutipes* oder *P. ostreatus*.

In der zweiten Inokulationsebene rief *P. ostreatus* in der verfärbten Fläche die größte Verfärbung hervor. *F. velutipes* verursachte die zweitgrößte Verfärbung, beide gemeinsam die nächst größte und die Kontrolle die geringste Verfärbung.

Die Kontrollinokulation breitet sich ebenfalls in beiden Ebenen am geringsten aus.

4.7.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ausbreitung der durch die Inokulation verursachten Verfärbungen in den Sprossachsen der *A. hippocastanum* werden in Tabelle 20 und Abbildung 34 zusammengefasst.

In tangentialer Richtung breitete sich *F. velutipes* dreimal am weitesten aus. *P. ostreatus* und beide Pilze gemeinsam je einmal. Radial verteilte sich die maximale Ausbreitung der Verfärbung auf *F. velutipes* (fünffmal) und *P. ostreatus* (einmal). Parallel zur Sprossachse in axialer Richtung breitete sich *P. ostreatus* dreimal, *F. velutipes* und beide Pilze gemeinsam einmal am stärksten aus. Die maximale flächenmäßige Ausbreitung in axialer Richtung wurde durch *F. velutipes* in drei Fällen dominiert. *P. ostreatus* breitete sich hier zweimal weiter aus. Im Querschnitt der Dübelebene breiteten sich die Verfärbungen, die durch *F. velutipes* verursacht wurden, in vier Fällen stärker aus, als die durch die Inokulation von *P. ostreatus*, der sich nur einmal weiter ausbreitete als *F. velutipes*. Die verfärbte Fläche war, bis auf drei Fälle (K2 E1 *F. velutipes*, und E2 *P. ostreatus* sowie K4 E1 beide Pilze gemeinsam), immer oberhalb größer als unterhalb.

In der Länge der axialen Ausbreitung konnten drei Ausnahmen, bei denen die Verfärbung unterhalb größer als die oberhalb war, festgestellt werden (K2 E1 *F. velutipes*, K3 E1 *P. ostreatus* und K4 E1 beide gemeinsam).

Die nicht infizierten Dübel der Kontrollinokulationen konnten in keinem Fall eine maximale Ausbreitung einer Verfärbung hervorrufen.

In keinem Fall konnte sich nach Beendigung des Versuches in den verfärbten Bereichen eine makroskopisch erkennbare Weißfäule etablieren.

4 Ergebnisse

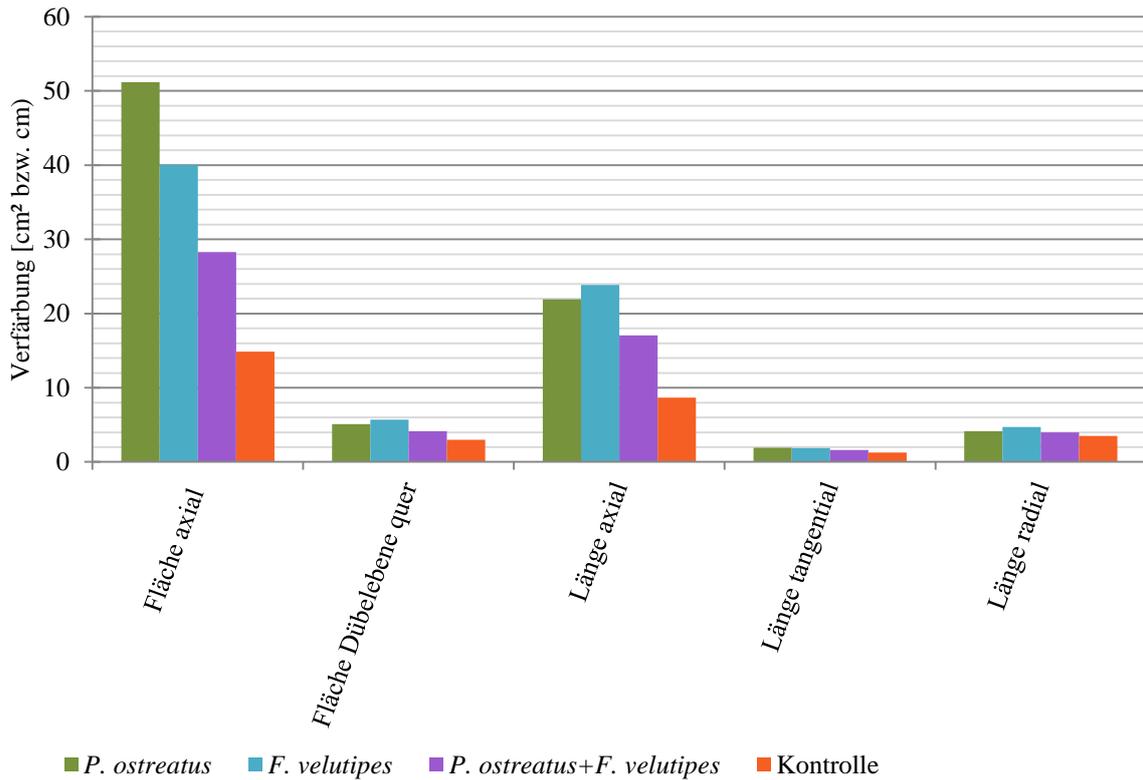


Abbildung 34: Arithmetische Mittel der Verfärbungen in der Sprossachse unabhängig von Baum und Ebene. Fläche axial und Fläche Dübelebene quer [cm²], Länge axial, tangential und radial [cm]. *P. ostreatus* (grün), *F. velutipes* (blau), beide gemeinsam (lila) und Kontrolle (rot).

Tabelle 20: Zusammenfassung des Inokulationsversuchs nach maximaler Ausbreitung in der Sprossachse der inokulierten *A. hippocastanum*.

Verfärbungen nach Ebene										
	axial [cm]		Fläche axial [cm ²]		tangential [cm]		radial [cm]		Dübelebene quer [cm ²]	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2
K2										
<i>P. ostreatus</i>	26,36	21,15	31,57	55,41	1,80	2,03	3,78	4,81	3,97	6,86
<i>F. velutipes</i>	21,47	14,56	44,06	42,36	2,01	2,25	4,77	6,34	5,74	7,63
<i>P. ostreatus</i> + <i>F. velutipes</i>	17,91	14,01	25,76	38,24	1,39	1,66	3,45	4,24	3,44	5,13
Kontrolle	12,89	10,22	20,31	23,58	1,20	1,87	3,29	3,80	2,55	4,19
K3										
<i>P. ostreatus</i>	29,27	17,84	35,22	95,59	1,55	2,32	3,59	4,74	4,67	6,69
<i>F. velutipes</i>	20,08	42,45	54,74	51,41	1,80	1,52	4,33	3,43	5,43	5,68
<i>P. ostreatus</i> + <i>F. velutipes</i>	14,39	15,27	30,43	34,82	1,54	1,30	3,94	3,83	4,85	3,77
Kontrolle	6,90	7,38	13,90	20,13	0,78	0,91	3,40	3,26	2,82	2,96
K4										
<i>P. ostreatus</i>	14,94	-	38,12	-	1,82	-	3,95	-	3,37	-
<i>F. velutipes</i>	20,65	-	47,58	-	1,81	-	4,60	-	3,93	-
<i>P. ostreatus</i> + <i>F. velutipes</i>	23,71	-	40,47	-	2,15	-	4,34	-	3,59	-
Kontrolle	5,86	-	11,14	-	1,65	-	3,74	-	2,50	-

5 Diskussion

Anlass dieser Untersuchung ist die neuartige Rosskastanien-Komplexkrankheit, die durch *Pleurotus ostreatus* und *Flammulina velutipes* charakterisiert ist und bei der Weiß- und Rotblühenden Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum* und *Aesculus x carnea*) auftritt. Das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) wird hierbei als Primärschädling eingestuft. *P. ostreatus* und *F. velutipes* gelten als Sekundärschädlinge und sind als Verursacher einer Weißfäule für die schnelle Gefährdung der Bruchsicherheit betroffener Bäume verantwortlich (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014, DUJESIEFKEN et al. 2016). Das Vorkommen beider Basidiomyceten nebeneinander in einem Schadbild an Rosskastanien war bis zum Auftreten dieser Krankheit nicht bekannt (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014, DUJESIEFKEN et al. 2016) und stellt eine Besonderheit dar.

Es liegen bislang keine Untersuchungen zu dem Krankheitsverlauf und der entstehenden Weißfäule vor, die im Baum ungewöhnlich rasch voranschreiten kann. Da die Verkehrssicherheit betroffener Rosskastanien ohne Kenntnisse über das Gefahrenpotential von *P. ostreatus* und *F. velutipes* nicht sicher beurteilt werden kann, wurden in dieser Untersuchung mykologische, holzphysikalische und molekularbiologische Verfahren entwickelt und angewandt, die Aufschluss über das von den Pilzen ausgehende Gefahrenpotential und die Pilz-Wirt-Interaktion geben sollen. Aktuell kann an Hand eigener Funde von einer Verbreitung des Krankheitsbildes von Helgoland nach Rügen und von Fanø (Dänemark) nach München ausgegangen werden. Die Verbreitung in ganz Mitteleuropa gilt zudem als wahrscheinlich (DUJESIEFKEN 2018).

5.1 Stand des Wissens

Abhängig von der Jahreszeit, in der eine Rosskastanie beurteilt wird, treten die Schadsymptome unterschiedlich stark auf. Verursacht durch das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) werden schwarze Leckstellen auf der Borke sichtbar (SCHMIDT et al. 2008, GREEN et al. 2009, STEELE et al. 2010, DUJESIEFKEN et al. 2016), die in den Frühjahrs- und Sommermonaten entstehen und später eintrocknen. Diese bleiben das ganze Jahr über erkennbar, ebenso die Rindenrisse, die durch das Abplatzen der abgestorbenen Borkenpartien entstehen. Die abgestorbenen Borkenpartien sind auf die Infektion mit dem Bakterium zurückzuführen. Abgestorbene Kronenteile fallen ab dem Beginn des Laubaustriebes im Frühjahr auf. Das Absterben der Kronenteile kann auch im Sommer erfolgen und äußert sich dann durch vorzeitiges Abwerfen des Laubes. Die Infektion mit Psa erfolgt offenbar über Wunden oder natürliche Öffnungen in der Rinde (SCHMIDT et al. 2014; GREEN et al. 2009; STEELE et al. 2010) oder im Blatt (MULLETT und WEBBER 2013). Bei ausreichender Schädigung dienen die abgestorbenen Rindenpartien als Eintrittspforte für die holzerstörenden Basidiomyceten *P. ostreatus* und *F. velutipes* (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014, DUJESIEFKEN et al. 2016). Aus der Besiedlung der Wunden mit holzerstörenden Pilzen resultiert die Gefährdung der Bruchsicherheit. In den Wintermonaten erfolgt die Bildung der Pilzfruchtkörper von *P. ostreatus* und *F. velutipes*, an Hand derer auf die Beteiligung der Pilze am Schaden geschlossen werden kann. Die Fruchtkörper erscheinen sowohl in den Rindenrissen als auch an augenscheinlich gesunder Rinde vom Stammfuß bis in die Krone (DUJESIEFKEN 2018). Andere Pilzfruchtkörper beteiligter Basidiomyceten können das ganze Jahr auftreten. Der Violette Knorpelschichtpilz (*C. purpureum*) bildet seine

Fruchtkörper auf den Ästen in der Krone. Der Angebrannte Rauchporling (*B. adusta*) konnte erst durch Nachweis seiner DNS als beteiligter Basidiomycet identifiziert werden (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014) und wächst oft unter bereits abgestorbenen Rindenpartien (SEEHANN 1979). Die Krankheit betrifft Bäume jeder Altersklasse.

Neben dem in dieser Untersuchung beschriebenen Schadbild haben auch andere Pilzkrankungen einen erheblichen Einfluss auf die Verkehrssicherheit von Bäumen. Dazu zählt beispielsweise die Massaria-Krankheit der Platane, die innerhalb weniger Monate die Bruchsicherheit betroffener Bäume herabsetzen kann (DUJESIEFKEN et al. 2005, DUJESIEFKEN et al. 2011). Verursacht wird die Krankheit, die bei *Platanus occidentalis* L, *P. orientalis* L und *P. x hispanica* (Mill.: Münch) vorkommt, durch den Ascomyceten *Splanchnonema platani* (Synonym: *Massaria platani*). Bei Baumkontrollen vom Boden aus kann die Infektion auf der Astoberseite übersehen werden, wodurch dann die Bruchsicherheit eines befallenen Baumes möglicherweise falsch eingeschätzt wird. Wird der Befall frühzeitig erkannt, kann durch Beseitigen befallener Äste der Befallsdruck verringert und die Verkehrssicherheit wieder hergestellt werden (DUJESIEFKEN et al. 2005).

Das „Ulmensterben“, welches seit Anfang des 20. Jahrhunderts europaweit Ulmenbestände gefährdet, wird wie die Massaria-Krankheit durch einen Ascomyceten (*Ophiostoma novo-ulmi*) verursacht (BRASIER 1991). Die Infektion der Ulmen mit *O. novo-ulmi* erfolgt durch den Ulmensplintkäfer (*Scolytus scolytus*), der als Zwischenwirt fungiert und den Pilz bei der Eiablage oder durch die Fraßgänge der Larven auf den Baum überträgt. Der Pilz bewirkt durch seine Anwesenheit das Absterben der Bäume durch Verstopfen der Gefäße.

Bei der Massaria-Krankheit und dem Ulmensterben handelt es sich um Erkrankungen, die von je einem Ascomyceten verursacht werden, dessen Vorkommen sich auf eben diese Krankheiten beschränkt und eine hohe Wirtsspezifität zeigt. Gleiches gilt für die Infektion der Rosskastanien durch Psa, das ebenso eine hohe Wirtsspezifität aufweist, da dieses Pathovar bislang nur an Arten der Gattung *Aesculus* nachgewiesen wurde (WEBBER et al. 2008, STEELE et al. 2010, MÜLLER-NAVARRA et al. 2014). Folgt einer Psa-Infektion die Besiedlung durch *P. ostreatus* und *F. velutipes*, muss die Situation für den betroffenen Baum neu eingeschätzt werden, da durch die Pilze eine Weißfäule verursacht wird. Ein Vorkommen beider Pilze in einem Schadbild in direkter Nachbarschaft in einem Baum ist bisher nicht dokumentiert. Bis zum Auftreten beider Pilze im Zusammenhang mit Psa galten diese als wenig aggressiv (LYR und ZIEGLER 1959; SEEHANN 1979; SCHLECHTE 1986; ROLOFF 2005, TEROH et al. 2007).

5.2 Ergebnisdiskussion

Entsprechend der Ergebnisse von MÜLLER-NAVARRA et al. (2014) konnte auch in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden, dass *P. ostreatus* und *F. velutipes* in direkter Nachbarschaft innerhalb des abgebauten Holzes vorkommen. An den mittels Multiplex-PCR molekularbiologisch untersuchten Abschnitten von Weiß- und Rotblühenden Rosskastanien war die Beteiligung beider Pilze nicht immer durch Pilzfruchtkörper angezeigt. Durch die PCR waren aber mit Ausnahme eines Baumes beide Pilze mindestens einmal innerhalb einer Stammscheibe nachweisbar (s. Abschnitt 4.1.2). Die Einteilung der untersuchten Stammscheiben in definierte Zonen zeigt, dass *P. ostreatus* öfter in den außen liegenden als in den innen liegenden Zonen vorhanden ist. Zudem kommt dieser Pilz auch weniger häufig vor. Dagegen findet sich *F. velutipes* in jeder untersuchten Stammscheibe und kommt insgesamt öfter vor. Dabei ist *F. velutipes* unabhängig von den einzelnen

Stammscheiben in jeder Zone präsent. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis auf eine anteilig stärkere Beteiligung von *F. velutipes* an der Weißfäule der Komplexkrankheit und deutet auf ein erhöhtes Gefahrenpotential hin. Durch die hohe Wirtsspezifität von Psa entstehen für *F. velutipes* offenbar optimierte ökologische Bedingungen. Hieraus könnte sich auch das molekularbiologisch nachgewiesene Vorkommen von *F. velutipes* innerhalb des gesamten Fäulebereiches erklären.

Zu bedenken ist jedoch, dass durch die hier entwickelten Primer nicht nur die gesuchten Arten, sondern auch andere Arten dieser Gattungen in einer PCR amplifiziert werden könnten. Grund dafür sind die Ähnlichkeiten der ITS-Sequenzen innerhalb der jeweiligen Gattung. Für den Nachweis der Arten *P. ostreatus*, *F. velutipes*, *C. purpureum* und *B. adusta* innerhalb der Rosskastanien-Komplexkrankheit sind die entwickelten Primer jedoch als spezifisch einzusetzen. Die Sequenzen, die zur Entwicklung der spezifischen Primer herangezogen wurden, sind durch MÜLLER-NAVARRA et al. (2014) mittels Vergleich der Art-Sequenz mit weiteren veröffentlichten Sequenzen der Art und Arten der derselben Gattung erarbeitet worden. Daraus lässt sich eine hohe Homologie der Primer zu den gesuchten Arten ableiten.

Die durch herkömmliche PCR nachgewiesenen Ascomyceten verursachen Rindennekrosen (*Nectria punicea* (HIROOKA et al. 2013)), sind Schädlinge im Weinbau (*Eutypa* sp. (SOSNOWSKI et al. 2007)), kommen als Schädling im Apfelanbau vor (*Cadophora malorum* (PIERSON et al. 1971)), wachsen an bereits morschem Nadelholz (*Ascocoryne sarcoides* (ZYCHA und DIMITRI 1968)) oder gehören der Gruppe der Schimmelpilze an (*Mucor racemosus*). Innerhalb dieser Untersuchung konnte keine regelmäßige Verteilung der Ascomyceten über die Stammscheiben festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass das Vorkommen der Arten zufällig ist und nicht im Zusammenhang mit der Komplexkrankheit steht. Ein anderer bislang nicht in den Zusammenhang mit der Rosskastanien-Komplexkrankheit gebrachter Basidiomycet (*Sarcomyxa serotina*, Muschelseitling (BREITENBACH und KRÄNZLIN 1991)), konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Bei der makroskopischen Bestimmung der Pilzfruchtkörper besteht auf Grund der ähnlich aussehenden Pilzfruchtkörper Verwechslungsgefahr mit *P. ostreatus*. Es ist möglich, dass durch die große Ähnlichkeit der Pilzfruchtkörper eine Fehlbestimmung stattgefunden hatte. In der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurde dadurch eine DNS-Sequenz von *P. ostreatus* fälschlicherweise *S. serotina* zugeordnet und veröffentlicht (s. dazu auch SCHMIDT et al. 2012). Auf Grund dessen wird der Nachweis von *S. serotina* hier als Verwechslung mit dem *P. ostreatus* eingestuft. Die in MÜLLER-NAVARRA et al. (2014) ebenfalls nachgewiesenen Basidiomyceten *C. purpureum* und *B. adusta*, sowie die Gattung *Phomopsis* sp. und *Diplodia* sp. konnten im Rahmen dieser Untersuchung nicht detektiert werden.

Da *F. velutipes* und *P. ostreatus* in direkter Nachbarschaft zueinander auftreten, stellt sich die Frage, ob synergistische Einflüsse den Krankheitsverlauf beeinflussen und den raschen Holzabbau erklären können. Um das beurteilen zu können, wurden in Dual- und Multiplexkulturen die Veränderung der Mycelwachstumsgeschwindigkeit untersucht und Abbaubersuche durchgeführt.

Das Mycelwachstum *P. ostreatus* wurde in Dual- und Multiplexkulturen sowohl durch *F. velutipes* als auch durch Psa gehemmt, wo hingegen durch die vorzeitige Anwesenheit von Psa das Wachstum von *F. velutipes* im Vergleich zu seiner Reinkultur gefördert wurde.

Beachtet werden sollte jedoch, dass die hiesigen Befunde nur auf jeweils einem Isolat der betreffenden Pilzart beruhen. Es wäre möglich, dass andere Isolate dieser Pilze abweichende Befunde im Vergleich zu den hier vorliegenden ergeben hätten. Grund dafür können Stammvariabilitäten sein (u. a. SCHMIDT 2006).

Wie in bisherigen Arbeiten beschrieben (s.o.), gilt Psa als Primärschädling, ist also vor der Sporenkeimung der Basidiomyceten anwesend. Die antagonistische Beziehung von Psa zu *P. ostreatus* begünstigt möglicherweise die Etablierung für *F. velutipes* an bereits geschädigten Rindenbereichen. Die nachgewiesene synergistische Wirkung des Bakteriums auf das Mycelwachstum von *F. velutipes* fördert die Etablierung im Baum zusätzlich und lässt darauf schließen, dass *F. velutipes* möglicherweise vor *P. ostreatus* eine durch Psa verursachte Wunde besiedeln kann.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich das bisher unauffällige Vorkommen von *F. velutipes* erklären. Psa wird seit 2006 (DUJESIEFKEN et al. 2007, WERRES und WAGNER 2007) für die Erkrankung zahlreicher Rosskastanien in Deutschland verantwortlich gemacht. Das hier untersuchte Krankheitsbild ist in Deutschland seit 2011 dokumentiert und beschränkt sich auf mit Psa infizierte Rosskastanien (MÜLLER-NAVARRA et al. 2014, DUJESIEFKEN et al. 2016). Das Gefahrenpotential des *F. velutipes* scheint sich durch den synergistischen Effekt des Neobionts Psa auf das Mycelwachstum erheblich gesteigert zu haben, so dass dessen Vorkommen erst durch die Anwesenheit des Bakteriums zu einem Problem wird.

Auch wenn sich *P. ostreatus* und *F. velutipes* in Dualkultur nicht gegenseitig fördern, so kann die Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum in besiedelten Gewebeteilen zu erhöhten Abbauraten im Rosskastanienholz führen. Dadurch wird das Gefahrenpotential der Komplexkrankheit erheblich gesteigert. In einem Abbauversuch konnte gezeigt werden, dass durch gleichzeitige Inkubation beider Pilze ein schnellerer Abbau von Rosskastanienholz möglich ist. In dem hier durchgeführten Abbauversuch wurde außerdem demonstriert, dass *F. velutipes* im Vergleich mit *P. ostreatus* bei der Rosskastanie höhere Abbauraten erreicht, so dass dessen Gefahrenpotential innerhalb dieses Krankheitsbildes als vergleichsweise höher eingestuft werden muss. Diese Ergebnisse werden dadurch unterstützt, dass bei Buche durch *F. velutipes* geringere Masseverluste als durch *P. ostreatus* erreicht wurden. Daraus lässt sich eine Präferenz von *F. velutipes* für Holz der Rosskastanien ableiten. Dem Langzeitabbauversuch ging ein weiterer Versuch voran, der zeigen konnte, dass sowohl *P. ostreatus* als auch *F. velutipes* bevorzugt Laubholz (*Aesculus* sp. und *F. sylvatica*) im Vergleich zu Nadelholz (*P. sylvestris*) abbauen. Die Ergebnisse aus dem Langzeitabbauversuch weichen von den Ergebnissen zum Masseverlust aus dem Abbauversuch, dem die Festigkeitsversuche folgten, ab. *F. velutipes* verursachte in diesen Versuchen keinen höheren Masseverlust als *P. ostreatus*. Zwar wird durch die Inkubation beider Pilze wieder ein höherer Masseverlust hervorgerufen, im Vergleich zu der Einzelinkubation erzielt aber *P. ostreatus* höhere Abbauraten als *F. velutipes*. Bei der gemeinsamen Inkubation der Pilze werden in diesem Versuchsteil ebenfalls geringere Werte als beim Langzeitabbauversuch erzielt.

Um das *in vivo*-Gefahrenpotential der beteiligten Basidiomyceten zu untersuchen, wurden *F. velutipes* und *P. ostreatus* getrennt voneinander und gemeinsam in lebende Weißblühende Rosskastanien inokuliert. Insgesamt konnte sich *F. velutipes* am stärksten ausbreiten. Es folgt *P. ostreatus*, der sich im Vergleich zu der gemeinsamen Inokulation beider Pilze wiederum stärker ausbreiten konnte. Dabei zeigt die Ausbreitung der Verfärbungen in der Sprossachse

eine gewisse Abhängigkeit vom inokulierten Pilz und der Richtung der Ausbreitung. Axial in der Länge dominiert *P. ostreatus*, wohingegen *F. velutipes* tangential und radial größere Verfärbungen hervorruft. Die flächige Ausbreitung des verfärbten Gewebes ist ebenfalls bei *F. velutipes* größer. Die gemeinsame Inokulation der Pilze verursacht entgegen den Erwartungen keine auffällig großen Verfärbungen. Bis auf wenige Ausnahmen sind die axialen Verfärbungen in der Länge und auch der Fläche in allen Behandlungsvarianten am größten. Dabei werden die höchsten Werte der axialen Ausbreitung der Verfärbungen jeweils oberhalb der Inokulationswunde gemessen. Nach zweijähriger Inokulationszeit sind makroskopisch noch keine weißfäuleähnlichen Veränderungen in den verfärbten Gewebeteilen erkennbar.

Um den Einfluss des Holzabbaus durch *P. ostreatus* und *F. velutipes* auf die Festigkeitseigenschaften vom Holz der *A. hippocastanum* beurteilen zu können, wurden Versuche zur Biegefestigkeit und Bruchschlagarbeit durchgeführt.

Obwohl in diesem Versuchsteil durch *F. velutipes* bei jedem Prüfungstermin der geringste Masseverlust verursacht wurde, nehmen die Festigkeit und der E-Modul durch *F. velutipes* verhältnismäßig am stärksten ab. Die gemeinsame Inkubation von *P. ostreatus* mit *F. velutipes* verursacht zwar über den gesamten Versuch jeweils die höchsten Masseverluste, aber nicht immer einen stärkeren Festigkeitsverlust. Das E-Modul wird nur einmal, bei doppelt so hohem Masseverlust wie bei *F. velutipes*, stärker reduziert. Im Vergleich dazu reduzierte *P. ostreatus* zwar schneller die Masse als *F. velutipes*, erreichte jedoch erst später im Versuchsverlauf entsprechende Festigkeitsreduzierungen und keine gleichwertig hohen E-Moduländerungen.

Bei dem Versuch zur Abnahme der Bruchschlagarbeit wurde durch *F. velutipes* der höchste Festigkeitsverlust, bei geringster Masseabnahme, erreicht.

Die gleichzeitige Inkubation beider Pilze verursachte den höchsten Masseverlust, erreichte aber geringfügig kleinere Festigkeitsverluste. *P. ostreatus* verursachte auch hier wieder einen höheren Masseverlust als *F. velutipes*, reduziert aber die Bruchschlagarbeit nicht so stark, wie die anderen Inkubationsvarianten. Die Ergebnisse aus diesem Versuch bestätigen wiederum das von *F. velutipes* ausgehende Gefahrenpotential.

5.3 Einordnung in die Literatur

Es besteht bei ausschließlich visueller Beurteilung von Schadsymptomen die Gefahr, nicht alle beteiligten Schaderreger zu erkennen. Im Fall der Rosskastanien-Komplexkrankheit muss aber unterschieden werden, ob es sich bei den Symptomen lediglich um eine Infektion mit Psa handelt, oder ob *P. ostreatus* und *F. velutipes* bzw. einer der beiden am Holzabbau beteiligt sind. Aus der jeweiligen Schaderregerzusammensetzung ergeben sich auf Grund dieser Untersuchung andere Konsequenzen für den weiteren Umgang mit einem betroffenen Baum.

Die Anwendung der hier entwickelten Multiplex-PCR kann ebenso schnell wie der Nachweis von Psa durch den von SCHMIDT et al. (2009) entwickelten Schnelltest erfolgen. SCHMIDT et al. (2012) bewerten die Anwendung von sog. SSPP (Species-specific priming PCR, artspezifische Primer PCR) für Stadtbäume zwar als ungeeignet, wenn keine vorherige Identifizierung der Pilze an Hand von Fruchtkörpern erfolgte. Da aber bei der hier untersuchten Komplexkrankheit die Hauptschadverursacher bekannt sind, kann durch die Anwendung von artspezifischen Primern in herkömmlichen PCRs ebenso wie in einer Multiplex-PCR das Vorkommen von *P. ostreatus*, *F. velutipes*, *B. adusta* und *C. purpureum*

nachgewiesen werden. Weiterhin wird auch von GIORDANO et al. (2015) die Anwendung von molekularen Identifizierungsmethoden als wichtige Ergänzung zur Identifizierung von Pilzen in lebenden Bäumen beschrieben. Im Falle der Rosskastanien-Komplexkrankheit konnte die Anwendung der taxonspezifischen Primer zeigen, dass die gleichzeitige Beteiligung von *P. ostreatus* und *F. velutipes* nicht auszuschließen ist, auch wenn nur Pilzfruchtkörper einer Art bei der Baumkontrolle vorhanden war.

Bei bisher beschriebenen Krankheiten an Bäumen, die durch Basidiomyceten verursacht werden, wird häufig nur eine Art als Hauptschadverursacher dargestellt. Als Hinweis für eine Beteiligung an einem Schaden werden die Pilzfruchtkörper herangezogen (LICHTENAUER et al. 2013). Auch bei diesen Krankheiten handelt es sich jedoch um Sukzessionsgesellschaften, bei denen sich häufig die beteiligten Organismen austauschen. Dabei sind es vor allem auch Pilze aus anderen Abteilungen (Ascomyceten oder Oomyceten), die sich gegenseitig verdrängen oder durch ihren Stoffwechsel die Milieubedingungen für nachfolgende Organismen verändern (RAYNER und BODDY 1988). Es entstehen zwangsläufig inter- und intraspezifische Beziehungen zwischen den beteiligten Organismen. Die Beeinflussung der Organismen *in vitro* resultiert laut BODDY (2000) aus der Interaktion der Organismen miteinander, was HARDER (1911) bereits beobachtet hat. Für den Stillstand des Wachstums oder den Austausch eines Organismus durch einen anderen können sowohl flüchtige als auch diffusionsfähige Antibiotika verantwortlich sein (SONNENBILCHER et al. 1994), so dass kein Hyphenkontakt entstehen kann. Möglich ist auch, dass der eine den anderen Organismus abbaut. Ein weiterer Effekt vom Mycelkontakt, der bei holzerstörenden Basidiomyceten am häufigsten auftritt, ist besonders in Sterilkulturen erkennbar und äußert sich in Veränderungen der Morphologie der Mycelien. Sich berührende Mycelien formen entweder Barrieren (Deadlock), welche von der anderen Art nicht durchwachsen werden können, eine Auffächerung des Mycels oder rufen die Bildung von rhizomorphen Strukturen hervor (BODDY 2000). Außerdem können farbliche Veränderungen der Mycelien im Kontaktbereich auftreten (GRIFFITH et al. 1994). Die Sterilkulturen, die von *Psa*, *F. velutipes* und *P. ostreatus* als Dual- und Multiplexkulturen angelegt wurden, zeigen beim Zusammentreffen der Mycelien solche farblichen Veränderungen. Die Mycelien wachsen makroskopisch sichtbar ineinander.

Um interspezifische Einflüsse unterschiedlicher Organismen aufeinander untersuchen und charakterisieren zu können, werden auch in anderen Forschungsbereichen Dual- und Multiplexkulturen beobachtet. Diese Tests werden häufig im Zusammenhang mit der Entwicklung von biologischen Holzschutzmitteln („biocontrol agents“) oder in der Speisepilzzucht mit Pilzen (Asco- oder Basidiomyceten) und Bakterien durchgeführt. CHAKRAVARTY und HIRATSUKA (1992) testeten *Peniophoram polygona* und *Phellinus tremulae*, die als Schädlinge in der Pappelproduktion gelten, um deren gegenseitige Beeinflussung aufzuklären. In der Speisepilzzucht werden beispielsweise Tests durchgeführt, die die Begünstigung der Fruchtkörperbildung von *P. ostreatus* durch Pseudomonaden aufklären soll (CHO et al. 2003). In diesen Tests wurde eine mögliche Förderung des Fruktifikationspotentials durch *Pseudomonas* ssp. festgestellt. Im Falle der Rosskastanien-Komplexkrankheit kann also die Anwesenheit von *Psa* auf die Fruchtkörperbildung von *P. ostreatus* eine fördernde Wirkung haben. Auch die Bildung von Pilzfruchtkörpern als Anzeiger für deren Regenerationsfähigkeit wird in Dualtest *in vitro* von EGER (1965) beschrieben. Wenn, wie von EGER (1965) beschrieben, die Fruchtkörperbildung einer Art

durch eine andere angeregt werden kann, so kann sich hierdurch das auffällige Fruktifizieren von *P. ostreatus* neben dem von *F. velutipes* erklären. *In vitro* konnte in dieser Untersuchung weder bei *P. ostreatus* noch bei *F. velutipes* eine geförderte Regenerationsfähigkeit festgestellt werden. In einem Versuch zur Fruchtkörperzucht an Birkenstubben im Bestand beobachtet KODRIK (2001), dass *P. ostreatus* nach fünf Jahren am stärksten fruktifiziert, was einen möglichen Anhaltspunkt zur Einschätzung der Dauer des Befalls vor der auffälligen Fruktifikation der Pilze sein kann. Multiplexkultur-Tests, die von LOHWAG (1966) durchgeführt wurden, um das Vorkommen mehrerer Basidiomyceten bei „Schwammsschäden“ in Gebäuden beurteilen zu können, zeigten ebenfalls verschiedene Verhaltensweisen der geprüften Pilze. KIM et al. (2008) prüften, ob es möglich ist *Trichoderma*-Arten, die erheblichen Schaden in der Speisepilzzucht verursachen, durch die Anwendung von *Bacillus*-Stämmen einzudämmen. Der Einsatz von *Trichoderma* sp. als biologisches Holz- bzw. Baumschutzmittel („biocontrol agent“) kann den Holzabbau durch Pilze eindämmen, wie SCHUBERT et al. (2008), SCHWARZE et al. (2012) und RIBERA et al. (2017) durch Dualtests bewiesen.

Um die antagonistische Beziehung zweier Arten darzustellen, eignet sich die Inokulation von Dualkulturen auf hölzernen Testblocks. Die Antagonisten trennen die durch ihr Mycel erschlossenen Territorien bzw. Nährstoffquellen durch die Bildung von Demarkationslinien voneinander (RAYNER und BODDY 1988, CHAKRAVARTY und HIRATSUKA 1992). HENNINGSSON (1967b) beobachtet bei seinen Versuchen zum Abbau von Birken- und Pappelholz durch Multiplexkulturen, dass die Reihenfolge der Inokulation von Pilzen und Bakterien einen Einfluss auf das Mycelwachstum und die Abbaurate hat, wobei er eine Abhängigkeit des verwendeten Mediums feststellt. Unter anderem beobachtete er eine erhöhte Abbaurate durch *Polyporus zonatus* durch zusätzliche Inokulation eines Bakteriums auf Birke und Pappel. In Flüssigmedium zeigte sich bei einer vorherigen oder gleichzeitigen Inkubation eines Bakteriums mit einem Basidiomyceten eine geringe Beeinflussung oder totale Hemmung des Pilzes. Wurde zunächst der Pilz und anschließend das Bakterium inokuliert, ergab sich gar kein oder nur ein geringer Einfluss auf das Mycelwachstum. Ein Grund für den positiven Einfluss von Bakterien auf das Pilzwachstum kann die Nutzung der Bakterien als Stickstoffquelle sein (BARRON 2003). Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte ein positiver Effekt von Psa auf das Mycelwachstum von *F. velutipes* beobachtet werden.

Bei dem hier durchgeführten Abbauersuch sind über den gesamten Versuchszeitraum in den Querschnittsflächen der Prüfkörper Demarkationslinien zu erkennen. Diese sind aber weniger dunkel und nicht scharf zum darum liegenden Gewebe abgegrenzt, wie es beispielsweise bei *Kretzschmaria deusta* beobachtet werden kann (KEHR 2007). In den molekularbiologischen untersuchten Stammabschnitten sind keine oder ebenfalls nur undeutliche ausgeprägte Linien auszumachen. Dies weist darauf hin, dass *in vivo* keine Separierung der Arten voneinander stattfindet, was durch das Vorkommen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* in einer Probe molekularbiologisch belegt werden konnte.

Das Gefahrenpotential von holzerstörenden Pilzen spielt besonders bei der Beurteilung von Park- und Straßenbäumen eine große Rolle. Eine umfangreiche Untersuchung von BAIETTO und WILSON (2010) unterscheidet mit Hilfe von *in-vitro*-Abbauersuchen wichtige wurzel- und stammbürtige Fäuleerreger in ihrer Aggressivität. Hierbei ist zu beachten, dass die *in-vitro*-Versuche nicht die absolute Aggressivität eines Pilzes darstellen können. Das Gefahrenpotential, in Abwesenheit der Abwehrreaktion des Wirtes, kann aber durchaus aus

den Abbauraten abgeleitet werden. Laut BAIETTO und WILSON (2010) gilt beispielsweise *Armillaria mellea* als Pilz mit großem Gefahrenpotential, da dieser den höchsten Masseverlust nach zwei Jahren im Vergleich zu den anderen beobachteten Pilzen verursachte. In ihrem Versuch unterschieden BAIETTO und WILSON (2010) außerdem zwischen den Abbauraten bei unterschiedlichen Laub- und Nadelhölzern, so dass gezeigt werden konnte, dass bei unterschiedlichen Wirten ein verstärktes oder vermindertes Gefahrenpotential von derselben Pilzart ausgehen kann.

Bei *P. ostreatus* und *F. velutipes* zeigen sich an Hand der hier durchgeführten Versuche ebenfalls Unterschiede im Gefahrenpotential in Abhängigkeit der Wirt-Pilz-Kombination. Die Masseverluste dienen ebenfalls als Bewertungsgrundlage. *P. ostreatus* verursacht einen geringeren Masseverlust bei Rosskastanie als bei Buche, so dass sein Gefahrenpotential für Rosskastanien als vergleichsweise geringer eingestuft werden muss. Anders verhält es sich bei *F. velutipes*, der einen höheren Masseverlust bei Rosskastanie hervorrufen kann als bei Buche. Daraus folgt, dass sein Gefahrenpotential von *F. velutipes*, im Zusammenhang mit der Rosskastanien-Komplexkrankheit, höher eingestuft werden muss, als jenes von *P. ostreatus*. Die insgesamt geringeren Abbauraten, die bei den Abbauversuchen, bei denen im Anschluss der 4-Punkt-Biege- und der Bruchschlagarbeitsversuch folgte, erhoben wurden, sind möglicherweise auf die Prüfkörperanatomie zurückzuführen. Diese Beobachtung machten auch KLEIST und PEEK (1999). Der Langzeitabbauversuch wurde mit Prüfkörpern durchgeführt, die eine 18-fach größere Querschnittsfläche als die Prüfkörper des Abbauversuchs für die Festigkeitsversuche haben.

Weil Psa eine große Rolle in der Rosskastanien-Komplexkrankheit als Primärschädling zukommt und es offenbar das Wachstum von *F. velutipes* fördern kann, ist es ein interessanter Aspekt, die Grenzen der optimalen Lebensbedingungen des Bakteriums zu kennen. Das Überleben eines in dieser Untersuchung isolierten Psa-Stammes konnte in flüssigem mit Glycerol versetztem KB-Medium für 11 Tage bei 4°C und -20°C dokumentiert werden. LAUE et al. (2014) zeigten in Rekultivierungsversuchen, dass Psa in der Lage ist, eine Lagerung auf KB-Agar bei 5°C und -20°C (und -80°C) über ein Jahr zu überleben. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass *P. syringae* pv. *aesculi* gut an das Nordeuropäische Klima angepasst ist (LAUE et al. 2014). Möglicherweise verhindert die Hitzeempfindlichkeit des Psa, die durch Versuche von DE KEIJZER et al. (2012) ermittelt wurden und bei 39°C liegt, die Ausbreitung des Bakteriums in wärmere Regionen (LAUE et al. 2014).

Die Verbreitung des Bakteriums findet möglicherweise durch Pflanzmaterial statt (BRAISER 2008, GREEN et al. 2009). Die Infektion der Rosskastanien kann bei optimalen Bedingungen durch junge sowie alte Baumteile erfolgen und setzt keine vorherige Verletzung dieser voraus (GREEN et al. 2009, GREEN et al. 2010). In der vorliegenden Untersuchung wurde Psa auf Helgoland an einer Weißblühenden Rosskastanie nachgewiesen. Bemerkenswert ist dabei die Lage der Insel in der Nordsee. Helgoland gilt als Hochseeinsel und ist ca. 50 km vom Festland entfernt. Dadurch, und durch Funde an Baumschulware in München, wird die Theorie der Verbreitung von Psa mittels Pflanzmaterial unterstützt.

Im Falle der getesteten Rosskastanie von Helgoland würde dies allerdings bedeuten, dass die Infektion vor Pflanzung des Baumes 1955 (pers. Mitteilung NEULEN⁸ 2019) stattgefunden haben muss. Die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Symptome hätte dann mehrere Jahrzehnte gedauert. Eine spätere Psa-Infektion über Blätter oder Rinde des Baumes scheint in diesem Fall wahrscheinlicher.

Aus dem Holzabbau, der durch die Basidiomyceten verursacht wird, folgt die Gefährdung der Bruchfestigkeit von Bäumen und damit der Verkehrssicherheit. Die Ermittlung der Biegefestigkeit und des E-Moduls sowie der Bruchschlagarbeit erweitert die Grundlage des Masseverlustes zur Einstufung des Gefahrenpotentials erheblich, da bereits bei geringem Masseverlust hohe Festigkeitsverluste zu erwarten sind (WAZNY 1958; ARMSTRONG und SAVORY 1959; SCHULTZE-DEWITZ 1966; HENNINGSSON 1967a; CURLING et al. 2002a; BRISCHKE et al. 2008, MA et al. 2017). Bereits 1934 zeigten LIESE und STAMER eine durch *Serpula lacrymans* (Echter Hausschwamm) um 45 % geminderte Druckfestigkeit bei nur 5 % Masseverlust. Es wird generell ein enger Zusammenhang zwischen Masseverlust und Festigkeitsverlust angenommen (TRENDELENBURG 1940, GÖHRE 1955, CURLING et al. 2002a, BRISCHKE et al. 2008), wobei die prozentuale Abnahme der Masse meist geringer ist als die prozentuale Abnahme der Festigkeit (CURLING et al. 2002b). WILCOX (1978) fasst Literatur zusammen, in der beschrieben wird, dass in frühen Stadien des Holzabbaus (5–10 %) die Biegefestigkeit um 24 % und der E-Modul um 14 %, sowie die Bruchschlagarbeit um 60 % durch Weißfäule abnehmen können. Der Grund für die verhältnismäßig hohe Abnahme der Festigkeit bei geringem Masseverlust wird von HENNINGSSON (1967a) in der Auflösung der chemischen und physikalischen Verbindungen des Lignins mit den Kohlenhydraten in der Mittellamelle vermutet, ohne dass eine Reduzierung der Masse stattfindet.

Wie in den Festigkeitsversuchen gezeigt werden konnte, wurden die Biegefestigkeit von *F. velutipes* im frühen Stadium des Holzabbaus (unter 10 % Masseverlust) um bis zu 38 % reduziert. Durch die gemeinsame Inkubation der Pilze wird zwar schneller die Masse reduziert, der Festigkeitsverlust von 39 % wird aber erst bei 19 % Masseverlust erreicht. Auch *P. ostreatus* kann die Festigkeit erst ab einem Masseverlust von über 15 % um knapp 34 % reduzieren.

Der E-Modul wird in dem hier durchgeführten Versuch stärker vom Masseverlust beeinträchtigt, als WILCOX (1978) beschreibt. Die Abnahme des E-Moduls durch *F. velutipes* liegt bei 10 % Masseverlust bei etwa 30 %. Durch die gemeinsame Inkubation der Pilze wird der E-Modul bei einem Masseverlust von ca. 10 % um etwa 25 % reduziert. *P. ostreatus* erreicht bei einem ähnlich hohen Masseverlust einen E-Modulverlust von ca. 15 %. Daraus folgt, dass die Bruchgefahr sowohl durch die gleichzeitige Besiedlung mit *P. ostreatus* und *F. velutipes*, als auch durch den alleinigen Befall mit *F. velutipes* gegenüber einem Befall mit *P. ostreatus*, erhöht sein kann. Es konnte dabei keine Abhängigkeit zwischen Versuchsdauer und dem damit verbundenen Masseverlust mit der Abnahme des E-Moduls festgestellt werden. Bei unterschiedlich hohem Masseverlust wurde der E-Modul etwa gleich stark beeinflusst. Ähnliche Beobachtungen machten auch LIESE und VON PECHMANN (1959) bei ihren Versuchen zum Einfluss von Braunfäule auf den E-Modul. In einem Versuch zur

⁸ Gemeinde Helgoland, Schleswig Holstein

Wirksamkeit von Holzschutzmitteln gegenüber holzbewohnenden Pilzen stellen KIRK und SCHULTZE-DEWITZ (1968) sowie MA et al. (2017) ebenfalls Schwankungen im E-Modul fest. Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise durch den nicht uniformen Holzabbau entlang des Prüfkörpers erklären, dessen Einfluss in den hier durchgeführten Versuchen durch die Verwendung der 4-Punkt-Biegebelastung minimiert werden sollte (WINANDY und MORRELL 1993).

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Festigkeitseigenschaften ist möglicherweise der bei der Rosskastanie bekannte Drehwuchs. Die Biegefestigkeit sinkt laut HENRICI und GRIMM (1984) mit steigendem Drehwinkel der Fasern. Das in dieser Untersuchung für die Festigkeitsprüfung verwendete Probenmaterial wurde aus einem ca. 100 cm langen Stammabschnitt entnommen, so dass ein sich ändernder Drehwinkel nicht auszuschließen ist.

Zur Beurteilung von Holzschutzmitteln wurde auch die besonders durch Holzabbau beeinflussbare Schlagbiegeprüfung durchgeführt (TRENDELENBURG 1940, VON PECHMANN und SCHAILE 1950). HENNINGSSON (1967a) wandte den Schlagbiegeversuch für die Fragestellung an, ob verschiedene Basidiomyceten die Festigkeit von Birke unterschiedlich beeinflussen. Dabei stellte er fest, dass der Masseverlust weniger stark abnimmt, als die Festigkeit. Außerdem wies er darauf hin, dass besonders bei Festigkeitsprüfungen von Holz, das durch Mikroorganismen abgebaut wurde, mit großen Schwankungen zu rechnen ist. So wie ARMSTRONG (1935) und TRENDELENBURG (1940) bereits feststellten, nimmt die Bruchschlagarbeit auch in dem hier durchgeführten Versuch stärker ab, als die Biegefestigkeit. *F. velutipes* erreicht wiederum den höchsten Wert, gefolgt von *P. ostreatus* gemeinsam mit *F. velutipes*. Die Inkubation von *P. ostreatus* bewirkt in diesem Versuch die geringste Abnahme der Bruchschlagarbeit. Auch durch diese Ergebnisse wird das Gefahrenpotential verdeutlicht, das von *F. velutipes* ausgeht.

Die von NIEMZ (2008) zusammengestellten Angaben über die Variationskoeffizienten geben für die Biegefestigkeit, den E-Modul und die Bruchschlagarbeit einen Anhaltspunkt für das zu erwartende Streuungsmaß bei der Prüfung von Holz. Die in dieser Untersuchung ermittelten Werte liegen unterhalb dieser Angaben und können als valide bewertet werden.

Der unterschiedlich hohe Einfluss der Pilze auf die Festigkeitseigenschaften von kleinen fehlerfreien Proben erlaubt Rückschlüsse auf das Holzabbaumuster der beteiligten Arten (HENNINGSSON 1967a, MA et al 2017). *P. ostreatus* wird in der Literatur als Weißfäulepilz eingestuft, der eine simultane Weißfäule verursacht. Er ist in der Lage, sowohl Lignin, Cellulose und Hemicellulose nahezu gleichzeitig abzubauen (SCHMIDT 2006). Diese Eigenschaft bewirkt eine schnellere Reduzierung der Masse. *F. velutipes* kann bei geringerem Masseverlust eine schnellere Abnahme der Festigkeitseigenschaften bewirken, was Folge eines sukzessiven Holzabbaus sein kann. Hierbei werden zunächst Lignin und Hemicellulosen abgebaut (SCHMIDT 2006), was den Verlust des Zusammenhalts der Zellen durch die Depolymerisation der Mittellamelle zur Folge hat und die Festigkeit schneller als die Masse herabsetzt (HENNINGSSON 1967a).

Die Inokulation von *P. ostreatus* und *F. velutipes* – getrennt voneinander und gemeinsam – kann unterschiedlich starke Verfärbungen im Innern der Sprossachsen von Rosskastanien in der Jugendphase verursachen. Es zeigte sich außerdem in dem hier durchgeführten Inokulationsversuch, dass die nicht infizierten „Kontrollwunden“ weniger große Verfärbungen hervorrufen.

Vergleichbare Inokulationsversuche zur Ausbreitung von *Kretzschmaria deusta* (Brandkrustenzpilz) in Linde (*Tilia cordata*) zeigten nach sieben Jahren Versuchsdauer ebenfalls Unterschiede in der Ausdehnung der Verfärbungen zwischen infizierten und nicht infizierten Inokulationswunden (KEHR 2007). Diese Beobachtung machten SHORTLE et al. (1995) bei ihren Versuchen an Ahorn mit *P. ostreatus* und *Trametes versicolor* auch. Die Inokulationsversuche von DEFLORIO et al. (2008) mit *Ganoderma* sp, *T. versicolor*, *Kretzschmaria deusta* und *Phomopsis pinicola* in Douglasie, Birke, Eiche und Ahorn ergaben eine verhältnismäßig geringfügigere Ausbreitung der Verfärbung der nicht infizierten Wunden. Bei ihren Inokulationsversuchen stellen DEFLORIO et al. (2008) ebenfalls fest, dass die Ausbreitung in axialer fast immer größer als in tangentialer oder radialer Richtung ist. KERSTEN (2001) macht ähnliche Beobachtungen bei der Ausbreitung von Verfärbungen in axialer Richtung bei Esche und Platane nach Bohrungen mit einem Bohrwiderstandsmessgerät und einem Zuwachsbohrer. DUJESIEFKEN et al. (1991) beobachten zudem eine stärkere Ausbreitung der Verfärbung oberhalb künstlicher Verwundung durch Bohrlöcher bei Buche, Ahorn, Esche, Eiche und Birke. Die Verfärbungen breiten sich außerdem, wie auch DEFLORIO et al. (2008) beobachten, insgesamt in radialer Richtung verhältnismäßig stärker als in tangentialer Richtung aus. Diese Verhältnisse konnten in dem hier durchgeführten Versuch ebenfalls ermittelt werden.

KEHR (2007) beschreibt bei seinen Versuchen, dass umfangreiche Fäulen durch die verhältnismäßig kleinen Inokulationswunden entstehen konnten und vermutet einen Zusammenhang von Aggressivität des Schadpilzes und Ausbreitung des Schadens. Da durch die Inokulationen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* und beiden gemeinsam innerhalb von zwei Jahren keine makroskopisch erkennbare Fäule entstanden ist, kann das Aggressions- bzw. Gefahrenpotential nur von der Verfärbung abgeleitet werden. Demnach geht von der Kombination von *P. ostreatus* und *F. velutipes* nicht die größte Gefahr aus. Es zeigt sich aber eine weniger effektive Abschottung durch die Roskastanien von *F. velutipes*, als von *P. ostreatus*. Wird die Verfärbung des Gewebes als Maß der Aggressivität herangezogen, muss beachtet werden, dass die Verfärbung nicht mit der eigentlichen Fäule gleichgesetzt werden darf. Ein wesentlicher Teil der Verfärbung wird durch die in das Gefäßsystem eindringende Luft verursacht (DUJESIEFKEN und LIESE 2015). Die verfärbten Gewebe können aber durch ihre unterschiedliche chemische Zusammensetzung differenziert und so tatsächlich der Wundreaktion des Baumes auf die inokulierten Pilze zugeordnet werden (SHORTLE et al. 1995). Zu beachten ist außerdem, dass innerhalb des verfärbten Gewebes der Holzabbau bereits begonnen haben kann, ohne dass makroskopisch sichtbare Veränderungen erkennbar wären. Grund für diese Annahme ist die Beobachtung fehlender makroskopisch erkennbarer Anzeichen einer Weißfäule bei den Abbauprüfungen bei deutlicher Reduzierung der Masse.

Die Wundreaktion der Gattung *Aesculus* wird im Vergleich zu anderen Baumarten als weniger effektiv beschrieben (DUJESIEFKEN und LIESE 2015). Wesentliche Einflussgrößen auf die Effektivität der Wundreaktion sind die Baumvitalität und die saisonale Verletzungszeit (DUJESIEFKEN et al. 1991) sowie die Größe der Wunde (KEHR 2007). Die Baumvitalität spiegelt den allgemeinen Gesundheitszustand eines Baumes wider und damit auch die Reaktions- bzw. Regenerationsfähigkeit (KEHR 2007, ROLOFF 2018).

Bei der Interpretation des Inokulationsversuchs können die Ergebnisse aus den Dualkulturtests sowie die der Abbauprüfungen herangezogen werden. Das Wachstum der Kulturen von *F. velutipes* und dem von *P. ostreatus* wird in gemeinsamer Dualkultur

verlangsamt. Diese Beobachtung kann die geringere Ausbreitung der Verfärbung bei der gemeinsamen Inokulation beider Pilze in der Sprossachse im Vergleich zu den Einzelinokulationen erklären. Es kommt auch im lebenden Baum zu einer „dead-lock-Phase“ (BODDY 2000), in der sich artfremde Mycelien zwar berühren und auch teilweise übereinander wachsen, sich aber nicht durch die andere Art verdrängen lassen. *P. ostreatus* und *F. velutipes* etablieren sich gemeinsam und konkurrieren um Nährstoffe, was wiederum bei gleichzeitiger Anwesenheit einen erhöhten Masseverlust hervorrufen kann. Die axialen Verfärbungen durch *F. velutipes* sind vergleichsweise am größten. Es ist möglich, dass im lebenden Baum die Anatomie des Rosskastanienholzes die Ausbreitung von *F. velutipes* begünstigt. Wie auch in den Abbauraten deutlich wird, stellen die Fasern und Gefäße keine effektive Barriere für den Pilz dar.

Die Wundreaktion erfolgte bei den inokulierten Rosskastanien nach dem CODIT-Prinzip (Compartmentalization of Damage in Trees, DUJESIEFKEN und LIESE 2015). In Phase 1, die durch das Einbringen der Inokulationsdübel ausgelöst wurde, dringt Luft in das Gefäßsystem ein. Entlang der Wundränder stirbt das Gewebe ab. Durch das noch lebende Gewebe der Rinde wird ein Wundperiderm gebildet. Das Kambium bildet einen (Wund-) Kallus und die Barrierzone. Im Holz entsteht die Grenzschicht. Im Falle des Inokulationsversuches erfolgt das Eindringen der Schaderreger (hier *P. ostreatus* und *F. velutipes*) nicht in Phase 2, sondern parallel in Phase 1. Zu diesem Zeitpunkt wurde noch keine Grenzschicht gebildet. Daraus folgt, dass erst in Phase 3 eine Grenzschicht gebildet wird und die inokulierten Pilze sich bis zu dieser ausbreiten können. Sobald die Schaderreger die Barrierzone (Grenzschicht) erreicht haben, können von dieser verstärkt Abwehrstoffe (z.B. Suberin oder Lignin) gebildet werden. Der Wundkallus (Überwallungswulst) wächst weiter. In Phase 4 wird die Wunde durch vollständige Einkapselung durch den Überwallungswulst verschlossen und die Schaderreger sterben ab. In diesem Inokulationsversuch wurden alle Inokulationswunden vollständig mit einem Wundkallus verschlossen. Bereits nach vier Monaten konnte teilweise die beginnende Kallusbildung beobachtet werden. Die inokulierten Pilze sind höchstwahrscheinlich durch den daraus entstandenen Sauerstoffmangel abgestorben. Die durch die Pilze bedingten Verfärbungen in den Sprossachsen der inokulierten Rosskastanien sind demzufolge bis zur vollständigen Überwallung der Inokulationswunden entstanden.

Die in diesem Versuch verwendeten *A. hippocastanum* zeichneten sich zum Zeitpunkt der Inokulation durch ihre gute Vitalität aus. Lediglich der Befall mit der Rosskastanienminiermotte während der Vegetationsperiode dürfte einen geringen Einfluss auf die Photosyntheseleistung und damit auf die Regenerationsfähigkeit der Bäume gehabt haben (PERCIVAL et al. 2011).

Entscheidend für die Entstehung der raschen umfangreichen Fäule, wie sie im Falle der Rosskastanien-Komplexkrankheit auftritt, ist offensichtlich die fehlende Reaktionsfähigkeit des durch Psa zerstörten Kambiums, das für die Wundkallusbildung notwendig ist. Nachfolgend kann *F. velutipes* also als ein Pilz charakterisiert werden, für den die Infektion eines Baumes mit Psa die Voraussetzung für eine erfolgreiche Besiedlung des Holzes darstellt („specialized opportunist“, RAYNER und BODDY 1988). WOLKINGER (1973) publizierte über das getrennte Vorkommen von *F. velutipes* und *P. ostreatus* an Astungswunden von Rosskastanien ohne eine Beurteilung des Gefahrenpotentials vorzunehmen. Auch die Veröffentlichung von SEEHANN (1979) über *F. velutipes* an Weide macht deutlich, dass das

Gefahrenpotential von *F. velutipes* innerhalb der Rosskastanien-Komplexkrankheit höher eingestuft werden muss als bei anderen Baumarten.

Aus den bereits vorliegenden Erkenntnissen und den hier präsentierten Ergebnissen lässt sich das Gefahrenpotential von *P. ostreatus* und *F. velutipes* innerhalb der Rosskastanien-Komplexkrankheit wie folgt einordnen und beschreiben:

1. *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) gilt weiterhin als Primärschädling.
 - a. Psa verursacht Rindennekrosen, die als Eintrittspforten für *P. ostreatus* und *F. velutipes* dienen.
 - b. Psa vermag das Hyphenwachstum von *F. velutipes* und folglich den durch ihn verursachten Holzabbau steigern.
 - c. Psa erleichtert möglicherweise die Besiedlung von Wunden durch einen synergistischen Effekt auf *F. velutipes*.
2. *P. ostreatus* und *F. velutipes* sind gemeinsam Hauptschadverursacher,
 - a. der Holzabbau wird durch Anwesenheit beider Pilze beschleunigt.
 - b. Die Fruktifikation wird durch Anwesenheit der zweiten Art möglicherweise gefördert.
3. *F. velutipes* zeigt eine Präferenz für *A. hippocastanum* als Nährstoffquelle,
 - a. wobei die Infektion eines Baumes mit Psa dabei die Etablierung des Pilzes im Holz begünstigt.
 - b. Daraus folgt eine höhere Einstufung des Gefahrenpotentials dieses Pilzes für die Rosskastanie;
 - c. *F. velutipes* kann die Festigkeit betroffener Bäume schneller herabsetzen als *P. ostreatus*.
4. *P. ostreatus* ist zu einem geringeren Teil an dem Holzabbau innerhalb des Schadbildes beteiligt als *F. velutipes*.

Es ist grundsätzlich davon auszugehen, dass von einem gleichzeitigen Auftreten von *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, *P. ostreatus* und *F. velutipes* eine erhöhte Gefahr für die Verkehrssicherheit ausgeht. Es ist dringend zu empfehlen, betroffene Rosskastanien entsprechend der FLL-Baumkontrollrichtlinien (2010) in verkürzten halbjährigen Baumkontrollintervallen zu beobachten, die es ermöglichen können, alle beteiligten Schadorganismen zu erkennen. Dabei sind Baumkontrollen in der Vegetationsruhe zusätzlich zu einer Kontrolle im belaubten Zustand erforderlich. Während der Vegetationsruhe ist mit einem gehäuften Auftreten der Pilzfruchtkörper zu rechnen, die innerhalb weniger Wochen wachsen können. Die Pilzfruchtkörper können eine Weißfäule auch bei anhaftender Rinde anzeigen und so Hinweise auf bereits vorhandene Weißfäule geben. Die vertrockneten einjährigen Pilzfruchtkörper haften teilweise bis weit in die Vegetationsphase an der Borke, können aber durch erheblichen Volumenverlust und Verfärbung bei einer Baumkontrolle leicht übersehen und nicht eindeutig einer Art zugeordnet werden.

6 Ausblick

Auf Grund der vorliegenden Untersuchung wird den an der Rosskastanien-Komplexkrankheit beteiligten Basidiomyceten *P. ostreatus* und *F. velutipes* ein höheres Gefahrenpotential zugesprochen als bisher angenommen. Es muss davon ausgegangen werden, dass sich in den bereits von Psa betroffenen Rosskastanienbeständen in ganz Europa eine ähnliche Ausbreitung der Komplexkrankheit wie beispielsweise derjenigen in Hamburg einstellen kann.

Durch die Auswertung von Baumkatasterdaten der Stadt Hamburg über den Befall mit Psa kommt MELZER (2018) zu dem Schluss, dass ausgehend von Befallsherden, die sich über das gesamte Stadtgebiet verteilen, der Befallsdruck durch die Komplexkrankheit in den letzten Jahren erhöht hat (s. Abbildung 35). Besonderes Augenmerk für den Erhalt der Verkehrssicherheit muss bei Bäumen in stark von Personen frequentierten Bereichen und im Straßenverkehr liegen. Beispielsweise stehen von den 8453 Hamburger Rosskastanien 6153 an Straßen und ein Teil der 2300 weiteren Bäume in Parks und parkähnlichen Anlagen. Es handelt sich dabei zu 99 % um Weiß- und Rotblühende Rosskastanien (1 % sind andere Arten der Gattung *Aesculus*). 80 % dieser sind Weiß- und 20 % Rotblühende Exemplare. 15 % dieser Bäume befinden sich in der Jugendphase (ab Baumpflanzung am Bestimmungsort 15 Jahre), 50 % in der Reifephase (30–80 Jahre) und weitere 25 % in der Alterungsphase (80 Jahre und älter). 10 % der Rosskastanien sind altersmäßig nicht erfasst. Bezogen auf den Gesamtbestand der Rosskastanien sind in Hamburg aus der Jugendphase 10 %, aus der Reifephase 15 % und aus der Alterungsphase 5 % der Bäume befallen (MELZER 2018).

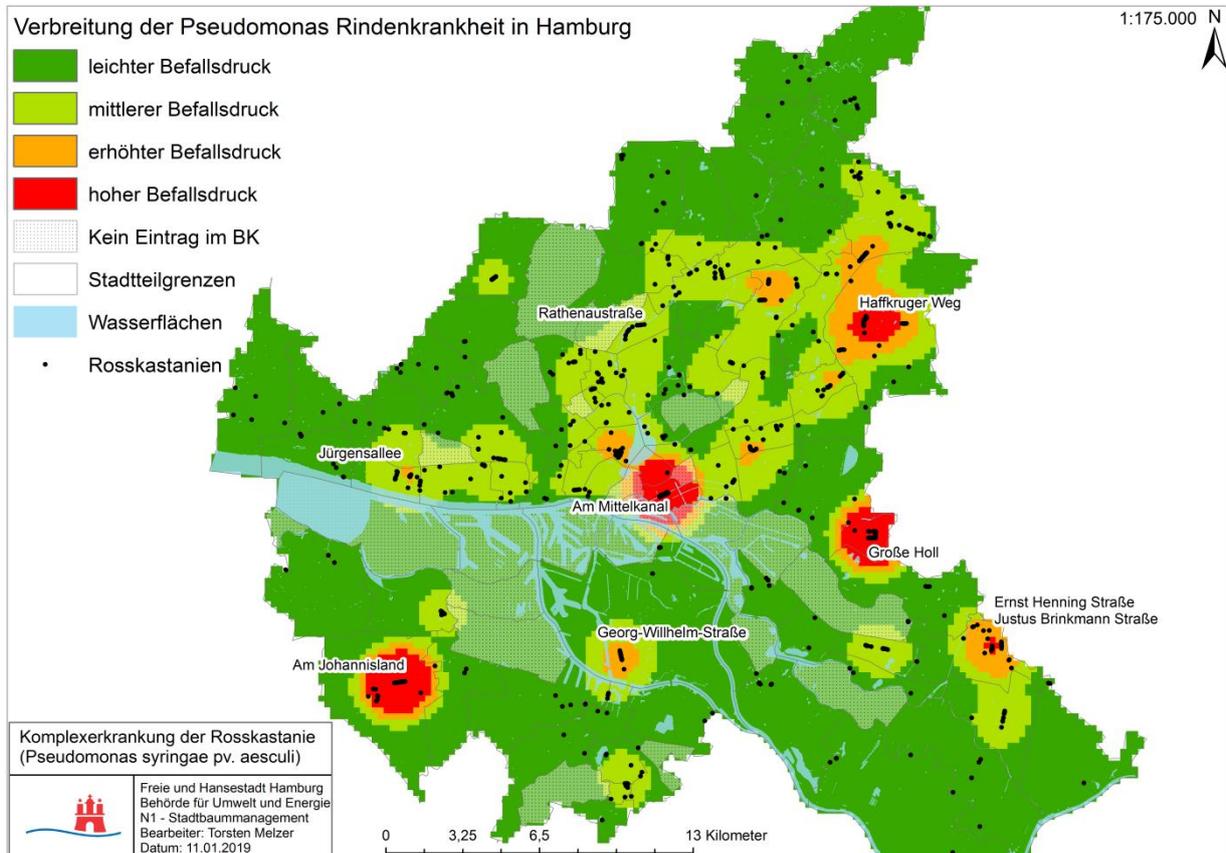


Abbildung 35: Verbreitung der Psa-Infektionen im Hamburger Stadtgebiet. Entsprechend der bereits nachgewiesenen Infektionen oder bereits erfolgten Fällungen, lassen sich Befallsherde darstellen (MELZER 2018).

Insgesamt sind 148 Weiß- und 314 Rotblühende Rosskastanien bereits gefällt worden. Weitere 441 Weiß- und 112 Rotblühende Rosskastanien stehen der Zeit unter Verdacht auf eine Infektion mit Psa und der Rosskastanien-Komplexkrankheit.

Es besteht die Gefahr für eine Verbreitung des Krankheitsbildes in ganz Europa, da Psa bereits in Großbritannien, den Niederlanden, Tschechien, Irland, Norwegen, Belgien und der Schweiz nachgewiesen werden konnte (GREEN et al. 2010, LAUE et al. 2014, DUJESIEFKEN et al. 2016, MAYER 2016). Bei der Beurteilung von Rosskastanien, die mit Psa infiziert sind, muss deswegen auf das Auftreten von *F. velutipes* und *P. ostreatus* geachtet werden, da diese im Zusammenhang mit Psa ein nachweislich erhöhtes Gefahrenpotential aufweisen. Die Wiederherstellung der Verkehrssicherheit von erkrankten Rosskastanien ist nur möglich, wenn sich der Befall auf einzelne Äste beschränkt und diese herausgenommen werden können.

Es besteht die Möglichkeit, dass durch Züchtungsprogramme auf Grundlage von natürlicher Resistenz gegenüber Psa, Sorten etabliert werden können, die gegenüber einer Infektion mit Psa resistent sind (PANKOVA et al. 2015). Auch Melzer (2018) beobachtet offenbar natürliche Resistenzen im Hamburger Rosskastanienbestand, welche auf Grundlage des Hamburger Baumkatasters im Rahmen eines Monitoringprogramms nachgewiesen wurden. Wenn es gelingt, resistente Sorten zu züchten, können an Standorten, an denen eine Ersatzpflanzung von Rosskastanien bisher nicht empfohlen wird, wieder Rosskastanien gepflanzt werden. Diese Sorten wären dann auch nicht dem großen Gefahrenpotential durch *F. velutipes* und *P. ostreatus* ausgesetzt. Durch gezielte Züchtungen konnte auch das sogenannte Ulmensterben begrenzt werden (TCHERNOFF 1962, SOLLA et al. 2005).

Da sich die Einschätzung des Gefahrenpotentials von *F. velutipes* und *P. ostreatus* zunächst auf Laboruntersuchungen bezieht, kann ein Vergleich mit anderen Pilz-Wirt-Kombinationen *in vitro* die Einstufung häufig vorkommender Pilzerkrankungen an Straßen- und Parkbäumen ermöglichen. Als Pilze mit hohem Gefahrenpotential gelten beispielsweise der Riesenporling (*Meripilus giganteus* an Buche) und der Brandkrustenzpilz (*Kretzschamria deusta* an Linde). Geringeres Gefahrenpotential haben bspw. der Schwefelporling (*Laetiporus sulphureus*) oder die Ochsenzunge (*Fistulina hepatica*) an der Eiche. Basierend auf den Erfahrungswerten von Baumkontrolleuren und -gutachtern zu den Pilz-Wirt-Kombinationen könnte ein Katalog über die Ergebnisse aus Abbau- und Festigkeitsversuchen zusätzlich eine Entscheidungshilfe zur Maßnahmenereifung darstellen.

Es ist außerdem interessant, ob die Möglichkeit besteht, antagonistisch wirkende Pilze gegen *F. velutipes* und *P. ostreatus* einzusetzen. Diese Art von natürlichem Antagonismus wurde durch *Trichoderma*-Arten bei *Inonotus hispidus* (Zottiger Schillerporling) und *Ganoderma adpersum* (Wulstiger Lackporling) bereits nachgewiesen und angewandt (SCHUBERT et al. 2008, SCHUBERT et al. 2008b).

7 Literatur

- ABRAMOFF, M. D. und MAGALHAES, P. J.; RAM, S. J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11 (7). 36–42
- ACKER VAN, J.; MILITZ, H.; STEVENS, M. (1999) The Significance of Accelerated Laboratory Testing Methods Determining the Natural Durability of Wood. *Holzforschung* 35 (5). 449–458
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215. 403–410
- ARMSTRONG, F. H. (1935) The effect of progressive decay by *Trametes serialis* on the mechanical strength of the wood of *Sitka spruce*. *Forestry* 9 (1) 441–466
- ARMSTRONG, F. H. und SAVORY, J. G. (1959) The influence of fungal decay on the properties of timber. Effect of Progressive Decay by the Soft Rot Fungus, *Chaetomium globosum*, on the Strength of Beech. *Holzforschung* 13 (3). 84–89
- BAIETTO, M.; WILSON, D. A. (2010) Relative In Vitro Wood Decay Resistance of Sapwood from Landscape Trees of Southern Temperate Regions. *HortScience* 45 (3). 401–408
- BARRON, G. L. (2003) Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity* 4 (1). 3–9
- BIGGS, A. R. (1985) Suberized boundary zones and the chronology of wound response in tree bark. *Phytopathology* 75. 1191–1195
- BODDY, L. (2000) Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology* 31. 185–194
- BRASIER, C. M. (1991) *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115 (3). 151–161
- BRAISER, C. M. (2008) The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Path.* 57. 792–808.
- BRANCHERIAU, L.; BAILLERES, H.; GUITARD, D. (2002) Comparison between modulus of elasticity values calculated using 3 and 4 point bending tests on wooden samples. *Wood and Fiber Science* 36. 367–383
- BRAUN-KIEWNICK, A. und SANDS, D. (2001) Gram-negative Bacteria. In: Schaad, W. N.; Jones, J.B.; Chun, W.: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press. 84–120

- BREITENBACH, J. und KRÄNZLIN, F. (1991) Pilze der Schweiz 03. Röhrlinge und Blätterpilze 1. Teil. Mykologia. 364 S.
- BRELOER, H. (2003) Verkehrssicherheitspflicht bei Bäumen aus rechtlicher und fachlicher Sicht. Thalacker Medien. 144 S.
- BRISCHKE, C.; WELZBACHER, C. R.; HUCKFELDT, T. (2008) Influence of fungal decay by different basidiomycetes on the structural integrity of Norway spruce wood. Holz als Roh- und Werkstoff. 66. 433–438
- BRISCHKE, C.; BEHNEN, C. J.; LENZ, M.-T.; BRANDT, K.; MELCHER, E. (2012) Durability of oak timber bridges – Impact of inherent wood resistance an environmental condition. International Biodeterioration and Biodegradation 75. 115–123
- BUTIN, H. (2011) Krankheiten der Wald- und Parkbäume: Diagnose, Biologie, Bekämpfung. Ulmer Verlag. 303 S.
- CHAKRAVARTY, P. und HIRATSUKA, Y. (1992) Antagonism of two fungi, *Peniophora Polygonia* and *Phellinus tremulae* associated with *Populus tremuloides*. Eur. J. Forest Path. 22. 354–361
- CHO, Y.-S.; KIM, J.-S.; CROWLEY, D. E.; CHO, B.-G. (2003) Groth promotion of edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonada. FEMS Microbiology Letters 218. 271–276
- CURLING, S. F.; CLAUSEN, C. A.; WINANDY, J. E. (2002a) Experimental method to quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. International Biodeterioration und Biodegradation 49. 13–19
- CURLING, S. F.; CLAUSEN, C. A.; WINANDY, J. E. (2002b) Relationships between mechanical properties, weight loss and chemical composition of Wood during incipient brown rot decay. Forest Products Journal 52 (7). 34–37
- DEAN, T. T.; ROOP., B. BETANCOURT, D.; MENETREZ, M. Y. (2004) A simple multiplex Polymerase chain reaction assay for the identification of four enviromentally relevant fungal contaminants. Journal of Microbiological Methods 61. 9–16
- DE JONG, M.; HOLDENRIEDER, O.; SIEBER, N. (1998) Der Violette Schichtpilz (*Chondrostereum purpureum*) ein Mittel zu biologischen Bekämpfung von Stockauschlägen. Schweiz. Z. Forstwes. 149. 17–32
- DEFLORIO, G.; JOHNSON, C.; FINK, S.; SCHWARZE, F. W. M. R. (2008) Decay development in living sapwood of coniferous and deciduous trees inoculated with six wood decay fungi. Forest Ecology and Management 255 (7). 2373–2383

7 Literatur

DIN 52186:1978-06, Prüfung von Holz.; Biegeversuch

DIN 52189-1:1981-12, Prüfung von Holz; Schlagbiegeversuch; Bestimmung der Bruchschlagarbeit

DIN 1305:1988-01, Masse, Wägewert, Kraft, Gewichtskraft, Gewicht, Last; Begriffe

DIN EN 113/A1:2004-04, Holzschutzmittel – Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten – Bestimmung der Grenzen der Wirksamkeit; Deutsche Fassung EN 113/A1:2004-04

DIN EN ISO 178:2013-09, Kunststoffe – Bestimmung der Biegeeigenschaften (ISO 178:2010 + Amd.1:2013); Deutsche Fassung EN ISO 178:2010 + A1:2013

DIN EN 350:2016-12, Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten - Prüfung und Klassifizierung der Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten gegen biologischen Angriff; Deutsche Fassung EN 350:2016

DOWLE, M. und SRINIVASAN, A. (2018) data.table: Extension of `data.frame` .R package version 1.11.8.

DUJESIEFKEN, D.; PEYLO, A.; LIESE, W. (1991) Einfluß der Verletzungszeit auf die Wundreaktion verschiedener Laubbäume und der Fichte. Forstw. Centralblatt 110. 371–380

DUJESIEFKEN, D.; KEHR, R.; POTSCH, T., SCHMITT, U. (2005) Akute Bruchgefahr and Platane (*Platanus x hispanica* Münch.). Erste Untersuchungen zur Biologie und Schadensdynamik der Massaria-Krankheit (*Splanchnonema platani* [Ces.] Barr). In: Dujesiefken, D., Kockerbeck, P. (Hrsg.) Jahrbuch der Baumpflege 2005. Haymarket Media. 61–73

DUJESIEFKEN, D.; SCHMIDT, O.; KEHR, R.; STOBBE, H.; MORETH, U.; SCHRÖDER, T. (2008) Pseudomonas-Rindenkrankheit der Rosskastanie – Erstnachweis des Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* in Deutschland. In: Dujesiefken, D. Kockerbeck, P. (Hrsg.) Jahrbuch der Baumpflege 2008. Haymarket Media 153–164

DUJESIEFKEN, D.; LÜER, B.; SCHMITT, U.; FROMM, J. (2011) Warum verläuft die Fäulnisentwicklung bei der Massaria-Krankheit der Platane so rasch? In: Dujesiefken, D. (Hrsg.) Jahrbuch der Baumpflege 2011. Haymarket Media. 191–197

DUJESIEFKEN, D. und LIESE, W. (2015) The CODIT Principle: Implications for Best Practices. International Society of Arboriculture. 162 p

- DUJESIEFKEN, D.; GAISER, O.; JASKULA, P.; KOWOL, T.; STOBBE, H. (2016) Das Rosskastanien-Sterben – ausgelöst durch *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. In: Dujesiefken, D. (Hrsg.) Jahrbuch der Baumpflege 2016. Haymarket Media. 99–107
- DUJESIEFKEN, D. (2018) Aktuelles zur Pseudomonas-Rindenkrankheit und zum Rosskastanien-Sterben. ProBaum. 2–6
- DURGAPAL, J. C. und SINGH, B. (1980) Taxonomy of pseudomonas pathogenic to horse chestnut, wild fig and wild cherry in India. Indian Phytopath. 24. 24–26
- EGER, G. (1965) Untersuchung über die Bildung und Regeneration von Fruchtkörpern bei Hutpilzen. III *Flammulina velutipes* Curt. Es. Fr. und *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing. Archiv für Mikrobiologie 52. 282–290
- EUL, J. und SCHWANTES, H. O. (1984) Einfluß der Substratkonsistenz auf das Fruktifikationsverhalten von *Lentinus tigrinus* – ein Vergleich flüssiger und fester Nährmedien mit ansonsten gleicher Nähstoffversorgung. Zeitschrift für Mykologie. Bnd 50 (2). 193–201
- FLL-Baumkontrollrichtlinien (2010) Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e.V., Richtlinien für Regelkontrollen zur Überprüfung der Verkehrssicherheit von Bäumen. FLL, Bonn. 53 S.
- FLL-Baumuntersuchungsrichtlinien (2013) Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e.V., Richtlinien für eingehende Untersuchungen zur Überprüfung der Verkehrssicherheit von Bäumen. FLL, Bonn. 42 S.
- GARDES, M. und BRUNS, T. D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2. 113–118
- GIORDANO, L.; SILLO, FA.; GUGLIELMO, F.; GONTHIER, P. (2015) Comparing visual inspection of trees and molecular analysis of internal wood tissues for the diagnosis of wood decay fungi. Forestry: An International Journal of Forest Research 88 (4) 465–470
- GÖHRE, K. (1955) Holzschutzmittelprüfung mit Hilfe der statischen Biegefestigkeit. Arch. Forstwes. Bnd. 4. 293–301
- GREEN, S.; LAUE, B.; FOSSDAL, C.G.; A'HARA, S. W.; COTTRELL, J. E. (2009) Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and its detection by quantitative real-time PCR. Plant Path. 58. 731–44

7 Literatur

- GREEN S.; STUDHOLME, D. J., LAUE, B. E.; DORATI, F.; LOVELL, H.; ARNOLD, D.; COTTRELL, J. E.; BRIDGETT, S.; BLAXTER, M.; HUITEMA, E.; THWAITES, R.; SHARP, P. M.; JACKSON, R. W.; KAMOUN, S. (2010) Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on European horse chestnut. PLoS ONE 5 (4). e10224
- GRIFFITH, G. S.; RAYNER, A. D. M.; WILDMAN, H. G. (1994) Interspecific interactions and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* (Agaricaceae). Nova Hedwig 59. 47–75
- GROSCLAUDE, C. (1988) *Chondrostereum purpureum*. In: Smith, I. M.; Dunez, J.; Lelliott, R. A.; Philips, D. H.; Archer, S. A. (eds.) European handbook of plant disease. Blackwell, Oxford. 510–511
- GUGLIELMO, F.; BERGEMANN, S. E.; GONTHIER, P.; NICOLOTTI, G.; GARBELOTTO, M. (2006) A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. Journal of Applied Microbiology 103. 1490–1507
- GUGLIELMO, F.; GONTHIER, P.; NICOLOTTI, G.; GARBELOTTO, M. (2007) A PCR-based method for the detection of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* sp. and *Phellinus* sp. FEMS Microbiology 282. 228–237
- HANSEN, F.; WISCHNEWSKI, N.; MORETH, U.; MAGEL, E. A. (2011) Molecular identification of *Fitzroya cupressoides*, *Sequoia sempervirens*, and *Thuja plicata* wood using taxon-specific rDNA-ITS primers. IAWA Journal 32. 273–284
- HARDER, R. (1911) Über das Verhalten von Basidiomyceten und Ascomyceten in Mischkulturen. Naturwissensch. Zeitschr. für Forst- und Landwirtsch. 9. 3–4
- HARTLEY, C (1958) Evaluation of wood decay in experimental work. USDA For. Prod. Lab. Mimeo. No. 2119
- HENNINGSSON, B. (1967a) Changes in impact bending strength, weight loss and alkali solubility following fungal attack on birch wood. Studia Forestalia Suecica 41. 1–21
- HENNINGSSON, B. (1967b) Interactions between microorganisms found in birch and aspen pulpwood. Studia Forestalia Suecica 53. 1–31
- HENRICI, D. und GRIMM, W. A. (1984) Drehwuchs und Biegefestigkeit der Roßkastanie. Holz als Roh- und Werkstoff. 153
- HENRY, L. und WICKHAM, H. (2018) purrr: Functional Programming Tools. R package version 0.5.5.
- HENRY, L. und WICKHAM, H. (2019) rlang: Functions for Base Types and Core R and 'Tidyverse' Features. R package version 0.3.1.

- HIROOKA, Y., ROSSMAN, A. Y., ZHUANG, W.-Y., SALGADO-SALAZAR, C., CHAVERRI, P. (2013) Species delimitation for *Neonectria coccinea* group including the causal agents of beech bark disease in Asia, Europe, and North America. *Mycosystema* 32. 485–517
- HORISAWA, S. und SAKUMA, Y.; DOI, S. (2009) Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *J. Wood Sci.* 55. 133–138
- KAUR, L.; DHANDA, S.; SODHI, H. S.; KAPOOR, S.; KHANNA, P. K. (2011) Storage and Preservation of Temperate Mushroom Cultures, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus florida*. *Indian Journal of Microbiology* 51. 234-238 pp
- KEHR, R. (2007) Langzeitversuch zur künstlichen Infektion von Winter-Linden mit Brandkrustenpilz in einem Waldbestand. In: Dujesiefken, D., Kockerbeck, P. (Hrsg.) *Jahrbuch der Baumpflege 2007*. Haymarket Media. 200–214
- KEHR, R.; MÖHLENHOFF, P.; PETERSEN, K. (2010) Pseudomonas-Rindenkrankheit der Rosskastanie – Anleitung zur Probennahme für den Schnellnachweis. In: Dujesiefken, D. (Hrsg.) *Jahrbuch der Baumpflege 2010*. Haymarket Media. 306–310
- KERSTEN, W. (2001) Infektionsgefahr durch den Einsatz invasiver Diagnosegeräte am lebenden Baum. In: Dujesiefken, D., Kockerbeck, P. (Hrsg.) *Jahrbuch der Baumpflege 2001*. Haymarket Media. 195–202
- KIM, W. G.; WEON, H. Y.; SEOK, S. J.; LEE, K. H. (2008) In vitro Antagonistic Characteristics of Bacilli Isolates against *Trichoderma* spp. and Three Species of Mushrooms. *Microbiology* 36 (4). 266–269
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44 (2). 301–307
- KIRK, H. und SCHULTZE-DEWITZ, G. (1968) Elastizität und Schlagzähigkeit und ihr Weiserwert für die Wirksamkeit von Holzschutzmitteln gegenüber Ascomyceten, *Fungi imperfecti* und Basidiomyceten. *Holztechnologie* 9 (4). 249–254
- DE KEIJZER, J.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; KETELAAR, T.; VAN LAMMEREN, A. A. M. (2012) Histological examination of horse chestnut infection by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and non-destructive heat treatment to stop disease progression. *PLoS ONE* 7 (7). e39064
- KLEIST, G. und PEEK, R.-D. (1999) The effect of sample size on decay when assessing natural durability. Tagungsbeitrag. COST Action E2: Wood Durability. Improvement Of Chemicals and Substrate Modification. Dublin, March 1997. 6 p
- KRÜSSMANN, G. (1976) *Handbuch der Laubgehölze*. Verlag Paul Parey. 486 S.

7 Literatur

- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33. 1870–1874
- LAUE, B. E.; STEELE, H.; GREEN, S. (2014) Survival, cold tolerance and seasonality of infection of European horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Plant Path.* 63 (6). 1417–1425
- LICHTENAUER, A.; KOWOL, T.; DUJESIEFKEN, D. (2013) Pilze bei der Baumkontrolle. Erkennen wichtiger Arten an Straßen- und Parkbäumen. *Haymarket Media*. 64 S.
- LIESE, J. und STAMER, J. (1934) Vergleichende Versuche über die Zerstörungsintensität einiger wichtiger holzerstörender und die hierdurch verursachte Festigkeitsminderung des Holzes. *Angewandte Botanik* 16. 363–372
- LIESE, W. und VON PECHMANN, H. (1959) Untersuchungen über den Einfluß von Moderfäulepilzen auf die Holzfestigkeit. *Forstw. Centralblatt* 78. 271–279
- LIESE, W. und AMMER, U. (1964) Über den Einfluß von Moderfäulepilzen auf die Schlagbiegefestigkeit von Buchenholz. *Holz als Roh- und Werkstoff* 22. 455–459
- LI, X.; LI, Y. (2014) Quality comparison and analysis on white *Flammulina velutipes* grown with bottle lines in China. *Edible Fungi China*. 33. 20–24
- LOHWAG, K. (1955) Zur Abbauintensität holzerstörender Pilze. *Sydowia* 6. 359–366
- LOHWAG, K. (1966) Über die gegenseitige Beeinflussung von Mycelien. *Sydowia* 20. 176–178
- LYR, H. (1958) Die Induktion der Laccasebildung bei *Collybia velutipes* Curt. *Arch. Microbiol.* 28. 310–324
- LYR, H. und ZIEGLER, H. (1959) Enzymausscheidung und Holzabbau durch *Phellinus igniarius* Qué. und *Collybia velutipes* Curt. *Phytopathologische Zeitschrift*. Bnd. 35. 173–200
- MA, X.; KIRKER, G. T.; CLAUSEN, C. A.; JIANG, M.; ZHOU, H. (2017) Modulus of Elasticity Loss as a Rapid Indicator of Rot-fungal Attack on Untreated and Preservative-treated Wood in Laboratory Tests. *BioResources*. 12 (1). 1850–1860
- MABETTE, T. (2007) Bacterial bleeding canker beyond doubt. *Forestry and British Timber* 6. 16–23

- MACK, R. N.; SIMBERLOFF, D., LONSDALE, W. M.; EVANS, H.; CLOUT, M., BAZZAZ, F. A. (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10. 689–710
- MAYER, J. B.; BRUNNER, M.; RIGLING, D. (2016) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on horse chestnut in Switzerland. *New Disease Reports* 33. 19 p
- MCEVOY, A.; O'REGAN, F.; FLEMING, C. C.; MORELAND, B. P.; POLLOCK, J. A.; MCGUINNESS, B. W.; HODKINSON, T. R. (2016) Bleeding canker of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) in Ireland: incidence, severity and characterization using DNA sequences and real-time PCR. *Plant Path.* 65. 1419–1429
- MELZER, T. (2018) Die Komplexkrankheit der Rosskastanie-Befallssituation und Verbreitungsdynamik auf Hamburger Stadtgebiet. Tagungsband. 36. Osnabrücker Baumpflegetage.
- MENZINGER, W. und SANFTLEBEN, H. (1980) Parasitäre Krankheiten und Schäden an Gehölzen. Verlag Paul Parey. 216 S.
- MERTELIK, J.; KLOUDOVA, K.; PANKOVA, I.; KREJZAR, V.; KUDELA, V.; STENLID, J. (2013) Occurrence of horse chestnut bleeding canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* in the Czech Republic. *Forest Path.* 43 (2). 165–167
- MÜLLER-NAVARRA, A. (2012) Molekularbiologische Untersuchungen zu neuartigen Schäden an der Rotblühenden Rosskastanie (*Aesculus x carnea*). Masterarbeit Universität Hamburg. 91 S.
- MÜLLER-NAVARRA, A.; GAISER, O.; MORETH, U.; DUJESIEFKEN, D., MAGEL, E. A. (2014) New disease on red flowering horse chestnut (*Aesculus x carnea* HAYNE) and the molecular identification of the involved pathogens. *Journal für Kulturpflanzen* 66 (12). 417–423
- MULLETT, M. S. und J. F. WEBBER (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*: folia infection of *Aesculus* species and temperature-growth relationships. *Forest Path.* 43 (5). 371–378
- NICOLETTI, G. G. P.; GUGLIELMO, F.; GARBELOTTO, M. M. (2009) A Biomolecular Method for Detection of Wood Decay Fungi: Focus on Tree Stability Assessment. *Arboriculture and Urban Forestry* 35. 14–19
- NIEMZ, P. (2008) Physik des Holzes. In: Wagenführ, A. und Scholz, F. (Hrsg.) (2008) Taschenbuch der Holztechnik. Carl Hanser Verlag. 568 S.
- NOWAK, D. J.; CRANE, D. E.; STEVENS, J. C. (2006) Air pollution removal by urban trees and shrubs in the United States. *Urban Forestry und Urban Greening* 4 (3-4). 115–123

7 Literatur

- PÁNKOVÁ, I.; KREZJAR, V.; MERTILEK, J.; KLOUDOVA, K. (2015) The occurrence of lines tolerant to the causal agent of bleeding canker, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, in a natural horse chestnut population in Central Europe. *Plant Path.* 141 (1). 3–13
- PARFITT, D.; HUNT, J.; DOCKRELL, D.; ROGERS, H. J.; BODDY, L. (2010) Do all trees carry the seeds of their own destruction? PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. *Fungal Biology* 3. 338–346
- PAULEIT, S.; JONES, N.; GARCIA-MARIN, G.; GARCIA-VALDECANTOS, J.-L.; REVIERE, L. M.; VIDAL-BEAUDET, L.; BODSON, M.; RANDTRUP, T. B. (2002) Tree establishment practice in towns and cities – results from a European survey. *Urban Forestry and Urban Greening* 1 (2). 83–96
- PECHMANN VON, H. und SCHAILE, O. (1950) Über die Änderung der dynamischen Festigkeit und der chemischen Zusammensetzung des Holzes durch den Angriff holzerstörender Pilze. *Forstw. Centralblatt* 69. 441–466
- PERCIVAL, G. C.; BARROW, I.; NOVISS, K.; KEARY, I.; PENNINGTON, P. (2011) The impact of horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka and Dimic; HCLM) on vitality, growth and reproduction of *Aesculus hippocastanum* L. *Urban Forestry and Urban Greening* 10 (1). 11–17
- PERCIVAL, G. C.; BANKS, J.M. (2014) Studies of the interaction between horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*) and bacterial bleeding canker (*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*). *Urban Forestry und Urban Greening* 13 (2). 403–409
- PIERSON, C. F.; CEP.O.NIS, M. J.; MCCOLLOCH, L. P. (1971) Market Diseases of Apples, Pears, and Quinces. *Agriculture Handbook No. 376*. 112 pp
- RÅBERG, U.; EDLUND, M.-L.; TERZIEV, N.; LAND, C. J. (2005) Testing and evaluation of natural durability of wood in above ground conditions in Europe – an overview. *Journal of Wood Science* 51 (5). 429–440
- R CORE TEAM (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- RAYNER, A. D. M. und BODDY, L. (1988) *Fungal Decomposition of Wood: Its Biology and Ecology*. Wiley-VCH Verlag. 587 p
- RIBERA, J.; FINK, S., BAS, M. D. C.; SCHWARZE, F. W. M. R. (2017) Integrated control of wood destroying basidiomycetes combining Cu-based wood preservatives and *Trichoderma* spp. *PLoS ONE* 12 (4). e0174335
- ROLOFF, A. (2018) Vitalitätsbeurteilung von Bäumen. Aktueller Stand und Weiterentwicklung. *Haymarket Media*. 205 S.

- ROLOFF, A.; WEISGERBER, H.; LANG, U.; STIMM, B. (2010) Bäume Mitteleuropas. Wiley-VCH Verlag. 479 S.
- SÆBØ, A.; BENEDIKZ, T.; RANDRUP, T. B. (2003) Selection of trees for urban forestry in the Nordic countries. *Urban Forestry und Urban Greening* 2 (2). 101–114
- SCHLECHTE, G. (1986) Holzbewohnende Pilze. Jahn und Ernst Verlag. 213 S.
- SCHMIDT, O. (2006) *Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use*. Springer Science & Business Media. 334 p
- SCHMIDT, O.; DUJESIEFKEN, D.; STOBBE, H.; MORETH, U.; KEHR, R.; SCHRÖDER, T. (2008) *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* associated with horse chestnut bleeding canker in Germany. *Forest Path.* 38. 124–128
- SCHMIDT, O.; MORETH, U.; DUJESIEFKEN, D.; STOBBE, H.; GAISER, O. (2009) Fast molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* in diseased horse chestnut trees. *Forest Path.* 39. 343–348
- SCHMIDT, O.; GAISER, O.; DUJESIEFKEN, D. (2012) Molecular identification of decay fungi in the wood of urban trees. *Eur. J. Forest Res.* 131. 885–891
- SCHMIDT, O.; DUJESIEFKEN, D.; STOBBE, H. (2014) Infektionsversuche an Rosskastanien mit *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Journal für Kulturpflanzen* 66 (4). 130–135
- SCHUBERT, M., FINK, S., SCHWARZE, F.W.M.R. (2008). In vitro screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. Part I. *Arboricultural Journal* 31. 227–248.
- SCHUBERT, M.; FINK, S. SCHWARZE, F. W. M. R. (2008b) Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control.* 45 (1). 111–123
- SCHULTZE-DEWITZ, G. (1966) Beziehungen zwischen der Elastizität und der statischen sowie dynamischen Biegefestigkeit von Kiefernholz nach dem Angriff durch echte holzerstörende Pilze. *Holz als Roh- und Werkstoff* 24. 506–512
- SCHWARZE, F. W. M. R.; JAUSS, F.; SPENCER, C.; HALLAM, C.; SCHUBERT, M. (2012) Evaluation of an antagonistic *Trichoderma* strain for reducing the rate of wood decomposition by the white rot fungus *Phellinus noxius*. *Biological Control* 61. 160–168
- SEEHANN, G. (1979) Holzerstörende Pilze an Straßen- und Parkbäumen in Hamburg. *Mitt. Dtsch. Dendrol. Ges.* 71. 193–221

7 Literatur

- SHORTLE, W. C.; SMITH, K. T.; DUDZIK, K. R., PARKER, S. (1995) Response of maple sapwood to injury and infection. *Forest Path.* 25. 241–252
- SOLLA, A.; BOHNENS, J.; COLLIN, E.; DIAMANDIS, S.; FRANKE, A.; GIL, L.; BURON, M.; SANTINI, A.; MITTEMPERGHER, L.; PINON, J.; VAN DEN BROECK, AN (2005) Screening European Elms for resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Science* 51 (2). 134–141
- SONNENBICHLER, J.; DIETRICH, J.; PEIPP, H. (1994) Secondary fungal metabolites and their biological activities, V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites in basidiomycetes. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375, 71–79
- SOSNOWSKI, M. R.; SHTIENBERG, D.; CREASER, M. L.; WICKS, T. J.; LARDNER, R.; SCOTT, E. S. (2007) The influence of climate on foliar symptoms of eutypa dieback in grapevines. *Phytopathology* 97. 1284–1289
- STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W.; GOEBEL, B. M. (1993) Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *The FASEB Journal* 7. 232–236
- STEELE, H.; LAUE, B. E.; MACASKILL, G. A.; HENDRY, S. J.; GREEN, S. (2010) Analysis of the natural infection of European horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Plant Path.* 59. 1005–1013
- STOBBE, H.; SCHMITT, U.; ECKSTEIN, D.; DUJESIEFKEN, D. (2002) Development stages and fine structure of surface callus formed after debarking on living lime trees (*Tilia* sp.). *Ann. Bot.* 89. 773–782
- STOBBE, H.; SCHMIDT, O.; MORETH, U.; KEHR, R.; DUJESIEFKEN, D. (2008) *Pseudomonas*: Derzeitige Verbreitung. Neuartige Rindenkrankheit an Rosskastanien in Deutschland. *AFZ Der Wald* 63. 176–177
- TCHERNOFF, V. (1965) Methods for screening and for the rapid selection of elms for resistance to Dutch elm disease. *Acta Bot. Neerl.* 14. 409–452
- TELLO, M.-L.; TOMALAK, M.; SIWECKI, R.; GÄPER, J.; MOTTA, E., MATEO-SAGASTA, E. (2005) Biotic urban growing conditions – Threats, pests and diseases. In: Konijnendiejk, C.; Nilsson, K.; Randrup, B. T.; Schipperijn, J. (Eds.) *Urban Forests and Trees*. Springer Verlag. 326–365
- TERHO, M.; HANTULA, J.; HALLAKSELA, A.-M. (2007) Occurrence and decay patterns of common wood-decay fungi in hazardous trees felled in Helsinki City. *Forest Path.* 37. 420–432

- TRENDELENBURG, R. (1940) Über die Abkürzung der Zeitdauer von Pilzversuchen an Holz mit Hilfe der Schlagbiegeprüfung. *Holz als Roh- und Werkstoff* 12. 397–407
- TROCKENBRODT, M. und LIESE, W. (1991) Untersuchungen zur Wundreaktion in der Rinde von *Populus tremula* L.; *Platanus x acerifolia* (Ait.) Willd. und *Betula pendula*. *Angew. Bot.* 65. 279–287
- TYRVÄINEN, L.; PAULEIT, S.; SEELAND, K.; DE VRIES, S. (2005) Benefits and uses of urban forests and trees. In: Konijnendijk, C. C.; Nilsson, K.; Randrup, T. B.; Schipperijn, J. (Eds.) *Urban Forests and Trees*. Springer Verlag. 81–110
- WAGENFÜHR, R. (2006) *Holzatlas*. Carl Hanser Verlag. 816 S.
- WARDA, H. D. (2001) *Das große Buch der Garten- und Landschaftsgehölze*. Bruns Pflanzen Export GmbH im Eigenverlag, Bad Zwischenahn. 2., erweiterte Auflage. 935 S.
- WAZNY, J. (1958) Studien über die Einwirkungen von *Merulius lacrymans* Wulf. Fr. und *Coniophora cerebella* Pers. auf die mechanischen Eigenschaften befallenen Holzes. *Holz als Roh- und Werkstoff* 16 (8). 285–288
- WEBBER, J. F.; PARKINSON, N. M.; ROSE, J.; STANFORD, H.; COOK, R. T. A.; ELPHINSONE, J. G. (2008) Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* causing bleeding canker of horse chestnut in the UK. *Plant Path.* 57. 368
- WERRES, S. und WAGNER, S. (2007) Neuartiges Rosskastaniensterben – *Pseudomonas*-Bakterium verursacht Krankheit an Rosskastanien. *AFZ Der Wald* 62 (20). 1–2
- WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (eds.) *PCR Protocols*. Academic Press San Diego. 315–322
- WICKHAM, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York
- WICKHAM, H.; HESTER, J.; FRANCOIS, R. (2018a) *readr: Read Rectangular Text Data*. R package version 1.3.1.
- WICKHAM, H.; FRANÇOIS, R.; HENRY, L.; MÜLLER, K. (2018b) *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 0.7.8.
- WILCOX, W. W. (1978) Review of Literature on the Effects of early Stages of Decay on Wood Strength. *Wood and Fiber Science* 9 (4). 252–257
- WIMMER, C. A. (2001) *Bäume und Sträucher in historischen Gärten–Gehölzverwendung in Geschichte und Denkmalpflege*. Muskauer Schriften. Bnd. 3. Verlag der Kunst. 256 S.

7 Literatur

- WINANDY, E. J. und MORRELL, J. J. (1993) Relationship between incipient decay, strength, and chemical composition of Douglas-Fir heartwood. *Wood and Fiber Science* 25 (3). 278–288
- WOLKINGER, F. (1973) Holzerstörende Basidiomyceten auf *Aesculus hippocastanum* und *Sophora japonica* im Stadtgebiet Graz. *Mitt. Naturwiss. Ver. Steiermark* 103. 205–220
- YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13 (134). 11 p
- ZYCHA, H. und DIMITRI, L. (1968) Ausmaß und Ursache der Kernfäule in einer Fichtenprobefläche in Reinhausen (Niedersachsen). *Forstw. Centralblatt* 87 (1). 331–41

Anhang

Tabelle 21: Kontrollbogen zur Aufnahme eines Probenbaumes.

Ort	Rot/Weiß Bhd	Vitalität	PFK 1=vereinzel, 2=büschelig, 3=viele	Leckstellen					Rindenrisse 1=beginnend 2=ausgeprägt 3=stark ausgeprägt	Umgebung/Pflegezustand		Astungswunden/ Höhlungen	
				1=vereinzel, 2=gruppenweise, 3=viele 4=großflächig 5=gesamter Baum	Psa	Standort	Kronenraum	Standort		Kronenraum			
		0		P.o.	F.v.	Ba	Ch	andere				AW	HÖ
		1	SF					SF			freistehend		
		2	ST					ST			einseitig		
		3	STÄ					STÄ			zweiseitig		
		4	AST					AST			mind. dreiseitig		

PFK = Pilzfruchtkörper

Rot = Rotblühende Rosskastanie

P.o. = *P. ostreatus*

Weiß = Weißblühende Rosskastanie

F.v. = *F. velutipes*

Bhd = Brusthöhendurchmesser

Ba = *B. adusta*Psa = *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*Ch = *C. purpureum*

SF = Stammfuß

ST = Stamm

STA = Starkast

AST = Äste > Starkast

AW = Astungswunden

HÖ = Höhlungen