

Abschlussbericht zum Forschungsauftrag  
**„Verbundvorhaben zur Bekämpfung des Feuerbranderreger  
im Obstbau ohne Antibiotika“**

Projektteil des LTZ-S Az 06HS032

15.08.2007 - 31.08.2010

**Verbesserung und Verfeinerung von bestehenden computergestützten Prognosemodellen für den Feuerbrand unter Berücksichtigung verschiedener Bekämpfungsverfahren und -mittel, unterschiedlich anfälliger Sorten und Anbauverfahren (integriert, ökologisch, Streuobstwiesen) unterstützt durch Untersuchungen zur Epidemiologie und Pathogenese des Feuerbranderreger (*Erwinia amylovora*)**

Dr. Esther Moltmann  
Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg -  
Außenstelle Stuttgart  
Reinsburgstraße 107  
70197 Stuttgart

Dr. Romeo Herr  
Universität Hohenheim  
Allgemeine Virologie  
70593 Stuttgart

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

1.1. Planung und Ablauf des Projekts

1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

2. Material und Methoden

3. Ergebnisse

3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

4. Zusammenfassung

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen, weiterführende Fragestellungen

6. Literaturverzeichnis

## **1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts**

Hauptziel des Projektes war die Erstellung eines verbesserten Programms zur Prognose von Blüten- und Triebinfektionen durch den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*, das sowohl Berater als auch Anbauer bedienen können und das für verschiedene Bekämpfungsverfahren und -mittel im integrierten und ökologischen Anbau bzw. Streuobstbau und bei unterschiedlich anfälligen Sorten geeignet ist. Die Anzahl Spritzungen und die ausgebrachte Pflanzenschutzmittelmenge sollten damit reduziert und der Einsatz biologischer Präparate besser planbar werden.

Ein weiteres Ziel des Projektes war es, ein besseres Verständnis der Pathogenese und der Epidemiologie des Feuerbranderrers *Erwinia amylovora* zu erarbeiten. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Einflüsse verschiedener Faktoren wie endo- und epiphytischer Besiedlung von Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen sollten zusammen mit einer verbesserten Korrelation zu detaillierten Wetterdaten direkt in die Erstellung des verbesserten Prognoseprogramms zur Vorhersage von Blüten- und Triebinfektionen durch den Feuerbrand einfließen. Im Zuge dieser Untersuchungen sollen außerdem der Einfluss von Vektoren und Pflanzenschutzmassnahmen auf den Ausbreitungsverlauf des Bakteriums verfolgt, sowie das Augenmerk auf einen möglichst frühzeitigen Erregernachweis gelegt werden (Universität Konstanz = UKN).

### **1.1. Planung und Ablauf des Projekts**

Das bisher verwendete überwiegend empirisch anhand einfacher Wetterdaten erstellte Feuerbrandmodell sollte durch Auswertung detaillierter Wetterdaten von Befallsereignissen der Vergangenheit und durch Untersuchungen zur Biologie des Erregers auf eine fundiertere Datenbasis gestellt und damit verfeinert werden. Der Algorithmus des Modells musste dazu verändert werden. Es sollten Wetterdaten vergangener Befallsereignisse analysiert werden. Laborversuche zur Infizierbarkeit von Blüten in Abhängigkeit von Temperatur und Feuchte sowie der Sorte und Messungen zur Übertragbarkeit der Laborergebnisse auf das Freiland wurden durchgeführt. Weiterhin wurden Freilanduntersuchungen zu möglichen Inokulumquellen, zur Ausbreitung der Bakterien von Blüte zu Blüte in Abhängigkeit von der Witterung und der Vektorenaktivität an mehreren Standorten und zum frühzeitigen Erregernachweis in der Blüte durchgeführt.

Untersuchungen zur Pathogenese des Erregers an verschiedenen Sorten und der Einfluss der Witterung ergänzten diese Untersuchungen (UKN). Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollten in die Algorithmen des bestehenden Feuerbrandprogramms des Landwirtschaftlichen Technologiezentrums Augustenberg, Außenstelle Stuttgart (LTZ-S) eingebaut und hieraus ein verbessertes Computerprogramm mit bedienerfreundlichen Ein- und Ausgabeformaten erstellt werden, das in die Praxis der Pflanzenschutzdienste eingeführt werden kann.

## **1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Der Feuerbrand, verursacht durch das Gram-negative Bakterium *Erwinia amylovora*, stellt heute weltweit die bedeutendste bakterielle Erkrankung des Kernobstes dar. Sie ist eine nicht regelmäßig, sondern sporadisch auftretende Krankheit, deren Folgen jedoch wirtschaftlich gravierend sein können. Daher ist eine zuverlässige Prognose zur Vermeidung unnötiger Behandlungen mit Pflanzenschutzmitteln dringend erforderlich. Mit Hilfe von Prognosemodellen wird das Risiko für Infektionen unter bestimmten Umweltbedingungen mit möglichst hoher Präzision und Treffsicherheit abgeschätzt. Der wichtigste Infektionsweg des Feuerbrands ist die Blüteninfektion, an zweiter Stelle stehen die Triebinfektionen, Infektionen nach Hagel und der Unterlagenbefall. Als Prognosemodelle für Blüteninfektionen werden heute weltweit Billing's Integrated System 95 - BIS 95 (Billing 1996, 1999), Maryblyt<sup>TM</sup> (Steiner 1990a, 1990b) und Cougarblight (Smith 1999) eingesetzt. Alle drei Modelle sind im Wesentlichen empirisch entwickelt worden und basieren ausschließlich auf der Berechnung von Wetterdaten. Die Datenbasis beschränkt sich auf Höchst- und Tiefsttemperaturen und Niederschläge bzw. Tauereignisse eines Tages. Der tatsächliche Temperaturverlauf wird durch eine Sinuskurve simuliert (Baskerville und Emin 1969). Kontinuierlich ermittelte tatsächliche Stundenwerte gehen nicht ein. Relativ grob für einen einzelnen Tag wird ein Infektionsrisiko berechnet. Ausschließlich die Wetterdaten in der Blütezeit werden verwendet, nicht aber die der Vorblütezeit oder des Vorjahres, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass die primären Inokulumquellen bereits zu diesem Zeitpunkt aktiviert werden und das Auftreten von Blüteninfektionen beeinflussen. Von den phänologischen Daten werden lediglich der Blühbeginn und das Blühende berücksichtigt. Sortenunterschiede gehen nicht ein. Die Modelle BIS 95 und Maryblyt<sup>TM</sup> gehen davon aus, dass der Erreger in jedem Fall anwesend ist. Im Modell Cougarblight wird das lokale Inokulum anhand der Befallsgeschichte der Anlage abgeschätzt, aber nicht gemessen. Über die Gefahr von Triebinfektionen werden keine

oder im Modell BIS 95 allenfalls grobe Aussagen gemacht. Weitere Prognosemodelle sind in der Literatur beschrieben, aber nicht weiter in der Praxis validiert worden.

Baden-Württemberg ist das Bundesland, das aufgrund seiner klimatischen und obstbaulichen Struktur am stärksten vom Feuerbrand betroffen ist. Das LTZ-S berechnet seit 1994 für die Obstbauregionen in Baden-Württemberg die Feuerbrandprognose, um streptomycinhaltige Pflanzenschutzmittel zur Abwehr von Blüteninfektionen termingerecht zur Anwendung freigeben zu können. Diese offizielle Freigabe verhindert unnötige Anwendungen und beugt damit der Entwicklung von Resistenzen gegen den Wirkstoff vor. Sie ist deshalb Bestandteil der Genehmigung von Streptomycin nach dem Pflanzenschutzgesetz. Das LTZ-S hat 1994 zwei verschiedene Modelle, zunächst die Modelle Maryblyt<sup>TM</sup> und Billing's Revised System, in ein Computerprogramm, das Feuerbrandprogramm der LfP (jetzt LTZ-S) übertragen, 1997 das Billing's Revised System durch BIS 95 ersetzt, Maryblyt<sup>TM</sup> durch die Version 4.3 (Steiner und Lightner 1996) aktualisiert und beide Modelle leicht modifiziert (Moltmann 1996a, 1996b). Seit 1997 sind keine Änderungen mehr vorgenommen worden, um die Basis für die Warnung konstant zu halten. Das Modell Cougarblight wird am LTZ-S gesondert berechnet. Die Wetterdaten für das Programm werden von 60 - 80 Kleinmessstationen in den Obstanlagen des Landes verteilt erhoben. Dieses Messnetz wurde Anfang der neunziger Jahre aufgebaut und kontinuierlich erweitert. Die Wetterdaten liegen seither als Stundenwerte archiviert vor.

Die Erfahrungen mit dem Programm in den vergangenen 14 Jahren hinsichtlich der Aussagekraft wurden festgehalten (Moltmann 1999, 2004, 2006). Alle drei Modelle berechnen nahezu dieselben Behandlungstermine. Eine weitere Optimierung erscheint daher mit der bisher verwendeten Datenbasis nicht möglich. Ungeklärt ist bei den jetzigen Modellen die Bedeutung von Niederschlag bzw. Tau. Eine Benetzung der Blüten ist nach Laborversuchen zur Biologie des Erregers zwar für eine Infektion erforderlich (Pusey 1997, 2000), in der Vergangenheit traten aber mehrfach Situationen auf, in denen es zu einer Infektion ohne ein gemessenes Nässeereignis kam. Die Taunässe wird im bisherigen Programm mittels Blattnässefühler und eines mehr oder weniger willkürlich gewählten Schwellenwerts ermittelt. Die Luftfeuchte geht in das Programm bisher nicht ein, obwohl sie eine im Gegensatz zur Blattnässe eichfähige meteorologische Messgröße ist. Das führt dazu, dass bei Überschreiten der Temperaturschwelle bereits ohne ein Nässeereignis gewarnt wird, was mitunter unnötige Anwendungen von Streptomycin zur Folge hat. Eine weitere

Schwachstelle der Modelle sind die starren Temperaturschwellen, die nur eine Ja/Nein-Entscheidung erlauben. Praxisgerechter wäre die Angabe eines Bereiches mit abgestufter Infektionsgefahr.

Die Modelle sind über die Berechnung potentieller Infektionstage auf die Ausbringung eines direkt auf die Feuerbrandbakterien wirksamen Bakterizids wie Streptomycin ausgerichtet. Die Anwendungstermine biologischer Mittel liegen jedoch in Abhängigkeit von der Witterung mehr oder weniger weit vor einem potentiellen Infektionstag (Johnson et al. 2004). Mit einem verbesserten Programm sollte daher zusammen mit der Wettervorhersage und dem Verhalten der Antagonisten gegenüber der Witterung der optimale Ausbringungstermin auch für solche biologische Mittel zu bestimmen sein. In den USA wird zur Zeit ebenfalls an Verbesserungen der Prognosemodelle gearbeitet (H.S. Aldwinckle, pers. Mitteilung). Während der Projektlaufzeit veröffentlichte Ergebnisse werden in die eigene Programmverbesserung einfließen, soweit sie für die hiesigen Verhältnisse verwertbar sind.

Der Feuerbrand trat in den letzten Jahren in Baden-Württemberg nicht mehr großflächig auf, wie es Mitte der 90er Jahre noch der Fall war, sondern verursachte nur noch lokal größere Schäden. Eine Ergänzung der Modelle um Informationen zum lokal vorhandenen Inokulum wäre daher wünschenswert. Da die Feuerbrandbakterien vor der Infektion der Blüte die Narbe besiedeln und sich dort auf hohe Zahlen vermehren, bietet sich die Untersuchung von Blütenproben an. Seit zwei Jahren führt das LTZ-S ein landesweites Blütenmonitoring durch. Zusätzlich untersucht das LTZ-S an einem alten Befallsstandort (Schlat bei Göppingen) und in der Versuchsanlage Kirschgartshausen mögliche primäre Inokulumquellen sowie die Ausbreitung der Feuerbrandbakterien nach natürlicher bzw. künstlicher Inokulation. Als Nachweismethode wird die am LTZ-S optimierte und etablierte molekularbiologische nested PCR-Methode (verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion) verwendet, die schnell und hochempfindlich ist. Die bisherigen Ergebnisse sind viel versprechend. Seit 2006 werden ähnliche Messungen auch von der UKN mit Hilfe eines mobilen Real Time PCR Gerätes im Rahmen eines von der BLE geförderten Projektes durchgeführt (Förderkennzeichen 04HS008). Hier werden verschiedene alte Befallsstandorte im Bodenseeraum, sowie die Versuchsanlage Karsee beprobt. Die Messungen im Bodenseeraum ergänzen die im Regierungsbezirk Stuttgart durchgeführten Untersuchungen und sollen in Zukunft noch besser aufeinander abgestimmt und um die Erfassung der epiphytischen Verbreitung von *E. amylovora* auf Nicht-Wirtspflanzen erweitert werden. Da eine Validierung der Methodik

(Korrelation von epiphytischem Nachweis und tatsächlich auftretendem Befall) noch aussteht, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein Einsatz der mobilen Real Time PCR in der obstbaulichen Praxis allerdings noch nicht flächendeckend möglich. Die Entwicklungen im Bereich des schnellen und empfindlichen Bakteriennachweises, lassen aber eine zukünftige Nutzung des Systems möglich erscheinen. Auf jeden Fall werden die Untersuchungen zum frühzeitigen Nachweis des Erregers auf der Blüte zu einem besseren Verständnis der Epidemiologie des Erregers beitragen.

Neben der Behandlung der Blüten mit Bakteriziden nach Prognosemodellen beruht die Strategie zur Bekämpfung von Feuerbrand derzeit auf dem konsequenten Entfernen von befallenen Pflanzenteilen. Pflanzenteile mit sichtbaren Symptomen sollen das ganze Jahr über entfernt und verbrannt werden, um das Erregerpotential möglichst gering zu halten. Dabei sollen befallene Bäume bis weit ins gesunde Holz zurück geschnitten werden. Wenn der Stamm betroffen ist muss der Baum gerodet werden. Ein Unsicherheitsfaktor bei dieser Methode ist, dass bisher nicht bekannt ist, wie weit der Erreger über sichtbare Symptome hinaus bereits im Gewebe vorgedrungen ist. Häufig wird an sanierten Bäumen in den Folgejahren wieder starker Befall beobachtet. Daher ist anzunehmen, dass der Erreger über längere Zeit latent in der Pflanze überdauern kann und unter günstigen Bedingungen wieder massiv zu Symptomen führt. Völlig unklar ist dabei, ob latente Infektionen auch an Bäumen vorhanden sind, die noch nie Symptome gezeigt haben. Solche Bäume könnten als ständige Inokulumquelle unerkannt immer wieder zu Befall führen. Eine zuverlässige Aussage über eine mögliche latente endophytische Ausbreitung des Erregers in symptomfreien Gewebe ist daher dringend erforderlich.

Der Feuerbranderreger wurde auch auf Blüten und anderen Pflanzenteilen von Pflanzenarten nachgewiesen, an denen eine Symptombildung bisher nicht beobachtet werden konnte (beispielsweise Löwenzahn und Kirsche; Dr. Moltmann, pers. Mitteilung). Eine epiphytische Ausbreitung der Bakterien auf Nicht-Wirtspflanzen könnte einen wesentlichen Beitrag zu einer Verbreitung des Erregers leisten. Bisher liegen keine Angaben darüber vor, ob und wie der Erreger sich auf diesen Pflanzen vermehrt und somit zum Aufbau eines hohen Inokulumpotentials beiträgt.

Honig- und Wildbienen sind als mögliche Überträger des Feuerbranderreger bereits bekannt (Johnson et al. 1993a, Johnson et al. 1993b, Sabatini et al. 2006). Es soll daher weiter

untersucht werden, in welchem Zeitraum der Erreger an Bienen oder anderen blütenbesuchenden Insekten nachgewiesen werden kann. Vor allem soll geklärt werden, ob der Erreger schon vor dem Auftreten von Symptomen und/oder nach dem Entfernen von Symptomen in einer Anlage an Insekten nachweisbar ist.

Das Programm des LTZ-S wurde an die Pflanzenschutzdienste anderer Bundesländer sowie des benachbarten Auslands (Österreich, Schweiz, Italien-Südtirol) weitergegeben und wird dort insbesondere wegen seiner praktischen Anwendbarkeit für den Pflanzenschutzdienst seit Jahren erfolgreich genutzt (Marschall und Moltmann 2002). In einigen Bundesländern werden allerdings noch andere, weniger gut geprüfte und bewährte Programme für die Feuerbrandwarnung verwendet (BMVEL 2006). Das Programm des LTZ-S kann derzeit allerdings nur von geschulten Beratern verwendet werden, da die Ausgabedatei Fachkenntnisse zur Interpretation erfordert. Ein auch für Nicht-Fachleute verständliches Ausgabeformat ist dringend erforderlich.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Laboruntersuchungen zur Biologie des Feuerbranderregers in der Blüte in Abhängigkeit von Wetterbedingungen (LTZ-S)**

Von Januar bis April wurden zwei- bis dreijährige Apfelbäume der Sorten Gala und Golden Delicious im Gewächshaus zur Blütengewinnung vorgetrieben. Im Jahr 2009 wurden 130 Bäume aus einer Baumschule, 2010 wurden 60 Bäume aus dem vorhandenen Bestand eingesetzt. Die jungen Blüten, die nicht länger als zwei Tage geöffnet waren, wurden zwei- bis dreimal wöchentlich abgeschnitten, ins Labor gebracht und einzeln in 2 mL Reaktionsgefäße mit 7 % steriler Saccharoselösung gestellt. Die Blüten wurden mit Signum (0,5g/L, Wirkstoffe: Pyraclostrobin und Boscalid) und Conserve (0,8 mL/L, Wirkstoff Spinosad, Anwendung nur im Jahr 2010) übersprüht und eine Stunde getrocknet. Die Blüten wurden inokuliert, indem eine Bakteriensuspension mit einer 10- $\mu$ L-Pipette auf die fünf Narben jeder Apfelblüte getupft wurde, so dass ein Feuchtigkeitsfilm auf den Narben zurückblieb. Die Bakteriensuspension enthielt in Phosphatpuffer<sup>1</sup>  $10^8$  KBE/mL des *E. amylovora*-Stammes 4.3.k, den das LTZ-S aus einem befallenen Weißdorn 2004 isoliert hatte. Nach Antrocknen der inokulierten Flüssigkeit (ca. 30 Minuten) wurde je ein

---

<sup>1</sup> 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,03 % Tween 20, pH 7.0

Versuchsansatz (Reaktionsgefäß-Ständer mit 25 Blüten) in einen geschlossenen Kunststoffbehälter (33 x 19 x 11 cm, 5 L) in einen Klimaschrank gestellt. Die relative Luftfeuchte (RF) in den Behältern wurde mit je ¼ L gesättigter KCl-Salzlösungen auf 85 % eingestellt. Die Inkubationszeit betrug 14 – 16 Tage bei 16 °C, 14 Tage bei 18 °C und 10 Tage bei 24 °C. Im Jahr 2009 wurden 4.000 Blüten, im Jahr 2010 wurden 2.500 Blüten inokuliert.

### **Vermehrung auf der Narbe und Besiedlung des Blütenbodens**

Die Vermehrung von *E. amylovora* auf der Narbe und die Besiedlung des Blütenbodens wurde 2009 an 164 Blüten (18°C und 24 °C) und 2010 an 40 Blüten (16°C) untersucht. Dazu wurden je Versuchsansatz 4 – 5 inokulierte Blüten zu verschiedenen Zeitpunkten aus den Behältern entnommen, mit einer sterilen Skalpellklinge zuerst die Staubblätter, dann die Narben abgeschnitten und die Narben in 1 mL Phosphatpuffer überführt. Anschließend wurde mit einer zweiten sterilen Skalpellklinge der Blütenboden von Kelch- und Blütenblättern befreit und von den Narben getrennt in 1 mL Puffer überführt. Die an den jeweiligen Blütenteilen (Narben / Blütenboden) anhaftenden Bakterien wurden durch Mischen, Behandlung mit Ultraschall für 2 Minuten und erneutes Mischen der Reaktionsgefäße suspendiert. Von den Waschpuffern wurden Verdünnungsreihen (unverdünnt bis 10<sup>-6</sup>) auf NSA (Nutrient Saccharose Agar) ausplattiert und die Zahl der Kolonien auf Bakterien je Blüte und Blütenboden umgerechnet.

### **Einfluss eines Nässeereignisses auf die Infektion der Blüte**

Nach der Inokulation vermehrten sich die Bakterien auf den Narben auf 10<sup>7</sup> KBE/Blüte, was bei 24 °C nach einem Tag, bei 18 °C nach zwei Tagen und bei 16 °C nach vier Tagen erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurden steigende Mengen an Nässe auf die Blüten gebracht, damit den Bakterien die Besiedlung und Infektion des Blütenbodens erleichtert wurde:

Kontrollansatz: Inkubation der Blüten bei 85 % RF ohne Nässeereignis;

Nässeereignis 1: Über Nacht Einstellen in 100 % RF und Abkühlung auf 4 °C;

der Ständer wurde bei Inkubationstemperatur in einen Behälter mit deionisiertem Wasser überführt, der nach 2 – 4 Stunden für 12 Stunden in einen Kühlraum gestellt wurde. Infolge der Abkühlung auf 4 °C sank der Dampfdruck des Wassers und damit der Wassergehalt der

Luft von 15 g (18 °C) bzw. 21 g (24 °C) auf 6 g/m<sup>3</sup>. Neben einer hohen RF war damit eine leichte Taubildung beabsichtigt.

Nässeereignis 2: leichtes Übersprühen mit sterilem, deionisiertem Wasser; das Übersprühen entsprach etwa 0,02 – 0,05 mm Niederschlag (ermittelt durch Abwiegen von ausgelegten Filterpapierscheiben);

Nässeereignis 3: kräftiges Übersprühen mit sterilem, deionisiertem Wasser; entsprach etwa 0,1 mm Niederschlag.

Bewertet wurde die Symptomausprägung der Krankheit nach folgenden Befallsklassen:

1 = am Blütenboden beginnende Nekrose; 2 = Nekrose bis zur Hälfte des Fruchtknotens; 3 = Nekrose des kompletten Fruchtknoten; 4 = Nekrose über den Fruchtknoten hinaus.

An den Böden oder Stielen der Blüten der Befallsklasse 4 traten sehr häufig Tröpfchen mit Bakterien Schleim aus, bei dem es sich eindeutig um *E. amylovora* handelte. Bei Blüten der Befallsklassen 1 - 3 wurde vereinzelt eine Isolation durchgeführt: kleine Gewebestücke aus dem Übergang von krankem zu gesundem Pflanzengewebe in steriler Kochsalzlösung (0,8%) geschüttelt und davon auf NSA unverdünnt und 1:10 verdünnt ausplattiert. In einer von zehn Isolierungen gelang der Nachweis von *E. amylovora*.

### **Einfluss eines Kälteereignisses auf die Infektion der Blüten**

Im Rechenprogramm Maryblyt bewirken kühle Temperaturen (<17,8 °C bei der Vermehrung des epiphytischen Infektionspotentials oder <15,6 °C bei der Infektion) einen verringerten Infektionsdruck. Um diesen Effekt im Laborversuch quantitativ abzuschätzen, wurden inokulierte Blüten zu verschiedenen Zeitpunkten für die Dauer von 1 – 3 Tage 5 °C Kälte ausgesetzt. Die zeitliche Lage der Kälteperioden ist in Tab. 8 angegeben. Die übrige Zeit wurden die Blüten bei 24 °C und 85 % RF aufgestellt und zur Förderung der Infektion mit 0,1 mm Wasser übersprüht, nachdem wenigstens 1 Tag seit der Inokulation bei 24 °C inkubiert worden war (zusätzlich zur Kälteperiode).

### **2.2. Übertragbarkeit der Klimaschränkergebnisse aufs Freiland (LTZ-S)**

Es sollte geprüft werden, inwieweit die mit den Wetterstationen an einer Stelle gemessenen Werte für alle Blüten an einem Baum und in einem Bestand repräsentativ sind und damit in Laborversuchen ermittelte Ergebnisse auf das Freiland übertragbar sind.

## **Stationsbeschreibung**

Für Stuttgart-Hohenheim standen die Daten von drei Wetterstationen zur Verfügung.

### Wetterhütte des Instituts für Physik und Meteorologie der Universität Hohenheim

Die Sensoren für Temperatur (TT) und relative Luftfeuchte (RF) befanden sich in einer großen Thermometerhütte 2 m über dem Boden am Rand eines ebenen Versuchsfelds („Goldener Acker“).

### Wetterstation der Versuchsstation für Gartenbau der Universität Hohenheim

#### (Opus II der Fa. Lufft)

Die TT- und RF-Fühler befanden sich 2 m über dem Boden am südlichen Ende einer Nord-Süd-verlaufenden Apfelbaum-Reihe in einem aus 10 runden, weißen Kunststoff-Lamellen bestehenden Strahlungsschutz (11 cm Durchmesser, 14 cm Höhe). Der Sensor für Blattbenetzung (BB) hing 1,30 m hoch über dem Boden in der Apfelbaum-Reihe der Sorte Champagner Renette.

### Wetterstation des LTZ in der Versuchsstation für Gartenbau

Die Wetterstation wurde für die Zwecke des Forschungsvorhabens etwa 50 m Luftlinie entfernt von der Opus-II-Station eingerichtet und bestand aus vier baugleichen Sensoren für TT und RF (TH-Sensoren Nr. 1 – Nr. 4), vier Sensoren für BB (Fa. Lufft) und einem Sensor nur für TT. Jeweils ein BB-Fühler befand sich dicht bei einem TH-Fühler und wurde ebenfalls mit der jeweils zugehörigen Nummer 1 – 4 bezeichnet. Die TH- und BB-Sensoren befanden sich in verschiedenen Höhen in der Laubwand einer Nord-Süd verlaufenden Apfelbaum-Reihe (Sorte Santana, Baumhöhe 2,90 m):

Nr. 1 : 2,1 m,    Nr. 2 : 1,4 m,    Nr. 3 : 1,3 m,    Nr. 4 : 0,8 m.

Die Sensoren Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 4 hingen untereinander dicht am Stamm eines Baumes, der Sensor Nr. 3 zwischen zwei Bäumen, 60 cm südlich benachbart zum Sensor Nr. 2.

Der TT-Sensor befand sich in 1,80 m Höhe in der Laubwand 80 cm nördlich benachbart zum TH-Sensor Nr. 1. Sein Strahlungsschutz bestand aus 13 runden, weißen Kunststofflamellen (11 cm Durchmesser, 18 cm hoch).

Die Station wurde im April 08 in Betrieb genommen. Die TH-Sensoren wurden 2008 belüftet (Eigenbau LTZ), die Stromversorgung über ein Solarpanel konnte den Strombedarf der belüfteten Sensoren nicht immer befriedigen, so dass die Station 2008 zeitweise ausfiel (83 % verfügbare Stundenwerte von April – September 08). Anfang April 09 wurden die TH-Sensoren mit dem gleichen Lamellen-Strahlungsschutz versehen wie für die Station Opus II beschrieben (10 Lamellen), die Lüftung war 2009 nicht mehr in Betrieb. Ende März 2010 schließlich wurden die Sensoren mit 13 Lamellen (statt 10 Lamellen im Jahr 2009) versehen, um einen möglicherweise verbesserten Strahlungsschutz zu erhalten.

Die Entfernung der Versuchstation für Gartenbau zum Versuchsfeld „Goldener Acker“ betrug etwa 1 km. Das Gelände ist in beiden Fällen eben und 400 – 410 m ü. NN. Etwaige Unterschiede der von den drei Wetterstationen erhobenen Daten sind somit nicht durch geländeklimatische Standortunterschiede verursacht, sondern durch die Anbringung der Sensoren in verschiedenen Höhen, in oder neben der Laubwand oder völlig freistehend, durch unterschiedlichen Strahlungsschutz und durch unterschiedliche Möglichkeiten der natürlichen Bewindung der Messfühler.

### **2.3. Frühzeitiger Erregernachweis**

An ausgewählten Standorten mit nachgewiesenem Vorjahresbefall in der Umgebung von Stuttgart wurde untersucht, wann welche Infektionsquellen des Feuerbrands aktiv werden. Dazu wurden von März bis Mai an den verschiedenen Standorten Befallsstellen aus dem Vorjahr (Canker) sowie Knospen bzw. Blüten wiederholt auf eine Besiedlung mit *E. amylovora* hin untersucht. Die Anlagen wurden bis in den Sommer hinein auf Symptome kontrolliert.

### **Cankerbeprobung**

Canker an Apfel, Quitte und Birnen wurden auf die Abgabe von Feuerbrandbakterien hin untersucht. Dazu wurden verdächtige Stellen mit einem sterilen und mit Puffer befeuchteten Wattestäbchen abgetupft, das anschließend in 1 mL Puffer abgespült wurde. Die Spülflüssigkeit wurde 1:10 und 1:100 verdünnt und je 100 µL davon auf Nutrient Saccharose Agar (NSA) und King's medium B (KB), die Cycloheximid (100 mg/L) enthielten,

ausplattiert. Nach Inkubation bei 28 °C für zwei Tage wurden die Platten ausgewertet und mit typischen Bakterien ein Serumagglutinationstest durchgeführt. Waren die Platten so stark bewachsen, dass keine Einzelkolonien erkannt werden konnten, wurde eine Bio-PCR durchgeführt. Hierfür wurde auf die bewachsenen Platten 2 mL Puffer gegeben, die Bakterienkolonien mit einer Einwegimpföse von dem Nährmedium gelöst und ein mL der Bakteriensuspension entnommen. Diese Bakteriensuspension wurde bei 95 °C für 10 Minuten erhitzt und mit 2,5 µL davon eine nested PCR nach Bereswill *et al.* (1995) und McManus & Jones (1995) durchgeführt. Zusätzlich wurden alte Befallsstellen von Apfel und Birne nach Standardmethoden auf Bakterien im Gewebe untersucht.

### **Knospen- und Blütenbeprobung**

Knospen (10 - 60 Stück) bzw. Blüten (mind. 10 bis zu 100) wurden mit Einweghandschuhen abgezählt in sterilen Einmalprobenbeuteln gesammelt. Die Knospen wurden in Puffer (je g Knospe ca. 10 mL Puffer) homogenisiert. Die Blüten wurden mit Puffer übergossen (je g Blüte 2 - 5 mL Puffer), mit der Hand leicht geknetet und bei 150 upm für 30 Minuten geschüttelt. Ein mL des Knospenhomogenisats bzw. Blütenwaschwassers wurde 10 min bei 12.000 g zentrifugiert, das Pellet in 50 µl deion. Wasser aufgenommen, 1:10 verdünnt und mit 2,5 µL davon eine nested PCR durchgeführt. Um den Einfluss von Inhibitoren auf das Ergebnis ausschließen zu können, wurde von jeder Probe eine zusätzliche Verdünnung von 1:10 angesetzt, mit *Erwinia amylovora* versetzt, so dass die Dichte  $10^4$  KBE/mL betrug, und parallel zu der eigentlichen Probe untersucht. Einzelne Proben wurden unverdünnt und 1:10 verdünnt ausplattiert, mit dem Schnelltest der Fa. Bioreba getestet bzw. eine Bio-PCR durchgeführt.

### **Landesweites Blütenmonitoring**

Um die Feuerbrandprognose um Informationen zur Anwesenheit des Feuerbrandbakteriums zu ergänzen, zogen die Pflanzenschutzberater im Zeitraum des ersten Infektionstags Blütenproben aus Kernobstanlagen verteilt über das Land Baden-Württemberg und schickten sie an das LTZ-S. Die Proben stammten aus unbehandelten Anlagen, da sie parallel zur Kontrolle der Anlagen auf ungenehmigte Streptomycinbehandlung gezogen wurden. Die Zahl betrug abhängig von der Arbeitskapazität der Berater 30 bis 60. In der Regel enthielten die

Proben 100 Blüten, einzelne Proben auch weniger. Sie wurden wie oben beschrieben mit der nested PCR auf epiphytische Feuerbranderreger untersucht.

#### **2.4. Erstellung eines verfeinerten Feuerbrandprognoseprogramms mit verbesserten Algorithmen**

Als Basis für das verfeinerte Feuerbrandprognoseprogramm diente das Modell Maryblyt, das bereits im bisherigen Programm enthalten war, sich am besten bewährt hat und weltweit genutzt wird. In die veränderten Algorithmen des neuen Modells flossen die Ergebnisse der Laborversuche an abgetrennten Blüten zur Infektionsbiologie und der Freilandversuche zur Messbarkeit von Wetterdaten in Obstanlagen ein. Anhand von Wetterdaten von Befallsereignissen der Vergangenheit in Baden-Württemberg wurden die Parameter des LTZ-Modells festgelegt. Die Algorithmen wurden so angepasst, dass alle in Baden-Württemberg belegten Befallsereignisse der Vergangenheit (21 von 1993 bis 2010) mit dem neuen Modell angezeigt wurden. Diese Befallsereignisse bestanden zum einen aus Versuchen mit natürlicher Infektion, bei denen aufgrund hochwirksamer Streptomycinbehandlungen auf den Infektionstag zurückgeschlossen wurde. Weiter wurden großflächige Befallsausbrüche (1993 - 1995, 2007 und 2008) und Meldungen über lokal stärkeres Auftreten der Krankheit verwendet. Hier erlaubten Angaben zum ersten Auftreten von Symptomen den Schluss auf die Infektionstage über Rückrechnung der Inkubationsperiode. Das von Jahr zu Jahr wechselhafte Auftreten der Krankheit wurde zudem durch die Zahl am LTZ-S positiv untersuchter Feuerbrandverdachtsproben widerspiegelt. Aufgrund der begrenzten Zahl an belegten Befallsereignissen mit detaillierten Wetterdaten standen keine nicht schon für die Entwicklung verwendeten unabhängigen Daten für eine Validierung zur Verfügung. Das liegt an dem sporadischen Auftreten der Krankheit und daran, dass erst mit der Verwendung von elektronischen Wetterstationen seit Mitte der 90er Jahre Stundenwerte zur Verfügung stehen. Die Daten aus der Schweiz (2007 bis 2009) unterschieden sich aufgrund weiträumig sehr ähnlicher Wetterlagen nicht wesentlich von denen in Baden-Württemberg, so dass sie zwar berechnet wurden, aber keine neuen Erkenntnisse erbrachten. Das erschwert grundsätzlich die Modellentwicklung. Die Validierung muss deshalb durch die zukünftige Verwendung des Modells erfolgen. Weitere Anpassungen werden dann notwendig werden. Das Modell wurde vom ISIP e.V. programmiert, mit verbesserten Ausgabeformaten versehen und am 12.07.2010 fertiggestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

##### 3.1.1. Laboruntersuchungen zur Biologie des Feuerbranderreger in der Blüte in Abhängigkeit von Wetterbedingungen (LTZ-S)

##### Vermehrung auf der Narbe und Besiedlung des Blütenbodens

Auf den Narben der nach der Inokulation untersuchten 204 Blüten konnten stets Feuerbrandbakterien nachgewiesen werden. Unmittelbar nach der Inokulation (0 h) wurden im Mittel 50.000 KBE je Blüte (10.000 KBE je Narbe) isoliert, was rechnerisch einem Inokulum von 0,5 µL mit  $10^8$  KBE/mL je Blüte (0,1 µL je Narbe) entspricht. Die Feuerbrandbakterien vermehrten sich nach 24 h bei 24 °C im Mittel auf  $1,2 \times 10^7$  KBE, nach 48 h bei 18 °C im Mittel auf  $7,8 \times 10^6$  KBE und nach 96 h bei 16 °C im Mittel auf  $1,1 \times 10^7$  KBE je Blüte; die Spannweiten der Werte waren mit etwa 30 – 200 % des Mittelwerts sehr hoch (Tab. 1).

Tab. 1: *E. amylovora* auf den Narben einer Blüte ( $10^6$  KBE)

Std. nach Inokulation	16 °C				18 °C				24 °C			
	Mittel	Min	Max	n	Mittel	Min	Max	n	Mittel	Min	Max	n
0 h	-	-	-	-	<b>0,05</b>	0,02	0,1	4	<b>0,05</b>	0,04	0,07	4
24 h	-	-	-	-	<b>1,0</b>	0,9	1,2	3	<b>12</b>	5,5	24	7
48 h	<b>3,7</b>	2,0	5,4	2	<b>7,8</b>	2,9	16	5	<b>35</b>	6,6	72	7
72 h	<b>4,7</b>	2,2	6,7	3	<b>9,3</b>	3,0	16	4	<b>36</b>	18	54	2
96 h	<b>11,2</b>	8,7	14,7	3	-	-	-	-	-	-	-	-

n : Anzahl Versuche mit je 4 – 5 Blüten

In den ersten beiden Versuchsreihen im Jahr 2009 wurden die Blüten mit einer mehrere Tage alten Signum-Spritzbrühe übersprüht. Danach waren sehr viele (insgesamt 79 % = 33 / 42) der untersuchten Blütenböden mit unbekanntem Keimen besiedelt. Unmittelbar nach dem Besprühen und der Inokulation waren im Mittel (Dichtemittel, Modus)  $10^1$ , nach 24 – 72 h bei 18 °C  $10^2$  und bei 24 °C  $10^3$  KBE je Blütenboden nachweisbar (Einzelwerte s. Tab. 2). Dieser Keimbesatz der Blütenböden war durch die Verkeimung der Fungizidbrühe verursacht: In einem Kontrollversuch waren nach Ansetzen des Fungizidgranulats in sterilem deionisiertem Wasser 300 KBE/mL Spritzbrühe nachweisbar, nach zwei Tagen bei Raumtemperatur vermehrten sich die Bakterien in der Spritzbrühe auf  $2 \times 10^4$  KBE/mL (ausplattiert auf KB-Medium, 1 Tag bei 28 °C inkubiert).

Tab.2: Besiedlung des Blütenbodens, Signumbrühe 1 Woche alt

Temp	Std. nach Inokulation	Kontamination mit unbekanntem Keimen		Besiedlung mit <i>E. amylovora</i>	
		% Blütenböden	KBE	% Blütenböden	KBE
	0 h	11/13 = 85 %	10 <sup>1</sup> (6) 10 <sup>2</sup> (4) 10 <sup>3</sup> (1)	0/13	0
18 °C	24 – 72 h ohne Nässe	13/17 = 76 %	10 <sup>1</sup> (2) 10 <sup>2</sup> (5) 10 <sup>3</sup> (4) 10 <sup>5</sup> (2)	1/17 = 6 %	10 <sup>3</sup>
24 °C	24 – 72 h ohne Nässe	9/12 = 75 %	10 <sup>1</sup> (2) 10 <sup>2</sup> (2) 10 <sup>3</sup> (3) 10 <sup>5</sup> (2)	2/12 = 17 %	10 <sup>3</sup> ;10 <sup>7</sup>

KBE : Kolonienbildene Einheiten je Blütenboden (in Klammer Häufigkeit der KBE-Werte)

In den folgenden Versuchen mit jeweils frisch angesetzter Spritzbrühe betrug die Kontamination mit unbekanntem Keimen insgesamt 11 % (= 13 / 122) der untersuchten Blütenböden mit 10<sup>1</sup> KBE im Mittel (Modus) aller Zählungen (Einzelwerte s. Tab. 3). Von den meisten Blütenböden konnten also keine Bakterien isoliert werden, sie waren nach den hier eingesetzten Isolierungsmethoden steril.

Unmittelbar nach der Inokulation der Narben waren auf einem der 32 untersuchten Blütenböden (= 3 %) *E. amylovora* (10<sup>1</sup> KBE auf dem Blütenboden) nachweisbar (Tab. 2 + 3). Dabei kann es sich um eine Kontamination beim Inokulieren mit der Mikroliterspritze oder auch beim Präparieren der Blütenorgane und Isolieren der Bakterien handeln. Nach 24 – 96 h ohne Nässeereignis (85 % RF) waren 6 % (= 6 / 104 Blütenböden) mit 10<sup>1</sup> – 10<sup>4</sup> KBE (*E. amylovora*) besiedelt. Durch das Nässeereignis 1 (100 % RF für 24 h mit Tau) waren mit 8 % (= 2 / 25) nicht signifikant mehr Blütenböden mit *E. amylovora* besiedelt. Auch ein Einfluss der Inkubationsdauer oder –temperatur ist nicht zu erkennen und bei der je Versuchsglied niedrigen Zahl untersuchter Blüten auch nicht zu erwarten (Einzelwerte vgl. Tab. 3) Das Übersprühen der Blüten (0,1 mm, Nässeereignis 3, Beprobung 24 h nach Sprühen) ergab mit 70 % (= 7 / 10 der Blütenböden mit 10<sup>1</sup> – 10<sup>6</sup> KBE) eine deutlich höhere Anzahl besiedelter Blütenböden, was darauf hindeutet, dass dieses Nässeereignis die Besiedlung der Blütenböden für *E. amylovora* verbesserte.

Tab. 3: Besiedlung des Blütenbodens; Spritzbrühe frisch

Temp	Std. nach Inokulation	Kontamination mit unbekanntem Keimen		Besiedlung mit <i>E. amylovora</i>	
		% Blütenböden	KBE	% Blütenböden	KBE
16 °C	0 h	2/23 = 11 %	10 <sup>1</sup> ; 10 <sup>2</sup>	1/23 = 4 %	10 <sup>1</sup>
	48 h	3 / 10 = 30 %	10 <sup>1</sup> (2) 10 <sup>2</sup> (1)	1 / 10 = 10 %	10 <sup>1</sup>
	72 h	0 / 15		0 / 15	
	96 h ohne Nässe	6 / 15 = 40 %	10 <sup>1</sup> (3) 10 <sup>2</sup> (3)	2 / 15 = 13 %	10 <sup>1</sup> ; 10 <sup>4</sup>
18 °C	24 – 72 h ohne Nässe	3/27 = 11 %	10 <sup>1</sup> (3)	1/27 = 4 %	10 <sup>2</sup>
	72 h mit Sprühen	1/5 = 20 %	10 <sup>4</sup>	4/5 = 80 %	10 <sup>1</sup> ; 10 <sup>3</sup> ; 10 <sup>3</sup> 10 <sup>5</sup>
	72 h mit Tau	1/5 = 20 %	10 <sup>5</sup>	0/5	0
24 °C	24 – 72 h ohne Nässe	6/37 = 15 %	10 <sup>1</sup> (4) 10 <sup>2</sup> (2)	2/37 = 5 %	10 <sup>2</sup> ; 10 <sup>2</sup>
	48 h mit Sprühen	1/5	10 <sup>2</sup>	3/5 = 60 %	10 <sup>2</sup> ; 10 <sup>3</sup> ; 10 <sup>6</sup>
	48 h mit Tau	0/20	0	2/20 = 10 %	10 <sup>1</sup> ; 10 <sup>5</sup>

### Einfluss eines Nässeereignisses auf die Infektion der Blüten

Ohne Nässeereignis (85 % RF) waren

bei 16 °C 0,5 %,

bei 18 °C 3 % und

bei 24 °C 5 – 10 %

der Blüten infiziert (Tab. 4 – 6). In einigen Versuchsansätzen (z.B. Gala bei 18 °C) lagen bis zu 2/3 davon in den Befallsklassen 1 – 3. Durch Einstellen der Blüten in 100 % RF für 12 h oder leichtes Übersprühen (0,02 mm) erhöhte sich der Gesamtbefall nicht: 1 – 4 % bei 18 °C und 5 – 13 % bei 24 °C. Das kräftige Übersprühen (0,1 mm) erbrachte dagegen eine deutliche Befallssteigerung

bei 16 °C 4 – 9 %,

bei 18 °C und 24 °C 40 – 60 %.

Mit einer Ausnahme (Golden Delicious bei 18 °C mit 43 % der befallenen Blüten in Befallsklasse 1-3) befanden sich nach Übersprühen mit 0,1 mm nur wenige der befallenen Blüten (etwa 10 – 20 %) in den Befallsklassen 1 – 3.

Der Grund für das Auftreten der niedrigen Befallsklassen 1 – 3 dürfte hauptsächlich die unterschiedliche Bakteriendichte auf den Narben im Laufe der Inkubation sowie möglicherweise eine ungleichmäßige Eignung der Blütenböden für die Infektion infolge

Nektarbildung sein. Gerade bei zusätzlich ungünstigen Infektionsbedingungen, z.B. kühlen Temperaturen und fehlender Nässe, dürften sich dann diese niederen Befallsklassen ausprägen. Der Befall in den Klassen 1 – 3 kann für praxisnahe Betrachtungen als nicht erfolgreiche Infektion bewertet werden; die Versuchsdauer war in allen Varianten ausreichend, dass zumindest bei einigen Blüten die Infektion bis in den Blütenstiel gelangte und eine Schleimabsonderung stattfand. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden unvollständig infizierte Blüten (Befallsklassen 1 – 3 im Versuch) unter natürlichen Bedingungen nach der Blütezeit vom Baum abgeworfen und liefern für die Epidemie der Krankheit keinen Beitrag.

Tab. 4: Befallene Blüten bei 16 °C nach Inokulation mit *E. amylovora* (Daten von 2010)

	85 %		0,1 mm	
	Ga	GD	Ga	GD
n	17	16	17	11
% inf	<b>0,5 %</b>	<b>0,5 %</b>	<b>4,0 %</b>	<b>8,7 %</b>
% 1	0,2 %	0,0 %	0,0 %	0,4 %
% 2	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,4 %
% 3	0,0 %	0,0 %	0,9 %	0,4 %
% 4	0,2 %	0,5 %	3,1 %	7,6 %

Tab. 5: Befallene Blüten bei 18 °C nach Inokulation mit *E. amylovora* (Daten von 2009)

	85 % 18 °C		100 % 18 °C		0,02 mm 18 °C		0,1 mm 18 °C	
	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD
n	19	21	6	6	11	8	5	3
% inf	<b>2,7 %</b>	<b>3,1 %</b>	<b>4,0 %</b>	<b>1,3 %</b>	<b>1,5 %</b>	<b>1,5 %</b>	<b>55 %</b>	<b>46 %</b>
% 1	1,7 %	1,6 %	0,0 %	0,7 %	0,0 %	0,5 %	0,8 %	13 %
% 2	0,2 %	0,2 %	0,0 %	0,0 %	0,7 %	0,0 %	3,2 %	3,7 %
% 3	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	4,8 %	3,7 %
% 4	0,8 %	1,3 %	4 %	0,7 %	0,7 %	1,0 %	46 %	26 %

Tab. 6: Befallene Blüten bei 24 °C nach Inokulation mit *E. amylovora* (Daten von 2009)

	85 % 24 °C		100 % 24 °C		0,02 mm 24 °C		0,1 mm 24 °C	
	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD
n	13	12	7	7	3	7	6	4
% inf	<b>5,4 %</b>	<b>9,9 %</b>	<b>10 %</b>	<b>13 %</b>	<b>5,3 %</b>	<b>13 %</b>	<b>59 %</b>	<b>42 %</b>
% 1	1,8 %	3,2 %	2,9 %	4,0 %	0,0 %	1,7 %	3,1 %	5,0 %
% 2	1,1 %	0,7 %	1,1 %	1,7 %	0,0 %	1,1 %	3,5 %	7,0 %
% 3	0,0 %	0,6 %	0,0 %	1,7 %	0,0 %	2,8 %	2,5 %	0,0 %
% 4	2,5 %	5,4 %	6,3 %	5,7 %	5,3 %	7,4 %	50 %	30 %

Ga : Gala, GD : Golden Delicious, n : Anzahl Versuchsansätze mit je 25 Blüten

% inf : % infizierter Blüten, %\_1 bis %\_4 : % infizierter Blüten in Befallsklasse 1 bis 4

## **Einfluss der Temperatur und der Sortenanfälligkeit**

Die Befallsunterschiede zwischen Gala und Golden Delicious waren 2009 uneinheitlich, in einigen Versuchen wurde Golden Delicious stärker als Gala befallen (Versuch ohne Nässeereignis und Versuch mit Sprühen 0,02 mm), in anderen Versuchen waren die Unterschiede umgekehrt (100 % RF 12 h und nach Sprühen mit 0,1 mm). In den Versuchen 2010 war Gala gleich oder meistens schwächer befallen als Golden Delicious. In allen Fällen waren die Unterschiede zwischen den Sorten statistisch nicht signifikant. Ohne eindeutige Sortenunterschiede können damit für die weitere Betrachtung die Daten der beiden Sorten gemeinsam bewertet werden (Tab. 7 und Abb. 1).

Tab. 7: Befall der Blüten bei unterschiedlichen Temperaturen (Daten für Ga und GD zusammengefasst, Daten für 16 °C von 2010, für übrige Temperaturen von 2009)

	85 % RF			100 % RF		0,02 mm		0,1 mm		
	16 °C	18 °C	24 °C	18 °C	24 °C	18 °C	24 °C	16 °C	18 °C	24 °C
n	33	40	25	12	14	19	10	28	8	10
% inf	<b>0,5 %</b>	<b>3,0 %</b>	<b>7,5 %</b>	<b>2,7 %</b>	<b>12 %</b>	<b>1,5 %</b>	<b>11 %</b>	<b>5,9 %</b>	<b>52 %</b>	<b>52 %</b>
± SD	1,3 %	5,2 %	11 %	4,9 %	13 %	2,4 %	5,9 %	5,3 %	25 %	18 %

Legende vgl. Tab. 6, SD : standard deviation (Standardabweichung)

In den Versuchsgliedern ohne Nässe, 100 % RF für 12 h und 0,02 mm Sprühen trat durch die Temperaturerhöhung von 16 °C auf 18 °C und von 18 °C auf 24 °C im Mittel eine ca. 3 – 8fache Befallssteigerung auf. Nach dem Übersprühen mit 0,1 mm, das sich als besonders befallssteigernd erwies, ist kein Unterschied zwischen 18 °C und 24 °C erkennbar. In diesem Versuchsglied brachte das Nässeereignis und nicht die Temperatur die entscheidende Wirkung zur Befallserhöhung; bereits 18 °C reichten für einen hohen Befall aus; auffällig ist der mit 5,9 % niedrige Befall bei 16 °C trotz Übersprühen. In den Versuchsgliedern mit weniger wirksamen oder ohne Nässeereignissen dagegen förderte die Temperatursteigerung von 16 °C auf 18 °C und auf 24 °C den Befall; die höhere Temperatur kompensierte die fehlende Nässe zu einem geringen Grad.

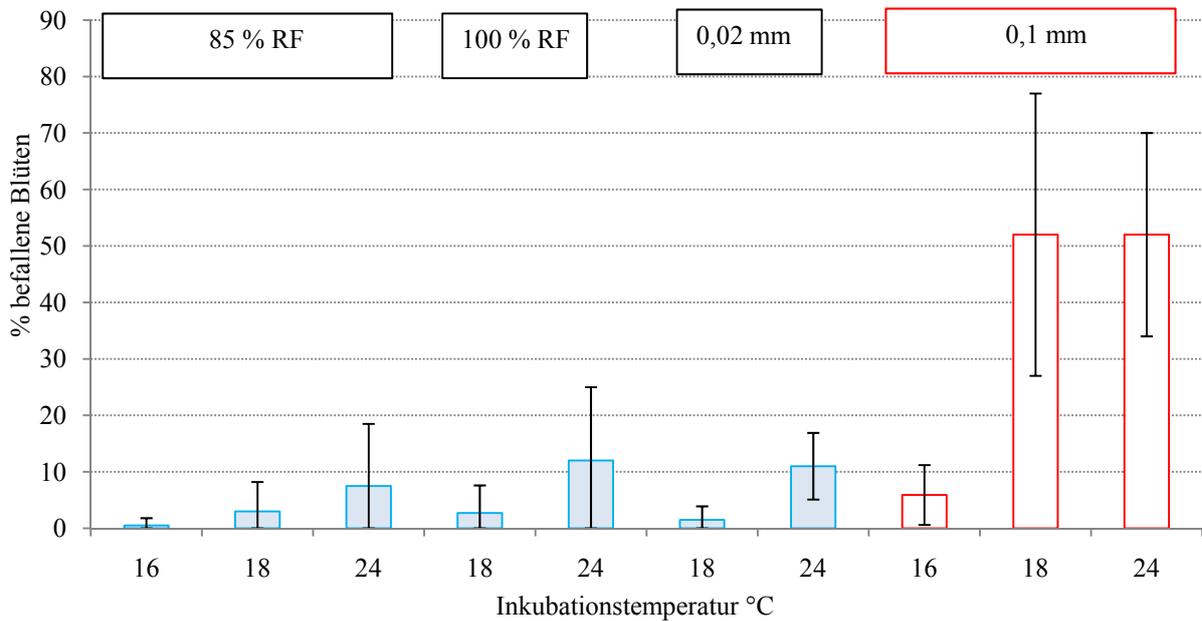


Abb. 1: Blütenbefall bei verschiedener Nässe und Temperatur

### Einfluss eines Kälteereignisses auf die Infektion der Blüten bei 24 °C

Mit einer geringen Anzahl Wiederholungen ( $n = 1 - 4$ ) wurden zunächst die Ergebnisse des Vorjahres überprüft und für 24 °C als Inkubationstemperatur grundsätzlich bestätigt (Tab. 8): sehr geringer Befall (0 % bei  $n = 4$ ) ohne Übersprühen, geringer Befall mit leichtem (0,05 mm) Übersprühen (0 – 8 %) und deutliche Befallssteigerung auf 8 – 39 % bei Übersprühen mit 0,1 mm (der niedrige Befall eines jeweiligen Versuchsglieds trat stets bei Gala auf, vgl. dazu die Anmerkung zu Sorteneignung).

Tab. 8: Befallene Blüten bei 24 °C nach Inokulation mit *E. amylovora* (Daten von 2010)

Nässe	85 %		0,05 mm		0,1 mm		0,1 mm		0,1 mm		0,1 mm	
Kühlen 5°	-		-		-		0-24 h		0-72 h		24-96 h	
Sprühen	-		24 h		24 h		48 h		96 h		24 h	
	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD	Ga	GD
n	4	4	2	1	2	3	3	1	5	4	6	5
% inf	<b>0,0 %</b>	<b>0,0 %</b>	<b>0,0 %</b>	<b>8,0 %</b>	<b>8,0 %</b>	<b>39 %</b>	<b>32 %</b>	<b>32 %</b>	<b>14 %</b>	<b>33 %</b>	<b>28 %</b>	<b>35 %</b>
%_1	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,6 %	3,0 %	1,3 %	0,0 %
%_2	0,0 %	0,0 %	0,0 %	8,0 %	0,0 %	0,0 %	1,3 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,7 %	0,8 %
%_3	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,3 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,3 %	0,0 %
%_4	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	8,0 %	37 %	31 %	32 %	13 %	30 %	25 %	34 %

Ga : Gala, GD : Golden Delicious, n : Anzahl Versuchsansätze mit je 25 Blüten

% inf : % infizierter Blüten, %\_1 bis %\_4 : % infizierter Blüten in Befallsklasse 1 bis 4

Das eintägige Kälteereignis unmittelbar nach Inokulieren (0-24 h) ergab mit 32 % Befall keine signifikante Verringerung, ebensowenig wie das dreitägige Kühlen (0-72 h) mit 23 % Befall. Auch das dreitägige Kühlen nach Inokulieren, nach eintägiger Bakterienvermehrung und nach Übersprühen (24-96 h) ergab mit 31 % Befall keine Verringerung (Tab. 9). Nach diesen Laborergebnissen mit künstlicher Inokulation und Inkubation unter keimarmen Bedingungen im Klimaschrank ist also eine Befallsreduktion im Programm Maryblyt nach kühler Witterung zu den genannten Zeitpunkten nicht zu bestätigen.

Tab. 9: Befall der Blüten bei 24 °C nach verschiedenen Kälteereignissen (Daten von 2010 für Ga und GD zusammengefasst)

Temp./Nässe	24°C 0,1 mm	24°C 0,1 mm	24°C 0,1 mm	24°C 0,1 mm
Kühlen 5°C	-	0-24 h	0-72 h	24-96 h
Inokulation	24 h	48 h	96 h	24 h
n	5	4	9	11
% inf	<b>26 %</b>	<b>32 %</b>	<b>23 %</b>	<b>31 %</b>
± SD	22 %	5,7 %	15 %	23 %

Legende vgl. Tab. 7

### Eignung der Sorten Gala und Golden Delicious

Bei den Versuchen 2010 entstand bei Gala der gleiche niedrige oder ein niedrigerer Befall als bei Golden Delicious (statistisch nicht signifikant). Im Vorjahr waren die Sortenunterschiede uneinheitlich. Einerseits erleichtert diese Situation die Auswertung, weil die Ergebnisse beider Sorten zusammengefasst werden können (Tab. 7 + 9, Abb. 1). Andererseits erhöhen schwankende Ergebnisse die Standardabweichung der Daten und stellen die Frage nach der biologischen Ursache der Varianz.

Die Bäumchen der Sorte Gala waren im Gewächshaus meistens deutlich reichblühender als die der Sorte Golden Delicious. Allerdings war der Aufbau der Gala-Blüten im Vergleich zu denen von Golden Delicious oft nicht gut für die Inokulation mit der Mikroliterspritze geeignet. Die Blütenstiele waren meistens erheblich kürzer, was das Einstellen in die Zuckerlösung erschwerte. Die Griffel waren oft sehr kurz, dadurch ragten die Narben nur wenig oder gar nicht über den Kranz der Staubblätter hervor; gelegentlich waren die Griffel auch verkrüppelt, so dass die Narben stark zur Seite oder nach unten wiesen. Die Sortenunterschiede beim Befall nach künstlicher Inokulation waren also mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine geringe Eignung der Sorte Gala für diese Versuche zurückzuführen und deuten nicht auf eine Resistenz hin.

### 3.1.2. Übertragbarkeit Klimaschrankergebnisse aufs Freiland (LTZ-S)

#### Problematik der Temperaturmessung

Der freie Stand und der hohe Strahlungsschutz durch die Thermometerhütte machte die Station „Goldener Acker“ (GA) zur Referenz für die Vergleiche mit den Daten der Kleinwetterstationen in der Versuchsstation für Gartenbau. An Strahlungstagen traten Temperaturabweichungen der LTZ-Station (vier TH-Sensoren, ein TT-Sensor) und der Opus-II-Station (OP) von der GA-Station mit ausgeprägtem Tagesgang auf: nachts waren der OP- und die LTZ-Sensoren kühler, tags wärmer (Abb. 2 – 4 für April – Mai 2008 – 2010 als Monatsmittel). Die geringsten Abweichungen traten bei den Sensoren TT und OP auf. Von den TH-Sensoren 1 – 4 wich TH 3 morgens um 8 Uhr im Mittel um bis zu 3 °C am stärksten von den GA-Werten ab. Die Abweichungen der Sensoren TH 2 und TH 4 lagen dicht beieinander im Mittelfeld, TH 1 wich tags um 1 – 2 °C im Mittel am wenigsten von GA ab. Die Art des Strahlungsschutzes (2008 Belüftung, 2009 zehn Lamellen, 2010 dreizehn Lamellen) hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die Abweichungen, auch wenn 2010 moderate Abweichungen verzeichnet wurden und damit die 13 Lamellen einen verhältnismäßig guten Strahlungsschutz boten. Die Stellung in der Laubwand hatte einen starken Einfluss, die Anbringung auf halber Höhe oder unten führte zu auffälligen Fehlmessungen, dabei führten die unterschiedlichen Beschattungs- und Bewindungsverhältnisse in der Laubwand zu großen Unterschieden auch zwischen den dicht nebeneinander stehenden Sensoren TH 2 und TH 3. Im Vergleich zu den vier TH-Sensoren zeigte der TT-Sensor mit 0,5 – 1 °C Abweichung zu den GA-Daten die geringsten Abweichungen, hier scheint sich die deutlich geringere Abmessung des hinter den Lamellen sitzenden stabförmigen TT-Fühlers gegenüber den etwas größeren TH-Fühlern bemerkbar zu machen. Dadurch ergibt sich hinter den Lamellen mehr Luftraum um den TT-Fühler.

Die Temperaturabweichungen sind zum einen dem Einfluss des Bestandesklimas in der Laubwand der Apfelanlage und zum andern dem schwächeren Strahlungsschutz der Sensoren zuzuschreiben. Dabei wurde der Einfluss des Sonnenlaufs deutlich: die Sensoren waren überwiegend nach Osten hin weniger von der Laubwand bedeckt und damit der morgendlichen Sonne deutlicher ausgesetzt als nach Westen und damit der Nachmittags-Sonne. In der Mittagszeit wirkt sich die Selbstbeschattung der Nord-Süd verlaufenden Laubwand bei hohem Sonnenstand aus. Auch bei gutem Strahlungsschutz und luftiger

Aufstellung (OP- und TT-Sensoren) wichen die Temperaturwerte in der Apfelanlage um  $\pm 0,5$  bis  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  von denen der Thermometerhütte GA ab, diese Abweichung ist vom Bestandesklima in einer Laubwand zu erwarten.

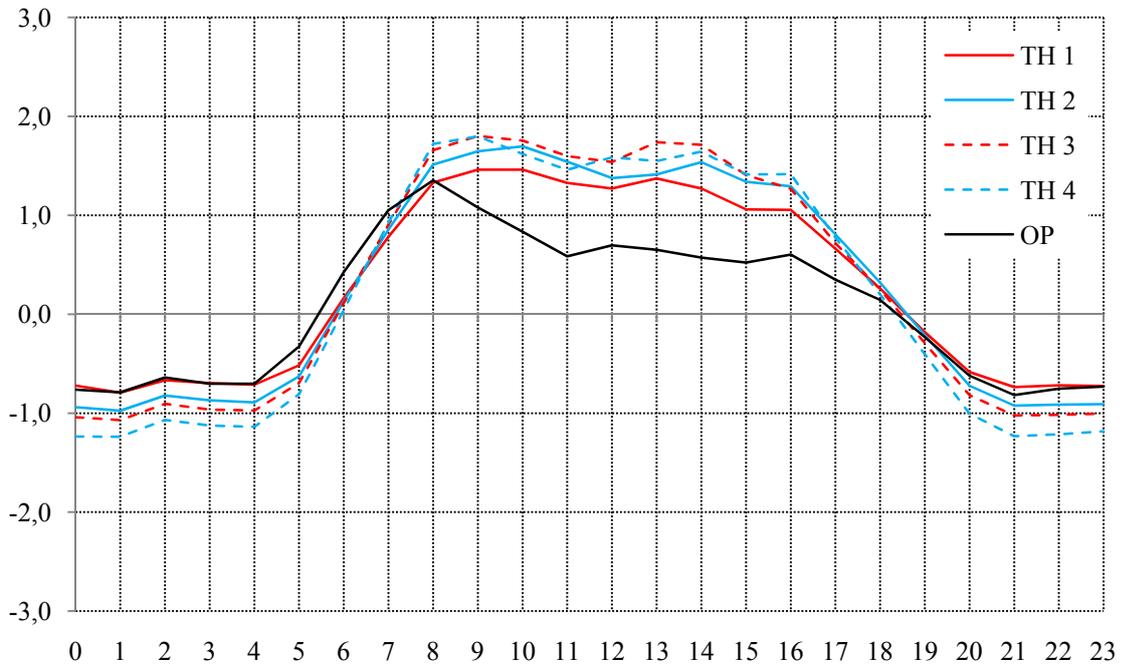


Abb. 2a: Mittl. Abweichung Temp.-Stundenwerte von Bezugswerten GA April 08

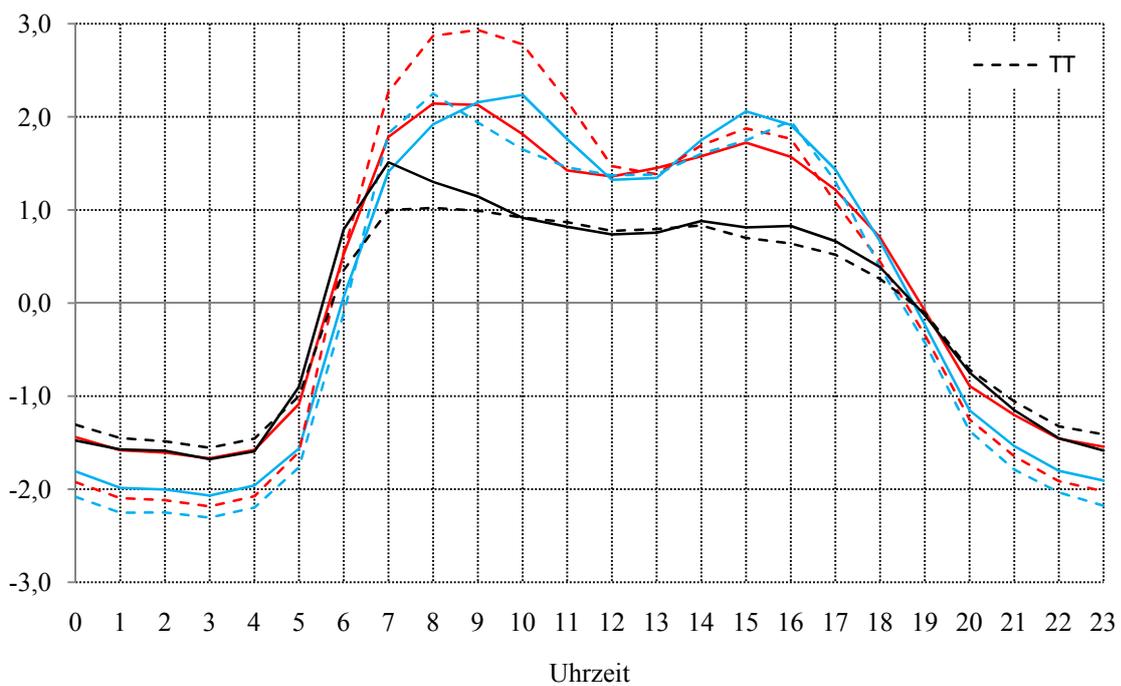


Abb. 2b: Mittl. Abweichung Temp.-Stundenwerte von Bezugswerten GA Mai 08

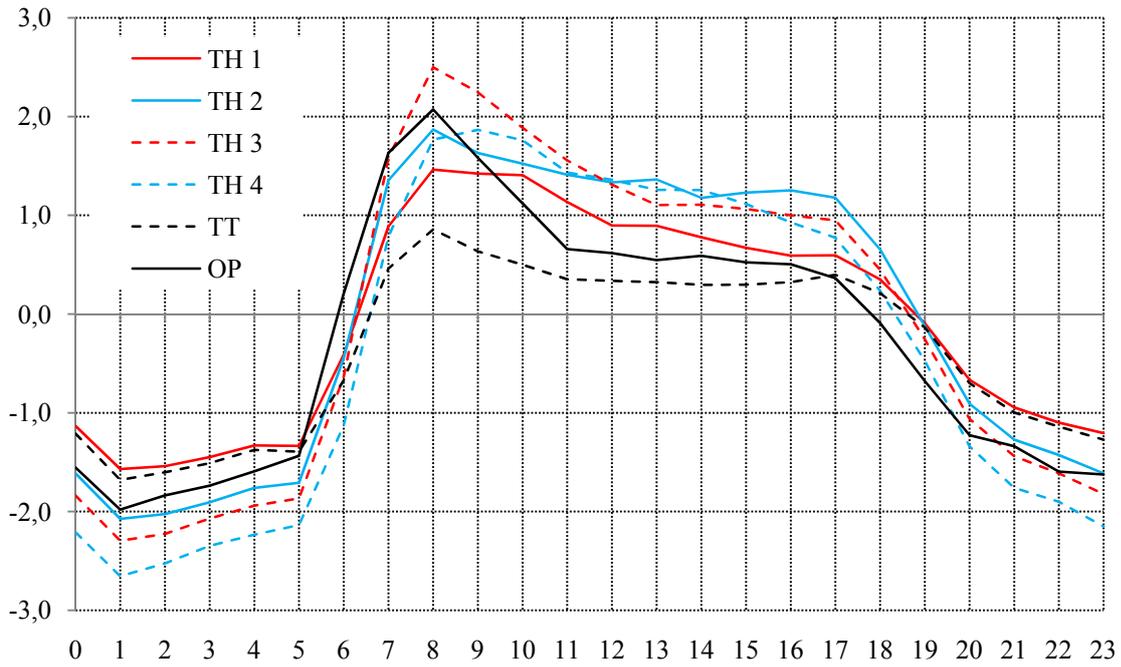


Abb. 3a: Mittl. Abweichung Temp.-Stundenwerte von Bezugswerten GA April 09

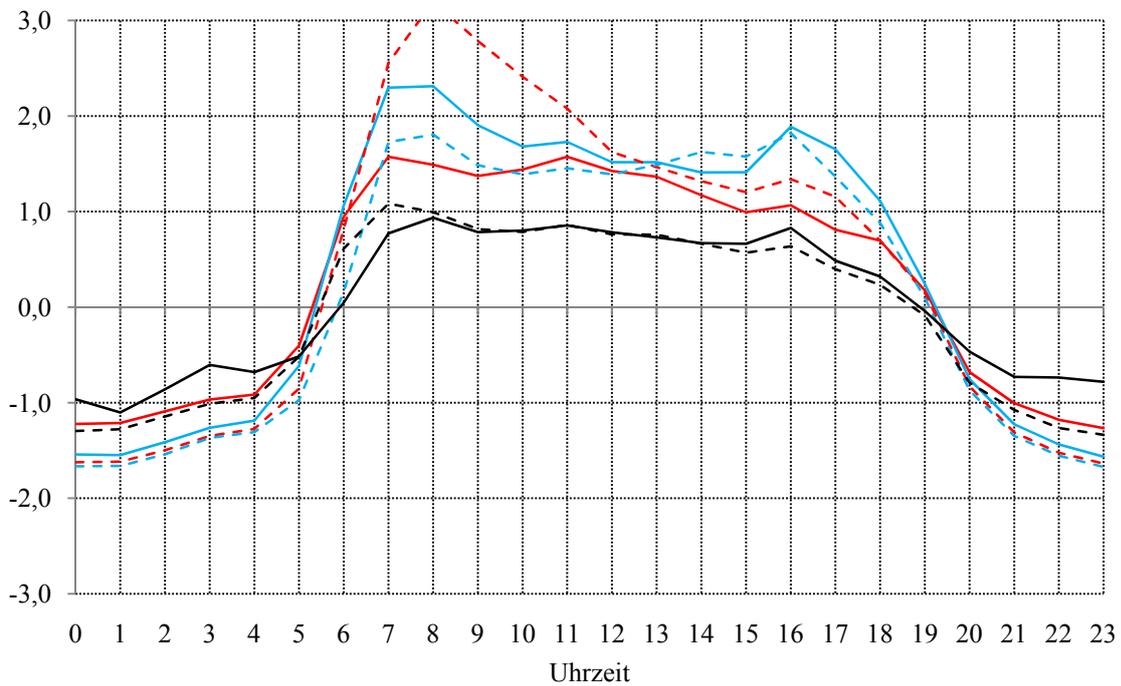


Abb. 3b: Mittl. Abweichung Temp.-Stundenwerte von Bezugswerten GA Mai 09

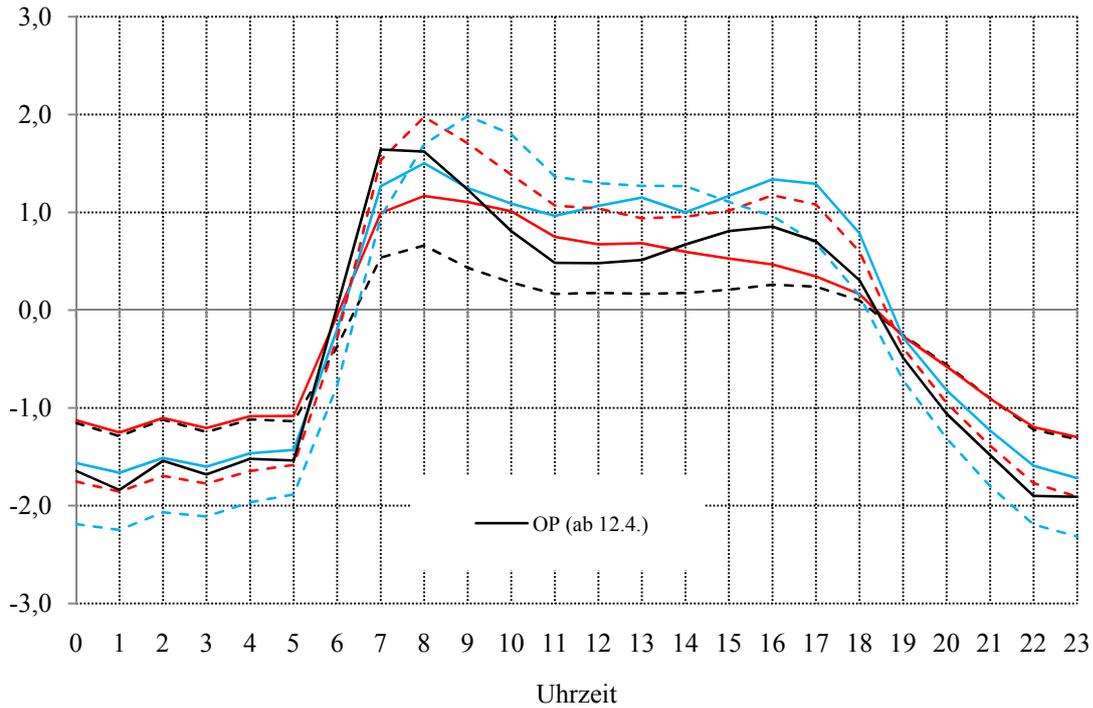


Abb. 4a: Mittl. Abweichung Temp.-Stundenwerte von Bezugswerten GA April 10

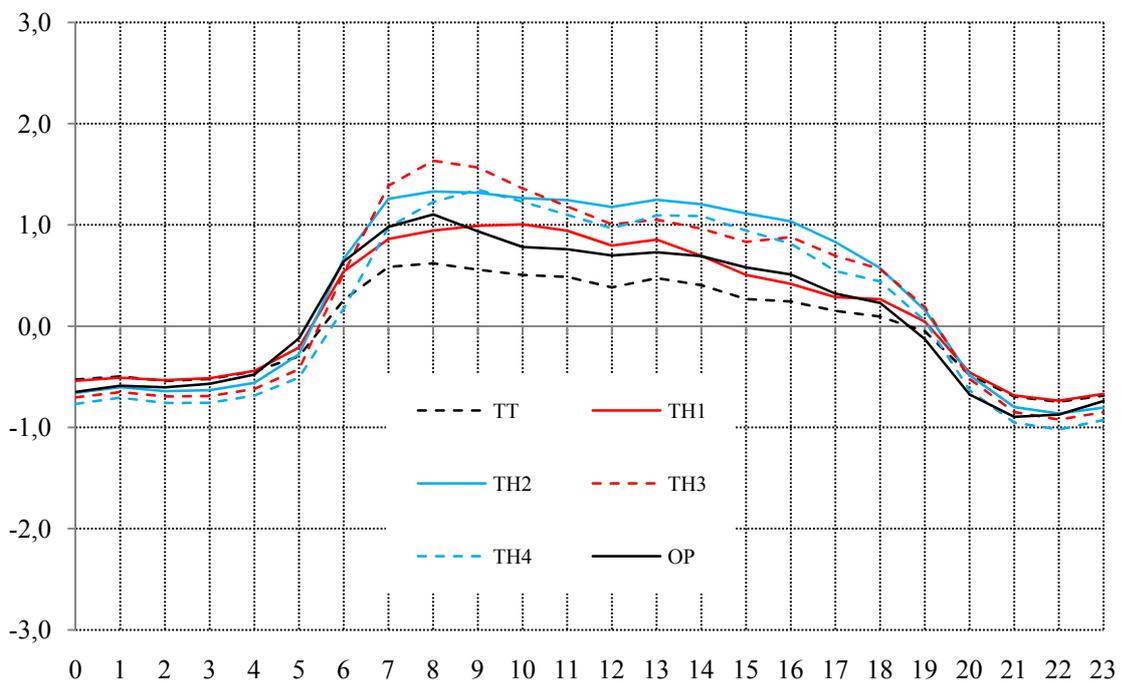


Abb. 4b: Mittl. Abweichung Temp.-Stundenwerte von Bezugswerten GA Mai 2010



### **Auswirkung der Temperaturabweichungen auf das Prognosemodell**

Das Feuerbrandprognose-Programm errechnete mit den Temperaturdateien von April und Mai 2008 für jeden Sensor getrennt die Temperatursummen der Werte  $> 18,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (CDH-18-Wert nach Maryblyt). Eine Überschreitung der Schwelle von 110 Gradstunden führt bei vorhandener Nässe zu einer Infektionsprognose. Am 07.05.08 wurde die Schwelle von drei Sensoren (TH Nrn. 2, 3 und 4, bodennah und mittig), vom TH-Sensor Nr. 1 (oben) am 08.05., von OP am 09.05. und von GA erst am 11.05. überschritten, also insgesamt mit einer Spannweite von vier Tagen (Abb. 5). Die Temperatursummen-Kurve stieg Anfang Mai nur langsam an, Ende Mai wurde die Schwelle bei steilem Anstieg von allen Sensoren innerhalb eines Tages überschritten

Die unterschiedlichen Temperaturdaten für den gleichen Standort (Hohenheim) ergaben bei der Feuerbrandprognose eine deutliche Unsicherheit bei der Überschreitung der Temperaturschwelle. Die Spannweite war umso größer, je langsamer die Temperatursumme anstieg, also bei schwierigen Witterungsbedingungen und damit ohnehin schwieriger Prognose.

### **Beobachtungen zur natürlichen Blattbenetzung (BB) und Auswertung der BB- und RF-Daten**

An 10 Tagen mit nächtlicher BB wurden morgens früh die natürliche Nässe und deren Abtrocknung auf den Blättern der Apfelbäume im Bereich der LTZ-Wetterstation bonitiert. Ein Blatt galt als nass, wenn es sichtbar oder fühlbar nass war, unabhängig vom Anteil der tatsächlich nassen Blattfläche. Deutliche Unterschiede zeigten sich nach Regen im Vergleich zu Tau, Regentropfen waren größer und ungleichmäßiger auf dem Blatt verteilt als Tautropfen; entsprechend ungleichmäßiger trockneten die regennasse Blätter ab. In Tab. 10 sind die von jedem der vier Sensoren gemessene BB-Dauer und die beobachtete BB der Blätter zusammengestellt.

Tab. 10: Gemessene (\*) BB und RF und beobachtete (\*\*) BB an der LTZ-Wetterstation 2009

Datum	Regen	Ursache der BB	BB1	BB2	BB3	BB4	BB natürlich	RF1	RF2	RF3	RF4
23./24.4.	nein	Tau	5 h	4 h	6 h	5 h	8 h	5 h	6 h	7 h	7 h
29./30.4.	16 Uhr	Regen+Tau	0	0	11 h	12 h	9 h	6 h	6 h	9 h	9 h
6./7.5.	nein	Tau	2 h	2 h	7 h	5 h	7 h	3 h	6 h	6 h	6 h
14./15.5.	19-6 Uhr	Regen	16 h	16 h	16 h	17 h	16 h	13 h	14 h	14 h	14 h
24./25.5.	nein	Tau	6 h	4 h	6 h	2 h	9 h	9 h	9 h	9 h	9 h
28./29.5.	24 Uhr	Regen	9 h	9 h	10 h	10 h	10 h	7 h	7 h	8 h	8 h
1./2.6.	nein	Tau	2 h	0	2 h	0	6 h	5 h	5 h	6 h	6 h
11./12.6.	24 Uhr	Regen	3 h	3 h	8 h	10 h	8 h	4 h	3 h	4 h	3 h
16./17.6.	nein	Tau	4 h	4 h	5 h	0	8 h	6 h	8 h	8 h	8 h
25./26.6.	18+6 Uhr	Regen	7 h	6 h	13 h	3 h	10 h	9 h	9 h	9 h	9 h

(\*) Anzahl BB-Stunden mit > 80 Einheiten bzw. Anzahl RF-Stunden mit >95 %

(\*\*) Beginn der natürlichen BB wird dann angenommen, wenn an einem Sensor RF > 95 % und BB > 60 Einheiten gemessen wird, Ende der natürlichen BB, wenn weniger als 10 – 20 % der Blätter als nass bonitiert wurden

Die vier BB-Sensoren der LTZ-Station maßen sehr unterschiedlich lange Nässeperioden. Häufig ermittelte Sensor Nr. 3 die längste BB-Dauer, Sensor Nr. 2 oder Nr. 4 die kürzeste. Da der Sensor Nr. 2 neben Nr. 3 und der Sensor Nr. 4 bodennah angebracht war, erklären sich die Messunterschiede nicht durch die unterschiedliche Position. Die Unterschiede zwischen den Sensoren waren nach Tau größer als nach Regen.

Nach den Daten der Tab. 10 war die gemessene BB-Dauer überwiegend kürzer als die natürliche. Die Unterschiede waren nach Taunächten besonders deutlich, in denen die tatsächliche Dauer praktisch nie durch einen Messwert getroffen wurde. Nach Regen wurde jeweils durch wenigstens einen Sensor die tatsächliche Dauer erfasst. Die Schätzung des Beginns der natürlichen BB bringt zwar eine geringe Unsicherheit über die tatsächliche Länge der Nässeperiode, jedoch macht die Kombination zweier Kriterien, hohe RF und steigende Messwerte der BB-Fühler, den Beginn durchaus plausibel. Das beobachtete Ende der natürlichen BB (10 – 20 % nasse Blätter) lag in allen Fällen nach Taunässe um 2 – 3 Stunden später als das gemessene Ende.

Die Anzahl gemessener Stunden mit RF > 95 % war an den vier Sensoren deutlich homogener und traf ungefähr die natürliche BB-Dauer. Die Werte für die benachbarten Sensoren Nr. 2 und Nr. 3 lagen dicht beieinander und der oben angebrachte Sensor Nr. 1 maß, insbesondere nach Tau, meistens weniger Stunden mit RF > 95 % als der bodennahe Sensor

Nr. 4. Diese Positionseffekte sind plausibel, der höher liegende Sensor wird besser bewindet und trocknet schneller als der bodennahe Sensor, der zudem auch der stärkeren nächtlichen Abkühlung und damit höherer Luftfeuchte ausgesetzt ist.

### **3.1.3. Frühzeitiger Erregernachweis**

Die regelmäßige Beprobung und Kontrolle von Befallsstandorten des Vorjahres während der Projektlaufzeit brachte wertvolle Erkenntnisse zu den frühen Infektionsquellen des Feuerbrands, die Ausgangspunkt einer Epidemie sein können. Befallene Birnbäume stellen eine besondere Gefahr dar. In allen 3 Jahren wurden an befallenen Birnbäumen aktive Canker vor oder zur Blüte (2008, 2009) oder nach der Blüte (2010) nachgewiesen. An Apfelbäumen wurde nur in 2008 ein aktiver Canker gefunden. In Blüten infizierter Birnbäume waren Erreger bereits in noch geschlossenen Blüten im Ballonstadium in 2008 nachweisbar, ohne dass Witterungsbedingungen für Blüteninfektionen vorlagen. Das bestätigte Beobachtungen, die bereits in 2006 gemacht wurden (Moltmann & Viehrig 2008). Blüten infizierter Birnbäume geben damit frühzeitig Feuerbrandbakterien in die Umwelt ab. In allen Jahren zeigten infizierte Birnbäume Blütensymptome, die vom Zeitpunkt und vom Auftreten nur an einzelnen Bäumen her nicht auf Neuinfektionen, sondern auf ein Einwandern der Bakterien in die noch gesunden Pflanzenorgane von innen heraus hindeuteten.

Durch das landesweite Blütenmonitoring ließ sich die Anwesenheit des Erregers bei Erreichen von Infektionsbedingungen feststellen und damit die auf Witterungsdaten basierende Prognosemodelle sinnvoll ergänzen. In dem Projektzeitraum zeichnete sich das Jahr 2008 durch einen hohen Anteil positiver Blütenproben aus und es folgte ein starker Befall. In 2009 und 2010 war der Anteil positiver Blütenproben gering und der Befall blieb sehr schwach, obwohl zumindest kurzfristig Infektionsbedingungen erreicht wurden (Tab. 11).

Tab. 11: Einfluss des Vorjahresbefalls, des mittels Blütenmonitorings eingeschätzten Infektionsdrucks, Höhe der Temperatursumme auf den Feuerbrandbefall in Baden-Württemberg 2006 bis 2010

	Vorjahresbefall	Aktuelles Infektionspotential positive Blütenproben (30 – 70 Proben)	Infektionsdruck	Höhe der Temp.summe (gemessene Stundenwerte)	Befall
2006	niedrig	3 %	schwach	mittel 110 – 200	gering
2007	niedrig	6 %	schwach	hoch > 200	<b>hoch</b>
2008	hoch	<b>37 %</b>	stark	niedrig 70 – 110	<b>hoch</b>
2009	hoch	3 %	schwach	überwiegend unter Schwelle < 70	gering
2010	niedrig	0 %	schwach	mittel 110 - 200	gering

### 3.1.4. Beschreibung des neuen Feuerbrandprogramms des LTZ

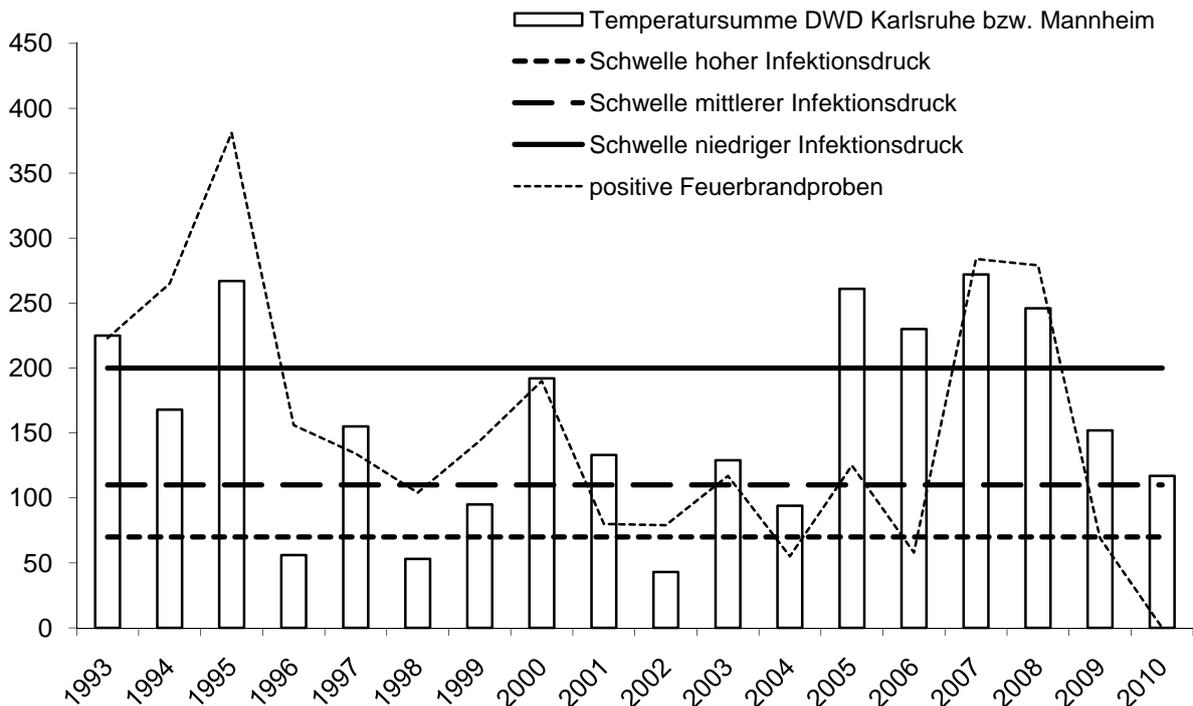
#### Veränderte Algorithmen

Das neue LTZ-Modell basiert im Wesentlichen auf dem Modell Maryblyt. Die Basis der Temperatursummenberechnung während der Blütenlebensdauer (CDH 18-Wert) wurde bei 18,3 °C belassen. Statt mittels Sinuskurve simulierte Werte werden im neuen Modell gemessene Stundenmittelwerte verwendet. Meist gleichen sich die Temperatursummenwerte. Im zeitigen Frühjahr jedoch liegen aufgrund des Sonnenstands die gemessenen Werte oft etwas niedriger und im späten Frühjahr höher als die simulierten. In einzelnen Fällen lagen die mit gemessenen Werten ermittelten Temperatursummen deutlich niedriger, wenn der Temperaturverlauf aufgrund von Bewölkung spitzer verlief als die idealisierte Sinuskurve (Wahlwies 13.5.- 18.5.2009). Da die Temperatur die Vermehrung von *E. amylovora* stark beeinflusst (Schouten 1987, Pusey & Curry 2004), stellt die Verwendung tatsächlich auftretender Temperaturwerte gegenüber simulierten eine deutliche Verbesserung dar.

Die mittlere Temperatur eines Tages wird im LTZ-Modell nicht mehr aus T<sub>min</sub> und T<sub>max</sub> geteilt durch 2 berechnet, sondern aus den aufsummierten Stundenmittelwerten geteilt durch 24. Auch das ist eine realistischere Bewertung der Temperatur. Die Anforderungen an die Mitteltemperatur wurde von 15,6 °C auf 14 °C gesenkt. Damit treten seltener als bisher

Infektionstage auf, an denen mit Ausnahme der mittleren Temperatur alle Bedingungen erfüllt sind und die deshalb als Infektionstage mit knapp verpasster Schwelle gewertet wurden.

Abb. 6: Befallsentwicklung des Feuerbrands in Baden-Württemberg dargestellt anhand der positiv getesteten an das LTZ-S eingesandten Verdachtsproben, Höhe der Temperatursumme  $>18,3^\circ$  während der Blütenlebensdauer berechnet mittels gemessenen Stundenmittelwerten und Bezug zu den Schwellenwerten 70, 110 und 200



Bei der Blütenlebensdauer wird nicht mehr zwischen der von Birne (66,7) und Apfel (44,4) unterschieden, sondern einheitlich der Wert von  $44,4 > 4,4^\circ\text{C}$  verwendet. Für die Berechnung der Inkubationsperioden wurden die bereits angepassten Schwellen des modifizierten Maryblyt-Modells beibehalten (57 Tagesgrade über  $12,6^\circ\text{C}$  für Apfel bzw. 17 für Birne und für Triebinfektionen bei Apfel und Birne). Alle Temperatursummen werden im neuen Modell mit gemessenen Stundenmittelwerten statt wie bisher mit simulierten berechnet. Die Reduktionsregeln nach einer Reihe von kalten Tagen mit  $T_{\text{max}} < 18,3^\circ\text{C}$  des Maryblyt-Modells wurde beibehalten, auch wenn sie in den Versuchen an abgetrennten Blüten biologisch nicht begründbar waren. Die Zahl von angegebenen Infektionstagen hätte sich sonst unrealistisch erhöht.

Die durch Verwendung von Stundenwerten im zeitigen Frühjahr niedrigeren Temperatursummen während der Blüte erfordern eine Absenkung des Schwellenwerts von

bisher 110 auf 70. Damit wird sichergestellt, dass die Infektionstage der Befallsereignisse an den Standorten Augustenberg 1995, Metzingen 1999, Kleintobel 1999 und an mehreren Stationen in Nordwürttemberg 2008 angezeigt werden. Mit Anstieg der Temperatursumme steigt die Gefahr für Feuerbrandinfektionen (Smith 2009). Das zeigen auch die Erfahrungen in Baden-Württemberg. In Abb. 6 sind die maximalen Temperatursummenwerte der DWD-Station Karlsruhe bzw. Mannheim und der Befall in Baden-Württemberg widergespiegelt durch die Zahl der positiv getesteten Proben dargestellt. Überschreitet die Temperatursumme die Schwelle von 200 ist mit starken Befallsausbrüchen zu rechnen, wie in 1993, 1995, 2007 und 2008. In 2005 und 2006 überschritt der CDH-Wert die Schwelle zwar auch, allerdings nur kurzfristig. Trotz Absenkung der Schwelle blieben die Jahre 1996, 1998 und 2002 Jahre ohne Infektionsgefahr. Nach diesen Auswertungen der vergangenen Befallsereignisse wurden die Schwellenwerte in Abhängigkeit des Infektionsdrucks auf 70 bei hohem Infektionsdruck, auf 110 bei mittlerem und auf 200 bei schwachem Infektionsdruck festgelegt. Die für die Festlegung der jeweiligen Schwelle erforderliche Infektionsdruck wird nach den Angaben in Tab. 12 anhand der Befallsgeschichte der Anlage, der Anwesenheit von Infektionsquellen im Umfeld und aktueller Messergebnisse zur Bakterienanwesenheit eingeschätzt. Die Festlegung von 3 verschiedenen statt einem Schwellenwert ermöglicht eine sehr differenzierte Angabe von Infektionsgefahr, die jedoch sehr von der korrekten Einschätzung des Infektionsdrucks abhängt. Als Voreinstellung sollte aus Vorsichtgründen immer ein hoher Infektionsdruck gewählt werden und mit mittlerem oder niedrigem Infektionsdruck nur zurückhaltend gerechnet werden.

Tab. 12: Einschätzung des Infektionsdrucks für die Feuerbrandprognose anhand der Feuerbrandbefallsgeschichte, Befallsquellen und Blütentestergebnissen (nach Smith 1999)

<b>Befallsgeschichte in Anlage und Umfeld</b>	<b>Infektionsdruck</b>
kein Feuerbrand in den Vorjahren	schwach
Feuerbrand im Vorjahr und gute Sanierung	mittel
Feuerbrand im Vorjahr und unzureichende Sanierung oder frühe Befallsquellen im Umfeld (Birnbäume) oder aktueller Nachweis des Erregers in Blüten	stark

Die Temperaturschwellen wurden anhand von Daten von Schorfwarnstationen der Fa. Luft mit in der Laubwand angebrachten Messfühlern mit Strahlenschutz (Lamellen) ohne Belüftung festgelegt. Daten von Temperaturfühlern anderer Stationstypen oder in freistehenden Wetterhütten können auch verwendet werden, sie müssen jedoch geprüft werden, ob sie mit denen der Schorfwarnstationen vergleichbar sind. Der Datenabgleich bzw.

die Vergleichsmessung muss unter den speziellen Strahlungs- und Belaubungsverhältnissen der Monate April und Mai erfolgen. In der Praxis der Feuerbrandprognose werden bei der Entscheidung für oder gegen ein Warnung nicht nur die Daten einer Station, sondern immer mehrerer in einer ganzen Region herangezogen. Die Temperatursummenberechnung an den einzelnen Stationen weicht oft voneinander ab, da die Temperaturmessung von der Aufstellung des Messfühlers in der Laubwand und Entwicklung der Laubwand abhängt.

Die Blattnässemessung mittels Blattnässesensoren in dem bisherigen Feuerbrandprogramm erwies sich als nicht sehr zuverlässig. In mehreren Jahren kam es zu Infektionen, ohne dass Blattnässe angezeigt wurde. Die Erhebungen zur Zuverlässigkeit der Messung von Blattnässe und Luftfeuchte ergab, dass die Luftfeuchte deutlich zuverlässiger messbar ist als die Blattnässe. Deshalb wird im neuen Programm die Blattnässe mittels einer Formel nach Racca (unveröffentlicht) aus Luftfeuchte und Temperatur berechnet. Mittels Auswertungen von Wetterdaten vergangener Befallsereignisse wurde die für Infektionen erforderliche berechnete Blattnässe auf 2 Stunden festgelegt. Damit werden alle bisher beobachteten Infektionstage ohne gemessene Blattnässe erfasst. Mit dieser neuen Blattnässeberechnung weisen zwar mehr Tage als bisher Blattnässe auf, aber an warmen Tagen im Frühjahr wird oftmals keine Blattnässe berechnet, so dass dennoch eine differenzierte Angabe von Infektionstagen möglich ist.

Nach Auswertung von Befallsereignissen der Vergangenheit schien eine gewisse Kompensation von Blattnässe durch Temperatur bei Infektionen vorzuliegen. Bei hohen Temperaturen war weniger Feuchte für Infektionen erforderlich als bei niedrigen (Bericht 2007, Dewdney *et al.* 2007). Die Laborversuche an abgetrennten Blüten zeigten bei höheren Temperaturen ohne Nässeereignis zwar eine höhere Infektionshäufigkeit, sie blieb jedoch auch bei der unrealistisch hohen Temperatur von 24 ° mit 8 % Befall relativ niedrig. Ob sich im niedrigen Temperaturbereich von 16 °C höhere Niederschlagsmengen als 0,1 mm förderlich auf die Infektion auswirken, ist in weiteren Laborversuchen an abgetrennten Blüten zu prüfen. Eine Kompensation von Temperatur und Nässe wurde deshalb im Programm zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht berücksichtigt.

Im bisherigen Programm wurde nach Eingabe eines Spritztermins die Temperatursumme am Morgen des Behandlungstag auf 0 gesetzt und am selben Tag begann die Aufsummierung erneut. Bei hohen Temperaturen und anhaltender Infektionsgefahr hatte das zur Folge, dass

sich die Temperatur rasch aufsummierte und unrealistisch schnell weitere Behandlungen notwendig waren. Die Temperatursummenbildung beginnt im neuen Programm deshalb erst an dem auf den Behandlungstag folgenden Tag.

### **Ausgabeformat**

Das neue Programm wurde vom ISIP e.V. erstellt und wird der amtlichen Beratung über seine Internetplattform zur Verfügung gestellt. Das Ausgabeformat enthält in eine Karte eingezeichnete einfache Symbole zur schnellen Orientierung und für den weniger erfahrenen Anwender. Das rote Symbol steht dabei für Blüteninfektionsgefahr des LTZ-Modells. Nach der Blüte wird das Risiko für Triebinfektionen nach dem Modell Billing symbolisch angegeben. Für die Stationen in einer Region wird die Infektionsgefahr der letzten 30 Tage in einer Liste in Symbolen dargestellt. In einer Grafik wird der Verlauf der Temperatursumme des LTZ-Modells in Bezug zu den Schwellenwerten für die Stationen dargestellt. Weiter sind Simulationen mit Spritzterminen (bis zu 4), geändertem Infektionsdruck oder Blütezeit und Eingabe von Wettervorhersagedaten für einzelne Stationen möglich. Die eingegebenen Daten bleiben erhalten und können am nächsten Tag für neue Simulationen verwendet werden. Schließlich wird eine umfangreiche Tabelle für jede Stationen ausgegeben, deren Format den Beratern vom bisherigen Programm bekannt ist. Zusätzlich zu der bisherigen Tabelle enthält die neue Tabelle nicht nur die Modelle Billing und Maryblyt, sondern auch das Modell Cougarblight (Stundenwerte, Smith, Version 2009) und das neue LTZ-Modell. Zusätzlich ist in der letzten Spalte angegeben, an welchem Tag diejenigen Blüten aufgegangen sind, die an dem aktuellen Tag infizierbar sind (berechnet anhand der Blütenlebensdauer). Der Vergleich der verschiedenen Programme nebeneinander bietet dem erfahrenen Anwender auf einen Blick umfassende Informationen für die Einschätzung der Infektionsgefahr. Die Voreinstellung für den Infektionsdruck wird zu Beginn der Blüte für das Bundesland festgelegt. Das neue Ausgabeformat stellt alle Informationen zur Feuerbrandprognose vom schnellen orientierenden Überblick, über Regionslisten, Grafiken und Simulationen bis zum Modellvergleich in einer umfangreichen Tabelle in einer vom Anwender wählbaren Tiefe dar. Das ist Voraussetzung dafür, dass der amtliche Dienst das Programm für die tägliche Entscheidung für oder gegen eine Warnung während der Kernobstblüte nutzen wird.

### **3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Das Hauptziel des Projektes war die Erstellung eines verbesserten und verfeinerten Feuerbrandprognoseprogramms mit praxisnahen, verständlichen Ausgabeformaten, das dem amtlichen Dienst bundesweit über die Internetplattform des ISIP e.V. für die Saison 2011 zur Verfügung steht. Schulungen zu Einführung erfolgen im Herbst 2010. Damit wird gewährleistet, dass das bisher nur im Rahmen einer Ausnahmegenehmigung erlaubte Antibiotikum Streptomycin nach einem einheitlichen und bewährten Prognosemodell so selten wie möglich eingesetzt wird. Wenn es jedoch notwendig ist, sollen gezielte Streptomycinausbringungen Schäden durch den Feuerbrand wirksam verhindern.

Das Programm lässt sich auch für den Einsatz anderer Bakterizide oder Antagonisten zur optimalen Terminierung von Spritzterminen nutzen. Die Möglichkeit, das Infektionsrisiko mit Wettervorhersagedaten für die nächsten Tage zu simulieren, ist insbesondere für die Terminierung der frühzeitigen Ausbringung von Antagonisten geeignet. Bei anhaltend hohem Infektionsrisiko lässt sich zudem mit dem Programm berechnen, wann weitere Behandlungen notwendig werden.

Eine wesentliche Verbesserung des neuen Feuerbrandprogramms ist die Berücksichtigung der Erregeranwesenheit, indem der Infektionsdruck abgeschätzt wird. Stehen befallene Birnbäume in der Anlage oder im Umfeld, sollte von einem hohen Infektionsdruck ausgegangen werden. Durch das landesweite Blütenmonitoring zum Infektionstermin lässt sich die Anwesenheit des Erregers in Blüten frühzeitig feststellen und damit das Infektionspotential landesweit einschätzen. Diese Befunde zusammen mit dem Befallsausmaß des Vorjahres bestimmen den Infektionsdruck, der wiederum die Auslöseschwelle für eine Warnung bestimmt. Die bisher vor allem auf Witterungsdaten basierenden Prognosemodelle lassen sich so deutlich verbessern. Die Anzahl unnötiger Warnungen und Behandlungen wird reduziert.

Unabhängig von der Ausbringung von Pflanzenschutzmitteln gibt das Programm Informationen über die Epidemiologie der Krankheit, das Infektionsrisiko während der Blüte und Triebinfektionen nach der Blüte. Die Berechnung der Inkubationsperioden gibt Hinweise, wann die Anlagen auf Symptome kontrolliert werden sollte.

Die Untersuchungen zur Pathogenese und Epidemiologie ergaben einige für die Praxis verwertbare Ergebnisse. Insbesondere Birnbäume stellen nach diesen Untersuchungen ein hohes Risiko dar. Der vielerorts praktizierte partielle Rückschnitt solcher Bäume erwies sich als nicht sinnvoll. Befallene Birnbäume in Erwerbsanlage sollten gerodet werden. Jahre ohne Neuinfektionen bieten die Chance, den Altbefall zu entfernen und damit den Befallsdruck für das kommende Frühjahr deutlich zu reduzieren. Das stellt jedoch eine große Herausforderung an die Beratung und Betriebsführung. Die Anlagen müssen wiederholt in kurzen Zeiträumen (etwa wöchentlich) sorgfältig Baum für Baum durchmustert werden, damit die Symptome erkannt und die Bäume zurückgeschnitten oder gerodet werden können.

#### **4. Zusammenfassung**

Ziel des Projektes war die Erstellung eines verbesserten und verfeinerten Feuerbrandprognoseprogramms, das vom amtlichen Dienst in allen von der Krankheit betroffenen Bundesländern genutzt werden kann. In die Algorithmen des neuen Modells sind die Ergebnisse von Blütenversuchen im Labor zur Infektionsbiologie, von Freilandbeobachtungen an Befallsstandorten zu frühen Infektionsquellen, Untersuchungen zur Messbarkeit von Wetterdaten im Bestand und Auswertungen von Wetterdaten historischer Befallsereignisse in Baden-Württemberg eingeflossen. Es basiert in den Grundzügen auf dem Modell Maryblyt und enthält folgende Neuerungen:

1. Der bisher nicht berücksichtigte Infektionsdruck wird abgeschätzt und in 3 Stufen eingeteilt. Die Abschätzung erfolgt anhand der Befallsgeschichte der Anlage, d.h. je länger der letzte Befall zurückliegt und je gründlicher saniert wurde, desto schwächer ist der Infektionsdruck. Nach Freilandbeobachtungen an alten Befallsstandorten erhöhten infizierte Birnbäume im Umfeld einer Anlage den Infektionsdruck, da ihre Canker frühzeitig Bakterien absondern, ihre Blüten oftmals unabhängig von witterungsbedingter Infektionsgefahr mit Erregern besiedelt sind und sie frühzeitig Symptome entwickelten. Eine sehr zuverlässige Aussage zum Infektionsdruck in einer einzelnen Anlage ergaben Untersuchungen von Blütenproben auf epiphytische Besiedlung mit *Erwinia amylovora* zum Infektionstermin mittels nested oder realtime-PCR. Schnelltests, die für eine solche flächendeckende Beprobung vor Ort erforderlich wären, sind jedoch noch in der Entwicklung. Statt der

Beprobung einzelner Anlagen war mit der Laboruntersuchung von repräsentativen Blütenproben mittels PCR, die die Berater im Rahmen eines landesweiten Blütenmonitorings zum Infektionstermin zogen, eine Einschätzung des aktuellen Infektionsdrucks in einer Region möglich.

2. Die abgeschätzte Höhe des Infektionsdrucks wird dazu verwendet, die bisherige starre Auslöseschwelle für Infektionen in Abhängigkeit vom Infektionsdruck zu variieren. Ein hoher Infektionsdruck erfordert eine geringe Temperatursumme über 18,3 °C, ein niedriger Infektionsdruck dagegen eine hohe Temperatursumme, damit Infektionsgefahr besteht. Zusätzlich wird im neuen Programm die Temperatursumme während der Blütenlebensdauer mit gemessenen statt mittels einer Sinuskurve simulierten Stundenmittelwerten berechnet.

3. Da in der Vergangenheit immer wieder Infektionen ohne gemessene Blattnässe beobachtet wurden, wurde in Laborversuchen an abgeschnittenen Blüten der Einfluss von geringen Niederschlagsmengen auf die Infektion untersucht. Ein Niederschlag von nur 0,1 mm bei im Freiland auftretenden Temperaturen von 16 bzw. 18 °C reichte aus, um die Infektionen deutlich zu erhöhen. In weiteren Versuchen erwies sich die direkte Messung von Blattnässe in Obstanlagen als nicht sehr zuverlässig. Daher wird im neuen Modell die für Infektionen erforderliche Taunässe nicht mehr mittels Blattnässesensoren direkt gemessen, sondern aus Temperatur und Luftfeuchte errechnet.

Die Parameter des Modells wurden so festgelegt, dass die wahrscheinlichen Infektionstermine aller Befallsereignisse der Vergangenheit in Baden-Württemberg angezeigt wurden. Insbesondere durch Berücksichtigung des aktuellen Infektionsdrucks ist eine differenziertere Angabe von Infektionstagen als bisher möglich. Die Feuerbrandprognose wird damit treffsicherer und die Zahl der Behandlungen mit dem Antibiotikum Streptomycin kann reduziert werden. Das neue Programm wurde von der Geschäftsstelle des ISIP e.V. umgesetzt und mit leicht verständlichen Symbolen und Grafiken im Ausgabeformat versehen. Über die Internetplattform [www.isip.de](http://www.isip.de) wird es dem amtlichen Dienst online zur Verfügung gestellt.

## **5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen, weiterführende Fragestellungen**

Das Hauptziel des Projektes wurde erreicht: die Erstellung eines verbesserten und verfeinerten Feuerbrandprognoseprogramms, das vom amtlichen Dienst von allen von der Krankheit betroffenen Bundesländern genutzt werden kann. In die Algorithmen des neuen Modells sind die Ergebnisse von Blütenversuchen im Labor, von Freilandbeobachtungen an alten Befallsstandorten und von Untersuchungen zur Messbarkeit von Wetterdaten im Bestand eingeflossen. Die Parameter des Modells wurden so festgelegt, dass die wahrscheinlichen Infektionstermine aller Befallsereignisse der Vergangenheit in Baden-Württemberg angezeigt werden. Insbesondere durch Berücksichtigung des aktuellen Infektionsdrucks ist eine differenziertere Angabe von Infektionstagen als bisher möglich.

Nicht erreicht wurde das Ziel, im Gewächshaus latent befallene Birnbäume zu erzeugen, um Untersuchungen zur Wanderung der Bakterien im Baum in die verschiedenen Pflanzenorgane durchzuführen, die die Freilandbeobachtungen ergänzen sollten. Die Ursachen für das rasche Abstoppen der Infektion an den inokulierten Bäumen sind nicht bekannt. Inokulationen im Freiland, die nur in besonderen Versuchsanlagen erlaubt sind, sind möglicherweise erfolgreicher. Unter natürlichen Bedingungen infizierte Bäume in Praxisanlagen stehen nur begrenzte Zeit zur Verfügung, da sie so rasch wie möglich zu roden sind.

Die Ausbreitung des Erregers von Blüte zu Blüte sollte in der Feuerbrandversuchsanlage in Kirschgartshausen mittels Einzelblütentestung analysiert werden. Diese Untersuchung sollte grundlegende Daten zur erforderlichen Probengröße und zum Probenahmezeitpunkt für die Blütentestung liefern. Aufgrund unvorhergesehener Rodung von Versuchsbäumen und aus methodischen Gründen (fehlende Selektivität des Mediums gegenüber im Versuch ausgebrachten Antagonisten) waren diese Untersuchungen nur sehr eingeschränkt möglich. Die Ergebnisse einzelner in Kirschgartshausen untersuchter Sammelproben und die Ergebnisse der UKN in 2008 zeigten jedoch, dass die Probengröße von 100 Blüten je Probe ausreicht, um einen stärkeren Befall vorherzusagen.

Die Temperaturdaten des Winters und der Vorblütezeit wurden analysiert und mit dem im folgenden Saison auftretenden Befall korreliert. Es ergaben sich interessante Hinweise auf

einen möglichen Einfluss, die jedoch für eine Berücksichtigung in den Prognosemodellen noch zu unsicher erschienen. Zudem fehlen Versuchsergebnisse zur biologischen Begründung dieser Korrelationen. Das Wetter während der Blüte bleibt die entscheidende Größe. Die Wetterdaten außerhalb der Blüte und ihr Einfluss auf einen Befall müssen weiter beobachtet werden.

### **Weiterführende Fragestellung**

Es wurde gezeigt, dass ein frühzeitiger Erregernachweis von Feuerbrandbakterien in Blüten zum Infektionstermin mittels der hochempfindlichen nested oder realtime PCR möglich ist. Die Entwicklung eines vor Ort einsetzbaren Schnelltests zur Prüfung von Blütenproben auf Besiedlung mit Feuerbranderregern, der in der Fläche einsetzbar wäre, steht noch aus. Der bisher zur Verfügung stehende Test der Fa. Bioreba erwies sich als noch nicht ausreichend sensitiv und spezifisch. Da in allen vom Feuerbrand betroffenen Gebieten ein dringender Bedarf nach einem solchen Test besteht, sind Neuentwicklungen von seiten der Industrie und/oder aus der universitären Forschung zu erwarten.

Die Laborversuche mit abgetrennten Apfelblüten nach Pusey haben sich für die Untersuchungen zur Infektionsbiologie an Blüten bewährt und erbrachten neue grundlegende Ergebnisse. Die Untersuchungen sollten fortgesetzt werden, um die Faktoren Feuchte und Temperatur auf die Infektion näher zu bestimmen und einzugrenzen, damit sie im Prognosemodell berücksichtigt werden und es weiter verbessern. Untersuchungen zur Intensität der Niederschläge (kinetische Energie) auf die Infektion liegen beim Feuerbranderreger noch nicht vor und könnten weitere wertvolle Erkenntnisse liefern.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Baskerville, G.L., Emin, P. 1969. Rapid estimation of heat accumulation from maximum and minimum temperatures. *Ecology* 50 (3), 514 – 517
- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I., Geider, K. 1995. Identification of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2632 - 2642

- Billing, E. 1996. BIS 95, an improved approach to fire blight risk assessment. *Acta Horticulturae* 411, 121 – 126.
- Billing, E. 1999. Fire blight risk assessment: Billing's Integrated System (BIS) and its evaluation. *Acta Horticulturae* 489, 399 - 405
- BMVEL 2006. Bericht über die Feuerbrandsituation im Jahr 2005 und die Strategie zur Bekämpfung des Feuerbrandregers in 2005. [http://www.bmelv.de/cln\\_044/nm\\_751176/SharedDocs/downloads/04-Landwirtschaft/Pflanzenschutz/Bericht-Feuerbrandsituation-2005.html](http://www.bmelv.de/cln_044/nm_751176/SharedDocs/downloads/04-Landwirtschaft/Pflanzenschutz/Bericht-Feuerbrandsituation-2005.html)
- Dewdney, M. M., Biggs, A. R., Turechek, W. W. 2007. A Statistical Comparison of the Blossom Blight Forecaster of MARYBLYT and Cougarblight with Receiver Operating Characteristic Curve Analysis. *Phytopathology* 97, 1164-1176
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O., Burgett, D.M., Sugar, D., Loper, J. E. 1993a. Dispersal of *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas fluorescens* by honey bees from hives to apple and pear blossoms. *Phytopathology* 83, 478 - 484
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O., McLaughlin, R.J., Sugar, D., Loper, J.E., Roberts, R.G. 1993b. Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology* 83, 995 - 1002
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O., Sawyer, T.L. 2004. Adaption of fire blight forecasting to optimize the use of biological control. *Plant Dis.* 88, 41 – 48
- McManus, P.S., Jones, A.L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology* 85, 618 - 623
- Marschall, K., Moltmann, E. 2002. Wie stark ist Südtirol durch Blüteninfektionen gefährdet? Auswertung von Witterungsdaten mit dem Prognosemodell Maryblyt<sup>TM</sup>. *Obstbau Weinbau, Fachmagazin des Südtiroler Beratungsrings* 39 (11), 341 – 342
- Moltmann, E. 1996a. Erfahrungen mit der Feuerbrandprognose nach verschiedenen Prognosemodellen 1994 - 1996 in Baden-Württemberg. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 48 (11), 245 – 252
- Moltmann, E. 1996b. Experience with different prediction systems for control of fire blight in southwest Germany. *Acta Horticulturae* 411, 131 – 137
- Moltmann, E. 1999. Fire blight control with streptomycin according to prediction systems in South-West Germany. *Acta Horticulturae* 489, 393 - 397
- Moltmann, E. 2004. 10 Jahre Erfahrungen mit der Feuerbrandprognose in Baden-Württemberg (1994 – 2003). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 56 (1), 13 – 16

- Moltmann, E.: 2006 Ten Year Summary of Fire Blight Prediction in South-West Germany (1994 - 2003). *Acta Horticulturae* 704, 177 - 181
- Moltmann, E. Viehrig, M. 2008. Blossoms of infected pear trees may be sources of early inoculum for fire blight (*Erwinia amylovora*). *Acta Horticulturae* 793, 39 - 43
- Pusey, P.L. 1997. Crab apple blossoms as a model for fire blight research on biological control of fire blight. *Phytopathology* 87, 1096 - 1102
- Pusey, P.L. 2000. The role of water in epiphytic colonization and infection of pomaceous flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 90, 1352 - 1357
- Pusey, P.L., Smith, T.J. 2006. Relation of pomaceous flower age to infection by *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 704, 127 - 129
- Pusey, P.L.; Curry, E.A. 2004 Temperature and pomaceous flower age related to colonization by *Erwinia amylovora* and antagonists. *Phytopathology* 94, 901 - 911
- Sabatini, A.G., Alexandrova, M., Carpana, E., Ghini, S., Girotti, S., Porrini, C., Bazzi, C., Baroni F., Alessandrini A. 2006. Relationships between *Apis mellifera* and *Erwinia amylovora* bioindication, bacterium dispersal and quarantine procedures. *Acta Horticulturae* 704, 155 - 162
- Schouten, H.J. 1987. A revision of Billing's potential doublings table for fire blight prediction. *Neth. J. Pl. Path.* 93, 55 - 61
- Smith, T.J. 1999. Report on the development and use of Cougarblight 98 C - a situation-specific fire blight risk assessment model for apple and pear. *Acta Horticulturae* 489, 429 - 436
- Smith, T.J. 2009 Cougarblight 2009\* [http:// www.ncw.wsu.edu/treefruit/fireblight/2000f.htm](http://www.ncw.wsu.edu/treefruit/fireblight/2000f.htm)
- Steiner, P.W. 1990a. Predicting apple blossom infections by *Erwinia amylovora* using the Maryblyt model. *Acta Horticulturae* 273, 139 - 148
- Steiner, P.W. 1990b. Predicting canker, shoot and trauma blight phases of apple fire blight epidemics using the Maryblyt model. *Acta Horticulturae* 273, 149 - 158
- Steiner, P.W., Lightner, G.W. 1996. Maryblyt<sup>TM</sup> 4.3 A predictive program for forecasting fire blight disease in apples and pears. University of Maryland, College Park, Maryland 20742, USA.