

INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Simone Alt  
aus Ludwigshafen/Rhn.  
2003

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Thema

**Kinetische Auslöser  
der Ascosporenausschleuderung  
von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.**

Gutachter: PD Dr. Wilhelm Jelkmann

Prof. Dr. Thomas Rausch

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andreas Kollar für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die eine unschätzbare Motivation waren. Dr. Andreas Kollar danke ich auch für die Überlassung des Themas.

Vielen Dank an Lin Himmelmann für den exzellenten Soft- und Hardwaresupport.

Nicht nur bei Beschallungsexperimenten herrschten in unserer Mykologie-Abteilung immer „good vibrations“, dafür danke ich Dr. Andreas Kollar und Andreas Engelhardt. Vielen Dank an die Helferinnen und Helfer für ihre praktische Unterstützung im Labor und Freiland: Andreas Engelhardt, Mandy Viehrig, Natascha Cisar und Nadine Gund. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Biologischen Bundesanstalt, Dossenheim danke ich für die freundliche Atmosphäre im Institut.

Herrn PD Dr. Wilhelm Jelkmann danke ich für die Übernahme des Referats und Herrn Prof. Dr. Thomas Rausch für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Herrn Dr. E. Dickler, der bis zu seiner Emeritierung 2002 Leiter des Institutes für Pflanzenschutz im Obstbau der BBA war, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Eltern für ihre tatkräftige und uneingeschränkte Unterstützung bei der Realisierung meiner Ziele.

Vielen Dank an Dirk, für alles.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pflanzenschutz im Obstbau der Biologischen Bundesanstalt in Dossenheim in der Zeit vom Februar 2001 bis September 2003 bei Herrn Dr. Andreas Kollar durchgeführt.

## Abkürzungen

~	Wechselspannung
=	Gleichspannung
AD	Analog/Digital
ATP	Adenosintri-phosphat
ATPase	Adenosintri-phosphatase
CD	compact disc
DA	Digital/Analog
DC	direct current (Gleichstrom)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GP	Gesamtpotential
Mes	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MW	Mittelwert
PVC	Polyvinylchlorid
rF	relative Luftfeuchtigkeit
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen/Minute
$v_m$	Durchschnittsgeschwindigkeit
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG .....	1
1.1 Der Apfelschorferreger <i>Venturia inaequalis</i> .....	1
1.2 Pseudothecien- und Ascusentwicklung .....	2
1.2.1 Morphologie und Differenzierung .....	2
1.2.2 Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Pseudothecienreifung .....	3
1.3. Ascosporenausschleuderung bei <i>V. inaequalis</i> .....	4
1.3.1 Vorgänge bei der Sporenausschleuderung .....	4
1.3.2 Hemmung der Sporenausschleuderung .....	4
1.4 Ursachen von Sporenfreisetzung und –verbreitung .....	6
1.4.1 Effekt von Wasser, Wind und anderen Umweltfaktoren auf Pilze.....	6
1.4.2. Einflüsse auf den Ascosporenausstoß bei <i>V. inaequalis</i> .....	9
1.4.2.1 Temperatur .....	9
1.4.2.2 Lichteinfluss und diurnale Periodizität des Sporenausstoßes .....	9
1.4.2.3 Physiologischer Zustand .....	10
1.4.2.4 Regen und Taunässe .....	10
1.4.3 Charakterisierung von Niederschlägen .....	11
1.4.3.1 Regen und Tau .....	11
1.4.3.2 Vorgänge beim Tropfenaufprall.....	12
1.4.3.3 Messtechnik zur Regenanalyse .....	13
1.5 Ziel der Arbeit .....	14
2. MATERIAL UND METHODEN .....	15
2.1 Regensensorik.....	15
2.1.1 Sensoren für kinetische Energie des Regens.....	15
2.1.1.1. Sensit V04A.....	15
2.1.1.2 Lautsprecher-Regensensoren .....	15
2.1.2 Aufzeichnung von Schwingungsimpulsen mit Mikrofonen und Lautsprechern .....	17
2.1.2.1 Lautsprecher- und Mikrofontypen.....	17
2.1.2.2 Aufnahme von Tropfeneinschlägen .....	18
2.1.2.3 Analyse der Schwingungen .....	20
2.1.2.4 Membranersatz durch einen natürlichen oder künstlichen Schwingungsaufnehmer.....	20
2.1.3 Schalldruckpegelmessung.....	20
2.2 Blattproben .....	21
2.2.1 Überwinterung .....	21
2.2.2 Ascosporennachreifung und Langzeitaufbewahrung .....	21
2.2.2.1 Primärsaison 2001.....	21
2.2.2.2 Primärsaison 2002.....	22
2.2.3 Lichtphasen-Inkubation .....	23

---

2.2.4 Konditionierung .....	23
2.3 Bestimmung der Ascosporenflugperioden im Freiland.....	24
2.4 Erzeugung von Wasserströmungen .....	24
2.4.1 Wasserbadmethode .....	24
2.4.1.1 Variation der Schwenkfrequenz .....	25
2.4.2 Strömungskanal .....	26
2.4.2.1 Lineare Strömung.....	26
2.4.2.1.1 Variation der Strömungsgeschwindigkeit .....	27
2.4.2.2 Oszillierende Strömung: Variation der Frequenz und Auslenkung .....	28
2.4.2.2.1 Variation des Zeitverlaufs und der Temperatur .....	30
2.4.2.3 Positivkontrollen .....	30
2.4.3 Beschallung .....	31
2.4.3.1 Schwingungsbibliothek .....	31
2.4.3.1.1 Impulse .....	31
2.4.3.1.2 Sinusschwingungen.....	33
2.4.3.1.3 Rauschen .....	33
2.4.3.2 Beschallungskammer.....	34
2.4.3.2.1 Variation der Ruhe- und Beschallungsdauer .....	35
2.4.3.3 Positivkontrollen .....	35
2.5 Charakterisierung der Sporenemission in die Luft- und Wasserkompartimente.....	36
2.5.1 Benetzung der Blattproben.....	36
2.5.1.1 Tauchen .....	36
2.5.1.2 Nebel .....	36
2.5.1.3 Tropfen und Tröpfchen .....	36
2.5.1.4 Bestimmung des Benetzungsgrades .....	37
2.5.2 Sporendeposition in stiller Luft.....	37
2.5.3 Sporenfreisetzung in den Luftstrom und die Wasserkompartimente .....	38
2.5.3.1 SKC Biosampler.....	38
2.5.3.2 Sporenquantifizierung mit dem Sporensammeltrichter .....	39
2.5.3.2.1 Freiland-Versuche .....	39
2.5.3.3 Schallübertragung über die Luft .....	40
2.5.3.3.1 Trichter-Aufbau .....	40
2.5.3.3.2 Trommel-Aufbau.....	40
2.5.4 Positivkontrollen .....	40
2.6 Sporenemission bei Licht und Dunkelheit .....	41
2.6.1 Vorbehandlung der Blätter.....	41
2.6.2 Dunkelkammerversuche .....	41
2.6.3 Klimakammerversuche.....	41
2.7 Hemmstoffscreening der Ascosporenausschleuderung.....	42
2.7.1 Blattextrakte.....	42
2.7.2 Chemische Hemm- und Förderstoffe .....	43

---

3. ERGEBNISSE.....	46
3.1 Regenanalytik .....	46
3.1.1 Sensoren für kinetische Energie .....	46
3.1.1.1 Sensit V04A.....	46
3.1.1.2 Lautsprecher- Regensensoren.....	48
3.1.1.3 Schalldruckpegelmessung.....	50
3.1.2 Aufzeichnung von Schwingungsimpulsen .....	50
3.1.2.1 Mikrofonlautsprecher .....	50
3.1.2.1.1 Lautsprechermodelle .....	50
3.1.2.1.2 Membranersatz durch einen natürlichen oder künstlichen Schwingungsaufnehmer .....	52
3.1.2.2 Mikrofone .....	54
3.2 Ascosporenpotential der Blattproben.....	55
3.2.1 Fruchtkörper- und Ascosporenreife .....	55
3.2.1.1 Primärsaison 2001.....	55
3.2.1.2 Primärsaison 2002.....	56
3.2.2 Auswirkungen der Lagerbedingungen .....	57
3.2.3 Ascosporenreife und Ausschleuderbereitschaft im Saisonverlauf.....	58
3.2.4 Effekt der Proben-Konditionierung .....	59
3.3 Sporenemission im Freiland .....	60
3.3.1 Primärsaison 2001 und 2002.....	60
3.3.2 Einfluss der Regenstärke auf den Sporenausstoß .....	61
3.3.3 Sporenemission bei Dunkelheit.....	63
3.3.4 Detailanalyse von Regeneffekten.....	64
3.4 Wasserströmung als kinetischer Reiz.....	66
3.4.1 Wasserbadmethode .....	66
3.4.2 Strömungskanal .....	66
3.4.2.1 Lineare Strömung: Effekt der Strömungsgeschwindigkeit .....	66
3.4.2.2 Oszillierende Strömung: Einfluss von Frequenz und Auslenkung .....	68
3.4.3 Schwingungsanregung durch Schalldruck .....	71
3.4.3.1 Effektivität verschiedener Schwingungsarten .....	71
3.4.3.2 Abhängigkeit vom Schalldruckpegel .....	72
3.4.3.3 Abhängigkeit von der Ruhe- und Beschallungsdauer .....	73
3.4.4 Wirkung von Licht.....	76
3.5 Sporenemission in Luft- und Wasserkompartimente .....	77
3.5.1 Tauchbenetzung: Freisetzung in stille Luft und in den Luftstrom .....	77
3.5.2 Künstliche Benetzung durch Tropfen, Tröpfchen, Nebel.....	80
3.5.2.1 Klimakammerversuche.....	82
3.5.3 Auswirkung einer zwischenzeitlichen Trockenphase auf den Sporenausstoß .....	82
3.5.4 Schallwirkung auf benetzte Blätter .....	83
3.5.5 Lichtwirkung.....	83
3.5.5.1 Dunkelkammer .....	83

---

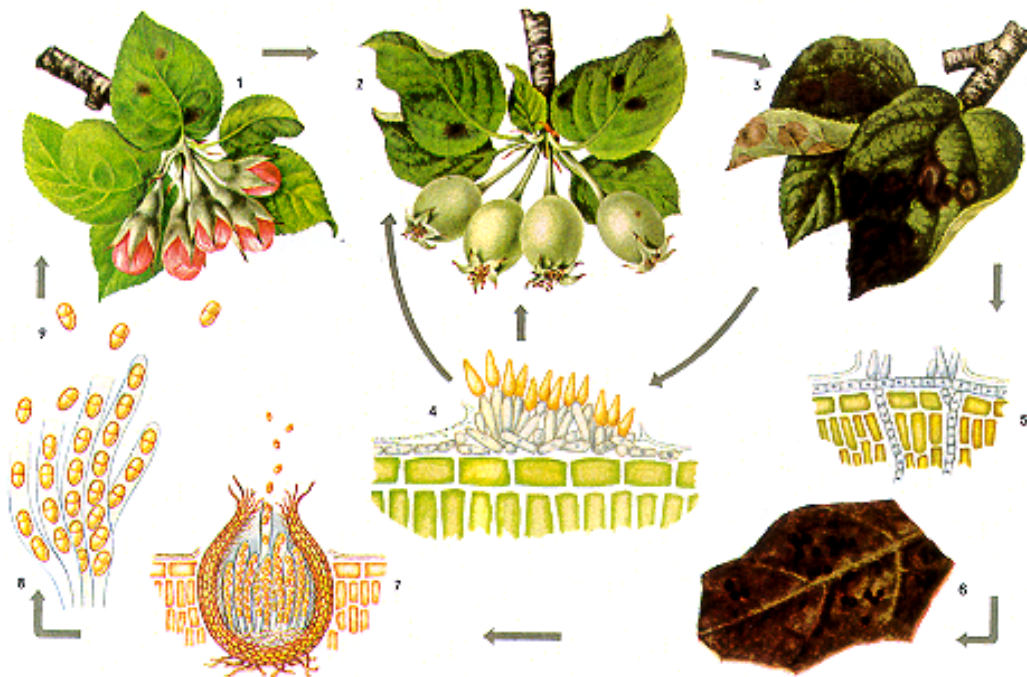
3.5.5.2 Klimakammer .....	85
3.6. Chemische Einwirkungen auf die Sporenemission .....	85
3.6.1 Wirkung von Substratextrakten .....	85
3.6.2 Osmoregulatoren und pH-Werte .....	86
3.6.3 Chemische Hemm- und Förderstoffe .....	86
4. DISKUSSION.....	87
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	106
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	108
7. ANHANG .....	119



## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Der Apfelschorferreger *Venturia inaequalis*

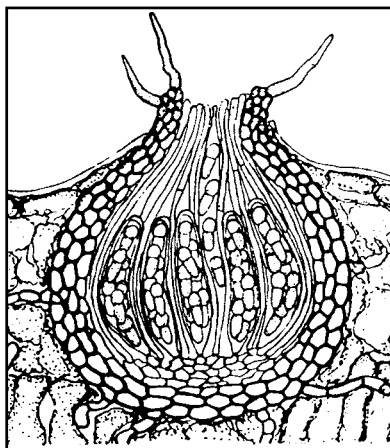
Der Apfelschorf, die weltweit wichtigste Mykose im Apfelanbau, wird durch den Ascomyceten *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. (Anamorph: *Spilocaea pomi* (Fries)) verursacht. Der Apfelschorf (engl. apple scab) ist insbesondere in gemäßigten Gebieten mit kühlem, feuchtem Frühjahr eine ernsthafte Bedrohung (MacHardy, 1996) und kann ohne Pflanzenschutzmaßnahmen zum völligen Verlust der Ernte führen (Vukovits, 1980). Der wirtschaftlich bedeutsamste Wirt ist der kultivierte Apfel *Malus sylvestris* var. *domestica* (Borkh.). Der ökonomische Schaden durch Apfelschorf entsteht vornehmlich durch die Beeinträchtigung von Fruchtqualität und Fruchtwachstum. Schwerer Schorfbefall der Blätter schwächt den Baum, so dass im nächsten Jahr die Blütenansätze stark vermindert werden (Bailey, 1895). Die Symptome sind besonders an Blättern, Blüten und Früchten zu sehen, seltener an Zweigen. Auf der Blattoberseite bilden sich annähernd kreisförmige, hell-olivgrüne Flecken mit samtartiger, grauer Oberfläche (Paul, 1981). Mit fortschreitendem Befallsverlauf verfärben sich die Flecken braunschwarz und entwickeln eine scharfe Begrenzung. Auf der Blattunterseite sind die Läsionen meist diffus mit schwach sichtbaren Begrenzungen (Aderhold, 1896). Die Blätter zeigen Verzweigung, Verdrehung und können vorzeitig abfallen, da sie durch die Zerstörung der Cuticula an den Schorfläsionen vertrocknen (Vukovits, 1980). Befallene Früchte zeigen erst olivfarbene, später dunkelbraune und verkorkte Flecken. Durch Ausbildung von Korklagern unterhalb der Flecken kann die Frucht deformiert werden, da die Korkbereiche nicht mitwachsen (Wallace, 1913). Der Apfelschorfpilz überwintert im Falllaub in Form der unreifen Fruchtkörper. Die sexuelle, saprophytische Phase beginnt im Herbst mit dem Einwachsen der Hyphen ins Blattgewebe und der Entwicklung der Pseudothecien (Wiesmann, 1932). Im Frühjahr reifen die ersten Pseudothecien und entlassen die Ascosporen, die auf den jungen Blättern und Blütenteilen zu den Primärfektionen führen (Wallace, 1913; Frey & Keitt, 1925; Keitt & Jones, 1926) (**Abb. 1**). Die Ascosporenausschleuderung ist eng an die Wirtsentwicklung im Frühjahr geknüpft und die meisten Sporen werden zwischen Blütenöffnung und Abblühen ausgestoßen (Frey & Keitt, 1925; Miller & Waggoner, 1958; Brook, 1976; Gadoury & MacHardy, 1982a). Durch Wind werden die Sporen auf die jungen Blätter und Blütenknospen getragen, wo sie anhaften und keimen (Vukovits, 1980). Nach der Etablierung der Infektion beginnt die parasitische asexuelle Phase. Die subcuticulären Hyphen bilden Konidiophoren, die durch Risse in der Cuticula über die Blattoberfläche ragen. Die Konidiophoren schnüren nacheinander mehrere einzellige Konidien ab. Sie werden durch Regen abgewaschen und führen zu Sekundärfektionen (Gupta, 1992).



**Abb. 1:** Der Entwicklungszyklus von *V. inaequalis* auf seinem Wirt (*Malus*). 1: Primärbefall an jungen Laub- und Kelchblättern durch Ascosporen; 2 - 4: Sekundärbefall an Blättern und Früchten durch Konidien, die von subcuticulärem Myzel (4) gebildet werden; 5: Beginn der saprophytischen Phase mit Eindringen des Myzels in das Blattinnere nach Blattfall; 6: überwintertes, mit Myzel durchwachsesenes Blatt; 7: reifes Pseudothecium mit Ascis; 8: freigesetzte Ascosporen (nach Paul, 1981).

## 1.2 Pseudothecien- und Ascusentwicklung

### 1.2.1 Morphologie und Differenzierung



**Abb. 2:** Schnitt durch ein überwintertes Apfelblatt mit Pseudothecium von *V. inaequalis* (nach Müller & Loeffler, 1982).

Die Form der Pseudothecien (90-150  $\mu\text{m}$ ) ist rund bis flaschenförmig mit kurzem Hals. Die Öffnung, das Ostium, ragt über die Blattoberfläche der dem Boden abgewandten Blattseite (Gadoury & MacHardy, 1985) und kann von schwarzen, spitz zulaufenden 25 – 75  $\mu\text{m}$  langen Borsten, den Setae, umgeben sein (Wallace, 1913) (**Abb. 2**). Diese Borsten sind dickwandige Auswüchse der Pseudothecienwandung, sie können in ihrer Anzahl variieren oder vollständig fehlen (Aderhold, 1896). Die Pseudothecienwand besteht aus 3-4 Schichten dickwandiger, pseudoparenchymatischer Zellen (Gupta, 1992). Ein Pseudothecium enthält 100-140 Ascis (Gadoury & MacHardy, 1986), die von hyalinen Paraphysen umgeben sind. Die Ascis (38-67 x 6-12  $\mu\text{m}$ ) wachsen aus den am Boden des Fruchtkörpers

befindlichen ascogenen Hyphen und enthalten je acht zweizellige, hell-olivgrüne Ascosporen (13-16 x 6-8  $\mu\text{m}$ ) (Vukovits, 1980). Die charakteristische Sporenform entsteht durch die ungleiche Größe der beiden Zellen. Die kleinere ist etwas breiter und endet in einer kleinen Spitze, die größere ist abgerundet. An der Querwand ist die Spore etwas eingeschnürt (Aderhold, 1896). Der bitunicate Ascus besteht aus zwei unabhängigen Wandteilen, dem steifen dickwandigen Exoascus und dem dünnwandigen dehnbaren Endoascus. Beide Tunics besitzen parallel zur Grenzschicht des Protoplasten angeordnete Mikrofibrillen. Die Mikrofibrillen im Exoascus erreichen ihre maximale Dehnung zum Zeitpunkt der Sporenreife. Im Endoascus sind die Mikrofibrillen zu längsverlaufenden Bündeln zusammengefasst und an ihren Enden etwas gebogen, wodurch der Endoascus quergebändert erscheint und eine erhebliche Streckung ermöglicht wird (Müller & Loeffler, 1982).

Die Pseudothecienanlage entsteht zunächst als kugeliger Zellverband aus einer Hyphe durch Einrollen an der Spitze (Oberhofer, 1985). In den Pseudothecienanlagen entwickeln sich Ascogonien und sterile Pseudoparaphysen. Antheridien eines kompatiblen Paarungstyps wachsen zu den Ascogonien und die Trichogyne des Ascogoniums legt sich an ein Antheridium (Müller & Loeffler, 1982). Nach Plasmogamie und Kernpaarung entstehen ascogene dikaryontische Hyphen. Diese Hyphen differenzieren durch Hakenbildung die Asci. Im jungen Ascus erfolgt zunächst Karyogamie, daraufhin streckt sich der Ascus und der Kern teilt sich meiotisch, wodurch vier haploide Kerne entstehen. Sofort danach teilen sich die vier Kerne zweimal mitotisch, wobei acht zweizellige Ascosporen gebildet werden (MacHardy, 1996).

### **1.2.2 Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Pseudothecienreifung**

Die Mehrheit der Pseudothecien wird innerhalb der ersten vier Wochen nach Blattfall angelegt. Im Herbst entwickeln sich zunächst die Ascogoniuminitialen und füllen sich mit Pseudoparaphysen. Im Winter folgt eine Ruhephase aufgrund der tiefen Temperaturen, bevor die Reifung der Asci mit dem Temperaturanstieg im Frühjahr beginnt. Essentiell für die Initiation und Entwicklung der Pseudothecien sind hohe Feuchtigkeit und niedrige Temperaturen (O'Leary & Sutton, 1986). In trockenen Blättern entwickeln sich keine Pseudothecien (Wilson, 1928) bzw. bleiben in ihrer Entwicklung stehen (James & Sutton, 1982). Die Anzahl der im Herbst angelegten Pseudothecien ist umgekehrt proportional zur Temperatur zwischen 4 und 20°C (Gadoury & MacHardy, 1982b). Die für die jeweilige Entwicklungsstufe optimale Temperatur steigt graduell an. Die optimale Temperatur für die Größenentwicklung der Pseudothecien während der ersten vier Wochen nach Blattfall liegt bei 10°C, zur Zeit der Ascosporenreife bei 20°C (Gadoury & MacHardy, 1982b). Wiesmann (1932) beobachtete eine bestmögliche Pseudotheciumreifung von der Prä-Ascusphase zum Zeitpunkt der Ascosporenreife mit 11 Tagen bei 17°C. Bei 0°C ist die Pseudothecienentwicklung verlangsamt (68 Tage), oberhalb von 24°C degenerieren die Pseudothecien (James & Sutton, 1982). Die Anpassung an die unterschiedlichen

Durchschnittstemperaturen im Herbst, Winter und Frühjahr führt zu einer Synchronisation zwischen der Entwicklung des Wirts und des Erregers, so dass die ersten Asci mit Beginn des Knospenaufbruchs reif sind (MacHardy, 1996). Apfelsorte und Zeitpunkt des Blattfalls haben keinen Effekt auf die Pseudothecienentwicklung (Hirst & Stedman, 1962b; James & Sutton, 1982).

### **1.3 Ascosporenausschleuderung bei *V. inaequalis***

#### **1.3.1 Vorgänge bei der Sporenausschleuderung**

Die Asci von *V. inaequalis* sind zur aktiven Sporenausschleuderung fähig (Aderhold, 1896). Bevor die Ascosporen ausgestoßen werden können, müssen die Pseudothecien von Wasser durchtränkt werden (Hirst & Stedman, 1962a; Brook, 1969a). Bei der Wasseraufnahme durch Osmose steigt in der basalen Vakuole des Ascus der Druck an, der Endoascus streckt sich und der starre Exoascus reißt am apikalen Ende (Müller & Loeffler, 1982). Der Endoascus schiebt sich ca. 40 µm durch das Ostiolum, bis die ersten zwei bis drei Sporen sichtbar werden, die in einer Linie angeordnet sind. Nach fünf bis sechs Sekunden reißt er an der Spitze und die Sporen werden durch den Innendruck in rascher Folge nacheinander ausgeschleudert, der leere Ascus zieht sich ins Innere zurück (Wiesmann, 1932). Es können mehrere Asci zur gleichen Zeit durch das Ostiolum nach außen treten, aber die Sporentladung der einzelnen Asci geschieht nacheinander (Brook, 1969a). Bei Windstille wurden Schleuderweiten in die Luft zwischen 0,1 und 8,1 mm (Maximum 13,2 mm) gemessen, während in Wasser Distanzen von 0,2 bis 0,25 mm zurückgelegt werden (Aylor & Anagnostakis, 1991). Wenn das Ostiolum durch einen dünnen Wasserfilm bedeckt ist, schiebt sich die Ascusspitze über das Wasser und entlässt die Sporen in die Luft. Extension und Ausschleuderung sind dann in nur 3,5 Sekunden abgeschlossen. Ist das Blatt von einem dickem Wasserfilm bedeckt, braucht ein Ascus 45-120 Sekunden, um sich aus dem Ostiolum zu schieben und die Sporen ins Wasser zu entlassen (Brook, 1969a). Gelangen Sporen durch einen Wasserfilm an die Luft, so haben sie ihre Energie zum größten Teil verloren und legen nur noch sehr kurze Distanzen zurück (MacHardy, 1996).

#### **1.3.2 Hemmung der Sporenausschleuderung**

Damit ein reifer Ascus Sporen ausstoßen kann, muss ein hydrostatischer Druck aufgebaut werden. Die Wasseraufnahme in den Ascus verläuft durch Diffusion von Wasser durch die Ascusmembran. Dafür muss das Wasserpotential des Ascus niedriger sein als das der umgebenden Lösung. Das osmotische Potential des reifen Ascus wurde durch Tauchen in Saccharoselösungen verschiedener Konzentrationen und mikroskopische Beobachtung der Asci bestimmt. Die Saccharose-Konzentration, bei der kein Wasser mehr in den Ascus diffundieren kann, wurde mit 2,0 - 2,5 molal

angegeben und entspricht näherungsweise dem osmotischen Potential im Ascus (Aylor & Anagnostakis, 1991).

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Verbindungen untersucht, mit denen die saprophytische Phase von *V. inaequalis* in Herbst und Frühjahr bekämpft werden kann. Getestet wurden u. a. die Kontaktfungizide DODINE und CAPTAN (Connor & Heuberger, 1968; Gadoury *et al.*, 1989), die Fungizide BENOMYL und Thiophanatemethyl (Miller, 1970; Burchill, 1972; Gadoury *et al.*, 1989) und Sterol-Biosyntheseinhibitoren (Gadoury & MacHardy, 1984; Gadoury *et al.*, 1989). Unter den anorganischen Verbindungen waren Ammoniumsulfat, Phenylquecksilberchlorid und Dinitroorthokresol (Keitt *et al.*, 1941; Hutton, 1954; Hirst & Stedman, 1962b). Auch verschiedene als Düngemittel eingesetzte Verbindungen wurden getestet, Harnstoff (Burchill *et al.*, 1965; Burchill, 1968; Miller, 1970), Kalk und Kaliumphosphat (Miller & Rich, 1968). Hierbei wurde stets auf die Abtötung bzw. Unterdrückung der Reifung von Fruchtkörpern gezielt (Miller, 1970; Gadoury & MacHardy, 1984; Gadoury *et al.*, 1989). Der Effekt der Behandlungen wurde durch die Quantifizierung ausgeschleuderter Ascosporen im Frühjahr im Vergleich zu unbehandelten Blättern ermittelt. Eine Reduktion der Ascosporenproduktion um 90-100 % gegenüber der Kontrolle wurde durch Dinitroorthokresol, Ammoniumsulfat (Hirst & Stedman, 1962b), BENOMYL (Burchill *et al.*, 1965; Connor & Heuberger, 1968; Miller, 1970), Thiophanatemethyl und Sterol-Biosyntheseinhibitoren (Gadoury *et al.*, 1989) bewirkt. Weniger effektiv, mit Reduktionen zwischen 20 und 70 %, waren Phenylquecksilberchlorid (Hirst & Stedman, 1962b), Harnstoff (Miller, 1970), Kalk und Kaliumphosphat (Miller & Rich, 1968) sowie DODINE und CAPTAN (Gadoury *et al.*, 1989). Die inhibitorische Wirkung der oben aufgeführten Verbindungen auf den eigentlichen Vorgang der Sporenausschleuderung wurde jedoch nicht untersucht. Basische Phosphatpuffer, die einen pH-Wert von mehr als 7,5 auf der Blattoberfläche bewirken, verhindern die Bildung von Pseudothecien (Cook, 1969), aber es ist bisher nicht bekannt, ob durch basischen oder sauren pH der Ascosporenausstoß unterbunden wird. Antibiotika, die in die DNA-Replikation, Transkription oder Translation eingreifen, oder Verbindungen, die z.B. die Energiegewinnung der Zelle oder die Membraneigenschaften beeinflussen, wurden bisher nicht als potentielle Hemmstoffe der Ascosporenemission untersucht. Desgleichen wurde bisher keine Untersuchung veröffentlicht, in der die Wirkung von Inhaltsstoffen der überwinterten Apfelblätter auf die Sporenausschleuderung analysiert wurde. Im Zusammenhang mit der Schorfresistenz des Apfels wurden verschiedene phenolische Verbindungen im Apfelblatt identifiziert (Mayr *et al.*, 1997; Michalek & Treutter, 1998) und eine inhibitorische Wirkung durch phenolische Stoffe auf Proteine und Enzyme des Pilzes *in vitro* konnte festgestellt werden (Golba *et al.*, 2000).

## 1.4 Ursachen von Sporenfreisetzung und -verbreitung

### 1.4.1 Effekt von Wasser, Wind und anderen Umweltfaktoren auf Pilze

Bereits seit mehr als einem Jahrhundert ist die Sporenfreisetzung der Pilze Objekt umfassender Erforschung. Der Prozess der Sporenfreisetzung und -verbreitung ist für den Fortbestand eines Pathogens von existenzieller Bedeutung, da er die Spore zum Infektionsort befördert (Meredith, 1973). Er ist gleichzeitig der kritische Punkt im Leben eines phytopathogenen Organismus, da oft größere Entfernungen zurückgelegt werden müssen und die Spore den Wirt in keimfähigem Zustand erreichen muss. Die Mechanismen der Sporenverbreitung bei vielen phytopathogenen Pilzen sind bekannt (Ingold, 1971) und eine Vielzahl von Umweltfaktoren, die an der Sporenfreisetzung beteiligt sind bzw. den Vorgang beeinflussen, wurden identifiziert: Wind, Wasser, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Licht, Vibration und elektrostatische Ladung. Ist die Sporenfreisetzung passiv, wird die notwendige Energie von Wasser, Wind oder Tieren aufgebracht. Bei aktiver Sporenfreisetzung liefert der Pilz selbst die Energie, ist aber wiederum auf auslösende Umweltfaktoren angewiesen.

Wasser und Wind sind die wichtigsten Umweltfaktoren für die Freisetzung und Verbreitung vieler Pilzsporen und sind oft beide zu wechselnden Anteilen beteiligt (Fitt *et al.*, 1989; Aylor, 1990). Die für die Freisetzung passiv verbreiteter Sporen notwendige Windgeschwindigkeit variiert von Pilz zu Pilz (Meredith, 1973). Die Sporen von *Botrytis cinerea* werden schon bei 1,6 km/h freigesetzt, während Sporen von *Fusarium culmorum* oder *Phytophthora infestans* selbst durch Windgeschwindigkeiten von 12 km/h nicht freigesetzt werden (Stepanov, 1935). Windböen können die Effektivität der Konidienfreisetzung von *Passalora personata* stark erhöhen (Wadia *et al.*, 1998). Windkanalstudien mit *Puccinia graminis* zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen Windgeschwindigkeit und Sporenfreisetzung ab 4,5 km/h (Smith, 1966). Windverbreitete Sporen, z.B. von *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.* oder *Puccinia coronata*, sind typischerweise rund und besitzen eine dicke, oft gefärbte Zellwand, die sie vor Austrocknung schützt, und eine raue Oberfläche, die möglicherweise die aerodynamischen Eigenschaften und/oder die Haftung auf der Wirtsoberfläche nach der Landung verbessert (Fitt *et al.*, 1989). Wind spielt bei Verbreitung von Schorfsporen eine wichtige Rolle: der Apfelschorfpilz ist auf Luftströmungen angewiesen, mit denen die aktiv ausgeschleuderten Ascosporen auf junge Blätter und Blüten getragen werden (Aylor, 1998). Die Wand der *V. inaequalis* Ascosporen ist dick aber glatt und kann fest auf dem jungen Wirtsgewebe anhaften (Gupta, 1992). Ascosporen von *V. inaequalis* sorgen im Allgemeinen nur in ihrem Ursprungsgebiet für erneute Schorfinfektionen (Burchill, 1966). Der Sporeneintrag aus entfernten Anbaugebieten ist vernachlässigbar, da die Sporenkonzentration mit wachsender Entfernung rasch abnimmt und spielt nur in Ausnahmefällen bei besonders hohem Sporenpotential und geringer Entfernung eine Rolle (Aylor, 1998).

Bei der Spritzwasserverbreitung durch Regentropfen handelt es sich um eine weitere häufige Form der passiven Sporenfreisetzung. Beim Aufprall auf einen sporulierenden Pilz wird ein Wassertropfen in viele kleine Tröpfchen zerlegt, in denen Sporen eingeschlossen und verbreitet werden. Phytopathogene Pilze mit Spritzwasserverbreitung produzieren in Schleim eingebettete, dünnwandige Sporen, die in trockenem Zustand auf der Pflanzenoberfläche haften und bei Regen leicht losgelöst werden. Sporen dieser Pathogene, u. a. *Gloeosporium* spp., *Fusarium* spp., *Pseudocercospora herpotrichoides* und *Septoria nodorum*, befinden sich im Allgemeinen nur während eines Regenereignisses in der Luft und werden nicht weiter als einen Meter von der Inokulumquelle verteilt (Meredith, 1973; Fitt *et al.*, 1989). Regentropfen sind auch an der Verbreitung von normalerweise windverbreiteten Sporen, z.B. der beiden Rostpilze *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* und *P. striiformis* an Weizen (Geagea *et al.*, 1999), beteiligt, indem der Tropfeneinschlag eine Luftverwirbelung oder eine Vibration hervorruft, wodurch die Spore gelöst wird (Hirst & Stedman, 1963; Wadia *et al.*, 1998). Dieses Prinzip kommt auch bei den großen Fruchtkörpern der Boviste und Stäublinge (Ordnung *Lycoperdales*) zum Ausdruck, hier werden Sporen durch den Aufprall von Regentropfen auf den Fruchtkörper durch einen Blasebalgmechanismus ausgeschleudert. Umgekehrt können durch Spritzwasserverbreitung in die Luft geschleuderte Sporen vom Wind weitergetragen werden (Fitt *et al.*, 1989). Das gilt auch für die Konidien von *V. inaequalis*, die durch Regen von ihren Konidienträgern abgewaschen werden (Frey & Keitt, 1925; Keitt & Jones, 1926). Die Sporangien von *Phytophthora* spp. zeigen Charakteristika beider Gruppen und können wahrscheinlich durch Spritzwasser (Grove *et al.*, 1985) oder trocken verbreitet werden (Hirst, 1953).

Die aktive Freisetzung von Pilzsporen ist auf auslösende Umweltfaktoren angewiesen. Bei *Drechslera gigantea* (Meredith, 1963a) sowie Arten von *Alternaria*, *Helminthosporium* und *Cladosporium* (Meredith, 1963b) ist der auslösende Faktor ein Rückgang der Luftfeuchtigkeit, während die Freisetzung von Konidien bei *Pyricularia oryzae* und *P. grisea* am stärksten durch ansteigende Luftfeuchtigkeit induziert wird (Ingold, 1964; Leach, 1980a). Konidienfreisetzung bei *D. turcica* und *D. maydis* kann sowohl durch ansteigende als auch abfallende Luftfeuchtigkeit ausgelöst werden (Leach, 1980b). Bei *D. turcica* und *D. maydis* wirken neben der Luftfeuchtigkeit auch Rot-Infrarotstrahlen (Leach, 1975; 1980c) sowie Vibrationen (Leach, 1980b) induzierend und auch *P. oryzae* antwortet auf Vibration, ausgelöst durch Regenschauer oder Windbewegungen, mit heftigem Sporenausstoß (Leach, 1980a). Für *D. turcica* wurde die Beteiligung eines elektrostatischen Mechanismus an der Sporenfreisetzung gezeigt. Die Konidien von *D. turcica* sind negativ geladen und werden von der gleich polarisierten Läsion abgestoßen. Durch Neutralisierung der Ladung an der sporulierenden Läsion kann man den Konidienausstoß stoppen (Leach, 1980d). Auch bei *D. maydis*, *P. oryzae* und *Stemphylium botryosum* wird dieser Mechanismus vermutet.

Unter den Ascomyceten befinden sich zahlreiche phytopathogene Pilze, die ihre Ascosporen aktiv ausschleudern, als Antwort auf Veränderungen des Wassergehalts durch Tau, Regen und Luftfeuchtigkeit. Wie bei den o. g. Pilzen dient absinkende Luftfeuchtigkeit bei *Sordaria fimicola* (Ingold & Marshall, 1962) und *Calonectria crotalariae* (Rowe & Beute, 1975) als Auslöser. Unter Freilandbedingungen ist ein Absinken des Dampfdrucks bei Tagesanbruch normalerweise mit einer Zunahme der Luftbewegung verknüpft, wodurch die Verbreitung der Sporen begünstigt wird. In den mit Schleim gefüllten Perithezien von *C. crotalariae* entsteht bei sinkender Luftfeuchtigkeit ein hydrostatischer Druck, der zum „Auspressen“ der Ascosporen aus dem im Ostiolum befindlichen Ascus führt (Rowe & Beute, 1975). Bei vielen Ascomyceten, darunter *V. inaequalis*, kann der Ascosporenausstoß erst nach ausreichender Wasseraufnahme des Fruchtkörpers beginnen (vgl. 1.3.1 und 1.4.2.4). Der Sporenausstoß dieser Pathogene ist infolgedessen eng an hohe Luftfeuchtigkeit und/oder das Vorhandensein freien Wassers geknüpft. Für *Anisogramma anomala* auf Haselnuss, den Holzfäuleerregern an Apfelbäumen *Botryosphaeria dothidea* und *Phyalospora obtusa* sowie *Ophiobolus graminis* an Weizen wurde eine Abhängigkeit des Sporenausstoßes von Regenfällen berichtet. Sporen werden nur während oder kurz nach Regenfällen nachgewiesen, während Tau den Sporenausstoß nicht induzieren kann (Samuel & Garrett, 1933; Sutton, 1981; Pinkerton *et al.*, 1998). Bei *Mycosphaerella pinodes* in Südaustralien wird Sporenausstoß durch Bewässerung bzw. Regen, aber auch durch Tauperioden in der Nacht induziert (Carter & Moller, 1961; Carter, 1963). *Apiosporina morbosa* benötigt zum Sporenausstoß mindestens 0,25 mm Regen, aber während drei Tauperioden hintereinander wurden ebenfalls relativ große Sporenmengen gefangen (McFadden-Smith *et al.*, 2000). Bei *C. crotalariae* existiert neben der aktiven Ascosporenausschleuderung auch Spritzwasserverbreitung. Die Sporen treten in einem Schleimtropfen aus dem Ostiolum und können durch Tropfeneinschlag verbreitet werden (Rowe & Beute, 1975). Die Kombination der beiden verschiedenen Freisetzung-Mechanismen tritt auch bei *A. anomala*, *Valsa leucostoma* sowie *P. obtusa* und *B. dothidea* auf (Bertrand *et al.*, 1976; Sutton, 1981; Pinkerton *et al.*, 1998).

Im Allgemeinen ist während des Tagesverlaufs eine bestimmte Abfolge des Sporenflugs verschiedener Pilze zu beobachten, das heißt die meisten Pilzsporen sind vorrangig zu bestimmten Tageszeiten in der Luft nachzuweisen (Hirst, 1953; Gregory, 1973). Diese diurnale Periodizität des Sporenflugs vieler Pilze ist auf den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf den Sporenausstoß zurückzuführen. Pilze, die auf abfallende Luftfeuchtigkeit zur Sporenausschleuderung angewiesen sind wie *Deighthoniella torulosa* (Meredith, 1961), verbreiten ihre Sporen zwischen 7 und 12 Uhr, wenn steigende Tagestemperaturen den Tau trocknen lassen. Ascomyceten, die auf das Vorhandensein freien Wassers angewiesen sind, verbreiten ihre Sporen oft nachts, wenn Tau maximal ist, oder am Tag kurz nach Regenperioden (Carter, 1963; Meredith, 1973; Sutton, 1981; Pinkerton *et al.*, 1998). Auch bei *V. inaequalis* wird eine diurnale Periodizität der Ascosporenkonzentration in



der Luft beobachtet (vgl. 1.4.2.2). Circadiane Rhythmen wurden bisher nicht nur bei Tieren und Pflanzen, sondern auch bei Bakterien und Pilzen untersucht. Ein Modellorganismus für die circadiane Steuerung verschiedener Vorgänge ist der Ascomycet *Neurospora crassa* (Feldman & Dunlap, 1983), bei dem u.a. die DNA- und RNA-Synthese, Enzymaktivität oder asexuelle Sporenbildung durch eine innere Uhr gesteuert werden. Ein direkter Lichteinfluss auf das Wachstums- bzw. Sporenausstoßverhalten ist von den zwei Gattungen *Phycomyces* und *Pilobolus* (Abteilung *Zygomycota*) bekannt, deren Sporangien Phototropismus zeigen (Müller & Loeffler, 1982; Lipson *et al.*, 1983).

## **1.4.2 Einflüsse auf den Ascosporenausstoß bei *V. inaequalis***

### **1.4.2.1 Temperatur**

Die Umgebungstemperatur hat über einen weiten Bereich keine Auswirkungen auf die Emission der Ascosporen. Keitt & Jones (1926) beobachteten Ascosporenausschleuderung bei Temperaturen zwischen 0,5 und 32°C und konnten kein Temperaturoptimum feststellen. Windkanalstudien und Freilandaufzeichnungen zeigten eine Verzögerung des Sporenausstoßes unter 10°C (Hirst & Stedman, 1962a; MacHardy & Gadoury, 1986). Die Verzögerungsdauer ist umgekehrt proportional zur Temperatur: bei 4-6°C ist der Beginn des Sporenausstoßes um ein bis zwei Stunden verzögert, bei 2°C um über drei Stunden. Erst unter 2°C kommt der Ascosporenausstoß fast vollständig zum Erliegen. Bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt ist zudem die Ausstoßrate verringert und infolgedessen kommt es zur Reduktion der absoluten Sporenmenge, die in die Luft freigesetzt wird (Stensvand *et al.*, 1997).

### **1.4.2.2 Lichteinfluss und diurnale Periodizität des Sporenausstoßes**

Der Sporenausstoß bei Dunkelheit oder Licht mit Wellenlängen unter 620 nm (blau und grün) ist sehr gering. Durch Wellenlängen zwischen 625-725 nm und besonders im Fernrotbereich von 710-730 nm wird starke Sporenemission ausgelöst (Brook, 1969b; 1975; Gadoury *et al.*, 1998). Die Beleuchtung mit Fernrot zeigt die gleiche Wirkung wie künstliches Tageslicht (Stensvand *et al.*, 2000). Lichtintensitäten ab  $0,5\mu\text{W}/\text{cm}^2$  bei 725 nm reichen aus, um Sporenausstoß auszulösen (Gadoury *et al.*, 1998). Der Sporenausstoß steigert sich drei bis sechs Stunden nach Sonnenaufgang auf ein Maximum (Frey & Keitt, 1925; MacHardy & Gadoury, 1986). Die Zunahme des Sporenausstoßes ist auf eine intrinsische Steigerung der Ausstoßrate mit der Zeit zurückzuführen (Gadoury *et al.*, 1998). Obwohl es Belege für eine Abhängigkeit des Sporenausstoßes von der Lichtintensität gibt (Gadoury *et al.*, 1998), wurde bei  $0,5\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und  $25\mu\text{W}/\text{cm}^2$  die gleiche Ausstoßrate gemessen (Gadoury *et al.*, 1994) und somit keine Abhängigkeit von der Lichtintensität festgestellt. Die

Steigerung des Sporenausstoßes ist demnach eine Folge der Zunahme der Zahl der auf Licht ansprechenden Pseudothecien (MacHardy, 1996).

Zahlreiche Freilandstudien lieferten ein übereinstimmendes Bild der diurnalen Periodizität des Sporenflugs. Der Hauptteil der Ascosporen in Regenzeiten wird am Tag gefangen, der nächtliche Sporenanteil liegt zwischen 0,5 und 15 % des gesamten Ascosporenausstoßes einer Saison (Keitt & Jones, 1926; Hirst & Stedman, 1962a; Brook, 1966; MacHardy & Gadoury, 1986; Aylor & Sutton, 1992; Kohl *et al.*, 1994). Eine Ausnahme wird aus Kanada berichtet, dort wurden 1991 20 % der jährlichen Ascosporen bei Nacht gefangen (Warner & Braun, 1992).

#### 1.4.2.3 Physiologischer Zustand

Gadoury *et al.* (1998) stellten bei Windkanalversuchen fest, dass durch die Zufuhr von unnatürlich trockener Luft (10-15 % rF) während eines simulierten Regenereignisses die Unterdrückung des Sporenausstoßes bei Dunkelheit verhindert wurde. Umgekehrt konnte durch die Zuführung feuchter Luft (90-94 %) im Windkanal ein zur Natur vergleichbares Verhalten des Ascosporenausstoßes erlangt werden. Die unnatürlich niedrige Luftfeuchtigkeit wurde als Ursache für die von der Natur abweichenden Ergebnisse in der Umweltkammer angeführt (Gadoury *et al.*, 1998). Die diurnale Periodizität der Sporenausschleuderung ließ in Freilandstudien mit künstlicher Benetzung zum Ende der Sporenflugsaison ebenfalls nach. Diese Störung des Hemmmechanismus war erst zu beobachten, nachdem 90 % des jährlichen Ascosporenpotentials freigesetzt waren (Gadoury *et al.*, 1998). Die Akkumulation reifer Ascosporen während langer regenfreier Phasen kann laut Stensvand *et al.* (1998) zur Freisetzung relativ großer Sporenmengen in Tauperioden führen, eventuell gekoppelt mit den von Gadoury *et al.* (1998) beobachteten Seneszenzeffekten. Die Lagerung verschorfte Blätter unter hoher Luftfeuchtigkeit nach einmaliger Benetzung veränderte das Ausstoßverhalten der Pseudothecien in den Studien von Gadoury *et al.* (1998). Mit jedem weiteren Inkubationstag stieg die Bereitschaft zum Sporenausstoß bei Dunkelheit. Bei Inkubationsversuchen von Kollar (2000) wurden überwinterte verschorfte Blätter für ein bis zwei Wochen bei 20°C und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Es war eine Beschleunigung der Pseudothecienreifung im Vergleich zu im Freiland gelagerten Blättern erkennbar, aber es wurde kein verändertes Ausschleuderverhalten bei der verwendeten Quantifizierungsmethode beobachtet.

#### 1.4.2.4 Regen und Taunässe

Blattnässe ist der wichtigste Faktor für die Sporenausschleuderung bei *V. inaequalis* (Brook, 1969a). Die Benetzung pseudothecientragender Blätter durch Regen wurde als Voraussetzung für signifikanten Sporenausstoß betrachtet (Frey & Keitt, 1925; Keitt & Jones, 1926; Wiesmann, 1932). Da die Sporen von *V. inaequalis* aktiv

ausgeschleudert werden, liefert der Regen nicht die benötigte Energie wie bei der Spritzwasserverbreitung. Demzufolge wurde der Regen als ein Nässeereignis angesehen, das zur Durchtränkung der Blätter führt. Tau wurde wegen seiner fehlenden Wirkung auf die Sporenausschleuderung zunächst als nicht ausreichendes Nässeereignis dargestellt (Keitt & Jones, 1926; Wiesmann, 1932). Die benötigten Regenmengen indessen sind sehr gering. In Windtunnelversuchen wurde schon ab 0,05 mm Regen Sporenausstoß gemessen und 0,2 mm genügte für starken Sporenausstoß (Hirst & Stedman, 1962a). Auch in Freilandstudien konnten Ascosporen nach 0,1 mm Niederschlag in der Luft gefangen werden (Brook, 1966). Andererseits konnte in 10-jährigen Studien in Dossenheim keine Sporenemission in Tauperioden festgestellt werden (Kohl, 1993; Kohl *et al.*, 1994; Kollar 1996-2000). Weltweit wurde bisher bei Tau kein oder nur unbedeutender Ascosporenflug beobachtet (Frey & Keitt, 1925; Keitt & Jones, 1926; Miller & Waggoner, 1958; Moore, 1958; Hirst & Stedman, 1962a; Brook, 1969a; MacHardy & Gadoury, 1986). Der einzige Bericht, in dem vergleichsweise hohe Anteile des jährlichen Inokulums (bis zu 26 %) in Tauperioden ausgeschleudert wurden, kommt aus Norwegen (Stensvand *et al.*, 1998). Es ist jedoch bisher nicht eindeutig geklärt, ob die Sporenemission bei Tau unterdrückt wird oder ob die Sporen durch den dicken Wasserfilm nicht in die Luft gelangen. Die Vorstellung, dass prasselnder Regen nicht nur die notwendige Feuchtigkeit liefert, sondern gleichzeitig den Sporenausstoß induziert, wird durch alle bisherigen Ergebnisse und Beobachtungen unterstützt. Da *V. inaequalis* in Fruchtkörper eingeschlossene Sporen produziert, erschien diese Variante bisher nicht naheliegend und entsprechend wurden keine Untersuchungen in dieser Richtung vorgenommen. Die durch Kollar (1998a,b; 2000) entwickelte Wasserbadmethode zur Quantifizierung des Ascosporenpotentials liefert einen Anhaltspunkt, dass kinetische Energie den Sporenausstoß bei *V. inaequalis* auslöst.

### 1.4.3 Charakterisierung von Niederschlägen

#### 1.4.3.1 Regen und Tau

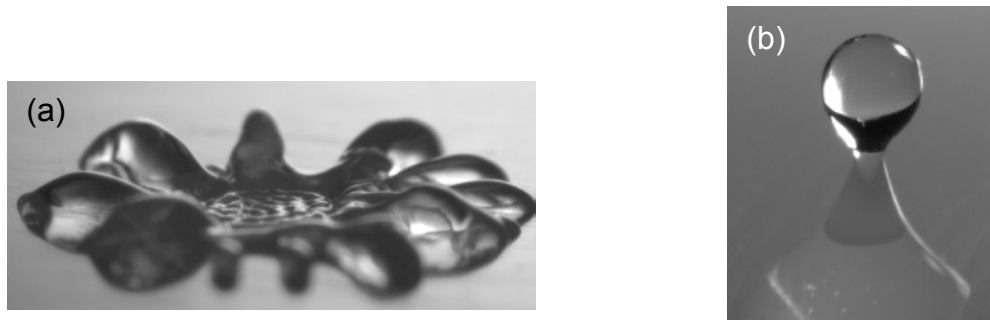
Regen, Hagel und Schnee werden als fallende Niederschläge den abgesetzten Niederschlägen Tau und Reif gegenübergestellt, bei denen der in Luft enthaltene Wasserdampf am Boden oder Blättern kondensiert oder sublimiert. Tauschichten bilden sich mit einer Geschwindigkeit von 70  $\mu\text{m}/\text{h}$  und können eine Dicke von 300-600  $\mu\text{m}$  erreichen (Garrat & Segal, 1988). Tau hat also gegenüber Regen keine geringere Benetzungskraft und kann zu völlig durchfeuchteten Blättern führen. Die Tauschicht trocknet allerdings bei Tagesanbruch meist schnell ab.

Die wesentlichen Parameter eines natürlichen Regenereignisses sind die kinetische Energie (J), Intensität (mm/h) (Marshall & Palmer, 1948; Gregory, 1973) und die Dauer. Die Wirkung von natürlichem Regen und die Messung der kinetischen Energie (Madden *et al.*, 1998; Pielaat *et al.*, 1998; Lovell *et al.*, 2002) wurde bisher in der Erosionsforschung (Wischmeier & Smith, 1958) und bei der Verbreitung von

Pilzsporen über das Spritzwasser erforscht. Spritzwasserverbreitung (vgl. 1.4.1) ist der Verbreitungsmechanismus vieler bedeutender phytopathogener Pilze (Fitt *et al.*, 1989; Madden, 1992) und wurde mit Hilfe von Regengeneratoren und Falltürmen eingehend studiert (Fitt *et al.*, 1986; Reynolds *et al.*, 1987; Lovell *et al.*, 2002). Regen besteht aus Regentropfen unterschiedlicher Größe (Marshall & Palmer, 1948; Pruppacher & Klett, 1980). Regentropfen, die am Boden ankommen, haben Durchmesser zwischen 0,2 und 5 mm (Madden, 1992) und erreichen Fallgeschwindigkeiten von bis zu 9 m/s (Gunn & Kinzer, 1949). Tropfen von über 5 mm Durchmesser werden nicht mehr durch die Oberflächenspannung zusammengehalten und zerfallen auf dem Weg zur Erde in kleine Tropfen (Fitt *et al.*, 1989). Die kinetische Energie (J) eines Wassertropfens ergibt sich nach  $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} m v^2$  aus der Masse  $m$  (kg) und der Geschwindigkeit  $v$  (m/s) des Tropfens. Die Fallgeschwindigkeit eines Wassertropfens wiederum ist abhängig von der Fallhöhe, der Luftreibung und der Tropfengröße. Die maximale Fallgeschwindigkeit ist erreicht, wenn die Gewichtskraft des Tropfens gleich der Luftreibungskraft ist. Ein Tropfen mit 1,5 mm Durchmesser hat bereits nach 1 m Fallstrecke (0,5 s) halbmaximale Geschwindigkeit erreicht. Danach nimmt die Beschleunigung durch starke Luftreibung schnell ab. Zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit sind Fallhöhen von ca. 11 m bei 5 mm Tropfendurchmesser notwendig (Fitt *et al.*, 1986). Für die Berechnung wird der Regentropfen als kugelförmig angenommen. In Wirklichkeit werden die Tropfen jedoch durch die Luftreibung ovalförmig zusammengedrückt.

#### 1.4.3.2 Vorgänge beim Tropfenaufprall

Die Aufnahme der Vorgänge mit hoher Zeitauflösung zeigt beim Tropfeneinschlag auf einen Flüssigkeitsfilm zunächst die Abflachung des Tropfens und die Bildung eines Kraters in der Flüssigkeit. Der Flüssigkeitsfilm der Kraterwände zieht sich durch die Oberflächenspannung zu einzelnen Tropfen zusammen, die sich ablösen (Worthington & Cole, 1897). Die Zahl der wegspritzenden Tröpfchen nimmt mit der kinetischen Energie des einfallenden Wassertropfens und mit abnehmender Dicke des Wasserfilms auf der Zieloberfläche zu (Gregory *et al.*, 1959). Wenn sich die Krone zurückbildet und der Krater kollabiert, wächst in der Kratermitte eine Wassersäule, von der sich wieder ein Tropfen ablöst. Auch dieser sekundäre Tropfen produziert wieder einen Krater beim Zurückfallen. Der Tropfeneinschlag versetzt die Wasseroberfläche in eine periodische Bewegung, eine Welle, die sich fortpflanzt. Die Vorgänge beim Einschlag eines Tropfens auf einer festen Oberfläche wurden ebenfalls untersucht (Rioboo *et al.*, 2002). Hier dehnt sich die Flüssigkeit zunächst aus (**Abb. 3a**) und zieht sich danach wieder zusammen, es entsteht eine Wassersäule und ein Tropfen löst sich wieder von der Oberfläche ab (**Abb. 3b**).



**Abb. 3:** Tropfeneinschlag, Ausbreitung der Flüssigkeit auf einer Oberfläche **(a)** und Bildung einer Flüssigkeitssäule mit Tropfenablösung bei Rückstrom **(b)** (nach Rioboo *et al.*, 2002).

### 1.4.3.3 Messtechnik zur Regenanalyse

Die ältesten und bis heute am häufigsten verwendeten Niederschlagsmessgeräte sind Pluviometer bzw. Pluviografen, die den Niederschlag über einer bestimmten Grundfläche bestimmen. Gebräuchlich ist die Messung mit einer Kippwaage. Eine Schale füllt sich mit Wasser, bis sie ein bestimmtes Gewicht erreicht (z. B. entsprechend 0,1 mm Regen). Dann kippt die Wippe um, wobei sie einen elektrischen Impuls liefert, der an einen Datenlogger abgegeben wird. Mit diesen Messgeräten können Niederschlagsmengen ab 0,1 mm bestimmt werden, sie liefern aber keine Information über die Tropfengrößenverteilung und kinetische Energie. Geschwindigkeit und Größe einzelner Regentropfen können mit einem optischen Distrometer präzise gemessen und aus den Daten kann die kinetische Energie ermittelt werden (Hall & Calder, 1996). Das „Long Ashton Splashmeter“ von Shaw (1987; 1991) ermöglicht die indirekte Bestimmung der kinetischen Energie von Regentropfen, indem die von den Spritzern erreichte Höhe nach dem Tropfeneinschlag gemessen wird. Mit dem „Splashmeter“ können jedoch keine kontinuierlichen Messungen durchgeführt werden, es liefert lediglich einen Einzelwert für ein bestimmtes Zeitintervall. Ein piezoelektrischer Sensor für kinetische Energie von Regentropfen wurde für Untersuchungen zur Spritzwasserverbreitung entwickelt und erlaubt kontinuierliche Messungen der Energie aufprallender Tropfen (Madden *et al.*, 1998). Der Sensor integriert die Energie einzelner Regentropfen und bestimmt so die Energie einer bestimmten Zeitperiode. Mit einem ähnlichen elektronischen „precipitation impact sensor“ von Lovell *et al.* (2002) ist sogar die Bestimmung der kinetischen Energie von Einzeltropfen möglich.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Das wesentliche Ziel war die Erforschung der Ursachen der Ascosporenausschleuderung von *V. inaequalis* in Luft und Wasser hinsichtlich kinetischer Reize und physiologischer Voraussetzungen. Die auslösende Wirkung kinetischer Energien in Form von Wasserströmungen und -tropfen auf den Sporenausstoß sollte qualitativ und quantitativ untersucht und der rein benetzenden Wirkung von Wasser gegenübergestellt werden. Zu diesem Zweck sollten Methoden entwickelt werden, mit denen Präzipitationsformen, Wasserschwingungen und definierte Strömungen des Wassers nachgeahmt bzw. erzeugt werden konnten. Zur Verifizierung der Ergebnisse sollte die umfangreiche Erfassung und Analyse natürlicher Regenereignisse Informationen zu den Parametern kinetische Energie, Wassermenge und Schwingungsereignisse liefern. Eine qualitativ hochwertige Schwingungsanalyse sollte durch die Verwendung unterschiedlicher Mikrofone, digitaler Verarbeitungstechnik und Entwicklung geeigneter Schwingungssensoren erstmals detaillierte Daten über die Frequenz- und Amplitudenzusammensetzung natürlicher Regenereignisse liefern. Die kinetische Energie des Regens sollte durch einen käuflichen Sensor mit automatisierter Datenerfassung registriert und dem zu analysierenden Sporenflugverlauf sowie den Aufzeichnungen von Niederschlagsmengen, Blattnässe, Temperatur und Licht gegenübergestellt werden. Zur Evaluation sollten selbst entwickelte Sensoren für die kinetische Energie exemplarisch zu ausgewählten Zeiten im Freiland eingesetzt werden. Ein weiteres Ziel war die Aufklärung der physiologischen und meteorologischen Bedingungen für die Wirkung der Dunkelhemmung auf den Sporenausstoß. Versuche zur stofflichen Beeinflussung der Sporenausschleuderung sollten allgemeine kritische Störgrößen hinsichtlich einer Förderung oder Hemmung aufzeigen (u.a. pH, Ionenkonzentration, Detergenzien) und spezifische Mechanismen aufklären, die im Zusammenhang mit einer möglichen Signalkaskade und den eingeleiteten zellulären Effekten stehen. Die Existenz substrat- oder fruchtkörpergebundener Hemmstoffe, die möglicherweise nur durch Regen auswaschbar sind, sollte durch die Anwendung wässriger Blattextrakte geprüft werden. Ein anwendungsorientiertes Ziel war es, durch neue grundlegende Erkenntnisse zu den Mechanismen und Voraussetzungen des Ascosporenausstoßes Grundlagen und Ansätze für eine in der Praxis verwendbare Bekämpfungsstrategie zu liefern. Hier ist einerseits eine verbesserte Prognose durch exaktere Terminierung des Sporenflugbeginns und damit der Infektionsperioden anhand kinetischer Energiedaten zu nennen. Zum anderen eröffnen sich gezielte Bekämpfungsmethoden durch definierte Beregnung zur künstlichen Induktion der Sporenausschleuderung in Luft und Wasser mit anschließenden für die Sporen tödlichen Trockenbedingungen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Regensensorik

Zur Regenanalyse wurden zwei Verfahren angewendet. Zum einen wurde die kinetische Energie des Regens bestimmt, zum anderen die Frequenzen der Schwingungen analysiert, die bei einem Tropfeneinschlag entstanden.

#### 2.1.1 Sensoren für kinetische Energie des Regens

##### 2.1.1.1 Sensit V04A



Abb. 4

Zur Messung der kinetischen Energie des Regens wurde ein spezieller Sensor erprobt, der in der Erosionsforschung und für Untersuchungen zur Rolle des Regens bei der Spritzverbreitung verwendet wurde (Madden *et al.*, 1998). Der elektronische Sensor für kinetische Energie des Regens V04A (Sensit Company, Portland, North Dakota, USA) besteht aus einer mit einem piezoelektrischen Kristall gekoppelten Schwingplatte (Durchmesser 50 mm, Dicke 2,54 mm) in einem wasserfesten Gehäuse aus eloxiertem Aluminium (**Abb. 4**). Der Kristall wird durch einschlagende Regentropfen deformiert. Durch diesen Vorgang werden elektrische Ladungen produziert, deren Wert proportional zur kinetischen Energie des Tropfens ist. Die Ladungen werden integriert, bis eine bestimmte Energiemenge erreicht ist. Dann gibt der Sensor einen Impuls an einen Datenlogger ab und fängt von neuem an zu zählen. Es werden keine Einzelereignisse dargestellt, sondern in Abhängigkeit der Zeit erreichte Energiemengen ( $\text{mJ}/\text{cm}^2 \text{ min}$ ). Der Sensor wurde in der Versuchsanlage in die vorhandene Wetterstation integriert (2 m über dem Boden) und mit 12 V Wechselspannung versorgt. Der Sensor wurde gemäß Vorgaben kalibriert und der Nullwert auf 54 mV eingestellt. Die gesammelten Daten wurden fünfminütig an den Datenlogger der Wetterstation übermittelt. Die Auswertung der Daten und der Vergleich mit den gemessenen Niederschlagsmengen, der Lufttemperatur, Windgeschwindigkeiten und den selbst gebauten Sensoren erfolgte grafisch.

##### 2.1.1.2 Lautsprecher-Regensensoren

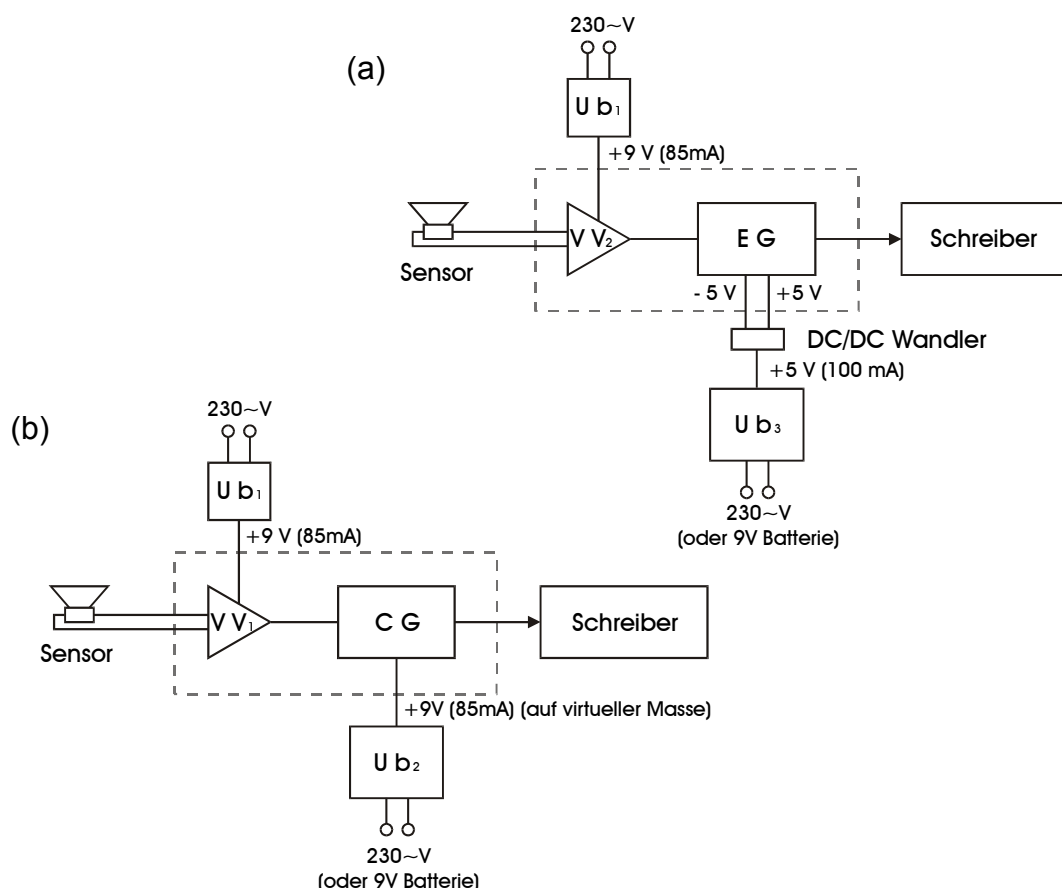
Neben dem käuflich erworbenen Sensor wurden zwei Sensoren für kinetische Energie angefertigt und erprobt. Grundlage dieser Sensoren war jeweils ein Lautsprecher, der zu Schwingungsaufzeichnungen geeignet war (vgl. 2.1.2.1). Einer der beiden Sensoren wurde für den Dauereinsatz im Freiland konzipiert (**Abb. 5**). Um ihn unempfindlich gegen Nässe zu machen, wurde die kegelförmige Membran und



Abb. 5

Kalotte des Lautsprechers MS-55 (Monacor) mit Epoxidharz beschichtetem Papier plan überspannt. Das Harz wurde leicht erhaben modelliert, damit sich kein Wasser auf der Sensoroberfläche ansammeln konnte. Außerdem diente es zur Beschwerung der Membran, so dass nur direkte Tropfentreffer aufgezeichnet wurden. Der Sensor wurde mit Silikon in ein Gehäuse aus PVC-Rohr eingebettet, das 1,5 m über dem Boden befestigt wurde.

Die Sensorabmessung entsprach dem Membrandurchmesser des Lautsprechers (ca. 45 mm). Die Schwingungsereignisse wurden über einen Mikrofon-Vorverstärker (Conrad Electronic, Hirschau) und Gleichrichter (ELV Elektronik AG, Leer) an einen Schreiber (Knauer, Berlin) übertragen (**Abb. 6a**). Der Gleichrichter entfernte negative Schwingungsbereiche und addierte sie zu den positiven Schwingungsabschnitten, damit die Schreiberaufzeichnung nur Ausschläge in positiver Auslenkung lieferte. Die Empfindlichkeit des Schreibers wurde auf Vollausschlag bei 1 V eingestellt, der Papiervorschub zwischen 20 und 50 mm/min.



**Abb. 6:** Elektronik zur Aufzeichnung von Regentropfeneinschlägen. **(a)** Blockschaltbild der Elektronik für die Lautsprecher-Regensensoren. **(b)** Blockschaltbild der Elektronik für den unmodifizierten Lautsprecher MS-55.  $VV_1$ : Universal-Vorverstärker (Conrad);  $VV_2$ : Mikrofon-Vorverstärker (Conrad);  $U_{b1}$ ,  $U_{b2}$ : stabilisiertes Netzteil 9 V, 85 mA (Conrad);  $U_{b3}$ : stabilisiertes Netzteil 5 V, 100 mA (Conrad);  $EG$ : ELV-Gleichrichter;  $CG$ : Conrad-Gleichrichter; DC/DC-Wandler (Conrad).



Zum Vergleich wurde bei jeder Aufzeichnung parallel ein unmodifizierter Lautsprecher MS-55 an den zweiten Schreiberkanal angeschlossen. Er verfügte über eine ähnliche Elektronik aus Universal-Vorverstärker (Conrad) und Gleichrichter (Conrad) (**Abb. 6b**). Die Stromversorgung erfolgte über eine 9 V Blockbatterie oder über die Netzspannung. Je ein stabilisiertes Netzteil (Conrad) mit 9 V Ausgangsspannung und maximal 85 mA Ausgangsstrom war den beiden Vorverstärkern und dem Gleichrichter von Conrad zur Spannungskonvertierung vorgeschaltet. Der Gleichrichter von ELV benötigte ein 5 V, 100 mA Netzteil (Conrad) und einen DC/DC Wandler (Conrad) (**Abb. 6a, b**). Zu Schaltplänen und technischen Daten der Elektronikbausteine vgl. 7.1.



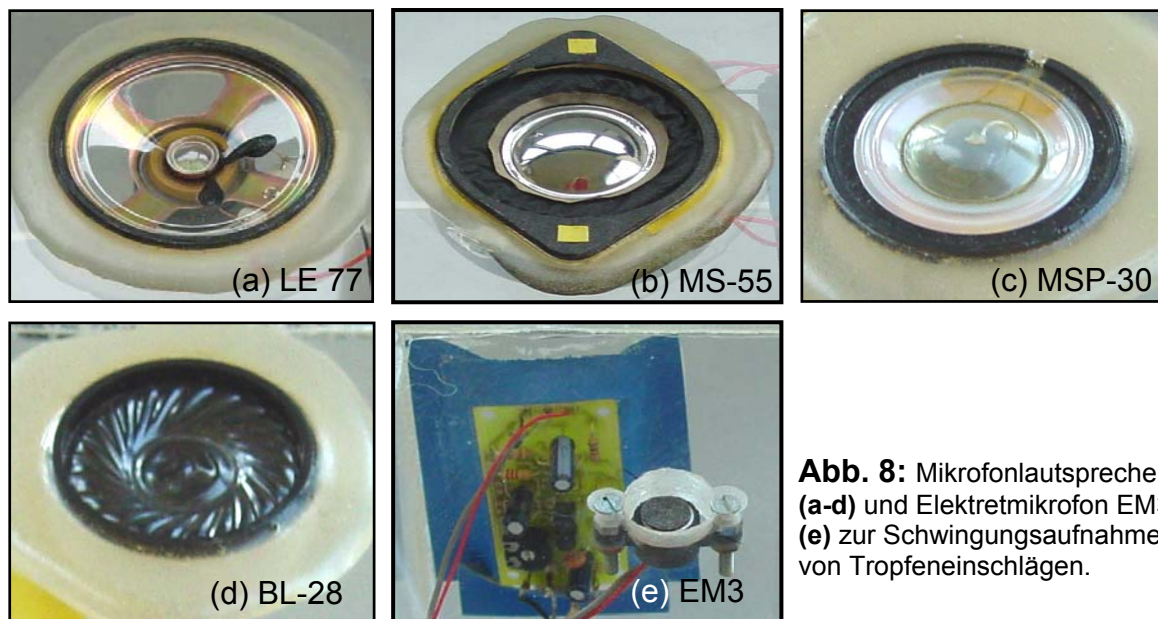
Im Zusammenhang mit Experimenten zum Sporenausstoß bei Regenbenetzung (vgl. 2.5.3.2.1) wurde ein einfacher Regensensor in Form eines Lautsprecherchassis verwendet, um den gefallenen Regen mit einem Schreiber aufzuzeichnen. Die Papiermembran (92 mm Durchmesser) des Lautsprechers wurde durch eine reißfeste Plastikfolie vor Wassereintritt geschützt (**Abb. 7**). Das Lautsprecherchassis wurde an einem Stativ in etwa 70 cm Höhe über dem Boden befestigt. Für die Schwingungsaufzeichnungen wurde die selbe Elektronik wie für den dauerhaften Sensor eingesetzt (**Abb. 6a**). Der Versuchsaufbau war in unmittelbarer Nähe der Wetterstation im Versuchsfeld positioniert. Die Schreiberdaten wurden durch die Niederschlagsdaten der Wetterstation und gleichzeitige Beobachtung verifiziert.

## 2.1.2 Aufzeichnung von Schwingungsimpulsen mit Mikrofonen und Lautsprechern

### 2.1.2.1 Lautsprecher- und Mikrofontypen

Es wurden vier Lautsprecher- und zwei Mikrofontypen zur Schwingungsaufzeichnung im Labor und Freiland eingesetzt (**Tab. 1**). Das Elektretmikrofon EM3 (**Abb. 8e**) war an einen Vorverstärker angeschlossen, der über eine 9 Volt Blockbatterie versorgt wurde (vgl. 7.1, **Abb. 7.4**). Das Kondensatormikrofon C 2000 B war ein hochwertiges Studiomikrofon mit geringem Eigenrauschen und hoher Empfindlichkeit. Die vier Lautsprecher (**Abb. 8a-d**) verfügten über Membranen mit geringer Masse und waren dadurch als Mikrofone einsetzbar (Mikrofonlautsprecher). Alle Lautsprecher und Mikrofone wurden in Gehäuse aus 6 mm dickem Plexiglas eingebaut. Lautsprecher LE 77, MSP-30 und BL-28 waren durch ihre Kunststoffmembran wasserfest. Die Membran von Lautsprecher MS-55 wurde mit einer doppelten Schicht dünner Haushalts-Plastikfolie abgedeckt. Die Mikrofone EM3 und C 2000 B wurden dicht unter einer Kreisöffnung (17 bzw. 69 mm Durchmesser) platziert. Über die Öffnung

wurde Folie (s.o.) gespannt. Alle Kästen wurden mit schalldämpfender Baumwollwatte ausgefüllt.



**Abb. 8:** Mikrofonlautsprecher (a-d) und Elektretmikrofon EM3 (e) zur Schwingungsaufnahme von Tropfeneinschlägen.

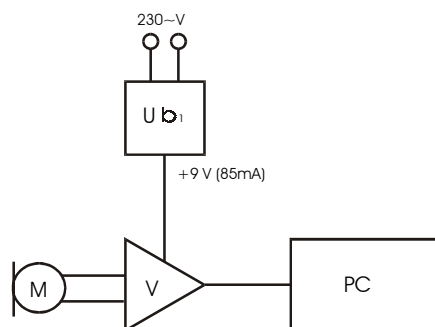
**Tabelle 1:** Eigenschaften und technische Daten der zur Schwingungsaufnahme verwendeten Mikrofone und Lautsprecher (-- = unbekannt).

Bezeichnung (Hersteller)	C 2000 B (AKG Acoustics, München)	EM3 (Conrad)	LE 77 --	MS-55 (Monacor)	MSP-30 (Monacor)	BL-28 --
Typ	Kondensator- mikrofon	Elektret- mikrofon mit Vorverstär- ker	Mikrofon- lautsprecher, Kunststoff- membran	Mikrofon- lautsprecher, Papier- membran, Kunststoff- kalotte	Mikrofon- lautsprecher, PVC- Membran	Mikrofon- lautsprecher, Kunststoff- membran
Zweck	Studio Aufnahme- mikrofon	Mehrzweck- mikrofon		Tonsignale, Außenlautsprecher (Bsp. Gegensprechanlagen)		
Frequenz- bereich [Hz]	20 - 20000	10 - 40000	--	200 - 20000	200 - 20000	--
Impedanz [ $\Omega$ ]	< 200	--	45	8	32	8
Durchmesser/ Einbautiefe [mm]	53 / 159	11	70 / 20	45 / 30	30 / 11	27 / 5

### 2.1.2.2 Aufnahme von Tropfeneinschlägen

Wassertropfen für Laboraufzeichnungen wurden aus 50-100 cm Höhe aus 1,5 ml Transferpipetten (Sarstedt) auf die Membranen getropft. Das Volumen eines Tropfens wurde bestimmt durch auffangen und wiegen von zehn Tropfen. Der

Tropfendurchmesser wurde aus dem Volumen des als kugelförmig angenommenen Tropfens berechnet. Der Durchmesser der Wassertropfen betrug ca. 4 mm. Fallende Wassertropfen lösten bei den Mikrofonlautsprechern einen Impuls der Membran aus, der durch die Schwingspule in ein elektrisches Signal umgewandelt wurde. Das Kondensatormikrofon und das Elektretmikrofon übertrugen den Luftschall des Tropfenaufpralls. Ein Universal-Vorverstärker (Conrad) oder ein Mikrofon-Vorverstärker (Conrad) konnten fakultativ an die Mikrofonlautsprecher in einer Peripherieschaltung vorgeschaltet werden, um die eingehenden Signalspannungen zu verstärken (**Abb. 9**).



**Abb. 9:** Peripherieschaltung zur Schwingungsaufzeichnung mit Mikrofonlautsprechern im Labor. V: Vorverstärker; M: Mikrofonlautsprecher;  $U_{b1}$ : stabilisiertes Netzteil 9 V, 85 mA; PC: digitales Aufnahmesystem.

Zur digitalen Aufzeichnung der Schwingungen wurde das Aufnahmesystem SoundTrack Audio DSP 2000 (Hoontech, Puchon, Korea) verwendet. Es besteht aus einem externen 24 bit/96 kHz 8-Kanal Analog/Digital- und Digital/Analog Wandler (ADC & DAC 2000) und einer Soundkarte (SoundTrack Audio DSP 24). Alle Aufzeichnungen wurden mit einer Sample Rate 44100 und 32 bit Auflösung vorgenommen. Die analogen Eingänge verfügten über separate Vorverstärker. Die Eingangsempfindlichkeit beider Eingänge wurde unabhängig voneinander manuell geregelt (-12 dB bis + 40 dB) und an die Empfindlichkeit des jeweiligen Systems sowie die Aufnahmebedingungen angepasst. Fakultativ konnte eine 48 V Phantomspeisung zugeschaltet werden, die für die Versorgung des Kondensatormikrofons notwendig war.

Neben der direkten Messung der Impulse wurden die Membranen und Mikrofone mit überwinterten Apfelblättern abgedeckt, um den Einfluss der Blattmasse sowie der möglichen materialbedingten Dämpfungseigenschaften festzustellen. Trockene Apfelblatthälften ohne Mittelrippe wurden locker auf die Lautsprechermembranen gelegt und an einem Punkt mit Haftfilm fixiert. Für das Kondensatormikrofon C 2000 B wurde eine Befestigung aus plastischer Kittmasse verwendet. Auf die über die Öffnung gespannte Folienschicht wurden im Abstand von 1,5 cm dünne Kittstränge gelegt und die Blätter (Trockengewicht 71 mg; nass 194 mg) darauf leicht angedrückt. Über die Blattschicht wurden im rechten Winkel zu den unteren wieder Kittstränge im Abstand von 1,5 cm aufgelegt (insgesamt 571 mg Kitt). Über der Öffnung des Mikrofons EM3 (Durchmesser 16 mm) wurden zwei Blatthälften (Trockengewicht 130 mg; nass 200 mg) mit einem Kittstrang (220 mg) befestigt.

### 2.1.2.3 Analyse der Schwingungen

Die aufgezeichneten Schwingungen wurden mit dem Audioprogramm Cool Edit Pro 1.2 (Syntrillium Software Corporation, Phoenix, Arizona, USA) analysiert. Durch beliebige Streckung der Zeitachse wurden einzelne Tropfentreffer vergrößert und die Schwingungen analysiert. Frequenzanalysen der Schwingungskurven wurden nach Blackman-Harris (Fourier-Analyse) durchgeführt und die jeweils vorherrschende Frequenz wurde angegeben als Mittelwert (MW) aus zehn Tropfeneinschlägen  $\pm$  Standardabweichung (SD), berechnet mit der Formel (1).

$$SD = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \quad (1)$$

Für die grafische Auswertung der Schwingungen wurden jeweils fünf bis zehn Schwingungskurven einzelner Tropfeneinschläge vergrößert und als digitales Bild gespeichert. Die so erhaltenen Bilder wurden in Adobe Photoshop 5.0 bearbeitet, um die einzelnen Kurven grafisch überlagern zu können.

Die Schwingungszusammensetzung wurde mit Filtern überprüft, die nur einen definierten Frequenzbereich passieren lassen. Tiefpassfilter mit der Grenze 1000 Hz entfernten alle Frequenzen oberhalb 1000 Hz aus dem Frequenzspektrum. Eventuell aufgezeichnete Hintergrundgeräusche konnten durch einen speziellen Filter (noise reduction) eliminiert werden. Amplituden der Schwingungen wurden auf einer normalisierten Skala zwischen  $-1$  bis  $+1$  angegeben.

### 2.1.2.4 Membranersatz durch einen natürlichen oder künstlichen Schwingungsaufnehmer

Das Aufzeichnungsverhalten des Lautsprechers LE 77 wurde auch ohne Membran analysiert. Hierzu wurde die Kunststoffmembran entfernt und ein trockenes überwintertes Apfelblatt mit Kittmasse direkt auf der Schwingspule befestigt. Das Schwingungsverhalten des trockenen Blattes wurde mit verschiedenen Flüssigkeiten getestet (Ethanol, dickflüssiges Paraffinöl, Glycerin, Wasser, 5 M NaCl). Das Tropfengewicht und der Tropfendurchmesser für jede Flüssigkeit wurden wie oben bestimmt. Ferner wurde das Schwingungsverhalten des benetzten Blattes mit dem trockenen Blatt verglichen. Alle Flüssigkeiten wurden aus 50 cm Fallhöhe mit 1,5 ml Transferpipetten (Sarstedt) auf das Blatt getropft. Anstelle des Blattes wurde außerdem ein Deckglas verwendet.

### 2.1.3 Schalldruckpegelmessung

Das digitale Schallpegelmessgerät AZ 8922 (ELV) wurde zur Schalldruckpegelmessung bei Beschallungsversuchen (vgl. 2.4.3.2) eingesetzt. Der

Messbereich des Gerätes reichte von 30 - 130 dB und konnte in fünf Teilbereiche abgegrenzt werden, um die Sensibilität zu steigern. Die Messwerte wurden nach der Frequenzkurve C bewertet, die einen geradlinigen Frequenzgang mit der Hauptbewertung zwischen 32 Hz und 8 kHz darstellt. Der Maximalwert einer Messung konnte gespeichert und angezeigt werden. Zur Schalldruckpegelmessung des Regens wurde das Schallpegelmessgerät in einen Plexiglaskasten eingepasst, so dass der Messfühler gerade unterhalb einer ausgeschnittenen Öffnung lag, die mit Folie (s.o.) überspannt wurde. Auf diese Folie konnten zusätzlich überwinterte und getrocknete Blattspreiten gelegt und mit einer zweiten Folienschicht fixiert werden. Die Daten des Gerätes wurden mit einem Schreiber (Knauer) aufgezeichnet. Die Empfindlichkeit des Schreibers wurde auf Vollausschlag bei 5 V eingestellt (1 V entsprach 100 dB (C)), der Papiervorschub auf 10 mm/min.

## **2.2 Blattproben**

### **2.2.1 Überwinterung**

Zur Bestimmung der Ascosporenproduktivität (Ascosporenpotential) während der beiden Primärsaisonen 2001 und 2002 mit der Wasserbadmethode (vgl. 2.4.1) wurden im Herbst 2000 und 2001 verschorfte Apfelblätter, im Wesentlichen der Sorten 'Golden Delicious' und 'Jonagold', vor dem Blattfall (etwa zweite Oktoberhälfte) gesammelt und in 55 x 30 x 7 cm großen Wannen am Boden der Apfelanlage überwintert, abgedeckt mit einem Drahtgitter. Der Boden dieser Wannen war mit Drainagerinnen versehen, zusätzlich wurden Drainage-Öffnungen gebohrt (4 mm Durchmesser). Auf die gleiche Art wurden verschorfte Blätter für die Versuche zum Ascosporenausstoß überwintert. Die Wannen standen im ersten Versuchswinter (2000/2001) direkt auf dem Grasboden. Um Wurmfraß zu vermeiden, wurden die Wannen im Winter 2001/2002 auf ein engmaschiges Saranetz gestellt.

### **2.2.2 Ascosporennachreifung und Langzeitaufbewahrung**

#### **2.2.2.1 Primärsaison 2001**

Die Zeitpunkte der Entnahme von Blättern für die Langzeitlagerung wurden anhand der Ergebnisse aus der Wasserbadmethode (vgl. 2.4.1) ermittelt. Die überwinterten verschorften Apfelblätter wurden in der Primärsaison 2001 an vier Terminen (A: 28. März; B: 4. April; C: 20. April und D: 3. Mai 2001) aus dem Freiland entnommen. Um den Reifungsgrad der Pseudothecien aus Charge A und B weiter zu erhöhen, wurden drei verschiedene Lagerbedingungen getestet:

- bei natürlichen Frühjahrstemperaturen im überdachten Freiland
- bei 20°C, 50 % rF (Tag 1-11) bzw. bei 20°C, 80 % rF (Tag 12-26)
- bei 4°C

Vor der Inkubation wurden die getrockneten Blätter von Stielen und Mittelrippen befreit und in ca. 10 x 10 mm große Stücke gebrochen. Je 1 g der Blattstücke wurde in eine Petrischale mit Belüftungsnocken (Greiner) eingewogen und in den Deckel wurde ein doppellagiges, mit Reinstwasser (im Folgenden als Wasser bezeichnet) befeuchtetes Filterpapier (Durchmesser 55 mm) geklebt (Schleicher und Schuell, Dassel), um die Pseudothecien mit Feuchtigkeit zu versorgen. Die Filterpapiere wurden nach 11 Tagen erneut befeuchtet. Die Entwicklung der Ascosporenreife wurde durch die Wasserbadmethode (vgl. 2.4.1) überprüft. Nach 26 Tagen wurde ein Teil der Blätter zur Langzeitaufbewahrung trocken bei 4°C gelagert, der andere wurde bei -20°C eingefroren. Die Blätter der Charge C, die am 20.4.01 entnommen worden war, wiesen ein hohes Sporenpotential auf (1734/cm<sup>2</sup>), sie wurden sofort getrocknet, w. o. zerkleinert und aliquotiert und bei 4°C gelagert. Je 10 1g-Aliquote der Charge C wurden bei -20°C bzw. -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde ein Blattaliquot zunächst in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml Wasser für 1 h ohne Bewegung inkubiert und anschließend in frischem Wasser für 1 h bei 100 U/min geschüttelt, die Proben wurden wie unter 2.4.1 quantifiziert. Die Blätter der Charge D wurden zunächst acht Tage bei 20°C im Laborgewächshaus unter Folie inkubiert und alle zwei Tage für 1 h mit dem Ultraschall Luftbefeuchter (vgl. 2.5.1.2) benetzt. Anschließend wurden die Blätter für weitere 14 Tage bei 20°C und 80 % rF im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.2.2 Primärsaison 2002

In der Primärsaison 2002 wurden die überwinterten Apfelblätter ebenfalls an vier Terminen aus dem Freiland entnommen (Charge A-D; **Tab. 2**). Die Blätter wurden getrocknet und zerkleinert. Zur weiteren Pseudothecienreife wurden die Blattstückchen überdacht im Freiland gelagert und wiederholt mit feinem Sprühnebel befeuchtet (**Tab. 2**). Dabei wurde nur so viel Wasser appliziert, bis sich die Blätter feucht anfühlten ohne zu glänzen. Nach 7 bis 17 Inkubationstagen wurde das Ascosporenpotential mit der Wasserbadmethode (vgl. 2.4.1) überprüft und die Blattstückchen aliquotiert. Blätter der Charge A und B wurden bei -20°C eingefroren oder bei natürlichem Tag-Nacht-Wechsel im Freiland bzw. in einem der beiden Inkubatoren mit künstlichem Tag-Nacht-Wechsel gelagert (vgl. 2.2.3). Die Chargen C und D wurden nach der Reifungsphase bei -20°C eingefroren.

**Tabelle 2:** Inkubation im überdachten Freiland mit wiederholter Sprühbenetzung zur Förderung der Ascosporenreife von überwinterten Apfelblättern während der Primärsaison 2002.

Charge (Datum der Entnahme)	Inkubation [Tage]	Sprühbenetzung am Inkubationstag
A (25.3.02)	17	2; 9; 14; 15
B (8.4.02)	7	1; 2
C (10.4.02)	7	1; 2; 3; 5
D (15.4.02)	10	7

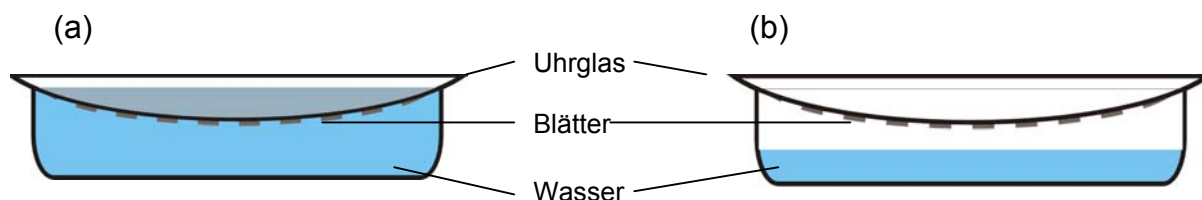
### 2.2.3 Lichtphasen-Inkubation

Für Versuche zum Sporenausstoß bei Dunkelheit wurden überwinterte trockene Blätter zum Zeitpunkt optimaler Sporenreife in zwei Inkubatoren (Ehret, Emmendingen) bei Wechsellicht-Rhythmus (14 h Licht/10 h Dunkelheit) gelagert. Im Inkubator 1 wurden die Blätter von 5:30-19:30 mit Tageslichtspektrum beleuchtet, im Inkubator 2 von 18:00-8:00. Tagtemperatur in beiden Inkubatoren war 17°C, Nachttemperatur 5°C. Die rF war konstant bei 50 %. Die geringe Luftfeuchtigkeit sollte die weitere Reifung der Pseudothecien verlangsamen und das Wachstum von Mikroorganismen verringern. Blätter im normalen Tag-Nacht-Rhythmus wurden zu Beginn der Lichtphase entnommen und für Kontrollversuche bei Licht eingesetzt. Die Blätter mit invertiertem Tag-Nacht-Rhythmus wurden kurz vor Beginn der Dunkelphase entnommen und für 4 h verdunkelt, so dass der Versuchsbeginn in der Mitte der Dunkelphase lag.

### 2.2.4 Konditionierung

Wenn nicht anders beschrieben, wurden überwinterte Blätter trocken aufbewahrt und erst kurz vor Versuchsbeginn benetzt. Für eine Konditionierung wurden Blätter am Vorabend durch Tauchen befeuchtet und über Nacht inkubiert.

- 700 mg Blattproben wurden auf der erhabenen Seite eines Uhrglases (Durchmesser 9 cm; Fläche 63,6 cm<sup>2</sup>) mit doppelseitigem Haftfilm (Tesa Fotostrip) befestigt.
- Das Uhrglas wurde mit der Blattseite nach unten auf eine mit 53 ml Wasser knapp randvoll gefüllte Petrischale (Durchmesser 9 cm) gesetzt (**Abb. 10a**). Die Tauchzeit betrug 10 min. In einer zweiten Petrischale wurden inzwischen 5 ml Wasser mit zwei Tropfen Extran (alkalifreies Detergenz; Merck) gemischt, um einen dünnen Wasserfilm zu erhalten.
- Anschließend wurden die Blätter ü. N. (14-16 h) bei RT und Dunkelheit bei Kammersättigung inkubiert (**Abb. 10b**). Der Wasserfilm wurde am Morgen auf Sporen untersucht.



**Abb. 10:** Konditionierung. (a) Tauchmethode zur Benetzung von Apfelblättern auf einem Uhrglas. (b) Inkubation der benetzten Apfelblätter über einem Wasserfilm.

Durch die hohe Luftfeuchtigkeit waren die Blätter 14-16 h nach der Behandlung noch vollständig mit Wasser vollgesogen. Sie wurden auf dem Uhrglas belassen und in

Versuchen zum Sporenausstoß in Luft- und Wasserkompartimente (vgl. 2.5.2; 2.5.3.2) und in der Wasserbadmethode (vgl. 2.4.1) eingesetzt, für die das Uhrglas mit 100 ml Wasser in einem 1000 ml Becherglas geschüttelt wurde.

## 2.3 Bestimmung der Ascosporenflugperioden im Freiland

Zwei volumetrische Sporenfallen (Burkard, Rickmansworth, England) wurden während der Primärsaisonen 2001 und 2002 in der Versuchsanlage positioniert, um den Verlauf des Sporenfluges aufzuzeichnen. Die Ansaugöffnung war ca. 1,5 m über dem Boden und ca. 10 cm über einem Blattdepot (32 x 24 x 5 cm), das zur Verstärkung des Sporenfluges diente. Eine elektrische Pumpe, die mit 230 V Wechselspannung versorgt wurde, erzeugte einen Saugstrom von 10 l/min. Die Sporen wurden auf ein mit Vaseline bestrichenes Melinex-Band geblasen, das auf einem Zylinder befestigt war. Der Zylinder rotierte einmal in sieben Tagen. Das Sporenband wurde quer zur Laufrichtung in 2 mm Abschnitte eingeteilt (1 h) und mikroskopisch bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet, wobei jeweils 1/4 des Sporenbands ausgezählt wurde (Kohl, 1993). Die Sporenflugtage wurden einzeln bewertet und der Sporenflug dem gemessenen Niederschlag und den Blattnässe- und Temperaturdaten gegenübergestellt. Blattnässe und Temperatur wurden mit dem Schorfwarngerät HP 100 (Lufft, Fellbach) gemessen und als Stundendurchschnittswerte angegeben. Tage ohne Sporenflug wurden auf Tauperioden untersucht, die als mehrstündige Blattnässeanzeige ohne messbaren Regen bei Tageslicht definiert wurden. Sporenflugtage mit Maximalwerten über 10 Sporen/h oder mit Gesamtsporenzahlen von 20 oder mehr in 24 h wurden bewertet. Sporenflug in der Nacht wurde ungeachtet der Sporenmenge bewertet. Der Sporenflugbeginn wurde definiert als der Zeitpunkt, an dem 1/3 der maximalen Sporenzahl/h des jeweiligen Tages erreicht wurde.

## 2.4 Erzeugung von Wasserströmungen

### 2.4.1 Wasserbadmethode

Die potentielle Ascosporenfreisetzung von *V. inaequalis* während der Primärsaisonen 2001 und 2002 wurde mit der von Kollar (1998a, b; 2000) beschriebenen Wasserbadmethode bestimmt.

- Einmal wöchentlich während der Sporenflugsaison wurde von den im Freiland überwinterten und gelagerten Blättern ein Aliquot entnommen und ü. N. im Labor getrocknet.
- Die getrockneten Blätter wurden von Stielen und Mittelrippen befreit, die Blattspreiten wurden in etwa 1 cm große Stücke gebrochen.
- 1 g Blattstücke wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben.



- 50 ml Wasser wurden langsam dazugegossen.
- Die Blätter wurden durch einmaliges kräftiges Schwenken benetzt und auf einem Kreisschüttler bei ca. 100 U/m für 1 h bei RT und Tageslicht bzw. Laborlicht geschwenkt.
- Unmittelbar danach wurde ein Aliquot entnommen und in eine Planktonkammer nach Kolkwitz gefüllt (0,5 ml, Hydro-Bios, Kiel). Die Sporen sanken während 10 min in das 1 x 1 mm große Raster. 30 Quadrate wurden gezählt.
- Die Sporenzahl wurde aus dem Kammervolumen und dem Probenvolumen berechnet nach:  $\text{Sporenzahl} = \text{Zahl/Quadrat} \times 769,2 \times \text{Probenvolumen}$ . Bei der Bestimmung des Ascosporenpotentials von Blättern wurde die Gesamtsporenmenge auf die Blattfläche bezogen (1 g entspricht 92,2 cm<sup>2</sup>) und als Sporen/cm<sup>2</sup> angegeben.
- An jedem Termin wurden Doppelansätze durchgeführt und die Werte gemittelt.

In der Primärsaison 2002 wurde an jedem Termin ein Doppelansatz zusätzlich mit der Wasserbadmethode über 20 h behandelt. Während der ersten Versuchsstunde wurde nach 30 und 60 min die Badflüssigkeit gewechselt, während der vier folgenden Stunden jeweils nach 60 min. Die Proben wurden ü. N. bei Laborlicht für weitere 15 h geschwenkt. Die Proben wurden wie beschrieben quantifiziert, die einzelnen Proben addiert und als Gesamtpotential (GP = 100 %) definiert, die Teilmengen jedes Probenintervalls wurden in Prozent des GP angegeben, die Werte jedes Doppelansatzes wurden gemittelt. Die Ergebnisse aus den drei frühen Terminen, den acht Terminen der Hauptsporensaison und den drei späten Terminen wurden jeweils gemittelt.

#### **2.4.1.1 Variation der Schwenkfrequenz**

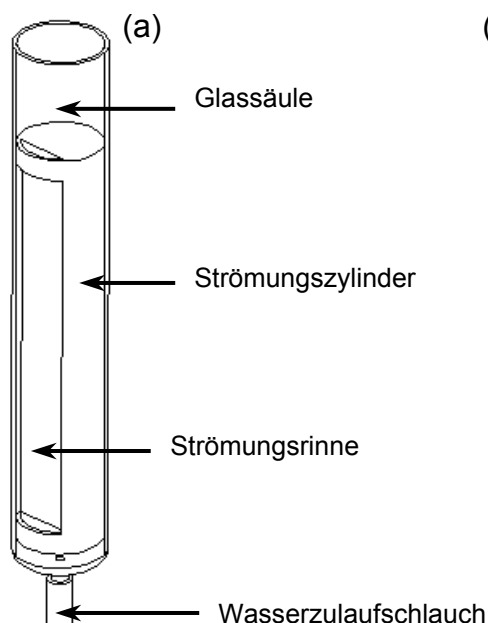
Neben der Standard-Schwenkfrequenz 100 U/min (1,6 Hz) wurden die Frequenzen 30, 70, 130, 170 und 270 U/min (0,5; 1,1; 2,2; 2,8 und 4,5 Hz) verwendet. Die Versuchsdurchführung entsprach der o.g. Methode mit einigen Modifikationen:

- 40 ml Wasser auf 1 g Blattproben wurden mit einer Spritze (20 ml) unter Vermeidung von Verwirbelung in den Erlenmeyerkolben eingefüllt.
- Die Kolben wurden 5 h mit der jeweiligen Frequenz geschüttelt.
- In der ersten Stunde wurde nach 30 und 60 min die Badflüssigkeit erneuert (Spritze), in jeder weiteren Stunde nach 60 min.
- Nach 5 h wurden die Kolben für weitere 60 min bei der Standard-Frequenz 100 U/min geschwenkt.
- Quantifizierung wie unter 2.4.1. Einzelproben wurden in Prozent des GP angegeben. MW und SD aus drei Ansätzen wurden berechnet.

In den gleichen Zeitabständen wurde die Badflüssigkeit einer ungeschüttelten Kontrolle gewechselt. Die Negativkontrolle wurde nach 5 h ebenfalls 1 h bei 100 U/min geschwenkt um das GP festzustellen.

## 2.4.2 Strömungskanal

Ein Strömungskanal wurde aus einer Glassäule (25 mm Durchmesser) angefertigt. In den Strömungskanal wurde ein Zylinder aus Plastik (Länge 135 mm, Durchmesser 24 mm) eingeführt (**Abb. 11a**). Die eigentliche Strömungsfläche (100 x 13 mm) war ca. 2 mm in den Zylinder eingesenkt und an beiden Enden angeschrägt, um Turbulenzen zu vermeiden (**Abb. 11b**). In dieser Rinne wurden die überwinterten Apfelblätter befestigt. Wasser konnte nur durch die Strömungsrinne fließen. Der Grundaufbau wurde sowohl für Versuche mit linearer als auch oszillierender Strömung verwendet.



**Abb. 11:** (a) Strömungskanal, Schemazeichnung. (b) Strömungszylinder, Blätter in der Strömungsrinne mit doppelseitigem Haftfilm befestigt.

### 2.4.2.1 Lineare Strömung

Der Wasserzulauf (**Abb. 11a**) wurde an eine Chromatographiepumpe (P-500, Pharmacia) angeschlossen, die Fließraten zwischen 10 und 480 ml/h erzeugen konnte. Die Strömungsgeschwindigkeit in der mit Blättern beklebten Strömungsrinne für jede Fließrate wurde bestimmt, indem die benötigte Zeit für eine 100 mm lange Strecke ermittelt wurde (**Tab. 3**).

**Tabelle 3:** Lineare Strömung: Fließraten und zugehörige Strömungsgeschwindigkeiten.

Fließrate [ml/h]	Strömungsgeschwindigkeit [mm/s]
10	0,07
30	0,23
60	0,46
120	0,9
240	1,8
480	3,6

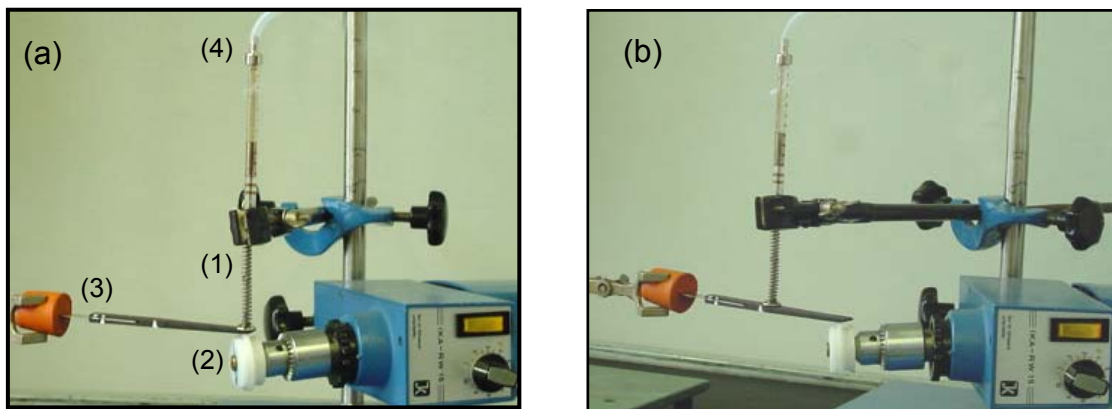
- 150 mg Blattproben wurden mit doppelseitigem Haftfilm in der Strömungsrinne des Zylinders befestigt, so dass die angeschliffenen Enden der Rinne ausgespart blieben. Als Unterlage für den Haftfilm diente ein Streifen selbstklebendes Gewebeband.
- Der Zylinder wurde senkrecht in den Strömungskanal geschoben und dieser mit einem geeigneten Adapter mit Auslassschlauch verschlossen.
- Der Strömungskanal wurde mit der Fließrate 10 ml/h ohne Luftblasenbildung geflutet, bis das Wasser am Ende des Auslassschlauches stand. Dann wurde der Fluss gestoppt und der Strömungskanal um 180° gedreht, so dass das Wasser in Richtung der Erdanziehung an den fixierten Blättern entlang strömte.
- Die Pumpe wurde mit der gewählten Fließrate gestartet. Die Versuchsdauer betrug 2 h; pro Stunde wurden drei Fraktionen aufgefangen (**Tab. 3**). Quantifizierung wie unter 2.4.1.
- Nach Versuchsende wurde eine Positivkontrolle durchgeführt (vgl. 2.4.2.3).
- Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt, die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Teilwerte wurden in Prozent des GP angegeben.

#### 2.4.2.1.1 Variation der Strömungsgeschwindigkeit

- Die Fließrate wurde während eines Versuches konstant gehalten (bei der Fließrate 10 ml/h wurde nur eine Fraktion pro Stunde gesammelt).
- Die Fließrate wurde während eines Versuches in jedem Intervall um eine Stufe erhöht, von 10 ml/h auf 480 ml/h.
- Die Strömungsgeschwindigkeit wurde während eines Versuches in jedem Intervall um eine Stufe verringert, von 480 ml/h auf 10 ml/h.

### 2.4.2.2 Oszillierende Strömung: Variation der Frequenz und Auslenkung

Ein exzentrischer Rotor wurde für die Erzeugung oszillierender Strömungen genutzt. Tangential zur Exzentrerscheibe war der Metallkolben einer Spritze (Walter Graf GmbH, Wertheim; Durchmesser 1,2; 1; 8 und 5 mm) platziert. Die exzentrische Kreisbewegung des Rotors führte zu einer periodischen Schwingung des mit einer Rückstellfeder versehenen Kolbens, die über den 40 cm langen Wasserzulaufschlauch (**Abb. 12a**) auf die Wassersäule im Strömungskanal übertragen wurde. Das vom Kolben verdrängte Wasservolumen bestimmte die Auslenkung ( $x$ ) des Wasserspiegels im Strömungskanal, d. h. den Abstand zwischen dem höchsten und tiefsten Punkt der Schwingung. Der Kolbenhub konnte minimiert werden durch einen am Rotor ansetzenden Hebel, auf dem der Kolben in zwei verschiedenen Distanzen zum Rotor platziert wurde (**Abb. 12b**).



**Abb. 12:** Apparatur für oszillierende Strömungen. Die mit einer Rückstellfeder (1) versehene Spritze wird durch die Exzentrerscheibe (2) in Schwingung versetzt. Der Kolbenhub kann durch den Hebel (3) variiert werden. Die Spritze ist über den Wasserzulaufschlauch (4) mit dem Strömungskanal verbunden (a) Normalstellung ohne Minimierung der Auslenkung. (b) Spritze auf dem Hebel seitlich versetzt zur Minimierung der Auslenkung.

Der Kolbenhub war variierbar zwischen 0,48 mm und 24 mm. Die Rotorfrequenz war stufenweise regelbar zwischen 3,4 Hz und 17 Hz (**Tab. 4**). Das durch den Kolben verdrängte Volumen wurde mit Hilfe der geeichten Spritzen-Skalierungen bestimmt. Die Auslenkung der Wassersäule wurde wenn möglich gemessen. Aus verdrängtem Volumen und dazugehörigem Kolbenhub wurde eine Eichkurve erstellt, mit der die außerhalb des Messbereichs liegenden Auslenkungen bestimmt wurden. Die Durchschnittsgeschwindigkeit  $v_m$  [mm/s] während einer Periode wurde nach Formel (2) aus der Frequenz  $f$  [Hz] und der Auslenkung  $x$  [mm] berechnet. Die Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  ( $w'$ ) zum Zeitpunkt  $t=0$  der Schwingung wurde nach der Formel (3) berechnet.

$$v_m = 2 \times f \quad [\text{mm/s}] \quad (2)$$

$$v_{max} = w'(t=0) = x \pi f \cos(t - 2 \pi f) = x \pi f \quad [\text{mm/s}] \quad (3)$$

Durch unabhängige Variation von Rotationsfrequenz und Kolbenhub konnten Durchschnittsgeschwindigkeiten zwischen 3 und 816 mm/s erzeugt werden (**Tab. 4a**), die zugehörigen Maximalgeschwindigkeiten sind aus **Tab. 4b** ersichtlich. Aus technischen Gründen wurden Durchschnittsgeschwindigkeiten von 163 mm/s nicht überschritten. Aus dem gegebenen Spektrum wurden die Geschwindigkeiten für die Versuche ausgewählt. Die Durchschnittsgeschwindigkeiten 163 mm/s bzw. 153 mm/s wurden durch die Kombination der Frequenz 3,4 Hz mit 24 mm Auslenkung bzw. 17 Hz mit 4,5 mm Auslenkung erreicht. Drei verschiedene Kombinationen ergaben ca. 90 mm/s (3,4 Hz\13 mm; 5 Hz\9 mm; 10 Hz\4,5 mm), durch jeweils zwei Kombinationen wurden die Strömungsgeschwindigkeiten 60 mm/s (3,4 Hz\9 mm; 6,5 Hz\4,5 mm) bzw. 16 mm/s (8,3 Hz\0,95 mm; 17 Hz\0,48 mm) erzeugt.

**Tabelle 4:** (a) Durchschnittsgeschwindigkeiten und (b) Maximalgeschwindigkeiten [mm/s] der oszillierenden Strömungen im Strömungskanal, durch Kombination von Auslenkung  $x$  und Frequenz  $f$ .

(a)	Auslenkung $x$ [mm]	Frequenz $f$ [Hz]								
		3,4	5	6,5	8,3	10	11,5	13,5	15,5	17
	0,48	3	5	6	8	10	11	13	15	16
	0,95	6	10	12	16	19	22	26	29	32
	4,5	31	45	59	75	90	104	122	140	153
	9	61	90	117	149	180	207	243	279	306
	13	88	130	169	216	260	299	351	403	442
	24	163	240	312	398	480	552	648	744	816

(b)	Auslenkung $x$ [mm]	Frequenz $f$ [Hz]								
		3,4	5	6,5	8,3	10	11,5	13,5	15,5	17
	0,48	5	8	10	13	15	17	20	23	26
	0,95	10	15	19	25	30	34	40	46	51
	4,5	48	71	92	117	141	163	191	219	240
	9	96	141	184	235	283	325	382	438	481
	13	139	204	265	339	408	470	551	633	694
	24	256	377	490	626	754	867	1018	1169	1282

- 150 mg Blattproben wurden wie unter 2.4.2.1 beschrieben in der Strömungsrinne befestigt. Bei hohen Frequenzen ( $>10$  Hz) oder Auslenkungen ( $>9$  mm) wurden zwei dünne Drähte über die Blätter gespannt, um die Blätter zusätzlich zu fixieren. Der Zylinder wurde senkrecht in den Strömungskanal geschoben und mit einem Gewicht beschwert.
- Der Wasserzulaufschlauch in diesem Aufbau war verzweigt. Ein Arm wurde an die Spritze der Rotationsapparatur angeschlossen. Die mit Wasser gefüllte Spritze wurde in die Rotor-Apparatur eingespannt, so dass der Kolben durch den Rotor auf- und nieder bewegt wurde. Die Schläuche und die Spritze

wurden auf Luftblasen überprüft und diese gegebenenfalls entfernt. Der zweite Arm des Wasserzulaufschlauches wurde als Auslass- und Einlassöffnung mit einer Klemme gesichert. Der Strömungskanal wurde durch diesen Arm mit Hilfe einer Spritze mit 10 ml Wasser gefüllt, bis der Zylinder ca. 10 mm hoch bedeckt war. Der Strömungskanal wurde nicht verschlossen und blieb in der ursprünglichen Orientierung.

- Die Strömungsintervalle waren 1, 10, 20 oder 60 min lang. Nach jedem Intervall wurde das Wasser durch frisches ersetzt und die Sporen quantifiziert (vgl. 2.4.1). Die Wasserbewegung zwischen den Strömungsintervallen wurde so langsam wie möglich durchgeführt. Je nach Versuchsvariante wurden Ruhe- und Strömungsintervalle abgewechselt.
- Nach Versuchsende wurde eine Positivkontrolle durchgeführt (vgl. 2.4.2.3). Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt, die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Teilwerte in Prozent des GP angegeben. Als Negativkontrolle diente eine bei gleichen Probenabständen ohne Strömung behandelte Kontrolle.

#### **2.4.2.2.1 Variation des Zeitverlaufs und der Temperatur**

- Versuchsdauer 5 h, jeweils nach 1 h wurde das Wasser erneuert.
- Versuchsdauer 2 h, jeweils nach 20 min wurde das Wasser erneuert.
- Versuchsdauer 3 h, jeweils nach 1 h wurde das Wasser erneuert. In der ersten Stunde wurden die Blätter ohne Strömung inkubiert, in der zweiten und dritten Stunde mit Strömung behandelt. Nach der ersten Strömungsstunde wurde die Wasser- und Lufttemperatur von RT auf 4°C gesenkt oder von 4°C auf RT erhöht (bzw. beibehalten). Versuchsteile bei 4°C wurden im Kühlraum, Versuchsteile bei RT im Labor bei Kunstlicht bzw. Tageslicht durchgeführt.
- Versuchsdauer 1 h, jeweils nach 10 min wurde das Wasser erneuert.
- Versuchsdauer 1 h, vor und nach dem Strömungsintervall (1 oder 10 min) wurde jeweils ein 30-minütiges Ruheintervall gesetzt. Wasserwechsel nach jedem Ruhe- bzw. Strömungsabschnitt.
- Versuchsdurchführung in der Dunkelkammer (vgl. 2.6.2): Versuchsdauer 3 h (s.o.), in der ersten Stunde bei Dunkelheit wurden die Blätter ohne Strömung inkubiert, in der zweiten und dritten Stunde mit Strömung, davon 1 h bei Dunkelheit, gefolgt von 1 h bei Laborlicht bzw. Tageslicht.
- Versuchsdurchführung in der Dunkelkammer: Versuchsdauer 5 h (s.o.), jeweils nach 1 h wurde das Wasser erneuert.

#### **2.4.2.3 Positivkontrollen**

Nach den jeweiligen Versuchen wurde eine Positivkontrolle durchgeführt, um die noch verbliebenen Ascosporen in den Blättern zu erhalten. Die Blätter wurden bei Tageslicht bzw. Laborlicht und RT für 1 h bei 100 U/min geschwenkt. Die während

der abschließenden Behandlung freigesetzten Sporen wurden mit den während des Versuchs erhaltenen Teilwerten zum GP addiert, die Teilwerte jedes Probenintervalls in Prozent des GP angegeben. Für jede Versuchsvariante wurde zusätzlich ein entsprechender Kontrollversuch mit der jeweiligen Schüttelmethode bei 100 U/min und gleichem Zeitverlauf durchgeführt, um den maximal möglichen Sporenausstoß der jeweiligen Versuchsdauer und in den Versuchsintervallen zu erfassen.

- Die Blätter wurden mit der Trägerfolie vom Zylinder abgelöst und im Boden einer Petrischale befestigt.
- In die Petrischale wurden 20 ml Wasser gegeben.
- Schütteln bei 100 U/min für 1 h.
- Quantifizierung vgl. 2.4.1.

## 2.4.3 Beschallung

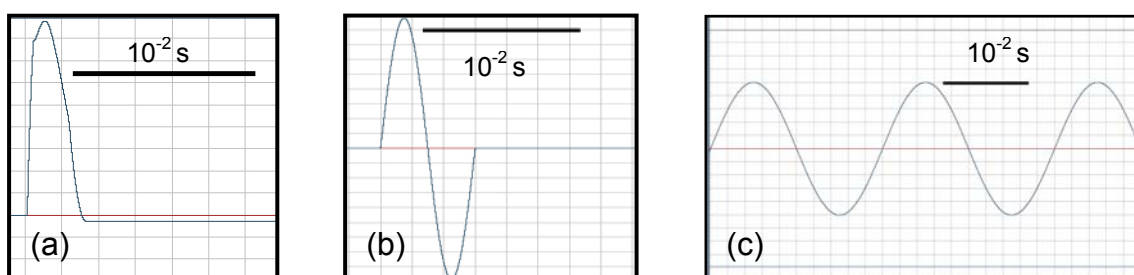
### 2.4.3.1 Schwingungsbibliothek

Schwingungen und Impulse wurden in Cool Edit Pro digital generiert oder aufgenommen. Von allen Schwingungs- und Impulsvarianten wurden jeweils 60 min generiert und auf Audio-CD gebrannt.

#### 2.4.3.1.1 Impulse

Die Impulse eines elektrischen Metronoms wurden über Kabel mit dem digitalen Aufnahmesystem aufgezeichnet. Die auf diesem Weg produzierten Impulse bestanden aus einer unvollständigen Schwingung, das heißt, nach dem ersten Ausschlag folgte der Rückgang in die Ruhelage. Die Schwingungsdauer betrug  $3 \times 10^{-3}$  s (**Abb. 13a**).

Eine einzelne Periode einer Sinusschwingung (166 Hz) wurde digital generiert. Die Schwingungsdauer wurde an den Impuls angepasst und betrug  $6 \times 10^{-3}$  s (**Abb. 13b**). Die Schwingung war aufgrund ihrer Kürze als Impuls wahrnehmbar.

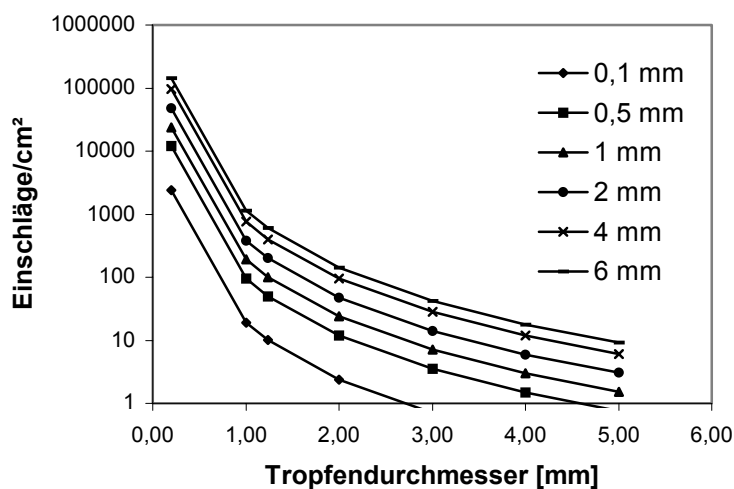


**Abb. 13:** Schwingungsbibliothek. Impulse und Sinusschwingung, in Cool Edit Pro bearbeitet. **(a)** Impuls ohne Ausschwingen. Länge  $3 \times 10^{-3}$  s. **(b)** Sinusimpuls, 166 Hz, Impulslänge  $6 \times 10^{-3}$  s. **(c)** Sinusschwingung 5 Hz.

Bei der Auswahl der Impulsfrequenzen wurde die theoretische Einschlagshäufigkeit von Tropfen auf einer bestimmten Grundfläche bei einer bestimmten Regenintensität zugrunde gelegt (**Abb. 14, Tab. 5**). Impulsfrequenzen zwischen 0,0008 Hz und 10 Hz wurden generiert, das heißt, die Intervalle zwischen den Impulsen waren zwischen 20 min und 0,1 s lang (**Tab. 6**).

**Tabelle 5:** Tropfeneinschläge pro Sekunde auf 1 cm<sup>2</sup> bzw. 36 cm<sup>2</sup> (Grundfläche eines Apfelblattes) bei Niederschlagsintensitäten von 0,1 bis 6 mm/h ; Tropfendurchmesser 1 mm.

Niederschlag [mm/h]	1 cm <sup>2</sup> [Einschläge/s ]	36 cm <sup>2</sup> [Einschläge/s]
0,1	0,005	0,19
0,5	0,03	0,95
1	0,05	1,9
2	0,12	3,8
4	0,2	7,6
6	0,32	11,5



**Abb. 14:** Tropfeneinschläge/cm<sup>2</sup> für 0,1-6 mm Niederschlag und Tropfendurchmesser von 0,2-5 mm.

**Tabelle 6:** Schwingungsbibliothek. Impulsfrequenzen und zugehörige Intervalllängen.

Impulsfrequenz [Hz]	Intervalllänge [s]	Impulsfrequenz [Hz]	Intervalllänge [s]
0,0008	1200	0,2	6
0,002	600	0,5	2
0,003	300	1	1
0,008	120	2	0,5
0,02	60	5	0,2
0,03	30	10	0,1
0,08	12		



### 2.4.3.1.2 Sinusschwingungen

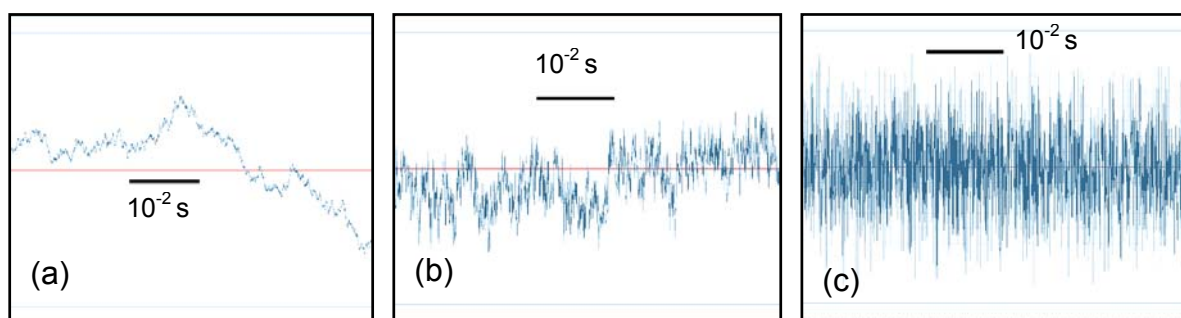
Sinusschwingungen der Frequenzen 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 50, 100, 400, 1000 und 10000 Hz wurden digital generiert (**Abb. 13c**). Neben der Standard-Länge 60 min wurden mit der Frequenz 5 Hz zusätzlich verschiedene Kombinationen aus Beschallungs- und Ruheintervallen unterschiedlicher Länge und Abstände generiert, die auf eine Gesamtlänge von 60 min vervielfacht wurden (**Tab. 7**).

**Tabelle 7:** Beschallungsvarianten mit der Sinusschwingung 5 Hz. Kombinationen aus wiederholten Beschallungs- und Ruheintervallen; Beschallungsdauer bezogen auf 60 min.

Beschallung \ Ruhe [s]	Zyklen in 60 min	Beschallungsdauer [min]
1 \ 59	60 x	1
5 \ 55	60 x	5
10 \ 50	60 x	10
10 \ 590	6 x	1
20 \ 580	6 x	2

### 2.4.3.1.3 Rauschen

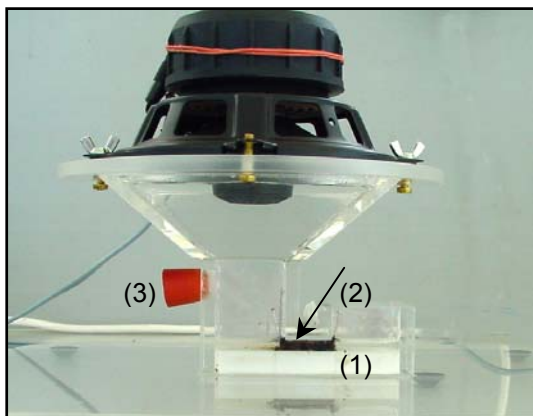
Zufallsgeräusche oder Rauschen wurden digital generiert. Es handelt sich um überlagerte Schwingungen unterschiedlicher Frequenz-Zusammensetzung (**Abb. 15**). Beim Weißen Rauschen sind alle Frequenzen gleich verteilt. Das Rosa Rauschen besitzt ein Frequenzspektrum mit etwas geringerem Anteil hoher Frequenzen und das Braune Rauschen besteht überwiegend aus Niederfrequenzkomponenten.



**Abb. 15:** (a) Braunes Rauschen, (b) Rosa Rauschen, (c) Weißes Rauschen, in Cool Edit Pro generiert.

### 2.4.3.2 Beschallungskammer

Zwei Beschallungskammern wurden entworfen und aus 6 mm dickem Plexiglas angefertigt (**Abb. 16**). Die Beschallungskammer wurde auf eine 300 x 300 mm große Grundplatte aus 15 mm dickem Plexiglas montiert, die auf Gummifüßen vibrationsfrei gelagert war. Die eigentliche Beschallungskammer besaß eine rechteckige Grundfläche von 80 x 30 mm. Die Beschallungskammer war U-förmig mit zwei unterschiedlich hohen Seiten. Die höhere Seite (50 mm) öffnete sich in den Beschallungstrichter, der an seiner weitesten Stelle 100 mm im Durchmesser maß und von einem 35 mm breiten Rand umgeben war. Die kürzere Seite (30 mm) war offen. Der Raum unter der 20 mm langen Brücke war 15 mm hoch und wurde mit Gummiblöckchen auf 5 mm begrenzt. Bei Füllung mit 10 ml Wasser war kein Luftaustausch zwischen den beiden Seiten der Kammeröffnungen möglich. Zwei Polyflex Koaxial Lautsprecher (Typ 130-HC, Focal JM-Lab, Saint-Etienne cedex 2, Frankreich) wurden für die Schwingungsübertragung verwendet. Die Lautsprecher besaßen einen 130 mm Mittel-Tieftöner und einen 25 mm Hochtöner, waren zur Wiedergabe hoher und tiefer Frequenzen geeignet und mit maximal 100 W belastbar. Der lineare Frequenzgang war mit 65 Hz bis 20 kHz angegeben. Der Einbaudurchmesser betrug 115 mm, das Chassis wurde mit vier Flügelschrauben auf dem Schalltrichter montiert. Die Lautsprecher wurden über den Endverstärker T.AMP S-100 (Thomann, Burgebrach) an den CD-Player Technics SL-PG390 (Matsushita Electric, Osaka, Japan) angeschlossen. Die Endstufe verfügte über eine Ausgangsleistung von 2 x 100 W an 4  $\Omega$  bzw. 2 x 65 W an 8  $\Omega$ . Die Pegel beider Ausgänge waren über Potentiometer separat regelbar.



**Abb. 16:** Beschallungskammer mit aufgesetztem Lautsprecher. Gummiblöckchen (1) zur Begrenzung des Kammervolumens. Blätter (2), unter der Brücke fixiert. Ein Gummistopfen (3) verschließt während der Schwingungsübertragung die Öffnung für die Schallpegelmessung.

- Einstellung des Schalldruckpegels vor jedem Versuch ohne Blattprobe: 10 ml Wasser wurden in die Beschallungskammer gefüllt und der Lautsprecher auf dem Schalltrichter montiert. Durch die Messöffnung in der Beschallungskammer wurde der Fühler des Schallpegelmessgerätes (vgl. 2.1.3) geschoben und der gewünschte Pegel für die nachfolgenden Versuche eingestellt (das Wasser wurde danach wieder entfernt).

- 250 mg Blattproben wurden unter die Brücke geschoben und mit zwei kleinen Gittern fixiert.
- Mit einer Spritze wurden 10 ml Wasser langsam in die Beschallungskammer gefüllt.
- Vor die Beschallung konnte fakultativ eine Ruhezeit von bis zu 60 min gesetzt werden, damit die Blätter Wasser aufnehmen und die Ascis quellen konnten. Nach der Ruhezeit wurde die Badflüssigkeit mit einer Spritze langsam abgesaugt und durch frisches Wasser ersetzt. Auf die gleiche Art wurden alle folgenden Probenahmen durchgeführt. Quantifizierung wie unter 2.4.1.
- Die Dauer der Schwingungsübertragung betrug je nach Versuch zwischen 60 min und 1 s, entweder ohne Unterbrechung oder im Wechsel mit Ruhepausen.
- Alle Versuche wurden bei Tageslicht bzw. Laborlicht und RT durchgeführt.
- Nach der Schalldruckbehandlung wurde eine Positivkontrolle durchgeführt (vgl. 2.4.3.3). Als Negativkontrolle diente eine nicht beschallte Probe. Alle Versuche wurden als Doppelansätze durchgeführt und ein- bis zweimal wiederholt, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen wurden in Prozent des GP angegeben.

#### 2.4.3.2.1 Variation der Ruhe- und Beschallungsdauer

- Standardmethode: Versuchsdauer 2 h, jeweils nach 60 min wurde die Badflüssigkeit erneuert. Erste Versuchsstunde ohne Beschallung, zweite Versuchsstunde mit 60 min Schalldruckbehandlung bzw. verschiedene Kombinationen aus Beschallungs- und Ruheintervallen unterschiedlicher Länge und Abstände (**Tab. 7**).
- Versuchsdauer 5 h, jeweils nach 30 min, 60 min und jeder weiteren vollen Stunde wurde die Badflüssigkeit erneuert.
- Versuchsdauer 1 h, jeweils nach 10 min wurde die Badflüssigkeit erneuert. Nur Sinusschwingung mit 5 Hz, 115 dB (C). Verschiedene Kombinationen von Ruheintervallen und Beschallungsintervallen.
- Versuchsdauer 1 h, Wechsel der Badflüssigkeit jeweils nach 1 min und 9 min in sechs Zyklen. Nur Sinusschwingung mit 5 Hz, 115 dB (C). Verschiedene Kombinationen von Ruhe- und Beschallungsintervallen.
- Versuchsdauer 70 min, jeweils nach 30, 40 und 70 min wurde die Badflüssigkeit erneuert. Nur Sinusschwingung mit 5 Hz, 115 dB (C). Verschiedene Abfolgen von Ruhe- und Beschallungsintervallen bei Licht und Dunkelheit (vgl. 2.6.2).

#### 2.4.3.3 Positivkontrollen

Nach den jeweiligen Versuchen wurde eine Positivkontrolle durchgeführt, um die noch verbliebenen Ascosporen in den Blättern zu quantifizieren (vgl. 2.4.2.3).

- Die Blätter wurden mit einer Pinzette aus der Beschallungskammer in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt, in dem sich 10 ml Wasser befanden.
- Schütteln bei 100 U/min für 1 h.
- Quantifizierung vgl. 2.4.1.

## **2.5 Charakterisierung der Sporemission in die Luft- und Wasserkompartimente**

### **2.5.1 Benetzung der Blattproben**

Überwinterte verschorfte Apfelblätter wurden trocken aufbewahrt. Für die Benetzung der Blätter wurden drei verschiedene Methoden verwendet.

#### **2.5.1.1 Tauchen**

Die Tauchmethode entsprach dem unter 2.2.4. beschriebenen Vorgehen. Die Tauchzeit betrug zwischen 30 s und 10 min. Anschließend wurden die Blätter sofort für Versuche zum Sporenausstoß in stiller Luft bzw. in den Luftstrom eingesetzt (vgl. 2.5.2; 2.5.3.2).

#### **2.5.1.2 Nebel**

Mittels eines Ultraschall Luftbefeuchters wurde Wasser in feinste Nebeltröpfchen zerstäubt. Der Luftbefeuchter Nebulon 800 (P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf) besitzt zwei getrennt regelbare Nebelerzeuger mit Ultraschallmembranen. Über ein Schwimmerventil wurde der interne, 0,5 l fassende Wassertank an ein Wasserreservoir angeschlossen. Für die Benetzung der Blätter wurde nur eine der beiden Ultraschallmembranen verwendet. Der Nebel wurde durch den angeschlossenen Flexschlauch (Durchmesser 32 mm, Länge 700 mm oder 350 mm) auf die Blätter gerichtet. Die Nebelerzeugung war stufenlos regelbar bis zu einer Wasservernebelung von 800 ml/h. Auf maximaler Stufe waren die Blätter nach ca. 10 min mit einem Wasserfilm bedeckt. Bei 150-200 ml/h wurden Blätter innerhalb von 45-75 min mit einem Wasserfilm bedeckt.

#### **2.5.1.3 Tropfen und Tröpfchen**

Mit einer handbetriebenen Pumpflasche wurden feine Wassertröpfchen erzeugt. Die Befeuchtung mit der Pumpflasche war für kontinuierliche Befeuchtung nicht geeignet. Daher wurden die Blätter zu Beginn jedes Sammelintervalls besprüht, bis die Blätter mit Wasser bedeckt waren (ca. 5-60 s, in der Regel 30 s). Die Befeuchtung war ausreichend, um die Blätter während eines 30-minütigen Sammelintervalls nass glänzend zu halten.

Tropfen definierter Größe wurden mit einem selbst angefertigten Tropfengenerator erzeugt. Der Tropfausgang aus einer vertikal befestigten Spritzenkanüle mit 0,9 mm Durchmesser (Braun) war über einen Zufuhrschlauch an eine Chromatographiepumpe P-500 (Pharmacia) angeschlossen. Durch Variation der Pumpleistung wurde die Tropfenfrequenz eingestellt. Die Tropfengröße war durch die Kanüle definiert. Der Tropfendurchmesser wurde wie unter 2.1.2.2 bestimmt. Tropfen von etwa 3 mm Durchmesser wurden generiert. Die Niederschlagsintensitäten wurden aus der betropften Fläche (63,6 cm<sup>2</sup>) und der verbrauchten Wassermenge/h berechnet. Niederschlagsintensitäten zwischen 1,6 mm/h (10 Tropfen/min = Tropfenfrequenz 0,18 Hz) und 9,5 mm/h (60 Tropfen/min = Tropfenfrequenz 1 Hz) wurden generiert. Die Fallhöhe der Tropfen war 1 m. Durch eine Tropfbefeuchtung mit 9,5 mm/h waren die Blätter nach 15 min mit einem Wasserfilm bedeckt, bei der Intensität 1,6 mm/h waren die Blätter nach 60 min mit einem Wasserfilm bedeckt.

#### 2.5.1.4 Bestimmung des Benetzungsgrades

Zur Bewertung der Blattnässe wurden unterschiedliche Benetzungsgrade von 1-3 definiert (**Abb. 17**); Stadium 0 wurde als trocken (brüchig) mit heller Oberfläche definiert.



**Benetzungsgrad 1**  
Blätter durchfeuchtet,  
geschmeidig, ohne  
Wasserfilm → dunkel, matt.



**Benetzungsgrad 2**  
Blätter durchfeuchtet,  
geschmeidig, mit dünnem  
Wasserfilm → seidener Glanz.



**Benetzungsgrad 3**  
Blätter durchfeuchtet,  
geschmeidig, mit dickem  
Wasserfilm → nasser Glanz

**Abb. 17:** Benetzungsgrade 1-3

#### 2.5.2 Sporendeposition in stiller Luft

Zur Untersuchung des Sporenausstoßes in unbewegter Luft wurde eine einfache Depositionsmethode in einer geschlossenen Kammer mit 100%iger Wassersättigung angewendet. Dazu wurden die Blätter zunächst durch Tauchen befeuchtet (vgl. 2.2.4; 2.5.1.1).

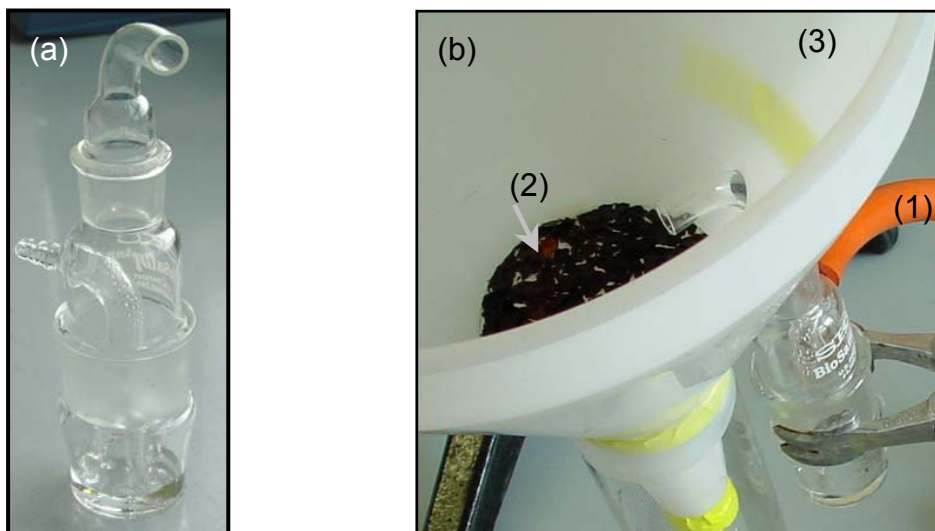
- Nach Ablauf der Tauchzeit wurde das Uhrglas aus dem Tauchbad gehoben und mit der Blattseite nach unten auf eine vorbereitete Petrischale gelegt (vgl. 2.2.4, **Abb. 10b**). Inkubationsintervalle lagen zwischen 15 und 60 min. Die Gesamtinkubationsdauer war 2-6 h. Nach jedem Inkubationsintervall wurde das Uhrglas auf eine neue vorbereitete Petrischale gelegt.
- Ausgeschleuderte Ascosporen sanken auf die Wasseroberfläche. Die Sporen wurden quantifiziert (vgl. 2.4.1).
- Nach Ende der Inkubationsdauer wurde eine Positivkontrolle durchgeführt (vgl. 2.5.4).

Die Depositionsversuche wurden bei Tageslicht bzw. Laborbeleuchtung und RT durchgeführt. Es wurden trockene oder konditionierte (vgl. 2.2.4) Blätter verwendet. Dunkelversuche wurden in der Dunkelkammer durchgeführt (vgl. 2.6.2).

### 2.5.3 Sporenfreisetzung in den Luftstrom und die Wasserkompartimente

#### 2.5.3.1 SKC-Biosampller

Ein Biosampller (SKC Inc., Eighty Four, Pennsylvania, USA) aus Glas wurde zur Quantifizierung des Ascosporengehaltes in der Luft verwendet (**Abb. 18a**). Der Biosampller sammelt Bioaerosole (Bakterien, Pilzsporen, Viren) und fängt sie in Wasser auf. Der Sampler besteht aus drei Teilen: Ansaugöffnung, Düsensektion (mit drei tangentialen Düsen) und Sammelgefäß für 5 ml Probenvolumen. Bei Betrieb mit einer Saugleistung von mindestens 12,5 l/min wird die Flüssigkeit im Sammelgefäß auf die Innenwand gewirbelt und nimmt die angesaugten Partikel auf.



**Abb. 18:** (a) SKC Biosampller. (b) Versuchsaufbau für die Bestimmung des Sporengehaltes in Luft- und Wasserkompartimenten. (1) Schlauch zur Vakuumpumpe. (2) Uhrglas, mit Blättern beklebt, im Innentrichter. (3) Sporensammeltrichter.

Der Unterdruck wurde von einer Vakuumpumpe V-500 mit Vacuum Controller B-721 (Büchi, Flawil, Schweiz) mit 13 l/min Saugleistung geliefert bzw. bei Freilandversuchen durch die mobile Pumpe MCS-15 (SKC Inc.), die 12,5 l/min Saugleistung produzierte. Die Auslassöffnung des Biosamplers wurde über einen Schlauch mit 5 mm Durchmesser an die jeweilige Pumpe angeschlossen. Vor Versuchsbeginn wurde die Saugleistung mit einem Flowmeter (Key Instruments, Trevose, Pennsylvania, USA) überprüft.

### **2.5.3.2 Sporenquantifizierung mit dem Sporensammeltrichter**

Trockene Blätter wurden auf einem Uhrglas der Fläche 63,6 cm<sup>2</sup> mit doppelseitigem Haftfilm fixiert (fakultativ wurden die Blätter am Vorabend konditioniert, vgl. 2.2.4). Das Uhrglas wurde mit Abstandhaltern in einem Trichter (größter Durchmesser 10 cm) platziert, der seinerseits mit Abstandhaltern in einen Sporensammeltrichter (größter Durchmesser 24,3 cm) gesteckt wurde. An der Spitze des inneren Trichters wurde ein 20 ml Röhrchen aus Polypropylen befestigt, um vom Uhrglas ablaufendes Wasser aufzufangen. Am äußeren Sporensammeltrichter wurde ein 50 ml Röhrchen aus Polypropylen befestigt, um das von der Trichterwand ablaufende Spritzwasser aufzufangen. Durch eine Öffnung in der Trichterwand ca. 0,5 cm oberhalb der Glaswölbung wurde die Ansaugöffnung des Biosamplers in den Trichter gesteckt (**Abb. 18b**). In das Sammelgefäß des Biosamplers wurden 5 ml Wasser vorgelegt.

Je nach Versuchsanforderung wurden die Blätter im Trichter durch Tropfen, Nebel oder Besprühen benetzt oder bereits vor Versuchsbeginn durch Tauchen befeuchtet. Der Benetzungsgrad der Blätter wurde durch Beobachtung registriert (vgl. 2.5.1.4). In regelmäßigen Abständen (15 oder 30 min) wurden in allen drei Kompartimenten die Proben entnommen, das Flüssigkeitsvolumen und die darin enthaltenen Sporenzahlen bestimmt (vgl. 2.4.1). Nach jedem Versuch wurde eine Positivkontrolle durchgeführt (vgl. 2.5.4). Alle Versuche wurden einmal wiederholt, MW und SD aller Teilwerte in Prozent des GP angegeben. Die Versuchsdauer lag zwischen 1-6 h. Die Versuche wurden bei Tageslicht bzw. Laborlicht und RT durchgeführt, Dunkelversuche in der Dunkelkammer (vgl. 2.6.2).

#### **2.5.3.2.1 Freiland-Versuche**

Bei Freilandversuchen wurden die Blätter durch natürliche Regenereignisse unterschiedlicher Intensität und Dauer benetzt, alle Versuche wurden bei Tageslicht durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug bis zu 8 h. Der Versuchsaufbau wurde, ca. 1,5 m über dem Boden, im Versuchsfeld neben der Wetterstation positioniert. Ein 5 m langer Schlauch wurde für die Verbindung des Biosamplers mit der Pumpe verwendet. Die Pumpe und die Schreiberelektronik des Regensensors wurden in einem Zelt untergebracht, das 3,4 m vom Sporensammeltrichter entfernt auf der windabgewandten Seite stand.

### **2.5.3.3 Schallübertragung über die Luft**

Für die Schallübertragung auf benetzte Blätter über die Luft wurden zwei Versuchsanordnungen verwendet (s. u.). Mit beiden Versuchsaufbauten wurden die Beschallungsvarianten Metronom 120/min, 110 dB (C); Sinus 400 Hz, 105 dB (C) und Braunes Rauschen, 100 dB (C) jeweils für 60 min verwendet, mit vier Probenwechseln nach je 15 min. Als Negativkontrolle wurden die Blätter nach dem Tauchen für 60 min ohne Beschallung bei gleichen Probenabständen inkubiert.

#### **2.5.3.3.1 Trichter-Aubau**

Blätter wurden auf einem Uhrglas befestigt und 10 min getaucht (vgl. 2.5.1.1). Anschließend wurde das Uhrglas in den Sporentrichter gelegt und ein Lautsprecher kopfüber in dem Trichter platziert. Zwischen Uhrglas und dem Lautsprecher blieben ca. 5 cm Luft, in diesen Zwischenraum wurde das Ansaugrohr des Biosamplers geschoben.

#### **2.5.3.3.2 Trommel-Aufbau**

Plastikfolie wurde trommelartig auf eine Glasröhre (25 cm Höhe) gespannt, deren Durchmesser dem verwendeten Lautsprecher entsprach. Die Blätter wurden auf der gespannten Membran mit doppelseitigem Haftfilm befestigt und durch 10-minütiges Tauchen benetzt. Die Glasröhre wurde mit der Membran nach oben auf den waagrecht positionierten Lautsprecher gestülpt, so dass der Schalldruck die Plastikmembran und die darauf befestigten Blätter in Schwingung versetzte.

### **2.5.4 Positivkontrollen**

Nach den jeweiligen Versuchen wurde eine Positivkontrolle durchgeführt, um die noch verbliebenen Ascosporen in den Blättern zu quantifizieren (vgl. 2.4.2.3).

- Das Uhrglas mit den darauf befestigten Blättern wurde in ein 1000 ml Becherglas mit der Blattseite nach oben gelegt.
- 100 ml Wasser wurden so eingefüllt, dass sich keine Luftblase unter der Glaswölbung bilden konnte.
- Schütteln bei 100 U/min für 1 h.
- Quantifizierung vgl. 2.4.1.



## 2.6 Sporenemission bei Licht und Dunkelheit

Die Sporenemission bei Dunkelheit wurde mit verschiedenen Versuchsmethoden geprüft. Nach jedem Versuch wurden die Blätter für 1 h im Licht bei 100 U/min geschüttelt, um die noch vorhandenen Ascosporen zur Ausschleuderung zu bringen. Die einzelnen Proben wurden wie unter 2.4.1 quantifiziert und in Prozent des GP angegeben.

### 2.6.1 Vorbehandlung der Blätter

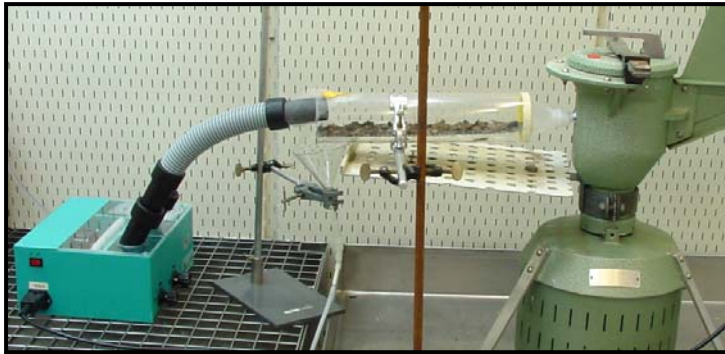
Für Versuche zur Dunkelhemmung der Sporenemission wurden Blätter mit natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus aus dem Freiland (nur während der Primärsaison 2002) oder mit künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus aus Inkubatoren (vgl. 2.2.3) verwendet bzw. tiefgefrorene Blätter, die am Vorabend aufgetaut und verdunkelt oder konditioniert wurden (vgl. 2.2.4). Blätter aus dem Freiland wurden am Vorabend des Versuchs verdunkelt und ü. N. trocken im Labor gelagert. Dunkelversuche fanden während der Nachtphase der Blätter statt. Entsprechende Kontrollversuche bei Helligkeit wurden während der Tag-Phase durchgeführt.

### 2.6.2 Dunkelkammerversuche

Die Aufbauten für die Beschallungsversuche (vgl. 2.4.3.2) und für die Versuche zur Sporenemission in Luft- und Wasserkompartimente (vgl. 2.5.2; 2.5.3.2) wurden in der Dunkelkammer aufgestellt. Die Erlenmeyerkolben für die Wasserbadmethode (vgl. 2.4.1) wurden in einer lichtdichten Box bei 100 U/min geschüttelt. Der Strömungskanal (vgl. 2.4.2) wurde mit Aluminiumfolie umwickelt. Versuchsaufbau und Probenwechsel fanden in der Dunkelkammer unter schwachem Grünlicht (15 W) statt.

### 2.6.3 Klimakammerversuche

Eine Burkard Sporenfalle wurde für Versuche unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer eingesetzt. Die Ansaugöffnung der Sporenfalle wurde mit einem Adapter an eine 314 mm lange Glasröhre (69 mm Durchmesser) angeschlossen, in der 3 g Blattproben auf einem Lochgitter (310 x 50 mm) aus Kunststoff locker ausgebreitet wurden (**Abb. 19**). In die gegenüberliegende Öffnung der Glasröhre wurde ein Nebelverteiler des Ultraschall Luftbefeuchters gesteckt. Die Befeuchtung wurde alle 12 h jeweils in der Mitte der Tag- oder Nachtphase für 1 h angeschaltet. Der durchschnittliche Verbrauch pro Stunde betrug  $185 \pm 26$  ml (Versuche 1-3) bzw.  $112 \text{ ml} \pm 23 \text{ ml}$  in Versuch 4. Die Röhre wurde minimal geneigt, das ablaufende Wasser wurde gesammelt und auf Sporengehalt untersucht, in Versuch 4 entstand kein Ablaufwasser. Um die Keimung der Sporen zu inhibieren, wurde 0,2 % Natriumazid in die Sammelgefäße vorgelegt (Endkonzentration 0,02 %).



**Abb. 19:** Versuchsaufbau in der Klimakammer. Eine Burkard Sporenfalle wurde an eine Röhre angeschlossen, in der die Blätter mit Nebel befeuchtet wurden.

In einem Fall (Versuch 3) wurde das Ablaufwasser jeder einzelnen Befeuchtungsphase mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 3 ml Fraktionen aufgefangen und einzeln auf Sporengleichgewicht untersucht. Die Sporenfalle wurde je nach Versuchsdauer sechs bis sieben Tage durchgehend betrieben und wie unter 2.3. ausgewertet. Die Luftfeuchtigkeit wurde konstant bei 80 %, die Temperatur bei 15°C gehalten, eine starke Belüftung sorgte für ausreichende Kühlung während der Beleuchtungsphasen. Licht wurde von Quecksilberlampen mit Tageslichtspektrum geliefert. Die Lichtstärke war konstant auf 40 kLux eingestellt. Für einen Tag-Nacht-Rhythmus (Versuch 1) mit jeweils sechs Hell- und Dunkelphasen wurde die Beleuchtung im 12-h-Rhythmus ein- und ausgeschaltet (eine Lichtphase von 12 h entspricht etwa der Tageslichtperiode in der dritten Märzwoche). In Versuch 2-4 wurden zwei Wechsellichtphasen und anschließend je eine Dauerdunkel- und eine Dauerlichtphase von 60 h durchgeführt. Nach Versuchsende wurden die Blätter mit der Wasserbadmethode in 150 ml Wasser behandelt (vgl. 2.4.1), um die verbliebenen Ascosporen zu erhalten. Alle Teilwerte des Versuchs wurden auf das Gesamtpotential bezogen.

## 2.7 Hemmstoffscreening der Ascosporenausschleuderung

### 2.7.1 Blattextrakte

- 50 g überwinterte, getrocknete Blätter wurden mit 500 ml Wasser 20-30 min geschüttelt; das Wasser wurde 5-mal durch frisches ersetzt, so dass 3 l Blattextrakt erhalten wurden.
- Der Blattextrakt wurde für 30 min bei 10000 U/min zentrifugiert (Beckmann, JA-14). Der Überstand wurde in 250 ml Aliquots in Kunststofftüten in 10 Tagen gefriergetrocknet.
- Das Lyophilisat wurde in insgesamt 100 ml Wasser aufgenommen und für 30 min bei 10000 U/min zentrifugiert (Beckmann, JA-20).

- Der Überstand 1 wurde dekantiert und aufbewahrt. Das Zentrifugat wurde sorgfältig resuspendiert, in insgesamt 100 ml Wasser, und für 30 min bei 10000 U/min zentrifugiert (Beckmann, JA-20).
- Die vereinigten Überstände wurden gefriergetrocknet und das Lyophilisat (291 mg; entsprechend 0,6 % der Ausgangsblattmenge) in 15 ml Wasser gelöst (Extrakt 1). Bis zur Verwendung wurden das Zentrifugat und Extrakt 1 eingefroren. Das Zentrifugat wurde kurz vor der Verwendung in 5 ml Wasser resuspendiert (Extrakt 2).

Die Extrakte 1 und 2 wurden mit Wasser gemischt und als Badflüssigkeit in einer Wasserbadmethode (vgl. 2.4.1) mit einigen Modifikationen verwendet. Eingesetzte Extraktmengen in 25 ml Badflüssigkeit waren 1,5 ml bzw. 4,5 ml für Extrakt 1 und 0,5 ml bzw. 1,5 ml für Extrakt 2. Der Bereich der sinnvollen Extraktmenge zur Nachbildung der natürlichen Gegebenheiten einer minimalsten Befeuchtung (Benetzungsgrad 1, vgl. 2.5.1.4) in der Wasserbadmethode wurde ermittelt. Vorversuche belegten, dass der Wassergehalt matt-feuchter Blätter durch die Wasserbadmethode um den Faktor 20 verdünnt wurde. Bei der eingesetzten Blattmenge von 0,5 g war demnach ein Extraktzusatz entsprechend 10 g Blättern notwendig, was einer Menge von 3 ml Extrakt 1 bzw. 1 ml von Extrakt 2 entspricht. 500 mg Blattproben wurden in 25 ml Badflüssigkeit zweimal 1 h geschüttelt, nach jeder Stunde wurde die Badflüssigkeit abgeschüttelt und die Sporen quantifiziert (vgl. 2.4.1). Anschließend wurden die Proben weitere 3 h in 25 ml Wasser geschüttelt, ebenfalls mit stündlichem Wechsel der Badflüssigkeit. Als Kontrolle diente eine 5 h mit Wasser geschüttelte Probe.

### 2.7.2 Chemische Hemm- und Förderstoffe

200 mg Blattproben wurden in 8 ml Wasser mit unterschiedlichen Zusatzstoffen (**Tab. 8**) in verschiedenen Konzentrationen bei 100 U/min 4 oder 5 h geschüttelt. Nach jeweils 60 min wurde die Badflüssigkeit erneuert und die Sporensuspension wie unter 2.4.1 beschrieben quantifiziert. Eine Kontrolle wurde mit Wasser geschüttelt. Stocklösungen in Ethanol wurden von Cycloheximid (12,5 mg/ml), Kresoxim-methyl (5,5 mg/ml), Cytochalasin (3,3 mg/ml), Pyrimethanil und Gramicidin (5 mg/ml) hergestellt und der Kontrolle die entsprechende Menge Ethanol zugegeben. Nach 2 bzw. 3 h wurde fakultativ die Hemmstofflösung durch Wasser ersetzt.

**Tabelle 8:** Chemikalien zur Überprüfung der Hemm- oder Förderwirkung auf den Sporenausstoß mit der Wasserbadmethode.

<b>Substanz [Bezugsquelle]</b>	<b>Konzentrationen</b>	<b>Wirkmechanismus</b>
<b>Replikation und Genexpression</b>		
Chloramphenicol [Sigma]	5/50/500/1500/3000/5000 µg/ml	Hemmung der prokaryontischen Translation
Cycloheximid [Sigma]	10/50/100/500/5000 µg/ml	Hemmung der eukaryontischen Translation
Puromycin [Sigma]	10/50/500 µg/ml	Hemmung der eukaryontischen und prokaryontischen Translation
Actinomycin D [Sigma]	1/4/40/80 µg/ml	Transkriptionshemmung (Replikationshemmung)
Rifampizin [Serva]	500/1500/3000 µg/ml	Hemmung prokaryontischer RNA-Polymerasen
<b>Beeinflussung des Membrantransports, Energiegewinnung</b>		
Amilorid [Sigma]	0,05 /0,25 %	Blockiert epitheliale Na <sup>+</sup> -Kanäle und Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher
Sanguinarin [Sigma]	0,03 %	Hemmung von Na <sup>+</sup> -, K <sup>+</sup> -, Mg <sup>2+</sup> -ATPase
Ouabain [Sigma]	0,05/0,5 %	Hemmung der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase
Cyclopiazonsäure [Sigma]	0,03 %	Hemmung der Ca <sup>2+</sup> -ATPase in intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Speicherorten
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ) [ICN], Natriumtartrat, Ammoniummolybdat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ), Natriumfluorid (NaF), Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> ) (Dutra <i>et al.</i> , 2001) EDTA	0,3/1/3 mM 1/3/9 mM 0,3/1/3 mM 1/3/9 mM 0,3/1/3 mM	Hemmung der P-ATPasen (Plasmalemma-ATPasen) und löslichen Phosphatasen
Fusicoccin [Sigma]	1/8 µg/ml	Förderung der P-ATPasen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) Kaliumphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Oligomycin B [Sigma]	1/3/9 mM 1/3/9 mM 5/50 µg/ml	Hemmung der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) [Merck]	0,3/1/3 mM	Hemmung der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase und Cytochrom aa <sub>3</sub> Komplex
Kresoxim-methyl, Wirkstoff in Discus [BASF] (Becker <i>et al.</i> , 1981)	1/5/50 µg/ml	Hemmung des Elektronentransfers am Cytochrom b/c <sub>1</sub> Komplex
<b>Veränderung der Membranpermeabilität</b>		
Gramicidin A [Sigma]	1/5/50 µg/ml	Bildet Membrankanäle → Einstrom monovalenter Kationen ins Cytoplasma
Nystatin [Sigma], Amphotericin B [Sigma]	50/250/1250 U/ml 1/5/50 µg/ml	Sterolbindung → Porenbildung
<b>Detergenzien</b>		
SDS (anionisch)	1/3/9 mM	
Tween 80 (nicht-ionisch)	0,01/0,1/1 %	
Triton-X 100 (nicht-ionisch)	0,01/0,1/1 %	
<b>pH Wert</b>		
	pH 5 (Mes, 50 mM) pH 7, pH 10 (Tris, 50 mM) pH 6,8 (Wasser)	
<b>osmotische Wirkung</b>		
Saccharose	0,05/0,1/0,15/0,2/0,3/0,4/0,5 0,6/0,7/0,8/0,9/1,0/1,5/2,0 M	Verhinderung des Wassereinstroms in die Asci
Mannit	0,1/0,15/0,2/0,5/1 M	

<b>Substanz [Bezugsquelle]</b>	<b>Konzentrationen</b>	<b>Wirkmechanismus</b>
Sorbit	1,0/1,5/2,0 M	
Glycerin	1,0/1,5/2,0 M	
<b>andere Mechanismen</b>		
Staurosporin [ICN]	0,1/1/3 µM	Hemmung von Proteinkinasen
Cytochalasin B [Sigma]	5/50 µg/ml	Hemmung der Actin-Polymerisierung → kontraktile Actinfilamente werden unterbrochen → Inhibierung der Plasmaströmung
Proteinase K [Serva]	10/100 µg/ml	Proteinabbau
Harnstoff	1/3/9 mM	Denaturierung von Proteinen
Kupfersulfat (Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,5/1/2/5 %	Interaktion mit Proteinen
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) (MacHardy, 1996)	1/3/9 mM	Letale Wirkung auf <i>V. inaequalis</i> - Pseudothecien bei Herbst-Applikation
Pyrimethanil, Wirkstoff in SCALA [Agrevo] (Jehlicka & Kollar, 2000)	1/5/50 µg/ml	Beeinträchtigung des Biosynthesewegs von Methionin

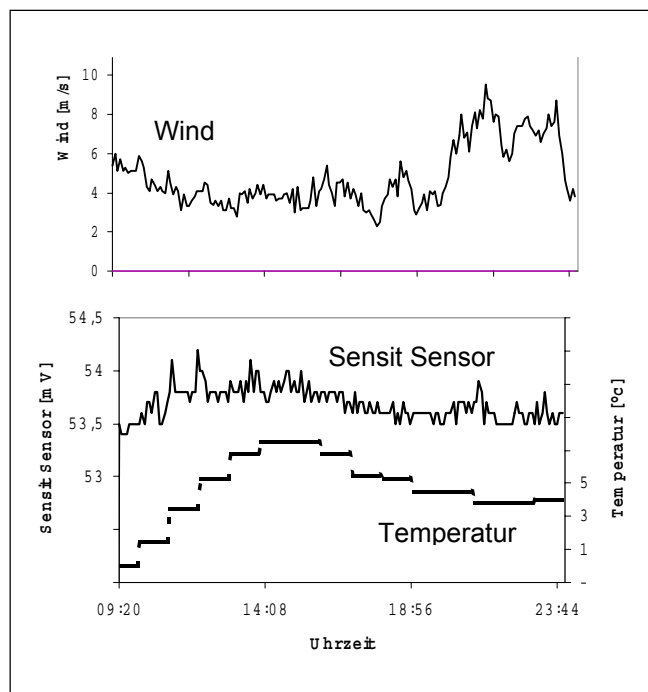
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Regenanalytik

##### 3.1.1 Sensoren für kinetische Energie

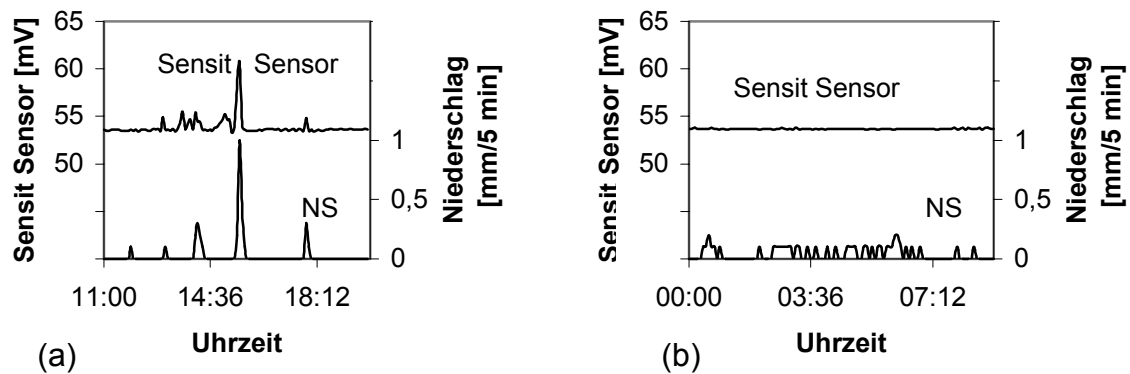
###### 3.1.1.1 Sensit V04A

Die Messdaten des Sensors unterlagen generell starken Schwankungen und wurden von der Temperatur beeinflusst (**Abb. 20**). Bei Temperaturen unter 5°C wichen die Werte zudem vom kalibrierten Nullwert stark nach unten ab. Die Windgeschwindigkeit war bei Werten bis 10 m/s ohne Auswirkungen (**Abb. 20**), lediglich bei kurzen, starken Windstößen wurden kleinere Ausschläge registriert.

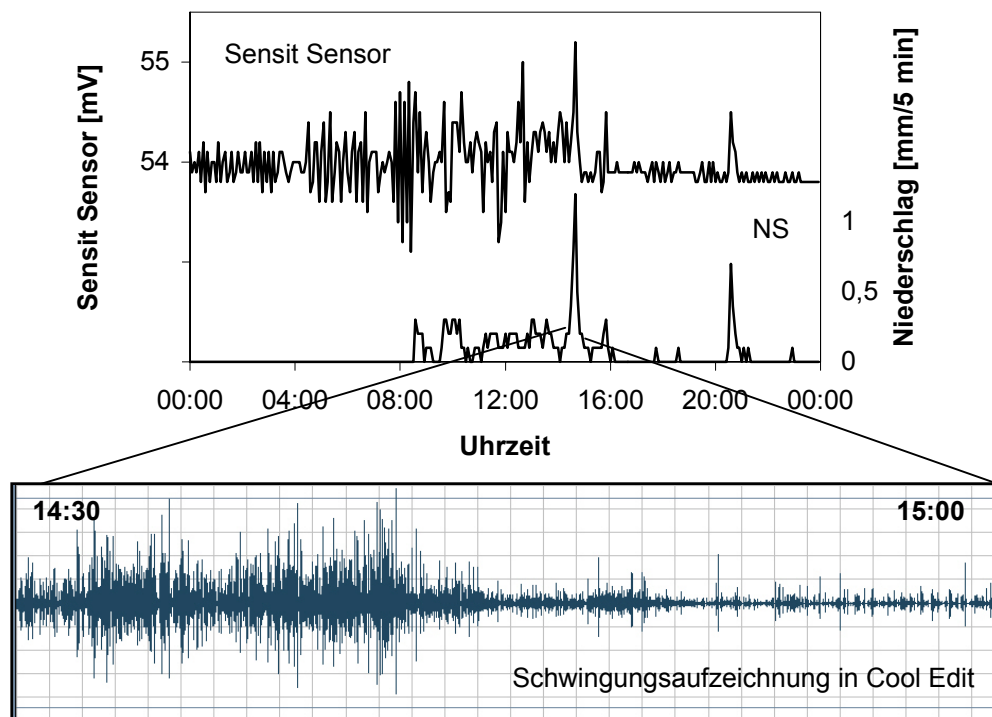


**Abb. 20:** Messdaten des Sensit Sensors für kinetische Energie an einem regenfreien Tag, Temperatur (Stundendurchschnittswerte) und Windgeschwindigkeit [m/s].

Extreme Regenmengen ab 1 mm/5 min wurden durch Ausschläge angezeigt (**Abb. 21a**). Der Sensor war nicht geeignet, kleine Regenmengen (0,1 -1 mm/h) aufzulösen (**Abb. 21b**). Über die Größe der Ausschläge konnte nicht auf die Regenintensität geschlossen werden, da auch bei geringen Regenmengen teilweise sehr starke Ausschläge registriert wurden. In **Abb. 22** werden Daten des Sensit Sensors im Vergleich zur Niederschlagsmessung der Wetterstation und einer digitalen Regenaufzeichnung dargestellt (vgl. 3.1.2.1.1). Alle drei Systeme zeigten den Spitzenwert des Niederschlags an (1,2 mm/5 min), bei der Lautsprecheraufnahme an der Dichte und Amplitude der Ausschläge zu erkennen. Der Sensit Sensor zeigte aber zusätzlich noch weitere starke Ausschläge bei geringerer Regenintensität.



**Abb. 21:** Vergleich des Sensit Sensors für kinetische Energie mit der Niederschlagsmenge (NS). (a) Messzeitraum 9 h; 3,1 mm Niederschlag cumulativ; Spitzenwert 1 mm/5 min. (b) Messzeitraum 9 h; 4,3 mm Niederschlag cumulativ; Spitzenwert 0,2 mm/5 min.



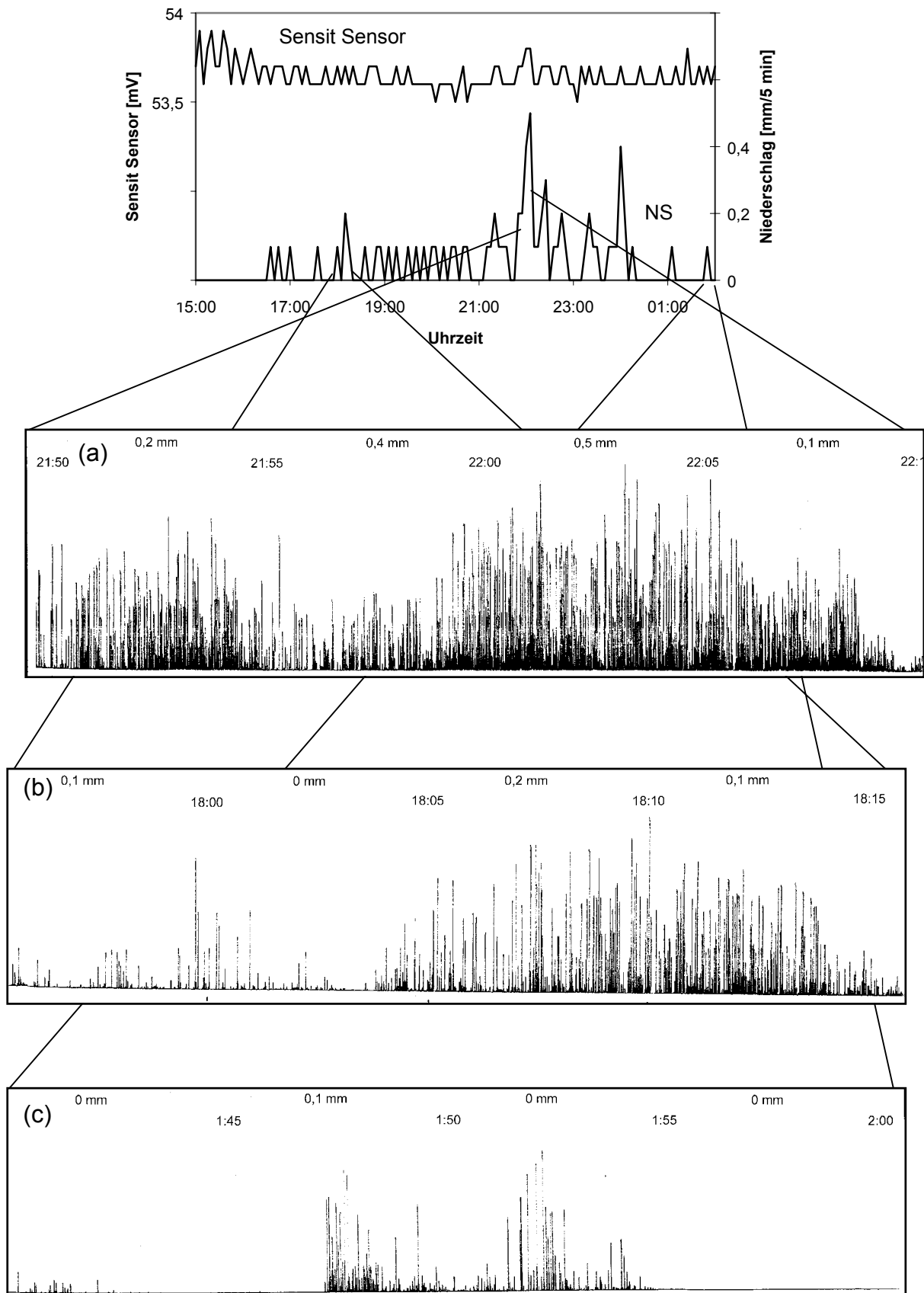
**Abb. 22:** Vergleich des Sensit Sensors mit der Niederschlagsmenge (NS) und der digitalen Schwingungsaufzeichnung des Mikrofonlautsprechers LE 77 in Cool Edit Pro (vgl. 3.1.2.1.1). Messzeitraum 24 h; 17,2 mm Niederschlag cumulativ; Spitzenwert 1,2 mm/5 min.

### 3.1.1.2 Lautsprecher –Regensensoren

Der selbst entwickelte Sensor für den Dauereinsatz (vgl. 2.1.1.2, **Abb. 5**) erreichte aufgrund der Aufzeichnung jedes einzelnen Einschlags eine tropfengenaue zeitliche Auflösung der Niederschlagsereignisse, Beginn und Ende jedes Ereignisses konnten genau bestimmt werden. Durch die Dämpfung der Membran wurden alle Nebengeräusche ausgeschlossen und nur Tropfeneinschläge übertragen. Bei sehr schwachen Tropfeneinschlägen, die der unmodifizierte Lautsprecher MS-55 erfasste, reichte die Sensibilität des Regensensors nicht aus. Während die Sensoraufzeichnung eine klare Nulllinie aufwies, zeigte der unmodifizierte Lautsprecher einen deutlich stärkeren Hintergrund in Form einer verzerrten Grundlinie. Bei starken Windböen wurden ebenfalls Ausschläge verzeichnet. Tropfeneinschläge waren bei beiden Impulswandlern als klare Linien erkennbar, die allerdings bei starkem Regen durch die Trägheit und zu geringen Papiervorschub des Schreibers zunehmend überlagert waren. Die Sensitivität war hoch. Auch kurze und schwache Regenereignisse unter 0,1 mm konnten erfasst werden, die von der Wetterstation noch nicht angezeigt wurden. Unterschiedliche Regenmengen und –intensitäten konnten anhand von Höhe und Dichte der Ausschläge unterschieden werden und waren mit den von der Wetterstation gemessenen Regenhöhen zu verifizieren (**Abb. 23**). Der Regensensor zeichnete mehrere Regenereignisse während der Primärsaison 2001 auf (vgl. 3.3.2).

Im Zusammenhang mit Experimenten zum Sporenausstoß bei Regenbenetzung (vgl. 3.3.4) erfasste der einfache Regensensor (vgl. 2.1.1.2, **Abb. 7**) den Niederschlag und gab einen Anhaltspunkt über die auf den Blättern auftreffenden Tropfenmengen. Bei sehr feinem Nieselregen (Einzelereignisse II, III, vgl. 3.3.4, **Tab. 16**) war die eingestellte Empfindlichkeit des Schreibers und/oder des Vorverstärkers zum Teil nicht ausreichend. Die Wetterstation zeichnete den Niederschlagsbeginn in einigen Fällen durch zu lange oder nicht erreichte Füllzeiten der Kippwaage erst 30-60 min später als der Regensensor auf bzw. erfasste einige kurze Regenphasen gar nicht (vgl. 3.3.4). In einem Fall wurde von der Wetterstation 0,8 mm Regen in 2 h aufgezeichnet, obwohl kein Niederschlag zu dieser Zeit beobachtet wurde (Regenereignis V, vgl. 3.3.4, **Tab. 16**). Bei allen Versuchen zum Sporenausstoß bei natürlichem Regen waren die Niederschlagsereignisse leicht bis mittelstark, demzufolge konnten die Daten des Sensit Sensors für die Auswertung nicht herangezogen werden, da er für diese Regenintensitäten nicht geeignet war (vgl. 3.1.1.1).





**Abb. 23:** Vergleich des Sensit Sensors mit der Niederschlagsmenge (NS) und der Schreiberaufzeichnung des selbst entwickelten Sensors für den Dauereinsatz mit Gleichrichter-Elektronik (a-c). Messzeitraum 10 h; 7,2 mm Niederschlag cumulativ; Spitzenwert 0,5 mm/5 min.

### 3.1.1.3 Schalldruckpegelmessung

Die Aufnahme von Regenereignissen mit dem Schallpegelmessgerät zeigte eine ungenaue Grundlinie und war durch Störgeräusche und Windböen stark beeinflusst. Regentropfeneinschläge wurden deutlich registriert. Energien von einzelnen Einschlägen auf die mit Blättern belegte Fläche lagen zwischen 75 und 90 dB (C), nur ganz vereinzelt wurden Tropfeneinschläge mit 95 dB (C) registriert. Ohne die Blattauflage wurden die meisten Einschläge mit Energien zwischen 80 und 100 dB (C) registriert, vereinzelt bis 105 dB (C).

## 3.1.2 Aufzeichnung von Schwingungsimpulsen

### 3.1.2.1 Mikrofonlautsprecher

#### 3.1.2.1.1 Lautsprechermodelle

In den Regenaufzeichnungen durch Mikrofonlautsprecher konnten verschiedene Regenintensitäten anhand der Ausschläge identifiziert werden (vgl. 3.1.1, **Abb. 22**). **Tab. 9** fasst die Eigenschaften der vier Lautsprecher und die Ergebnisse der Frequenzanalyse zusammen. Zusätzliche Vorverstärker waren für die Tropfenaufnahmen nicht erforderlich; sie verringerten den Frequenzumfang und führten zu Dynamikkompression.

**Tabelle 9:** Schwingungsaufzeichnung mit Mikrofonlautsprechern. Eigenschaften und Frequenzen [Hz] der erzeugten Schwingungen.

	LE 77	MS-55	MSP-30	BL-28
<b>Schutzfolie<sup>1</sup></b>	nein	ja	nein	nein
<b>Verstärkung<sup>2</sup></b>	halbmaximal	halbmaximal	halbmaximal	halbmaximal
<b>Empfindlichkeit für Umgebungsgeräusche<sup>3</sup></b>	nicht vorhanden	nicht vorhanden	vorhanden	vorhanden
<b>Labortropfen [Hz]</b>	347 ± 10	378 ± 1	277 ± 60	526 ± 33
<b>Regentropfen [Hz]</b>	3401 ± 9	371 ± 10	293 ± 62	579 ± 10
<b>Regentropfen auf Blattauflage [Hz]</b>	251 ± 62	366 ± 15	359 ± 56	597 ± 58

<sup>1</sup> zum Schutz der Lautsprechermembran vor Wasser

<sup>2</sup> PegelEinstellung des Vorverstärkers am ADC & DAC 2000 bei Aufnahmen ohne Blattauflage

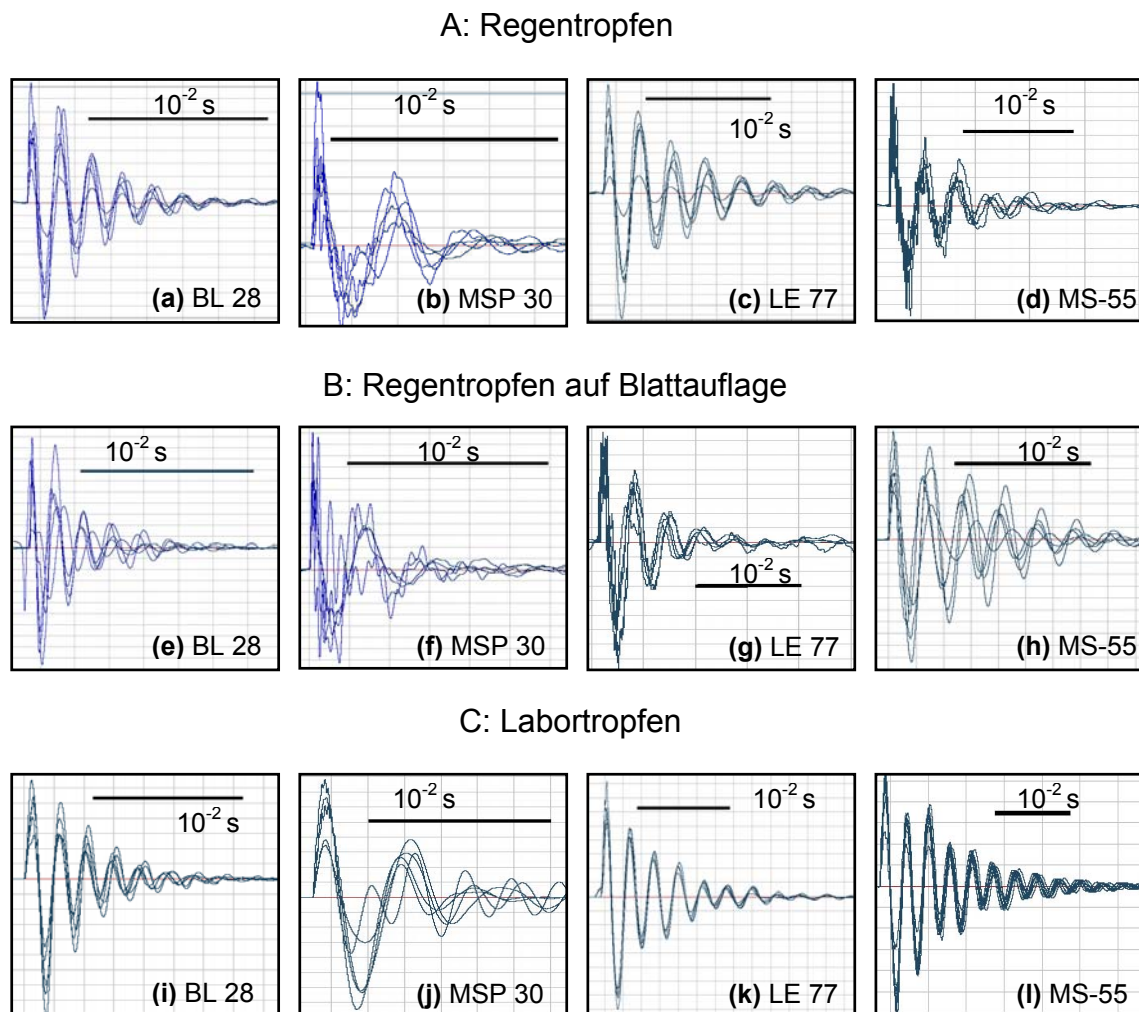
<sup>3</sup> Hintergrundgeräusche, als Verzerrung der Grundlinie sichtbar

Alle vier Systeme erzeugten bei Labortropfen und Regentropfen jeweils Schwingungen einer bestimmten Grundfrequenz, Unterschiede im Schwingungsverhalten waren lediglich als stärkere Überlagerung durch hohe Frequenzen bei Regentropfeneinschlägen sichtbar. Die Grundfrequenz war für jeden Lautsprecher typisch. Eine hohe Varianz der Schwingungsfrequenz zwischen

einzelnen Tropfeneinschlägen zeigte nur MSP-30 (**Tab. 9; Abb. 24**). Alle vier Lautsprechertypen zeigten im Analysespektrum auch Frequenzanteile bei 8000-15000 Hz und unterschiedlich hohe Frequenzanteile zwischen 1000 und 10000 Hz auf, welche die Grundschiwingung überlagerten. Diese konnten durch den Tiefpassfilter mit Durchlassgrenze 1000 Hz entfernt werden, ohne dass sich die Frequenz der Grundschiwingung änderte. Nach dem Entfernen der Hochtöne blieb die einfache Sinusschiwingung erhalten. Alle vier Systeme wurden während der Aufnahme natürlicher Regentropfen ohne Blattauflage mit halbmaximaler Verstärkung ausgesteuert, da die maximale Auslenkung vieler Tropfeneinschläge zu Übersteuerungen des Systems geführt hätte. Mit der gewählten Verstärkung blieb die Amplitude der meisten Tropfeneinschläge im Bereich von  $\pm 0,2$ . Auch bei Labortropfenaufnahmen war eine Verringerung der Verstärkung bei Fallhöhen über 50 cm erforderlich. Mit Blattauflage war bei allen vier Lautsprechersystemen die Aufnahme mit Maximalverstärkung ohne Übersteuerung der Einschläge möglich. Bei den Lautsprechern MS-55, MSP-30 und BL-28 wurde das Schwingungsverhalten durch die Blattauflage nicht signifikant verändert, bei dem System LE 77 bewirkte die Blattauflage eine Verschiebung der Frequenz um 90 Hz in den Tieftonbereich.

Die eingesenkte Membran von LE 77 füllte sich im Verlauf von Regenaufnahmen mit Wasser. Ohne Wasserbelegung zeigten die Frequenzanalysespektren von Aufnahmen ohne Blattauflage neben dem Maximum bei  $347 \pm 10$  Hz ein zweites schwächeres Maximum im Bereich um 140-150 Hz. Bei vollständig wassergefüllter Membran war nur noch ein Maximum bei  $96 \pm 0,2$  Hz im Spektrum sichtbar. War die Membran durch wenig Wasser beschwert, zeigte die Frequenzanalyse zwei gleich starke Gipfel bei 140 Hz und 240 Hz. Dieses Verhalten war sowohl bei Labortropfen als auch bei natürlichen Regentropfen erkennbar. Wurde die Membran mit einem nassen Apfelblatt bedeckt, so war in der Frequenzanalyse ebenfalls nur noch ein Gipfel zu erkennen, dessen Maximum mit Zunahme der Wasserfüllung von 315 auf 185 Hz sank. Durch die Auflage des nassen Apfelblattes auf die Membran wurde der Ausschwingvorgang der Schwiwingung verkürzt (**Abb. 24c, g, k**). Auch auf der leicht nach innen gewölbten Membran des MS-55 sammelte sich während eines Regenereignisses Wasser. Das Maximum verschob sich mit zunehmender Wasserbelegung von 371 Hz nach 306 Hz. Tropfeneinschläge in Labor und Freiland erzeugten gleichmäßige, gedämpfte Sinusschiwingungen. Die Blattauflage bei Regenaufnahmen im Freiland veränderte das Schwiwingungsverhalten des Lautsprechers nicht (**Abb. 24d, h, l**). In allen Aufnahmen waren kaum hochfrequente Töne vorhanden. MSP-30 und BL-28 besaßen ebene Membranen, daher trat das Problem der zunehmenden Wasserbelegung bei diesen Systemen nicht auf. Regentropfen sowohl ohne als auch mit Blattauflage erzeugten beim MSP-30 unregelmäßige Schwiwingungen mit kurzem Ausschwingen und Überlagerungen. Labortropfen erzeugten gleichmäßige, lang ausschwingende Schwiwingungen ohne sichtbare Überlagerungen (**Abb. 24b, f, j**). BL-28 wies als einziges System Schwiwingungsfrequenzen über 500 Hz auf. Die Regentropfen hatten eine etwas höhere Frequenz als Labortropfen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Regentropfen aus Labor und Freiland waren bei diesem System nicht zu unterscheiden (**Abb. 24a, e, i**).

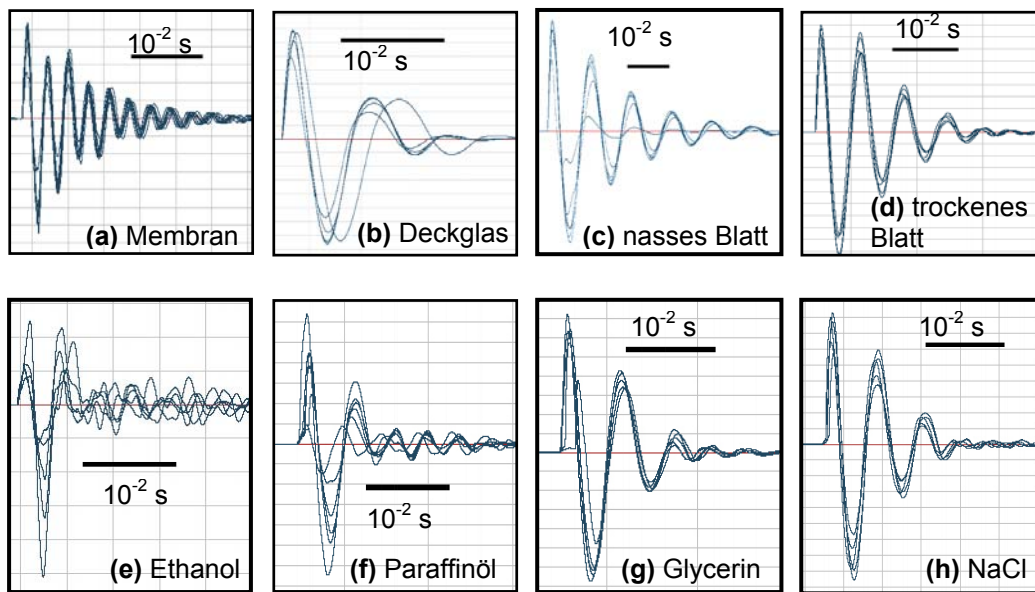


**Abb. 24:** Schwingungsaufzeichnung natürlicher Regentropfen und Labortropfen mit Mikrofonlautsprechern in Cool Edit Pro (jeweils 5 bzw. 10 überlagerte Schwingungskurven). (A) Schwingungen natürlicher Regentropfen. (B) Regentropfen auf Blattauflage. (C) Schwingungen im Labor erzeugter Wassertropfen.

### 3.1.2.1.2 Membranersatz durch einen natürlichen oder künstlichen Schwingungsaufnehmer

Künstliche Wassertropfen aus 50 cm Fallhöhe lieferten ein verändertes Schwingungsmuster, wenn die Membran von LE 77 entfernt und durch ein überwintertes getrocknetes Apfelblatt ersetzt wurde (**Abb. 25a, d**). Mit dem Blatt als Schwingungsmasse lagen die Frequenzen der Tropfeneinschläge bei  $156 \pm 7$  Hz, mit der Membran bei  $347 \pm 10$  Hz. Ein vollständig mit Wasser vollgesogenes Blatt (**Abb. 25c**) wies eine niedrigere Frequenz ( $91 \pm 15$  Hz) auf, als ein trockenes Blatt. Wurde das Blatt durch ein Deckgläschen ersetzt, zeigten die Tropfeneinschläge zwei

vollständige Schwingungen mit der Frequenz  $118 \pm 0,5$  Hz ohne weiteres Ausschwingen (**Abb. 25b**). Glycerin, Wasser und 5 M NaCl-Lösung erzeugten auf einem trockenen Blatt Schwingungsfrequenzen von ca. 160 Hz, Tropfen von dickflüssigem Paraffinöl zeigten eine geringfügige Frequenzverschiebung und durch Ethanoltröpfchen verursachte Schwingungen lagen bei 220 Hz und zeigten unregelmäßiges Ausschwingen (**Tab. 10; Abb. 25d-h**).



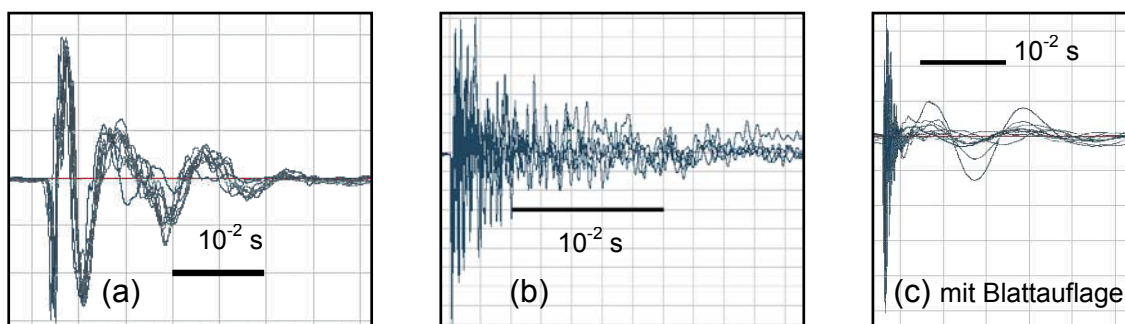
**Abb. 25:** (a-d) Schwingungsaufzeichnung von Labor-Wassertropfen mit LE 77 mit unterschiedlichen Schwingungssystemen, in Cool Edit Pro (jeweils 5 überlagerte Schwingungskurven). (a) Plastikmembran. (b) Membranersatz durch Deckglas. (c) Membranersatz durch nasses Blatt. (d) Membranersatz durch trockenes Blatt. (e-h) Unterschiedliche Flüssigkeitstropfen mit trockenem Blatt als Schwingungssystem von LE 77.

**Tabelle 10:** Schwingungsanregung durch unterschiedliche Flüssigkeitstropfen. Schwingungssystem: Lautsprecher LE 77 mit trockenem Blatt als Membranersatz. Frequenz [Hz] der ersten beiden Schwingungen nach dem Einschlag. d = Tropfendurchmesser; m = Masse des Tropfens.

	Ethanol	Paraffinöl	Glycerin	Wasser	5 M NaCl
m [mg]	13	19,5	33	35,5	38
d [mm]	2,9	3,3	4,0	4,1	4,2
Frequenz [Hz]	$223 \pm 28$	$183 \pm 21$	$161 \pm 1$	$161 \pm 0,4$	$162 \pm 0,3$

### 3.1.2.2 Mikrofone

Laboraufnahmen von Wassertropfen mit dem Kondensatormikrofon C 2000 B zeigten Einschläge mit kurzem Ausschwingen (**Abb. 26a**). Die Frequenzanalyse zeigte einen Schwerpunkt der tiefen Frequenzen unter 100 Hz und einen geringen Anteil hoher Töne. Hintergrundgeräusche waren kaum vorhanden und hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis der Frequenzanalyse. Regenaufzeichnungen mit den Mikrofonen EM3 und C 2000 B waren durch starke Hintergrundgeräusche gekennzeichnet. Durch digitale Bearbeitung konnte dieser Anteil entfernt werden, wodurch das Ergebnis der Frequenzanalyse der Tropfeneinschläge nicht verändert wurde. Die Schwingungsereignisse von Regentropfeneinschlägen, die mit den beiden Mikrofonen aufgezeichnet wurden, waren wesentlich komplexer als bei den vier Mikrofonlautsprechern. Die Frequenzanalyse ergab keine vorherrschende Frequenz. Die Tropfeneinschläge zeigten oft mehrere kleine Frequenzgipfel im mittleren Frequenzbereich. Auf der Folie ohne Blattbelegung erzeugten Regentropfeneinschläge komplizierte überlagerte Schwingungen mit langem Ausschwingvorgang (**Abb. 26b**). Durch die Auflage eines nassen Apfelblattes wurde das Ausschwingen verhindert, es resultierte der Tropfeneinschlag mit starken Überlagerungen (**Abb. 26c**). Beide Mikrofontypen konnten mit und ohne Blattauflage im Labor und Freiland bei nahezu voller Verstärkung angesteuert werden. Das Kondensatormikrofon hatte einen größeren Dynamikumfang als das Elektretmikrofon.



**Abb. 26:** Schwingungsaufzeichnung mit dem Kondensatormikrofon C 2000 B in Cool Edit Pro (jeweils 5 bzw. 10 überlagerte Schwingungskurven). **(a)** Im Labor erzeugte Wassertropfen. **(b, c)** Natürliche Regentropfen.

## 3.2 Ascosporenpotential der Blattproben

### 3.2.1 Fruchtkörper- und Ascosporenreife

#### 3.2.1.1 Primärsaison 2001

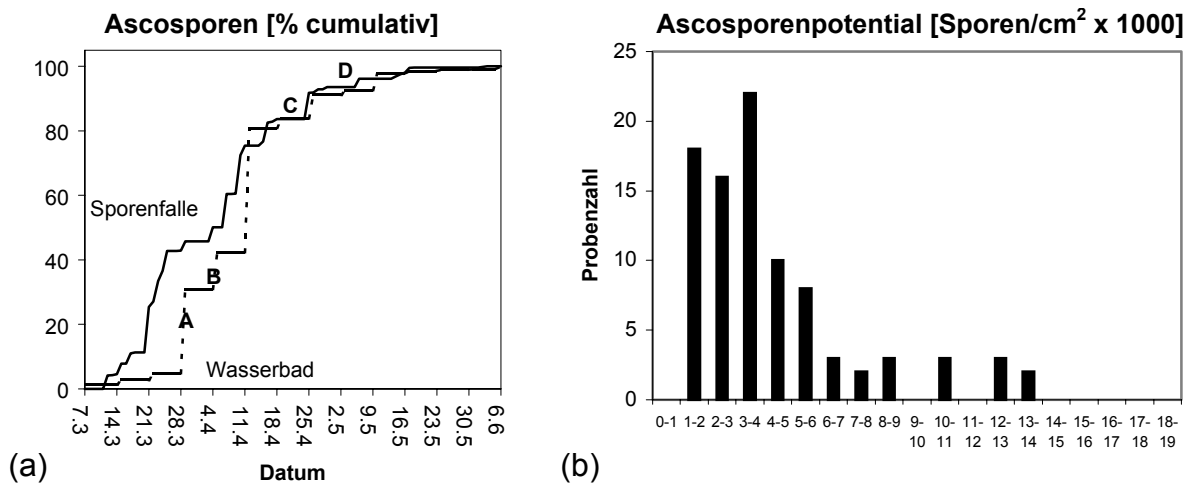
Im Frühjahr 2001 waren die überwinterten Apfelblätter verklebt, der Blattabbau weit fortgeschritten. Die mit der Wasserbadmethode bestimmte potentielle Ascosporenausschleuderung und die Ascosporenfänge mit den beiden volumetrischen Sporenfallen zeigten übereinstimmend den Reifungsverlauf der Ascosporen in den überwinterten Blättern während des Frühjahrs (**Abb. 27a**). Charge A wurde zu Beginn der exponentiellen Reifungsphase aus dem Freiland entnommen, zwischen den beiden Hauptsporenflugphasen dieser Saison (vgl. 3.3.1, **Abb. 32a**); die Entnahme der Charge B lag innerhalb der exponentiellen Reifungsphase (während der zweiten Hauptflugphase), Charge C wurde gegen Ende der exponentiellen Reifungsphase entnommen und besaß ein hohes Sporenpotential ( $1734/\text{cm}^2$ ). Zum Zeitpunkt der Entnahme der Charge D war das Ascosporenpotential im Freiland bereits weitgehend erschöpft. Eine dreiwöchige Lagerung von Blättern der Charge D bei  $20^\circ\text{C}$  und hoher Luftfeuchtigkeit brachte keine Steigerung des Ascosporenpotentials ( $270/\text{cm}^2$ ). Die Blätter der Charge D wurden daher nicht für Versuche verwendet. Der Reifungsgrad der Pseudothecien der Chargen A und B wurde durch drei verschiedene Lagerbedingungen unterschiedlich schnell gesteigert (**Tab. 11**). Vor Beginn der Lagerung lagen die Ascosporenzahlen beider Chargen bei  $400/\text{cm}^2$ .

**Tabelle 11:** Ascosporenreife in Abhängigkeit der Inkubationsart (Ascosporenzahl/ $\text{cm}^2$ ; Wasserbadmethode, 1 h schütteln). Freiland: Blätter waren allen Umwelteinflüssen außer Regen ausgesetzt.  $20^\circ\text{C}$ : Blätter wurden im Inkubator bei  $20^\circ\text{C}$  im Dunkeln und zwei verschiedenen Luftfeuchtigkeiten inkubiert.  $4^\circ\text{C}$ : Blätter wurden im Dunkeln gelagert. n. b. = nicht bestimmt.

Inkubationstage	Inkubationsbedingungen		
	Freiland [ $\text{cm}^2$ ]	$20^\circ\text{C}$ [ $\text{cm}^2$ ]	$4^\circ\text{C}$ [ $\text{cm}^2$ ]
4	590	765 (50 % rF)	790
11	420	300 (50 % rF)	1345
14	2760	800 (80 % rF)	n. b.
26	1620	2100 (80 % rF)	n. b.
39	n. b.	n. b.	3960

Die bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrten Blattstückchen wurden durch das feuchte Filterpapier im Deckel anhaltend feucht gehalten, während die bei Außentemperaturen und bei  $20^\circ\text{C}$  aufbewahrten Blätter schnell trockneten. Die Sporenzahlen bei  $4^\circ\text{C}$  Umgebungstemperatur stiegen am schnellsten, die Blätter im überdachten Freiland und bei  $20^\circ\text{C}$  entwickelten erst nach 2-3,5 Wochen hohe Ascosporenpotentiale. Eine deutliche Zunahme reifer Pseudothecien wurde bei der Inkubation bei  $20^\circ\text{C}$  erst nach Erhöhung der Luftfeuchtigkeit festgestellt.

Die Ascosporenpotentiale aus 90 Proben der Saison 2001 lagen nach drei Versuchsstunden mehrheitlich zwischen 1000 und 4000 Sporen/cm<sup>2</sup> (56 Blattproben). Keine Blattprobe zeigte ein Ascosporenpotential von weniger als 1000/cm<sup>2</sup>. 16 Proben hatten Ascosporenpotentiale über 6000/cm<sup>2</sup> (**Abb. 27b**).



**Abb. 27:** (a) Vergleich der cumulativen Werte der Ascosporenfänge mit den volumetrischen Sporenfallen in der Anlage und des Ascosporenpotentials (Wasserbadmethode) in der Primärsaison 2001. **A-D:** Entnahmetermine der überwinterten Blätter aus dem Freiland. (b) Verteilung der Ascosporenpotentiale (nach drei Versuchsstunden) von Proben der Saison 2001.

### 3.2.1.2 Primärsaison 2002

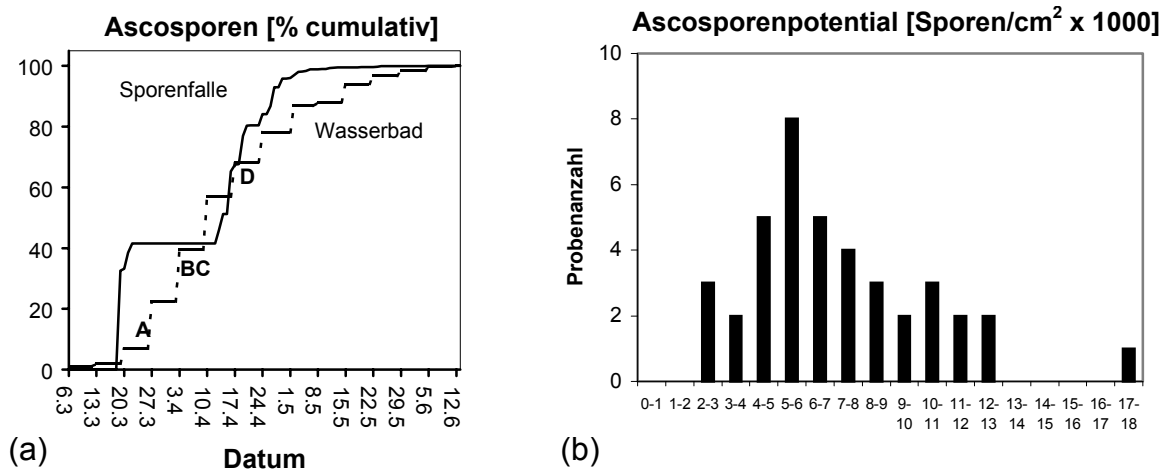
Die Blattqualität war im Frühjahr 2002 sehr gut, Blattabbau hatte kaum stattgefunden. Die vier Blattentnahmetermine lagen innerhalb der Hauptreifungsphase (**Abb. 28a**). Die ersten drei Termine (25.3.; 8.4. und 10. 4.) lagen im Anschluss an die stärkste Ascosporenenflugphase, während einer langen Trockenphase ohne Sporenflug, der Termin D (15.4.) lag nach dem Ende der Trockenphase und zwei Sporenflugtagen (vgl. 3.3.1, **Abb. 32b**). Nach 7-17 Tagen Inkubation im überdachten Freiland mit wiederholter Sprühbefeuchtung hatten alle vier Chargen hohe Ascosporenpotentiale ausgebildet (**Tab. 12**).

**Tabelle 12:** Steigerung der Ascosporenenreife (Ascosporenzahl/cm<sup>2</sup>; Wasserbadmethode, 1 h schütteln) durch 7-17 Tage Inkubation im überdachten Freiland mit wiederholter Sprühbenetzung.

Charge	VOR Inkubation [cm <sup>-2</sup> ]	NACH Inkubation [cm <sup>-2</sup> ]
A	1310	6690
B	2170	4820
C	2170	6420
D	1420	4510



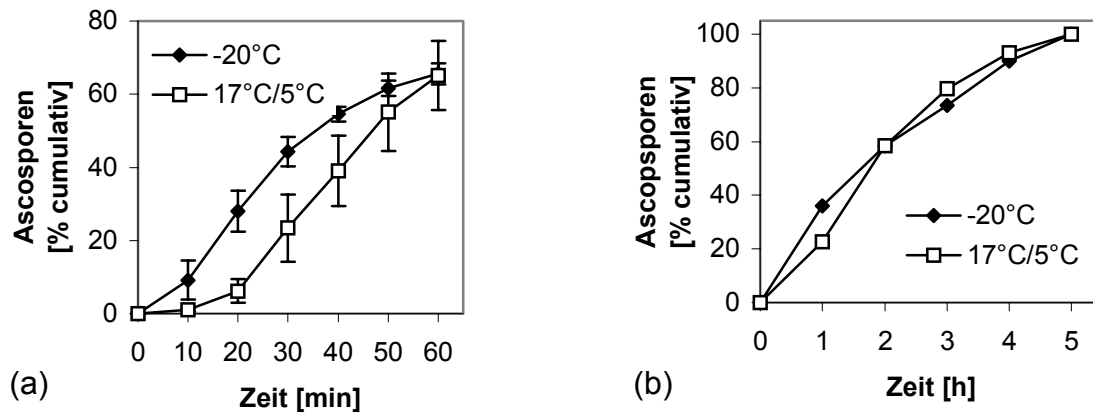
Die Ascosporenpotentiale aus 40 Blattproben der Saison 2002 lagen nach drei Versuchsstunden mehrheitlich zwischen 4000 und 7000 Sporen/cm<sup>2</sup> (18 Proben). Keine Probe lag unter 2000/cm<sup>2</sup> (**Abb. 28b**).



**Abb. 28:** (a) Vergleich der cumulativen Werte der Ascosporenfänge mit den volumetrischen Sporenfällen in der Anlage und des Ascosporenpotentials (Wasserbadmethode) in der Primärsaison 2002. **A-D:** Entnahmetermine der überwinterten Blätter aus dem Freiland. (b) Verteilung der Ascosporenpotentiale (nach drei Versuchsstunden) von Proben der Saison 2002.

### 3.2.2 Auswirkungen der Lagerbedingungen

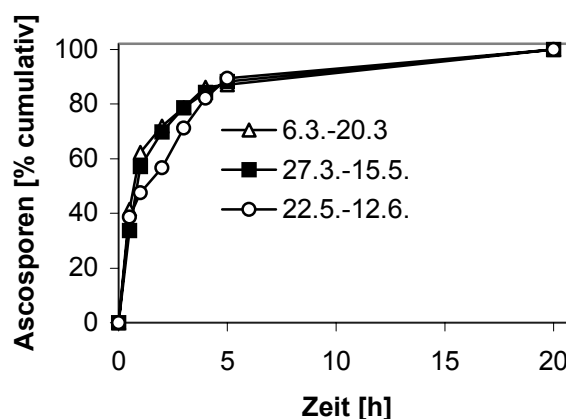
Blätter der Charge C (2001), die mit einem Ascosporenpotential von 1734/cm<sup>2</sup> bei -20°C bzw. -80°C eingefroren worden waren, wurden nach dem Auftauen mit der Wasserbadmethode getestet. Die Ascosporenzahlen lagen nach 1 h Ruhe gefolgt von 1 h schütteln bei 1180 ± 360/cm<sup>2</sup> cumulativ (-20°C) bzw. bei 710 ± 220/cm<sup>2</sup> cumulativ (-80°C). Die Ascosporenzahlen einer Ruhestunde betragen bei Blättern aus -20°C 10 % des Gesamtpotentials, bei Blättern aus -80°C 15 % des Gesamtpotentials. Der zeitliche Verlauf des Sporenausstoßes von Pseudothecien der Saison 2001 war nach acht Monaten trockener Aufbewahrung bei 4°C unverändert im Vergleich zu einer bei -20°C aufbewahrten Probe. Durch Lagerung bei 50 % Luftfeuchtigkeit mit Wechsellicht-Rhythmus und einem Wechseltemperatur-Rhythmus (Tagtemperatur 17°C, Nachttemperatur 5°C) war nach etwa 12 Wochen die Bereitschaft zur Ascosporenausschleuderung verändert. Der Sporenausstoß bei dauerhafter Reizung kam im Vergleich zu Blättern aus -20°C verzögert, war aber im Ausmaß nicht vermindert. Diese Verzögerung war bei Versuchen mit kurzen Probennahme-Abständen sichtbar (**Abb. 29a**). Bei Versuchen mit stündlicher Probennahme war der Unterschied nicht signifikant (**Abb. 29b**).



**Abb. 29:** Auswirkung der Aufbewahrung bei Wechseltemperatur (17°C/5°C) und 50 % rF im Vergleich zur Aufbewahrung bei -20°C. (a) Ascosporenausstoß (MW  $\pm$  SD aus vier Versuchen) während 60 min unter Schalldruckbehandlung (Sinus 5 Hz, 115 dB). (b) Ascosporenausstoß während 5 h schütteln (100 U/min).

### 3.2.3 Ascosporenreife und Ausschleuderbereitschaft im Saisonverlauf

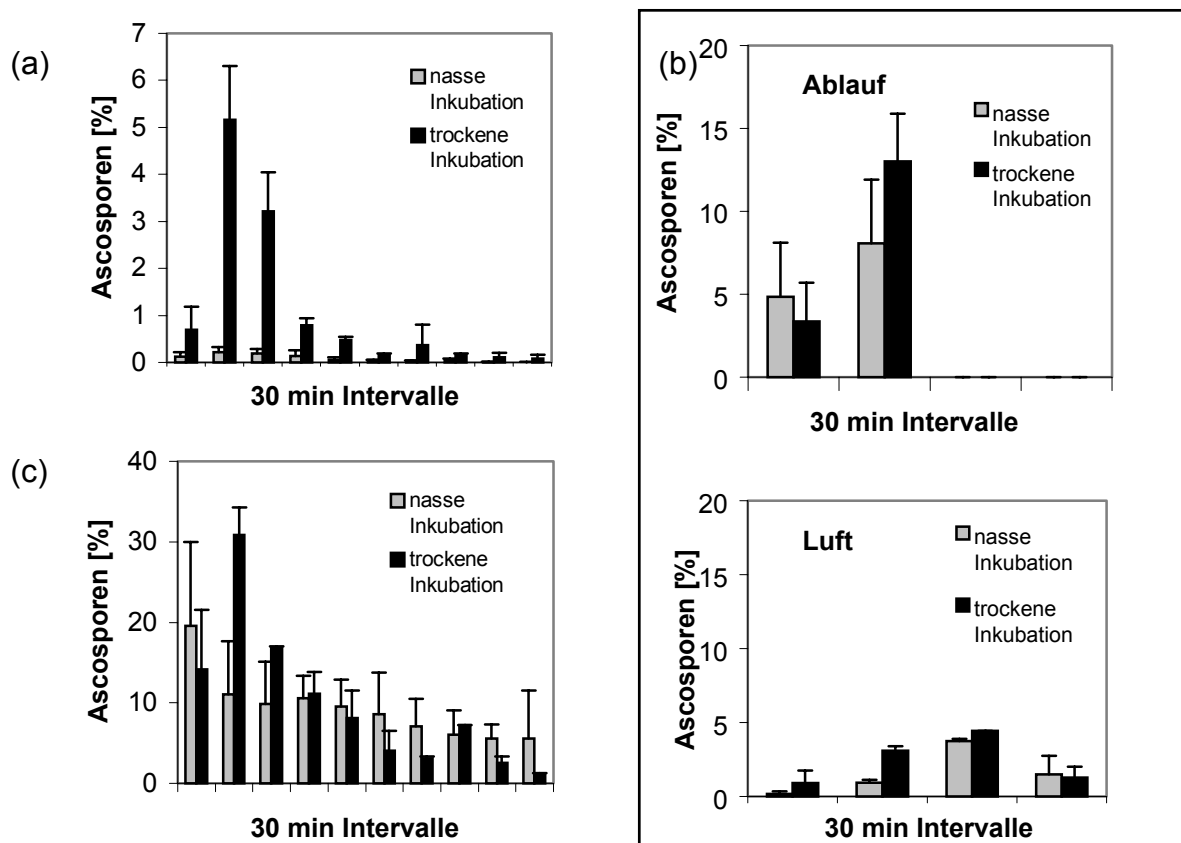
Der zeitliche Verlauf der Sporenemission veränderte sich während der Primärsaison 2002 nicht. An drei frühen Terminen (6./13./20. März) sowie den drei späten Terminen (22. Mai., 5./12. Juni), mit Sporenpotentialen von 100-600/cm<sup>2</sup>, wurde ein ähnlicher zeitlicher Verlauf im Vergleich zur Hauptsporensaison festgestellt (Sporenpotential 700-2200/cm<sup>2</sup>) (**Abb. 30**).



**Abb. 30:** Zeitlicher Verlauf des Ascosporenausstoßes während 20 h schütteln bei 100 U/min in Abhängigkeit der Probennahme-Termine. Wechsel der Badflüssigkeit nach 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 und 20 h. Mittelwerte der frühen, mittleren bzw. späten Termine.

### 3.2.4 Effekt der Proben-Konditionierung

Konditionierung führte zu stark vermindertem Sporenausstoß bei Befeuchtung durch Tauchen oder Tröpfchen. Wurden die Blätter trocken aufbewahrt (RT oder  $-20^{\circ}\text{C}$ ), verursachte die gleiche Benetzung bei Versuchsbeginn starken Sporenausstoß. Der zeitliche Verlauf beider Varianten war identisch (**Abb. 31 a-c**). Der Sporenausstoß nach der Tauchbenetzung streute sehr stark (vgl. 3.5.1, **Tab. 20b**), sie hatte aber keinen Einfluss auf den Sporenausstoß bei anschließenden Experimenten. Durch Tröpfchenbenetzung wurde mit konditionierten Blättern  $0,9 \pm 0,4$  % des GP erreicht (**Abb. 31a**). Mit trocken inkubierten Blättern wurden bei gleicher Benetzung  $11,2 \pm 1,4$  % erreicht. Tropfbenetzung hingegen induzierte starken Sporenausstoß in Luft- und Ablaufkompartiment gleichermaßen, ohne Unterschied, ob die Blätter trocken oder konditioniert waren. Nach einstündiger Tropfenbenetzung und einstündiger Ruhephase wurde mit trockenen Blättern  $26,1 \pm 5$  % und nach Konditionierung  $19,3 \pm 5,7$  % des Gesamtpotentials erhalten (**Abb. 31b**). Schütteln bei 100 U/min induzierte bei konditionierten und trocken aufbewahrten Blättern die gleiche Sporenmenge (**Abb. 31c**).

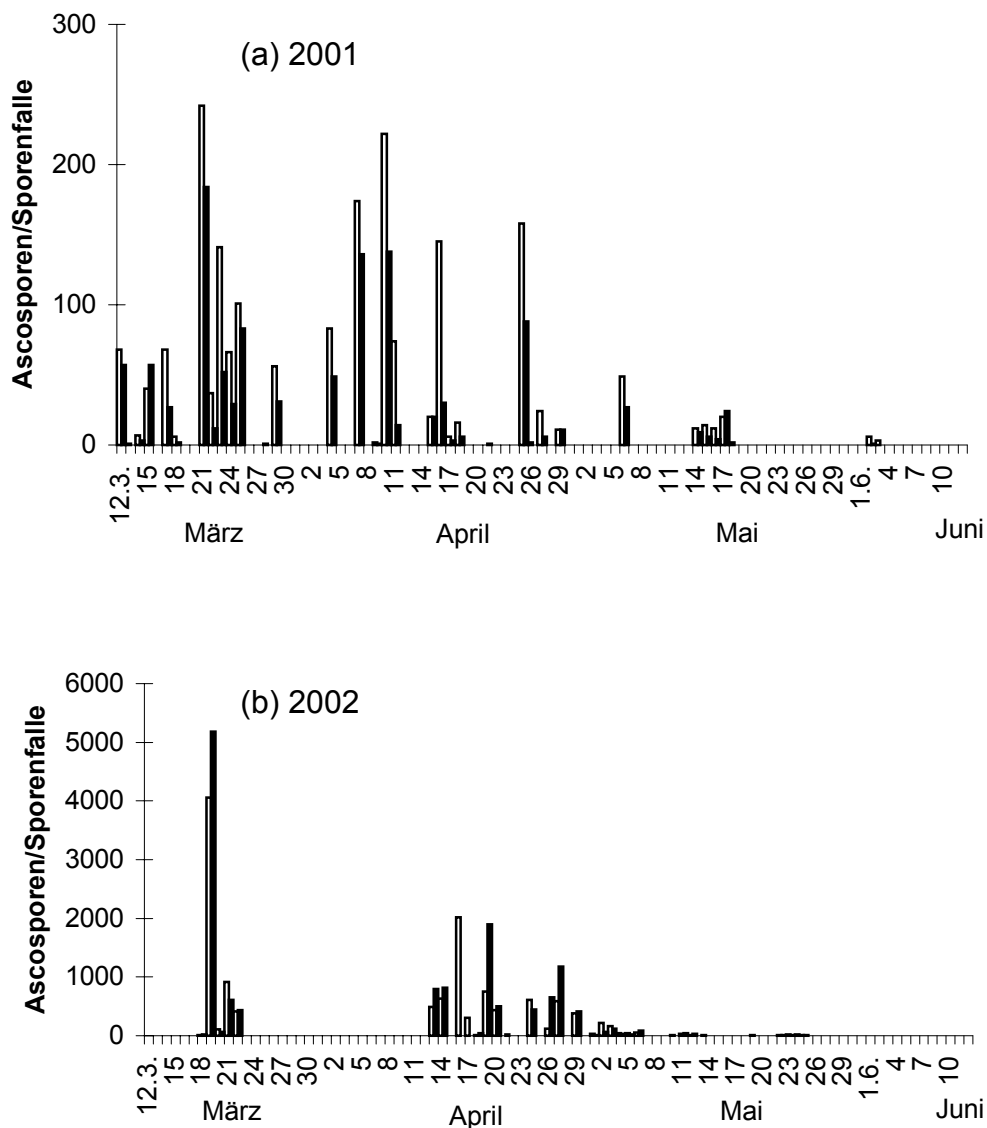


**Abb. 31:** Einfluss der Probenkonditionierung. Sporenausstoß aus konditionierten (nasse Inkubation) und trocken inkubierten Blättern bei **(a)** Tröpfchen- und **(b)** Tropfbefeuchtung (9,5 mm/h). **(c)** Schütteln bei 100 U/min.

### 3.3 Sporenemission im Freiland

#### 3.3.1 Primärsaison 2001 und 2002

Die Ascosporenflugphasen der beiden Primärsaisonen 2001 und 2002 sind in **Abb. 32** dargestellt. Im Frühjahr 2001 wurde an 32 Tagen Sporenflug gemessen. Der erste Sporenflug wurde am 12.3. verzeichnet, ab Ende April wurden nur noch sehr wenige Sporen im Freiland gefangen, der letzte Sporenflug wurde am 4.6. verzeichnet. In der Primärsaison 2002 gab es 34 Tage mit messbarem Ascosporenflug. Zwischen dem 18.3. und 22.3. 2002 wurde die erste Sporenflugphase aufgezeichnet, durch lange Trockenheit folgte erst wieder ab dem 13.4. Ascosporenflug. Im Mai und Juni wurde vergleichsweise geringer Sporenflug detektiert und der letzte Sporenflugtag war am 7.6. 2002.



**Abb. 32:** Ascosporenflugphasen 2001 und 2002, gemessen mit zwei volumetrischen Sporenfallen in der Versuchsanlage Dossenheim. Die Zahlenwerte bestehen aus der Summe der Tagesstundenwerte, die bei einer mikroskopischen (500 x) Querdurchsicht innerhalb eines Stundenintervalls gezählt wurden.

### 3.3.2 Einfluss der Regenstärke auf den Sporenausstoß

Von insgesamt 66 wurden 37 Sporenflugtage ausgewertet (16 Tage der Saison 2001, 21 Tage der Saison 2002; zu grafischen Darstellungen vgl. 7.3), davon wurden 22 Ereignisse durch Regenfälle am Tag ausgelöst (**Tab. 13**). Von diesen wurde an 14 Tagen sofort mit Regenbeginn Sporenflug aufgezeichnet, an vier bzw. einem Tag nach 1 h bzw. 3 h und an drei Tagen wurden erst nach über 3 h Sporen gefangen.

**Tabelle 13:** Sporenflugtage 2001 und 2002 mit Regenbeginn und Sporenflug bei Tageslicht. Niederschlagsmessungen der Wetterstation, Sporenflugaufzeichnung mit den Burkardsporenfallen.

Sporen- flug sofort bei Regen- beginn	Niederschlag nach 1 h [mm] (reine Regenzeit in min)	Sporen- flug <1h nach Regen- beginn	Niederschlag nach 1 h [mm] (reine Regenzeit in min)	Sporen- flug <3h nach Regen- beginn	Niederschlag nach 3 h [mm] (reine Regenzeit in min)	Sporen- flug nach >3h nach Regen- beginn	Niederschlag nach 3 h [mm] (reine Regenzeit in min)
24.3.01	0,7 (30)	29.3.01	0,7 (20)	16.4.01	1 (30)	12.3.01	4,8 (135)
25.3.01	2 (30)	13.4.02	0,2 (10)			23.3.01	1,5 (60)
4.4.01	3 (20)	29.4.02	0,3 (15)			25.4.01	1,2 (35)
7.4.01	0,1 (5)	6.5.02	1,4 (55)				
6.5.01	0,8 (40)						
20.3.02	0,8 (15)						
21.3.02	0,4 (20)						
22.3.02	2 (60)						
18.4.02	0,5 (20)						
19.4.02	0,2 (5)						
20.4.02	0,1 (5)						
26.4.02	2,6 (55)						
27.4.02	1,3 (20)						
11.5.02	0,7 (15)						

Bei Sporenflug innerhalb 1 h nach Regenbeginn lagen die Temperaturen an 13 Tagen über 10°C (24./25./29.3.01; 4./7.4.01; 20./21.3.02; 19./20./26./27.4.02; 6./11.5.02) und an fünf Tagen unter 10°C (6.5.01; 22.3.02; 13./18./29.4.02). War der Sporenflug 3 h oder länger nach Regenbeginn verzögert, lagen die Temperaturen in zwei Fällen über 10°C (12.3.01; 25.4.01), an zwei Tagen nur wenig unter 10°C (23.3.01; 16.4.01). An den meisten Regentagen war eine typische zeitliche Verteilung des Ascosporenflugs zu beobachten: am Morgen stieg die Sporenzahl an und erreichte bis zum Mittag ein Maximum, um danach bis zum Sonnenuntergang zurückzufallen. In einigen Fällen konnte am Nachmittag, 5-10 h nach Sporenflugbeginn, ein schwacher zweiter Anstieg registriert werden (10.4.01; 21.3.02; 14./16./17./27.4.02; 2./4.5.02). Diese Muster wurden an Tagen mit durchgehendem Regen und unterbrochenem Regen gleichermaßen beobachtet. An

vier Tagen (25.3.01; 7.4.01; 19./20.4.02) regnete es während der Nacht und nach einer Pause erneut gegen 12:00. Die Blattnässe wurde an diesen vier Tagen um 9:00, 10:00 oder 12:00 unterbrochen. Regenereignisse gegen Mittag lösten starken Sporenausstoß noch vor erneutem Blattnässebeginn bzw. ohne folgende Blattnässe aus. Am 20.4.02 begann der Sporenflug schon am Vormittag und stieg zeitgleich mit dem mittäglichen Regen stark an. Am 19. und 20.4.02 wurde durch erneuten Regen am Nachmittag (2,2 mm bzw. 2 mm) ein zweiter Sporenpeak ausgelöst, der am 19.4.02 stärker war als der erste. Am 22.3.02 (**Tab. 13**) und 3.5.02 (**Tab. 15**) wurde ebenfalls ein erneuter Anstieg der Sporenemission am Nachmittag beobachtet, der mit erneutem oder verstärktem Niederschlag (0,5 mm bzw. 17,5 mm) zusammenhing. Die Blattnässe an diesen Tagen war gar nicht bzw. nur kurz unterbrochen. Mit dem selbst entwickelten Regensensor für kinetische Energie (vgl. 2.1.1.2, **Abb. 5**) wurden zwei Regenereignisse erfasst, die zur Emission signifikanter Sporenzahlen führten. Am 25.4.01 zeichnete der Regensensor zwischen 9:15 und 10:00 ein kurzes Regenereignis (1,2 mm cumulativ) und eine weitere Regenphase zwischen 12:00 und 15:00 (3,4 mm) auf. Bereits zwischen 5:45 und 6:15 (kurz nach Sonnenaufgang) wurde von der Wetterstation 1 mm Regen aufgezeichnet. Der Sporenausstoß begann an diesem Tag erst gegen 12:00, obwohl seit 3:00 in der Nacht Blattnässe herrschte. Ein besonders heftiger Regenschauer am 4.4.01 (3 mm in 20 min) wurde ebenfalls durch den Regensensor für kinetische Energie (**Abb. 5**) erfasst. Blattnässe und Sporenflug setzten sofort ein. Auch die weiteren schwachen Regenfälle im Verlauf des Nachmittags wurden von dem Sensor für kinetische Energie erfasst, verlängerten den Sporenflug aber nicht.

In der Saison 2001 wurden zwei, 2002 sechs Tauperioden mit Temperaturen zwischen 5 und 10°C registriert, an diesen Tagen wurde kein Sporenflug gemessen (1.4.01; 2.5.01; 17.3.02; 25.4.02; 13./16./20./26.5.02). In der Saison 2001 wurde an sechs Tagen Regen ohne Sporenflug registriert, 2002 an einem Tag (**Tab. 14**).

**Tabelle 14:** Regenereignisse 2001 und 2002 bei Tag, die nicht zu Sporenflug führten. Niederschlagsmessung der Wetterstation, Blattnässe- und Temperaturlaufzeichnung des Schorfwarngerätes. Die Temperaturangaben zeigen Durchschnittswerte für den Messzeitraum.

Datum (Uhrzeit)	Niederschlag [mm]	Blattnässe [Uhrzeit]	Temperatur [°C]
28.3.01 (6:05)	0,1	6:00 - 8:00	2
30.3.01 (8:40 und 13:35)	jeweils 0,1	9:00 - 10:00	6
3.4.01 (5:45 – 5:50)	1,4	5:00 - 8:00	12
21.4.01 (16:00-23:00)	3,1	16:00 - 24:00	5
22.4.01 (12:10)	0,1	----	9
28.4.01 (7:45 und 13:05)	jeweils 0,1	----	10
1.5.02 (6:50-9:20)	1	7:00 - 12:00	10

### 3.3.3 Sporenemission bei Dunkelheit

In der Primärsaison 2001 begann in fünf von sechs Fällen mit nächtlichen Regenereignissen (**Tab. 15**; vgl. 7.3) die Sporenemission zwischen 9:00 und 12:00 am Vormittag. Am 17.5.01 wurden 2 Sporen (8,3 % des Tagesgesamtwertes 24) zwischen 0:00 und 4:00 gezählt. Der cumulative Ascosporenausstoß an den übrigen fünf Tagen mit nächtlichen Regenereignissen in 2001 betrug 27 Sporen am 17.3.01, 20 am 15.4.01 und 53, 184 bzw. 138 Sporen am 15.3., 21.3. und 10.4.01. Die Sporenemission bei Dunkelheit während der Primärsaison 2002 betrug 4,8 % des jährlichen Ascosporenpotentials. An einem Tag mit nächtlichem Regen wurden erst nach Tagesanbruch Ascosporen in der Luft gefangen (12.5.02, 35 Ascosporen cumulativ). An zwei Tagen begann der Regen zwischen 1:00 und 2:00 in der Nacht (16./24.4.02) und wurde sofort von schwachem Sporenausstoß gefolgt, der bei Sonnenaufgang stark anstieg. Cumulativ wurden am 16.4.02 2017 Ascosporen gefangen, davon 99 (4,9 % des Tagesgesamtwertes) vor Sonnenaufgang. Am 24.4.02 wurden 452 Ascosporen gefangen, davon 5 (1,1 % des Tagesgesamtwertes) vor Sonnenaufgang. An den übrigen Tagen setzte der Regen bereits am Vorabend ein. In der Nacht zum 19.3.02 (**Tab. 15**) wurden 3,6 mm zwischen 20:30 (2 h nach Sonnenuntergang) und 0:30 gemessen und 8,1 mm zwischen 4:30-7:30. Cumulativ wurden am 18./19.3.02 5198 Sporen gefangen, davon 20 (0,4 % des Tagesgesamtwertes) zwischen 21:00 und 3:00. Starke Sporenemission wurde bei Sonnenaufgang gemessen. Eine ähnliche Situation trat am 18./19.4.02 (**Tab. 13**) auf: kurzer Regen bei Sonnenuntergang löste schwachen Sporenausstoß aus (21 Sporen bis 4:00, entsprechend 1,1 % des Tagesgesamtwertes). Bei Regenfällen, die am Tag begannen und sich bis in die Nacht fortsetzten, wurde nachts ein Rückgang der Sporenemission mit wiederholtem Anstieg beobachtet, wenn es am anderen Morgen noch bzw. wieder regnete (**Tab. 15**). Bei stetigem Regen in der Nacht auf den 14.4.02 wurden zwischen 0:00 und Sonnenaufgang 20 Sporen (2,5 % des Tagesgesamtwertes) gefangen. Vom 16. auf den 17.4.02 wurden zwischen 0:00 und Sonnenaufgang 18 Sporen gefangen (5,9 % des Tagesgesamtwertes). Der Niederschlag am Abend des 26.4.02 (**Tab. 13**) (1,4 mm zwischen 21:45 und 0:00) bewirkte in der Nacht auf den 27.4.02 Sporenausstoß, es wurden 19 Sporen (0,9 % des Tagesgesamtwertes) zwischen 23:00 und 7:00 gefangen. Die Tage mit nächtlicher Sporenemission lagen in der exponentiellen Reifungsphase der Pseudothecien und es waren im Freiland bis zum 27.4.02 86,8 % der jährlichen Ascosporen zum Ausstoß gekommen. Während einer langen Regenperiode zwischen dem 1. und 5.5.02 wurden 8 Sporen (3,7 %) während der Nachtstunden gezählt (cumulativ 215 Sporen während der Regenperiode). Zu diesem Zeitpunkt waren bereits mehr als 95 % der Ascosporen freigesetzt worden.

**Tabelle 15:** Regenereignisse in den Nachtstunden, die zu Sporenausstoß führten. Niederschlagsmessung der Wetterstation, Temperaturaufzeichnung des Schorfwarngerätes. Die Temperaturangaben zeigen Durchschnittswerte für den Messzeitraum.

Datum (Uhrzeit)	Niederschlag [mm]	Temperatur [°C]
14./15.3.01 (21:30 - 7:00)	8,9	6
17.3.01 (4:45 - 7:00)	2,1	9
21.3.01 (5:25 - 7:00)	2,0	2
9./10.4.01 (16:45 - 7:00)	9,6	8
15.4.01 (1:45 - 7:00)	8,5	0
16./17.5.01 (23:10 - 7:00)	13,4	14
19.3.02 (4:00-7:00)	8,1	10
13./14.4.02 (15:50 - 7:00)	7,0	7
16.4.02 (1:20 - 7:00)	6,9	5
16./17.4.02 (19:00 - 7:00)	9,3	6
24.4.02 (1:55 - 7:00)	1	11
1./2.5. 02 (19:35 - 7:00)	11,8	9
2./3.5.02 (19:20 - 7:00)	5	9
3./4.5.02 (23:20 - 7:00)	1,9	7,5
12.5.02 (0:00 - 7:00)	0,3	13

### 3.3.4 Detailanalyse von Regeneffekten

Bei Regenereignissen im Freiland (Ereignisse I-VI, **Tab. 16**; vgl. 7.2, **Abb. 7.6-7.11**) wurde der Sporenausstoß in die Luft- und Wasserkompartimente analysiert (vgl. 2.5.3.2.1). Bei starkem Regen bildete sich innerhalb von 5 min ein dicker Wasserfilm, aber die Blätter waren in der Regel erst 15-30 min nach Regenbeginn vollkommen durchnässt. Die ersten Sporen wurden frühestens mit Beginn der Blattnässe registriert, kamen in manchen Fällen aber ein bis zwei Stunden verzögert. Am Tag mit den tiefsten Temperaturen war der Sporenflugbeginn am längsten verzögert (Ereignis IV). Die Sporenemission in die Luft steigerte sich immer erst im Verlauf der folgenden ein bis zwei Stunden auf ein Maximum. Sporenausstoß wurde auch bei Ereignis III registriert, bei dem die Blätter während des gesamten Versuches ohne glänzenden Wasserfilm blieben. Die Regenereignisse waren unterschiedlich in ihrer Intensität und Dauer (**Tab. 16**), die cumulativen Ascosporenwerte im Luftkompartiment waren einheitlicher, mit Ausnahme von Regenereignis V. Lang anhaltender Regen löste lang anhaltenden Sporenflug aus (Ereignis I, IV). Nach kurzen Regenphasen verzögerte sich der Beginn des Sporenausstoßes bis zur anschließenden Trockenperiode (Ereignis II, V, VI), während der Wasserglanz von der Blattoberfläche langsam verschwand, aber das Innere durchfeuchtet blieb (Benetzungsgrad 1: matt). Die Blattnässe und der Sporenausstoß gingen anschließend bei Ereignis V auf Null zurück, es folgte kein Regen mehr an diesem Tag. An den Tagen II und VI trockneten die Blätter an der Oberfläche, wurden hell



aber nicht brüchig, als der Sporenausstoß durch Regen erneut ausgelöst wurde. Bei starkem Regen aufgefangene Ablaufproben enthielten immer Ascosporen, auch bevor Sporenausstoß in der Luft gemessen wurde. Der Sporengehalt im Ablaufwasser war bei diesen Bedingungen etwa doppelt so hoch wie in der Luft (Ereignis IV, V, VI). Bei schwachem Regen war der Sporengehalt im Ablaufwasser hingegen gering (Ereignis I, II). Das Spritzwasser enthielt im Vergleich zum Luftkompartiment geringere oder vergleichbare Sporenanteile. Die Schreiberdaten des Regensensors für kinetische Energie (vgl. 3.1.1.2) verzeichneten bei Ereignis II einen kurzen Regenabschnitt zwischen 11:48 und 12:41, der zu einem Wasserfilm auf den Blättern und geringer Stimulation der Sporenemission führte, aber von der Kippwaage nicht erfasst wurde. Der Regensensor erfasste an zwei Tagen den Beginn des Regens früher als die Kippwaage. Bei Ereignis IV zeigte der Regensensor bereits ab 9:46 Regen an, die Kippwaage erst ab 10:53. Bei Ereignis VI zeichnete der Regensensor ab 12:33, die Kippwaage aber erst ab 13:00 auf.

**Tabelle 16:** Ascosporenausstoß in Luft- und Wasserkompartimente (in Prozent des GP) bei sechs Regenereignissen in 2002. Niederschlagsmessung der Wetterstation, Temperaturoaufzeichnung des Schorfwarngerätes. Die Temperaturangaben zeigen die Durchschnittswerte für den Versuchszeitraum. Grafische Darstellung vgl. 7.2, Abb. 7.6-7.11.

Ereignis	I	II	III	IV	V	VI
<b>Start-Ende</b>	12:50-15:37	08:08-16:09	09:19-13:45	09:46-15:58	11:14-15:03	07:47-15:31
<b>Dauer [h:min]</b>	02:47	08:00	04:26	06:12	03:48	07:44
<b>T [°C]</b>	13	11	11,5	4	11	8,5
<b>NS [mm] (Wetterstation)</b>	0,7	0,6	0,1	4,2	0,4	0,9
<b>Regenart</b>	gleich- mäßiger Regen	Nieselregen (2 Regen- phasen) 8:23 - 9:11	extrem fein, unregelmäßig	starker, gleich- mäßiger Regen	starker, kurzer Schauer	Prasselregen (2 Regen- phasen)
<b>Wasserfilm<sup>1</sup></b>	ab 13:20	12:09-12:41 ab 14:00	---	10:00-15:58	11:20-13:43	7:53-10:26 12:50-15:31
<b>Sporenflugbeginn</b>	13:54	08:39	10:37	11:43	11:46	08:02
<b>Sporen cum.<sup>2</sup> [%]</b>	14	13,3	5,7	23,6	2,2	19,4
<b>Luft [%]</b>	6,8	10,8	5,7	7,2	0,7	4,3
<b>Spritzwasser [%]</b>	6,5	1,2	0	2,9	0,3	3,5
<b>Ablaufwasser [%]</b>	0,7	1,3	0	13,5	1,2	11,6
<b>GP [cm<sup>-2</sup>]</b>	7541	7904	7980	10194	7341	12723

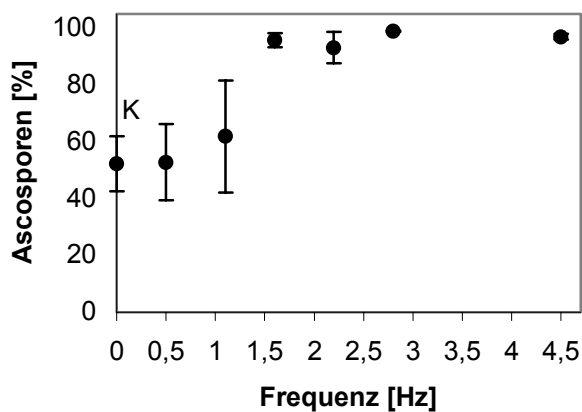
<sup>1</sup> Wasserfilm = Benetzungsgrad 3 (visuelle Einschätzung)

<sup>2</sup> cumulative Sporenmenge in Luft- und Wasserkompartimenten

### 3.4 Wasserströmung als kinetischer Reiz

#### 3.4.1 Wasserbadmethode

Die Effekte der beiden niedrigsten Schwenkfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle. Ab 100 U/min (1,6 Hz) konnte durch eine Erhöhung der Frequenz keine Steigerung des Effektes bewirkt werden (**Abb. 33**). Der Hauptsporenausstoß wurde bei jeder Frequenz während der ersten beiden Stunden gemessen. Bei Frequenzen unter 1,6 Hz wurde danach ein Rückgang der Ascosporenemission beobachtet, während sie ab 1,6 Hz für weitere 2 h auf einem hohen Niveau blieb. Nach 5 h schütteln mit der Frequenz 100 U/min (1,6 Hz) wurde während der nächsten 15 h kaum noch Sporenzuwachs gemessen (vgl. 3.2.3, **Abb. 30**).



**Abb. 33:** Wasserbadmethode. Cumulativer Ascosporenausstoß nach 5 h (in Prozent des GP) in Abhängigkeit von der Schwenkfrequenz. K: nicht geschüttelte Negativkontrolle.

#### 3.4.2 Strömungskanal

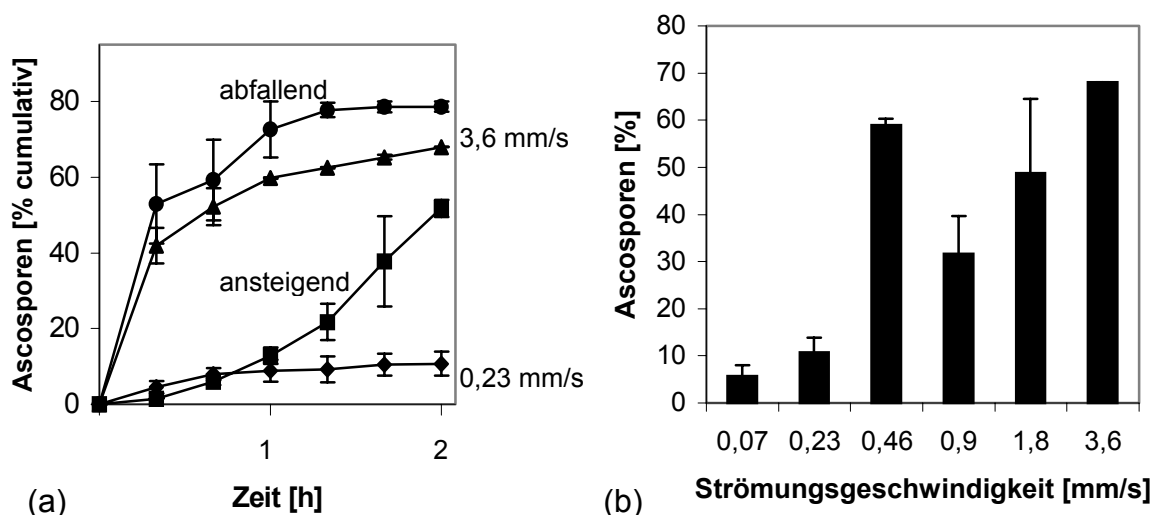
##### 3.4.2.1 Lineare Strömung: Effekt der Strömungsgeschwindigkeit

In allen Versuchen mit konstanter Geschwindigkeit war der Sporenausstoß in der ersten Versuchsstunde wesentlich stärker als in der zweiten Stunde. Das Verhältnis der Sporenzahlen zwischen erster und zweiter Versuchsstunde lag zwischen 2:1 und 8:1 (**Tab. 17**). Wurde während eines Versuches die Geschwindigkeit von Intervall zu Intervall um eine Stufe erhöht, so wurde der Sporenausstoß in jedem Intervall stärker. In der zweiten Stunde wurde ein höherer Wert erreicht, als in der ersten Stunde (Verhältnis ca. 1:3). Bei abfallender Strömungsgeschwindigkeit innerhalb eines Versuches war die Abflachung der Zeitverlaufskurve in der zweiten Versuchsstunde stärker als bei einem Versuch mit gleichbleibender Geschwindigkeit (**Abb. 34a**). Der cumulative Sporenausstoß nach 2 h mit konstanter Geschwindigkeit war bei der Strömungsgeschwindigkeit 0,46 mm/s vergleichbar mit der erreichten Sporenzahl bei der höchsten Strömungsgeschwindigkeit 3,6 mm/s. Der Sporenteil von ca. 70 % nach 2 h Strömung lag knapp unter dem maximal erreichbaren

Sporenausstoß mit 84 %, der durch eine bei gleichen Probenintervallen bei 100 U/min geschüttelte Probe erreicht wurde. Die übrigen Ergebnisse zeigten eine Abhängigkeit des Sporenausstoßes von der Geschwindigkeit (**Abb. 34b**). Eine Strömungsgeschwindigkeit unter 0,23 mm/s regte keinen signifikanten Sporenausstoß an.

**Tabelle 17:** Lineare Strömungen. Sporenanteile (in Prozent des GP) in der ersten und zweiten Versuchsstunde bei konstanter, ansteigender oder rückgehender Geschwindigkeit. Einzelwerte aus zwei bzw. drei Versuchen.

Strömungsgeschwindigkeit [mm/s]	Sporenanteil 1. Stunde [%]	Sporenanteil 2. Stunde [%]
0,07	4,1	2,7
	2,0	1,0
	6,8	0,5
0,23	6,8	1,7
	10,9	2,0
0,46	51,6	10,2
	49,7	7,5
0,9	29,9	7,5
	21,0	5,1
1,8	43,9	16,0
	30,9	6,8
3,6	59,6	8,4
	59,9	8,0
Geschwindigkeitsanstieg	11,3	39,0
	14,3	39,2
Geschwindigkeitsrückgang	77,9	1,8
	67,4	10,3



**Abb. 34:** Lineare Strömungen. Ascosporen in Prozent des GP (MW  $\pm$  SD aus je zwei bzw. drei Versuchen, vgl. **Tab. 17**). **(a)** Zeitlicher Verlauf des Sporenausstoßes während 2 h Strömung mit konstanter, ansteigender oder rückgehender Geschwindigkeit. **(b)** Ascosporenausstoß (nach 2 h) in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit.

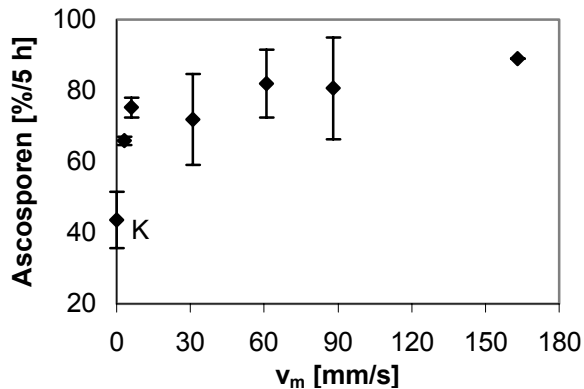
### 3.4.2.2 Oszillierende Strömung: Einfluss von Frequenz und Auslenkung

Beide Kombinationen aus Frequenz und Auslenkung der Durchschnittsgeschwindigkeit 163/153 mm/s bewirkten eine heftige Wasserbewegung und starken cumulativen Sporenausstoß, vergleichbar mit dem einer bei 100 U/min geschüttelten Probe (**Tab. 18**). Bei den Durchschnittsgeschwindigkeiten 90, 60 bzw. 16 mm/s betrug der cumulative Sporenausstoß nach 5 h zwischen 70 und 82,6 % und war ebenfalls unabhängig von der Kombinationsvariante von Frequenz und Auslenkung. Es war kein signifikanter Unterschied der Sporenzahlen zwischen den Durchschnittsgeschwindigkeiten 60, 90 und 153/163 mm/s zu erkennen, jedoch war eine Tendenz zu höherem Sporenausstoß bei höherer Geschwindigkeit sichtbar (**Tab. 18**). Es gab keine Unterscheidung in der Wirkung, die durch hohe Frequenz/kleine Amplitude oder niedrige Frequenz/große Amplitude hervorgerufen wurden (**Tab. 18**).

**Tabelle 18:** Oszillierende Strömungen, erzeugt durch unterschiedliche Kombinationen aus Frequenz und Auslenkung. Ascosporenausstoß nach 5 h (in Prozent des GP) in Abhängigkeit von der Durchschnittsgeschwindigkeit ( $v_m$ ).

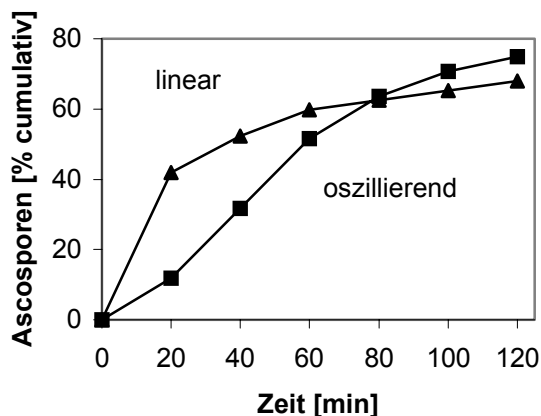
$v_m$ [mm/s]	Auslenkung [mm]	Frequenz [Hz]	Ascosporenausstoß [%/5 h]
16	0,95	8,3	70 ± 0,3
	0,48	17	78,2 ± 1,1
60	9	3,4	81,9 ± 9,5
	4,5	6,5	82,6
90	13	3,4	80,7 ± 14,4
	9	5	81,4 ± 2,8
	4,5	10	72,8 ± 14,7
163/153	24	3,4	89
	4,5	17	95,4
Schüttelkontrolle			96,4 ± 0,8

Bei einer konstanten Frequenz von 3,4 Hz wurden durch Variation der Auslenkung sechs verschiedene Durchschnittsgeschwindigkeiten zwischen 3 und 163 mm/s erzeugt. Alle Geschwindigkeiten zeigten eine nicht signifikant unterscheidbare, starke Induktion der Sporenemission (**Abb. 35**). Eine Kontrolle ohne Strömungsbehandlung zeigte einen deutlichen, aber im Vergleich mit den Strömungsproben geringeren Sporenausstoß (**Abb. 35**).



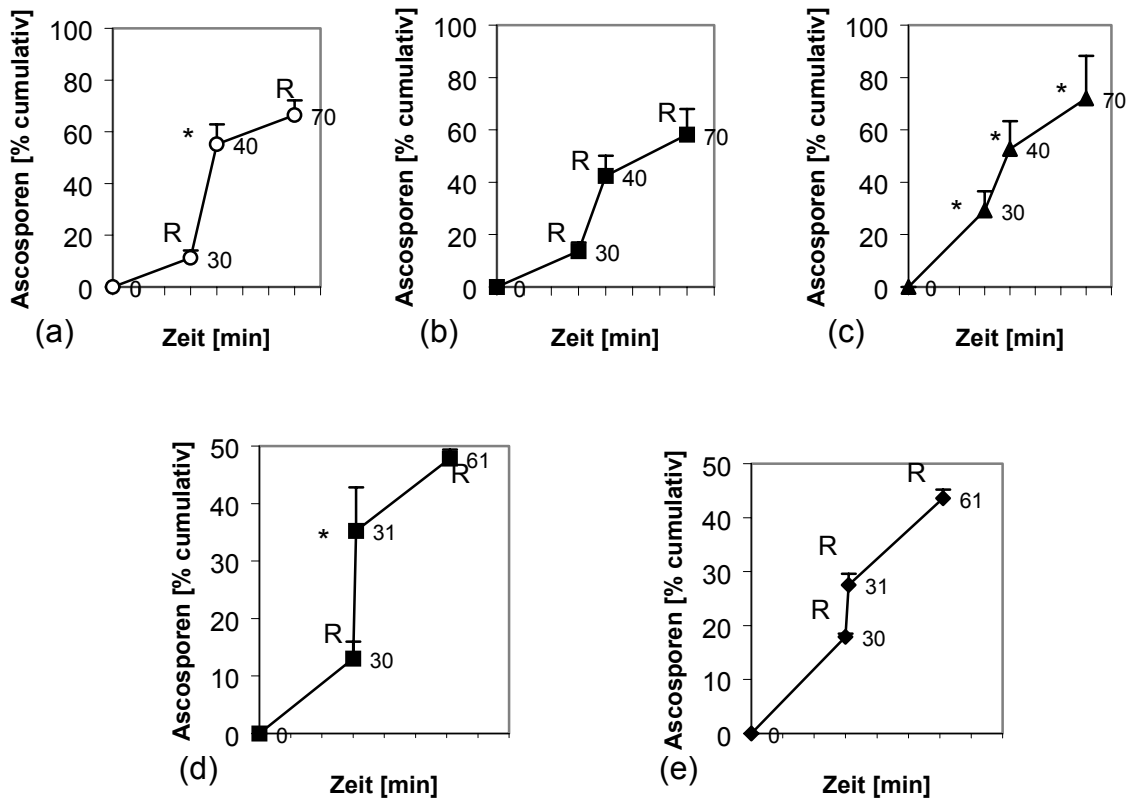
**Abb. 35:** Oszillierende Strömungen. Abhängigkeit des Sporenausstoßes von der Durchschnittsgeschwindigkeit ( $v_m$ ) bei der Frequenz 3,4 Hz. Ascosporen cumulativ nach 5 h in Prozent des GP. K: ohne Strömung behandelte Kontrolle.

Versuche mit stündlich ansteigender bzw. abfallender Geschwindigkeit zeigten im zeitlichen Verlauf des Sporenausstoßes keinen Unterschied zu Versuchen mit konstanter Geschwindigkeit. Lineare und oszillierende Strömung bewirkten bei gleicher Geschwindigkeit (3 mm/s) gleichen Sporenausstoß (**Abb. 36**).



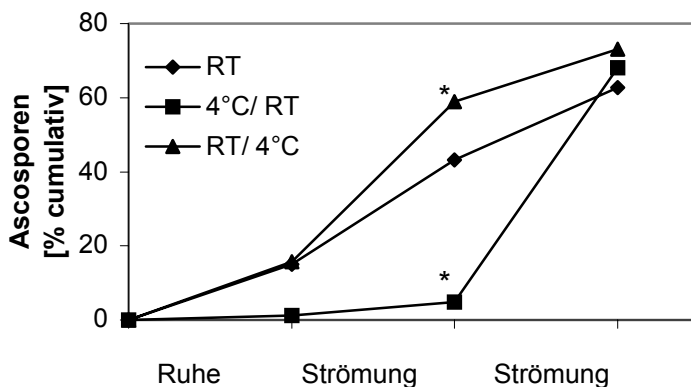
**Abb. 36:** Strömungskanal. 2 h lineare bzw. oszillierende Strömung mit gleicher Geschwindigkeit (3 mm/s), Ascosporen cumulativ in Prozent des GP. MW aus zwei Versuchen.

Mit der Apparatur zur Erzeugung oszillierender Strömung durchgeführte Negativkontrollen ohne Strömungsbehandlung zeigten bei Probenintervallen von 10 oder 20 min keinen geringeren Sporenausstoß als die jeweiligen Strömungsversuche. Wurde nur eines von sechs Intervallen innerhalb einer Stunde mit Strömung behandelt, wies dieses Intervall keinen höheren Sporenausstoß auf als die fünf Ruheintervalle. Bei reduzierter Anzahl der Wasserwechsel wurde ein 10-minütiges Strömungsintervall von je zwei 30-minütigen Ruheabschnitten flankiert (**Abb. 37**). Wurde nur der intermediäre Abschnitt mit Strömung behandelt, so war der Sporenausstoß hier zwar deutlich stärker als in den beiden flankierenden unbehandelten Abschnitten, doch es bestand kein signifikanter Unterschied zu einer unbehandelten Kontrolle (**Abb. 37a, b**). Wurden alle drei Abschnitte mit der gleichen Strömung behandelt, so ergab sich ein abgestufter Rückgang des Sporenausstoßes von Intervall zu Intervall (**Abb. 37c**). Das gleiche Ergebnis wurde mit einem 1-minütigen intermediären Intervall zwischen zwei flankierenden 30-minütigen Intervallen erreicht (**Abb. 37d, e**).



**Abb. 37:** Oszillierende Strömung ( $v_m = 163 \text{ mm/s}$ ). Ascosporenausstoß in Abhängigkeit von der Strömungsdauer. **(a)** 10 min Strömungsintervall (\*), flankiert von zwei Ruheintervallen (R). **(b)** Drei Ruheintervalle (R). **(c)** Drei Strömungsintervalle (\*). **(d)** 1 min Strömungsintervall (\*), flankiert von zwei Ruheintervallen (R). **(e)** Drei Ruheintervalle (R). Ascosporen in Prozent des GP. Datenbeschriftung: Minutenangaben.

Durch tiefe Temperaturen wurde der Sporenausstoß eingeschränkt. Nach einer Strömungsbehandlung der Blätter bei  $4^\circ\text{C}$ , gefolgt von einer Stunde Strömung bei RT ( $v_m = 31 \text{ mm/s}$ ), steigerte sich der Sporenausstoß in einem Versuch um das 18-fache, von 3,6 % ( $4^\circ\text{C}$ ) auf 63,3 % (RT) (**Abb. 38**). Eine durchgängig bei RT behandelte Probe erreichte in der ersten Strömungsstunde 28,1 % und in der zweiten Stunde 19,5 %. Der Hemmeffekt durch tiefe Temperatur war nicht mehr erkennbar, nachdem bereits die Hälfte des Ascosporenpotentials ausgeschleudert worden war (**Abb. 38**).

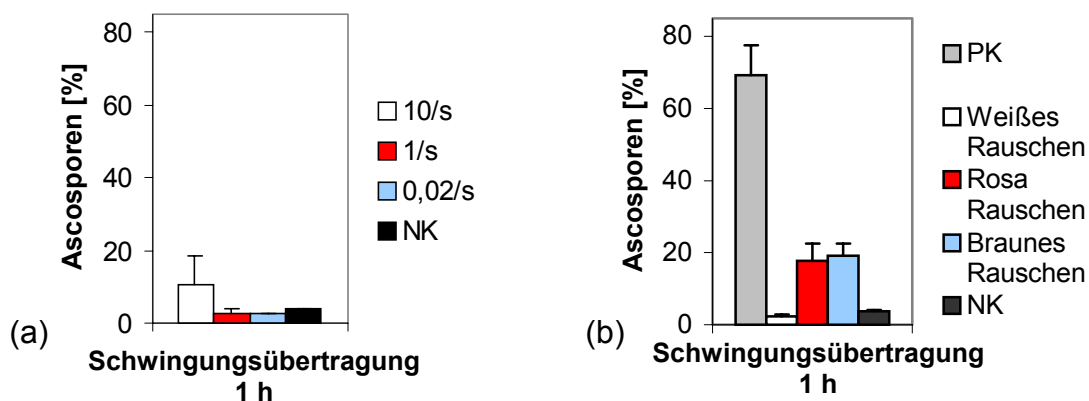


**Abb. 38:** Ascosporenausstoß (in Prozent des GP) in Abhängigkeit von der Temperatur. 1 h Ruhe, 2 h oszillierende Strömung ( $v_m = 31 \text{ mm/s}$ ). Temperaturwechsel (\*) nach der zweiten Stunde von  $4^\circ\text{C}$  auf Raumtemperatur ( $4^\circ\text{C}/\text{RT}$ ) bzw. von Raumtemperatur auf  $4^\circ\text{C}$  ( $\text{RT}/4^\circ\text{C}$ ). (RT): 4 h durchgehend bei Raumtemperatur.

### 3.4.3 Schwingungsanregung durch Schalldruck

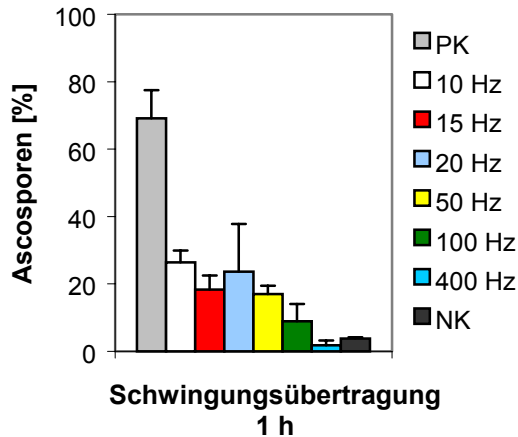
#### 3.4.3.1 Effektivität verschiedener Schwingungsarten

Schwingungsanregung durch Impulse konnte den Sporenausstoß nicht induzieren (**Abb. 39a**). Die erreichten Sporenzahlen nach 1 h Schallübertragung mit einem Schalldruckpegel von 130 dB (C) waren auch bei der höchsten verwendeten Impulsfrequenz 10/s nicht signifikant größer als die der Negativkontrolle. Mit Weißem Rauschen wurde auch bei maximaler Schallenergie (130 dB (C)) nach 60 min Schwingungsübertragung kein Effekt erzielt. Braunes Rauschen und Rosa Rauschen waren bei Schallruck von etwa 130 dB (C) in ihrer Wirkung vergleichbar und bewirkten signifikanten Sporenausstoß (**Abb. 39b**).



**Abb. 39:** Ascosporenausstoß bei Schwingungsübertragung (1 h) mit 130 dB (C) auf unter Wasser getauchte Blätter. (a) Abhängigkeit von der Impulsfrequenz. (b) Abhängigkeit von der Frequenzzusammensetzung überlagerter Schwingungen (Rauschen). PK = 1 h bei 100 U/min geschüttelte Kontrolle; NK = nicht beschallte Kontrolle. Effekte angegeben in Prozent des GP.

Bei maximal erreichbarem Schalldruckpegel von 130 dB (C) war die Beschallung mit Sinusschwingungen der Frequenzen zwischen 10 und 50 Hz wirksam (**Abb. 40**). Die tieffrequenten Schwingungen versetzten das Wasser in der Beschallungskammer in eine visuell verfolgbare oszillierende Bewegung. Durch Schwingungen der Frequenzen 100 und 400 Hz wurde kein signifikanter Sporenausstoß bewirkt (**Abb. 40**), das Wasser in der Beschallungskammer wurde den hohen Frequenzen entsprechend zu schnellen Schwingungen angeregt. Die Frequenzen 1000 und 10000 Hz konnten von dem verwendeten Audiosystem nur mit einem Schalldruckpegel von 115 bzw. 95 dB (C) übertragen werden und bewirkten keinerlei Effekt. Die Frequenzen unter 10 Hz wurden mit der jeweils erreichbaren Maximallautstärke übertragen. 5 Hz mit 115 dB (C) bewirkte starken Sporenausstoß ( $25,2 \pm 9,8$  %). Mit der Frequenz 3 Hz lies sich eine schwache Wasserschwingung anregen, der maximal mögliche Schalldruckpegel wurde mit 100 dB (C) gemessen. Der Sporenausstoß erreichte  $13,7 \pm 4,2$  %. Die Frequenz 1 Hz bewirkte eine kaum merkliche Wasserbewegung und keinen signifikanten Sporenausstoß.

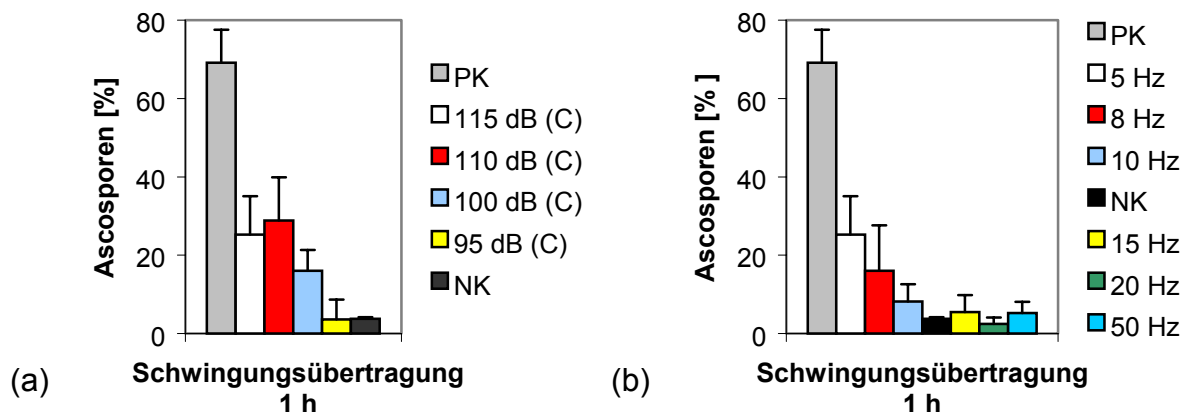


**Abb. 40:** Abhängigkeit des Ascosporenausstoßes von der Schwingungsfrequenz. Schwingungsübertragung (1 h) auf unter Wasser getauchte Blätter mit Sinusschwingungen zwischen 10 und 400 Hz bei 130 dB (C). PK = 1 h bei 100 U/min geschüttelte Kontrolle; NK = nicht beschallte Kontrolle; Effekte angegeben in Prozent des GP.

Der maximal erreichbare Sporenausstoß durch 60-minütiges Schwenken bei 100 U/min betrug  $69,2 \pm 8,4$  % und lag somit deutlich über allen Beschallungseffekten. Der in einer Ruhephase erreichte Sporenausstoß betrug  $3,8 \pm 0,4$  %. Durch eine 5-stündige Schalldruckbehandlung mit Braunem Rauschen bei 130 dB (C) oder einer Sinusschwingung mit 5 Hz bei 115 dB (C) wurde anfänglich ein starker Sporenausstoß beobachtet, der nach 1 h im weiteren Versuchsverlauf wieder zurückging.

### 3.4.3.2 Abhängigkeit vom Schalldruckpegel

Die 5 Hz Sinusschwingung war bei einem Schalldruckpegel von 115, 110 und 100 dB (C) in der Lage, Sporenausstoß auszulösen, der Schalldruckpegel 95 dB (C) war zu gering für signifikanten Sporenausstoß (**Abb. 41a**). Die Frequenzen zwischen 10 und 50 Hz bewirkten bei einem Schalldruckpegel von 115 dB (C) keinen signifikant höheren Sporenausstoß als die Negativkontrolle (**Abb. 41b**).



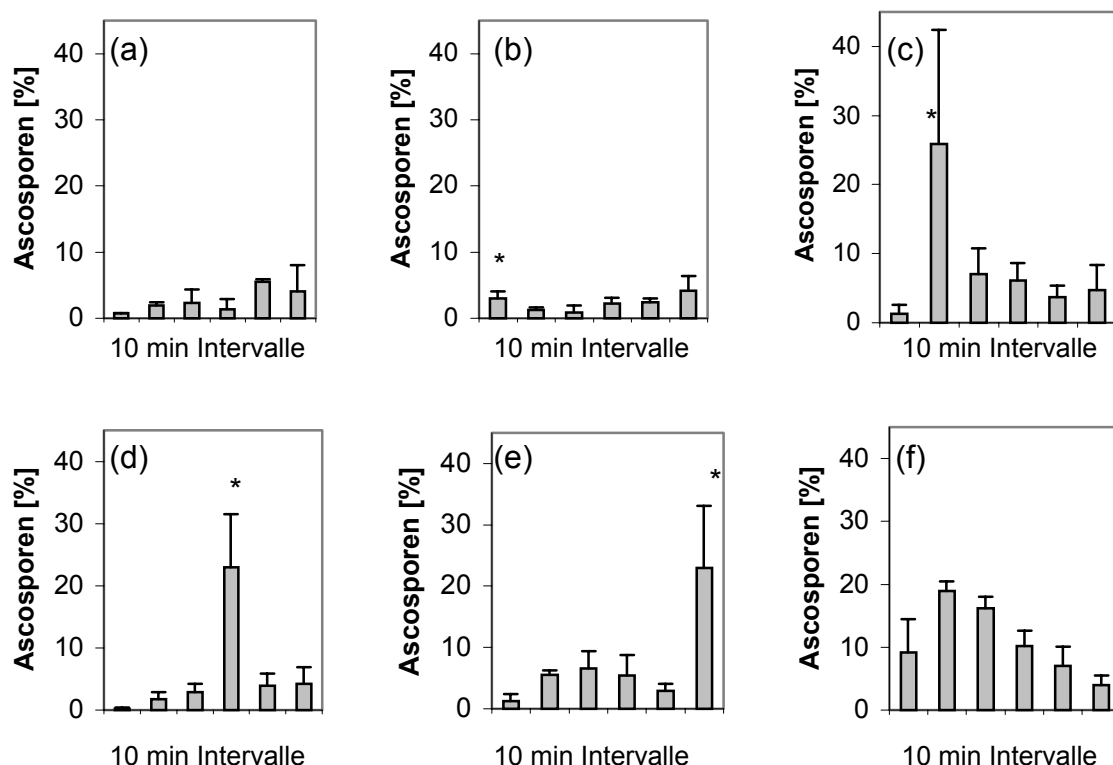
**Abb. 41:** Ascosporenausstoß in Abhängigkeit des Schalldruckpegels. Schwingungsübertragung (1 h) auf unter Wasser getauchte Blätter mit Sinusschwingungen. (a) Sinusschwingung 5 Hz, mit Schalldruckpegeln zwischen 95 und 115 dB (C). (b) Sinusschwingungen 5-50 Hz mit 115 dB (C). PK = 1 h bei 100 U/min geschüttelte Kontrolle; NK = nicht beschallte Kontrolle. Effekte angegeben in Prozent des GP.



Alle Schwingungsübertragungen mit Impulsen brachten keinen Effekt bei maximal möglicher Lautstärke und auch mit geringerem Schalldruckpegel zwischen 120 und 125 dB (C) blieb signifikanter Sporenausstoß aus. Braunes Rauschen war mit leicht vermindertem Schalldruckpegel (125 bzw. 120 dB (C)) ohne Wirkung auf den Sporenausstoß.

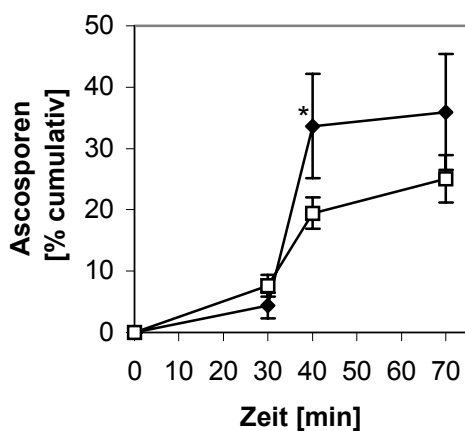
### 3.4.3.3 Abhängigkeit von der Ruhe- und Beschallungsdauer

Wurden die Blätter nach 30 oder 50 min Ruhe für 10 min mit Schalldruck behandelt, war der Sporenausstoß in der Schallphase signifikant erhöht gegenüber den fünf unbehandelten Intervallen vor oder nach der Beschallung (**Abb. 42d, e**). Nach 10 min Ruhe (**Abb. 42c**) oder 20 min Ruhe war der Sporenausstoß in der Schallphase nicht signifikant höher im Vergleich zu den nicht mit Schalldruck behandelten Intervallen. Die Beschallung im ersten Intervall bewirkte einen von der unbehandelten Kontrolle nicht unterscheidbaren Sporenausstoß (**Abb. 42a, b**). Auch bei durchgängiger Schalldruckbehandlung in jedem der sechs Intervalle war der Sporenausstoß im ersten Intervall niedriger als im zweiten und dritten Intervall. In den drei letzten Intervallen ging der Sporenausstoß wieder langsam zurück (**Abb. 42f**).



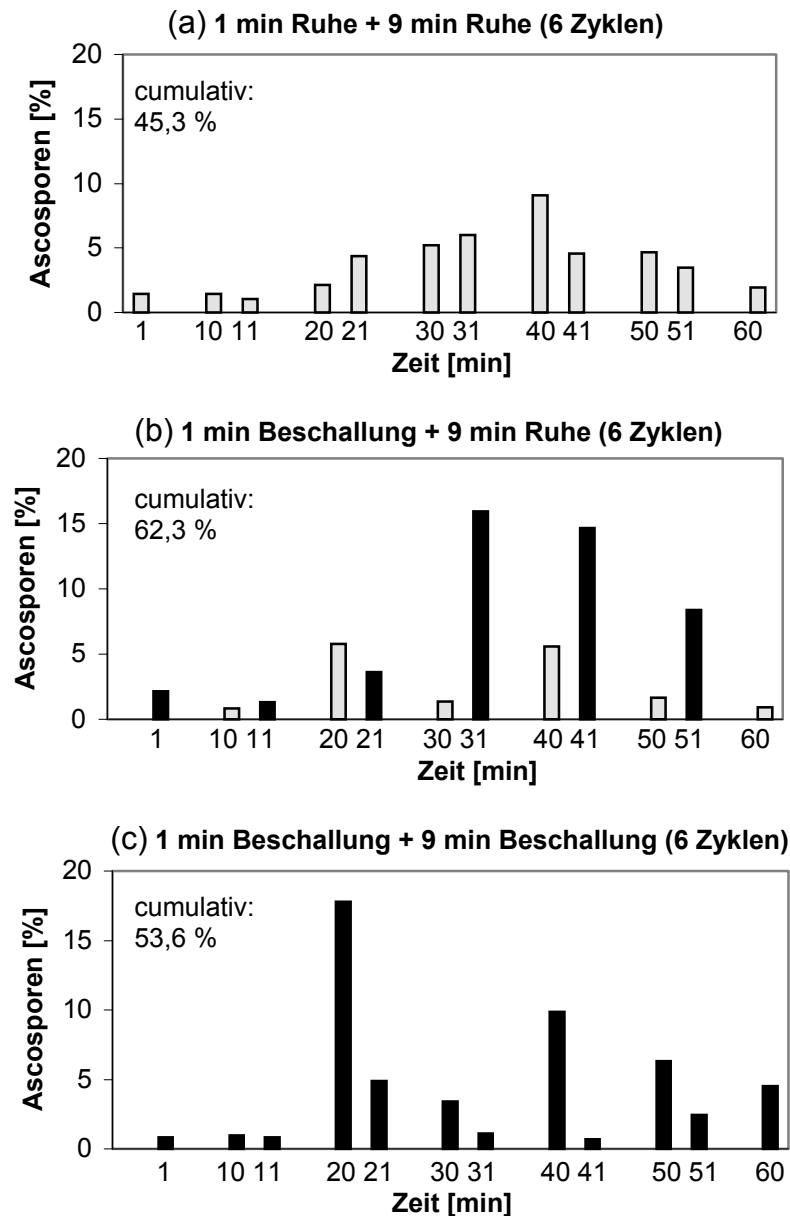
**Abb. 42:** Ascosporenausstoß während Ruhe- und Beschallungsintervallen. Schwingungsübertragung auf unter Wasser getauchte Blätter mit Sinusschwingung (5 Hz, 115 dB (C)). Kombinationen aus 10-minütigen Ruhe- und Beschallungsintervallen. **(a)** 6 Intervalle ohne Schalldruckbehandlung. **(b)** 10 min Beschallung (\*), 5 x 10 min Ruhe. **(c)** 10 min Ruhe, 10 min Beschallung (\*), 4 x 10 min Ruhe. **(d)** 3 x 10 min Ruhe, 10 min Beschallung (\*), 2 x 10 min Ruhe. **(e)** 5 x 10 min Ruhe, 10 min Beschallung (\*). **(f)** 6 x 10 min Beschallung. Effekte angegeben in Prozent des GP.

Der Effekt der Beschallung auf den Sporenausstoß war nach einer minimalen Quelldauer von 30 min signifikant (**Abb. 42**). Der cumulative Sporenausstoß in sechs Intervallen ohne Beschallung (NK) betrug  $16,1 \pm 2,7$  %. In sechs Beschallungsabschnitten wurden insgesamt  $65,6 \pm 2,8$  % erreicht. Der cumulative Sporenausstoß nach 60 min bei Versuchen mit einem 10-minütigen Beschallungsintervall lag zwischen  $22,3 \pm 13,5$  und  $48,8 \pm 20,8$  %. Der Sporenausstoß während des 10-minütigen Beschallungsintervalls hob sich deutlicher von den flankierenden Ruhephasen ohne Schalldruckbehandlung ab, wenn die Badflüssigkeit nicht alle 10 min, sondern erst nach 30 min Ruhe gewechselt wurde. Eine unbehandelte Kontrolle zeigte einen ähnlichen Zeitverlauf, der Sporenausstoß war aber signifikant kleiner, verglichen mit der beschallten Probe (**Abb. 43**).



**Abb. 43:** Ascosporenausstoß während Ruhe- und Beschallungsintervallen. Schwingungsübertragung auf unter Wasser getauchte Blätter mit Sinusschwingung (5 Hz, 115 dB (C)). Schwarz : Beschallungsintervall (\*), flankiert von zwei Ruheintervallen. Weiß: Negativkontrolle, drei Ruheintervalle. Effekte angegeben in Prozent des GP.

Bei abwechselnden Beschallungs- und Ruheintervallen von 1 min bzw. 9 min Dauer war in einem Einzelversuch ab dem dritten Zyklus der Sporenausstoß in dem kurzen Beschallungsintervall deutlich stärker als in dem nachfolgenden längeren Ruheintervall (**Abb. 44b**). Eine bei gleichem Rhythmus ohne Schalldruck behandelte Probe (**Abb. 44a**) und eine ausschließlich mit Schalldruck behandelte Probe (**Abb. 44c**) zeigten dieses Verhältnis nicht, sondern wiesen in dem längeren Intervall eine höhere Sporenzahl auf, als in dem kürzeren. Jedoch war der cumulative Sporengehalt in allen drei Versuchsvarianten ähnlich. Intervallbeschallung von 1 min + 9 min Ruhe (sechs Zyklen) ohne intermediären Wechsel der Badflüssigkeit war ebenso effektiv wie 6 min Beschallung nach 54 min Ruhe und nicht signifikant kleiner gegenüber einer 60-minütigen Beschallung. Eine einminütige Beschallung nach 59 min Ruhe und eine 60-minütige Beschallung induzierten vergleichbaren Sporenausstoß.



**Abb. 44:** Ascosporenausstoß während Ruhe- und Beschallungsintervallen. Schwingungsübertragung auf unter Wasser getauchte Blätter mit Sinusschwingung (5 Hz, 115 dB (C)). Grau = Ruheintervalle; schwarz = Beschallungsintervalle **(a)** 1 min Ruheintervall + 9 min Ruheintervall (6 Zyklen). **(b)** 1 min Schalldruckbehandlung + 9 min Ruheintervall (6 Zyklen). **(c)** 1 min Schalldruckbehandlung + 9 min Schalldruckbehandlung (6 Zyklen). Effekte angegeben in Prozent des GP (Einzelversuche).

Wurde pro Minute jeweils 1 s oder 5 s beschallt, so addierten sich die Beschallungsintervalle in 60 min auf 1 bzw. 5 min, die für signifikanten Effekt nicht ausreichten (**Tab. 19**). Beschallungsintervalle von 10 s/min, die sich in einer Stunde (60 Zyklen) zu einer effektiven Beschallungszeit von 10 min summierten, bewirkten einen starken Sporenausstoß, der nicht signifikant kleiner war als nach einer Stunde Dauerbeschallung. Beschallungsintervalle von 10 s/10 min summierten sich in einer Stunde (6 Zyklen) auf 1 min Effektivbeschallung und waren für signifikanten Sporenausstoß nicht ausreichend. Beschallungsintervalle von 20 s/10 min, die in

einer Stunde eine effektive Beschalldauer von 2 min ergaben, bewirkten einen schwachen aber signifikanten Effekt (**Tab. 19**).

**Tabelle 19:** Ascosporenausstoß in Abhängigkeit von Dauer und Wiederholungshäufigkeit der Beschallungsintervalle. Schwingungsübertragung auf unter Wasser getauchte Blätter mit Sinusschwingung (5 Hz, 115 dB (C)). Kombinationen aus 1-20 s langen Beschallungsintervallen im Wechsel mit Ruheintervallen. Effekte angegeben in Prozent des GP. NK: 2 h ohne Beschallung inkubierte Kontrolle. PK: 60 min beschallte Probe.

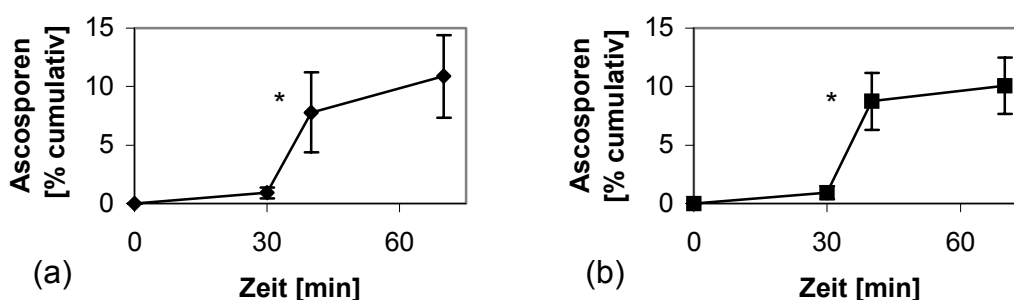
Beschallung [s]	Ruhe [s]	Zyklen in 60 min	Beschalldauer <sup>1</sup> [min]	Ruhephase <sup>2</sup> [%]	Beschallungsphase [%]
NK	-	-	-	7,7 ± 3,4	3,8 ± 0,4
PK	-	-	60	5,5 ± 4,3	25,2 ± 9,8
1	59	60 x	1	5,2 ± 6,7	4,5 ± 4,3
5	55	60 x	5	9,5 ± 5,7	7,7 ± 3,4
10	50	60 x	10	2,7 ± 2,7	17,3 ± 6,8
10	590	6 x	1	5,5 ± 5,2	6,6 ± 4,8
20	580	6 x	2	2,7 ± 2,1	7,4 ± 1,6

<sup>1</sup> effektive Beschalldauer bezogen auf eine 60-minütige Beschallungsphase

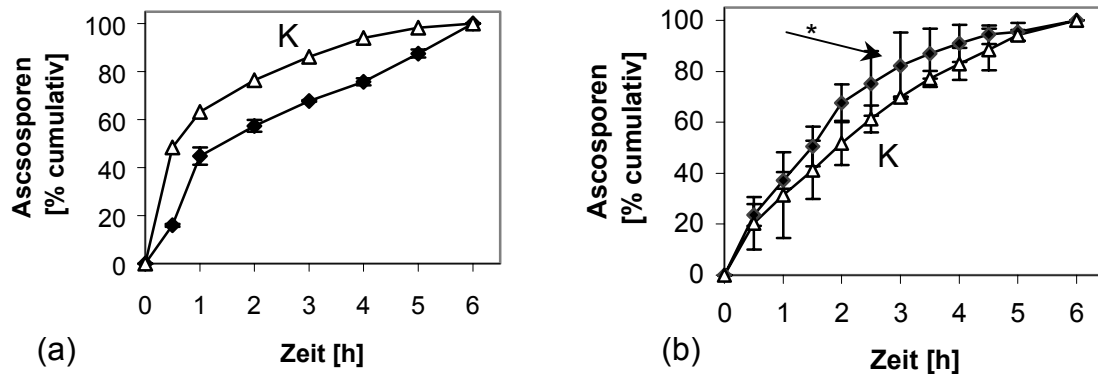
<sup>2</sup> 60-minütige Inkubation vor der Beschallungsphase

### 3.4.4 Wirkung von Licht

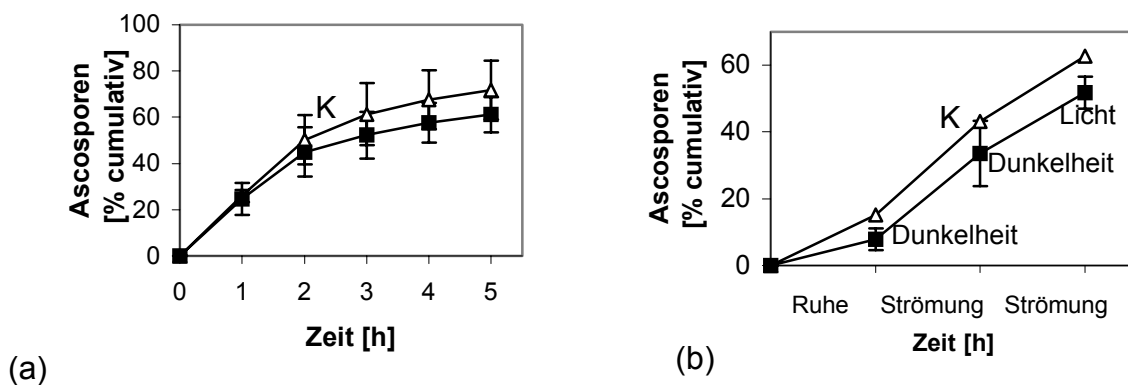
Wasserströmungen induzierten bei Dunkelheit und Belichtung vergleichbare Sporenemission (**Abb. 45-47**). Ein erhöhter Sporenausstoß bei Belichtung nach anfänglicher Dunkelbehandlung wurde nicht festgestellt (**Abb. 46b; 47b**). Auch durch Konditionierung der Pseudothecien wurde der Sporenausstoß nicht vermindert (**Abb. 46b**). Pseudothecien, die bei künstlichem Tag-Nacht-Wechsel inkubiert worden waren, zeigten in ihrer Nachtphase keinen verringerten Sporenausstoß (**Abb. 45b; 47**). Auch bei verringerter Reizung durch niedrige Strömungsgeschwindigkeit oder kurze Reizeinwirkung wurde keine Hemmung des Sporenausstoßes erzielt. Ein 10-minütiges Beschallungsintervall, flankiert von zwei 30-minütigen Ruheintervallen, bewirkte im Dunkeln (Blätter mit Tag-Nacht-Rhythmus) einen ebenso hohen Sporenausstoß wie bei Licht (**Abb. 45**).



**Abb. 45:** Ascosporenausstoß bei Licht und Dunkelheit (in Prozent des GP). 10 min Beschallung (\*Sinus 5 Hz, 115 dB), flankiert von zwei Ruheintervallen (a) Beschallung bei Licht, Blätter in Tag-Phase. (b) Beschallung bei Dunkelheit, Blätter in Nacht-Phase.



**Abb. 46:** Ascosporenausstoß bei Licht und Dunkelheit, Schütteln (100 U/min). **(a)** Blätter mit natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus, ohne Konditionierung. 5 h bei Dunkelheit, gefolgt von 1 h schütteln bei Licht. **(b)** Konditionierte Blätter. 2,5 h im Dunkeln, gefolgt von 3,5 h bei Licht. (\*) Beginn der Lichtphase. Effekte angegeben in Prozent des GP. K: bei Licht (Tagphase) behandelte Kontrollen.



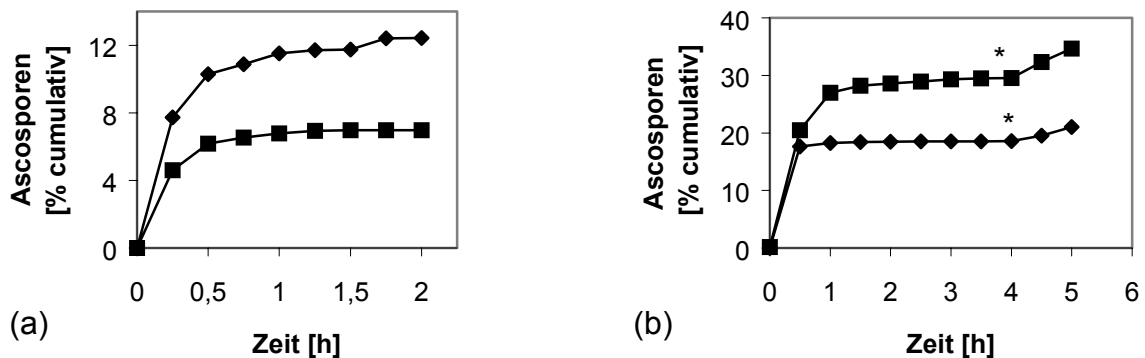
**Abb. 47:** Ascosporenausstoß (in Prozent des GP) bei Licht und Dunkelheit. **(a)** Blätter mit natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus, 5 h oszillierende Strömung ( $v_m = 31$  mm/s) in der Nachtphase im Dunkeln. **(b)** Blätter mit künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus, 1 h Ruhe, 2 h oszillierende Strömung ( $v_m = 31$  mm/s). Effekte angegeben in Prozent des GP. K: bei Licht (Tagphase) behandelte Kontrollen.

### 3.5 Sporenemission in Luft- und Wasserkompartimente

#### 3.5.1 Tauchbenetzung: Freisetzung in stille Luft und in den Luftstrom

Nach 10-minütiger Tauchphase waren die Blätter vollständig mit Wasser vollgesogen, die Oberfläche war nass glänzend. Die Blätter blieben während der gesamten Versuchsdauer durchnässt. Sporenausstoß begann während der Tauchphase und erreichte innerhalb der ersten 15-30 Minuten nach dem Tauchbad ein Maximum (**Abb. 48a**), selten in der zweiten Stunde. Innerhalb der zweiten Stunde kam der Sporenausstoß zum Erliegen. Erneutes 1-minütiges Tauchen brachte keinen Sporenzuwachs in der folgenden Stunde. Eine zweite Befeuchtung mit

Tröpfchen induzierte schwachen Sporenausstoß in der folgenden Stunde (**Abb. 48b**).



**Abb. 48:** (a,b) Ascosporenausstoß in unbewegter Luft nach 10-minütiger Tauchphase.  
\* Sprühbefeuchtung nach 4 h und eine weitere Stunde Sporendeposition. Effekte angegeben in Prozent des GP (Einzelversuche).

Der Sporenausstoß während der 10-minütigen Tauchphase schwankte zwischen 0,2 und 1,5 % des GP. Die Stärke des Hauptsporenausstoßes (2 h) variierte zwischen 1,7 und 28 % (**Tab. 20a**). Tauchen und anschließende Sporendeposition über Nacht bei RT und Dunkelheit führte zu variierenden Sporenzahlen (**Tab. 20b**).

**Tabelle 20a:** Ascosporen im Tauchwasser nach 10 min Tauchen und nach 2 h Inkubation in stiller Luft. Angaben in Prozent des GP.

10 min Tauchbad [%]	2 h Sporendeposition [%]
1,5	21
0,8	12,3
0,6	6,9
0,6	4,3
0,2	28,4
0,6	1,7
0,7	4,3
1,1	3,7
0,2	6,3

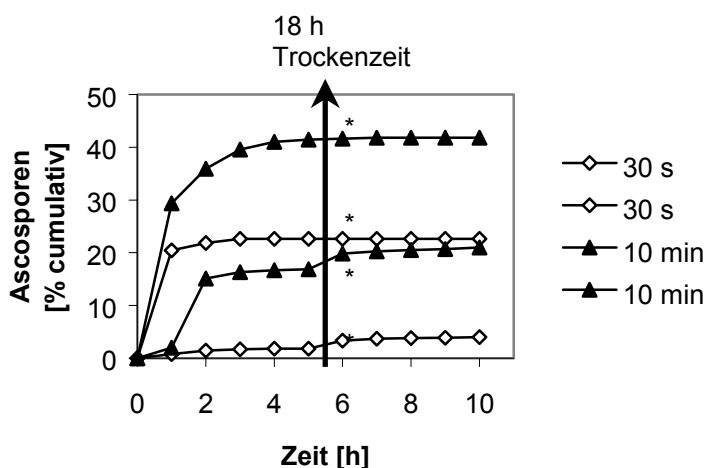
**Tabelle 20b:** Sporenteile der Sporendeposition über Nacht und der Schüttelkontrolle (K) am cumulativen Gesamtsporenausstoß. Angaben in Prozent des GP.

Deposition [%]	K [%]	Deposition [%]	K [%]	Deposition [%]	K [%]	Deposition [%]	K [%]
60,5	39,5	8,3	91,7	14,8	85,2	5,4	94,6
3,7	96,3	2,5	97,5	4,4	95,6	0,6	99,4
12,1	87,9	16,6	83,4	0,4	99,7	0,9	99,1
27,7	72,3	22,7	77,3	8,1	91,9	0,1	99,9
39,8	60,2	6,5	93,5	1,8	98,2	2,4	97,6

**Tabelle 20c:** Sporenausstoß während der Inkubation nach 1. und 2. Tauchphase. Angaben in Prozent des GP. <sup>1</sup> nach erster Tauchphase 14-18 h nass inkubiert; <sup>2</sup> nach erster Tauchphase 5 h nass inkubiert; <sup>3</sup> mit 18-stündiger Trockenphase zwischen beiden Tauchphasen. Grau unterlegt: Tauchen und Inkubation bei Dunkelheit, vgl. 3.5.5.1).

1. Inkubation [%]	2. Inkubation [%]
16,6 <sup>1</sup>	0,5
22,7 <sup>1</sup>	0,04
6,5 <sup>1</sup>	0,3
5,4 <sup>1</sup>	0,3
15,2 <sup>2</sup>	0,1
13,8 <sup>3</sup>	3,1
34,4 <sup>3</sup>	0,4

Wiederholtes Tauchen bewirkte stets eine wesentlich schwächere Sporenemission in der darauf folgenden Inkubation als das erste Tauchbad, gleichgültig ob die Blätter zwischen den beiden Befeuchtungen trocknen konnten oder feucht blieben (**Tab. 20c; Abb. 49**). Das Tauchwasser des zweiten Tauchvorgangs enthielt mehr Sporen als das des ersten. Das Sporenverhältnis zwischen erstem und zweitem Tauchwasser betrug 1:2 bis 1:4; in einem Fall betrug das Verhältnis 1:50; in einem Fall mit besonders starkem Sporenausstoß bei der ersten Befeuchtung wurden im zweiten Tauchbad keine Sporen gezählt. Schon nach 30 s im Tauchbad war die Sporendeposition bei der anschließenden Inkubation dem 10-minütigen Tauchen vergleichbar (**Abb. 49**). Wurden die Blätter ohne Tauchbenetzung bei Kammersättigung inkubiert, wurden in 5 h geringe Sporenzahlen, unter 1 % des GP, freigesetzt.



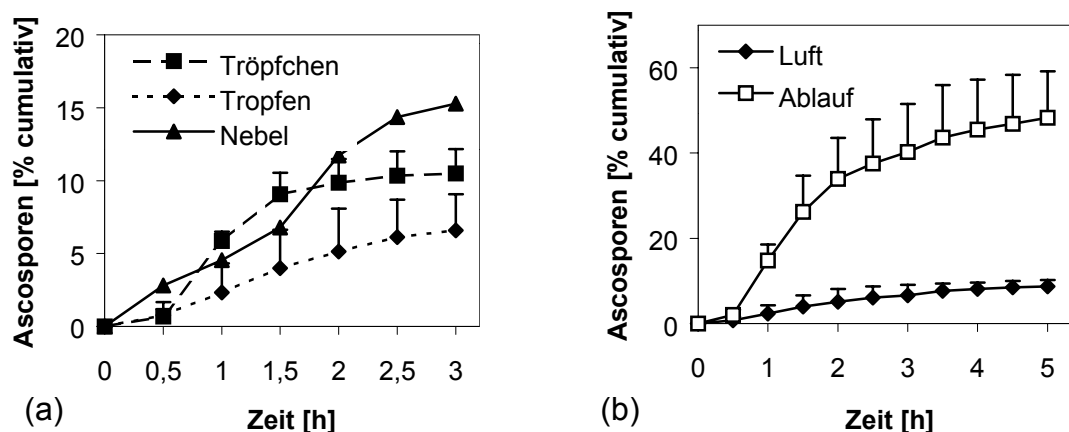
**Abb. 49:** Sporendeposition nach 30 s bzw. 10 min Tauchbad. Nach 5 h Sporendeposition und 18 h Trockenzeit folgte erneutes Tauchen (\*) und Inkubation. Ascosporen in Prozent des GP (Einzerversuche).

Nach Tauchbad und 5-stündiger Inkubation konnte nach kurzem Schwenken der Blätter in 2 M Glycerin-Lösung bis zu 33 % des Sporenpotentials im Glycerin gezählt werden (vgl. 3.6.2).

Im Luftstrom zeigte der Sporenausstoß nach 10 min Tauchbefeuchtung den gleichen zeitlichen Verlauf wie in stiller Luft mit einem Maximum innerhalb der ersten 30-45 min. In 60 min wurden  $3,1 \pm 0,5$  % des GP gefangen, der gleiche Versuchsverlauf mit Sporendeposition in stiller Luft brachte eine Sporenausbeute von 7,1 bzw. 2,3 % des GP. Nach 60 min waren die Blätter durch den Luftstrom von 13 l/min bis zum Benetzungsgrad 1 (matt) abgetrocknet.

### 3.5.2 Künstliche Benetzung durch Tropfen, Tröpfchen, Nebel

Tropfen- und Tröpfchenbenetzung waren schnell und direkt, die Blätter nach wenigen Minuten bzw. sofort mit einem Wasserfilm belegt. Die Nebelbefeuchtung war etwas langsamer und es dauerte ca. 45-75 min bis die Blätter mit einem glänzenden Wasserfilm bedeckt waren (Benetzungsgrad 3). Bei allen drei Befeuchtungsarten waren Sporen in der Luft innerhalb 15-30 min nach der ersten Befeuchtung messbar. Der Hauptsporenausstoß wurde 30-60 min nach Beginn der Befeuchtung erreicht, wenn mit Tröpfchen oder Tropfen befeuchtet wurde. Benetzung mit Nebel bewirkte den Hauptsporenausstoß in der zweiten Stunde nach Befeuchtungsstart (Einzelversuch). Nach Erreichen des Maximums ging der Sporenausstoß bei Tröpfchenbefeuchtung rasch zurück, bei Tropfbefeuchtung und Nebelbefeuchtung war der Rückgang langsamer (**Abb. 50a**). Bei allen drei Befeuchtungsvarianten lag der Anteil der in Luft gefangenen Sporen nach 3 h zwischen 6 und 15 % des GP. Die Befeuchtung durch Sprühen und Nebel erzeugte kein Ablauf- oder Spritzwasser, bei Tropfbefeuchtung sammelte sich von den Blättern ablaufendes Wasser (**Abb. 50b**).



**Abb. 50:** (a) Ascosporenausstoß (Prozent des GP) in das Luftkompartiment bei Benetzung mit Tropfen (9,52 mm/h), Tröpfchen (Sprühintervalle) oder Nebel (150-200 ml/h). (b) Ascosporenausstoß in Luft- und Wasserkompartimente bei Benetzung mit Tropfen (9,52 mm/h).

Der cumulative Sporenausstoß in Luft und Wasser erreichte nach 5 h  $57 \pm 9,4$  %. Eine 5 h geschüttelte Probe erreichte  $99 \pm 0,2$  %. Wurde die Befeuchtung nach 60 min gestoppt, blieb der Sporengehalt im Luftkompartiment nach Tropfbefeuchtung



zunächst weitere 60 min auf gleich hohem Niveau, bei Tröpfchen- und Nebelbefeuchtung wurde der maximale Sporenausstoß während der Befeuchtungsphase erreicht und fiel nach Befeuchtungsende rasch zurück. Nach 60 min Befeuchtung durch Tropfberegnung entsprechend 9,5 mm/h befanden sich durchschnittlich ca. fünfmal mehr Sporen im Ablaufwasser ( $16,4 \pm 3,3$  %) als im Luftkompartiment ( $3,4 \pm 1,5$  %). Nach 3 h machte der Sporengehalt im Ablaufwasser 40 % (Luft: 6,6 %) und nach 5 h bis zu 50 % (Luft 8,7 %, **Abb. 50b**) des Gesamtpotentials aus. Bei der selben Tropfrate aus minimaler Fallhöhe (Tropfen ohne kinetische Energie) ergab sich nach 60 min ebenso das Verhältnis 5:1 (Ablauf: 14,8 %; Luft: 3 %). Da der Sporenausstoß in die Luft in einer auf die Benetzung folgenden Trockenphase weitere 60 min auf gleichem Niveau blieb, ergab sich nach zwei Versuchsstunden ein Verhältnis des Sporengehaltes in Luft und Ablaufwasser von 1:2. Der cumulative Sporengehalt in Luft- und Wasserkompartimenten betrug nach 1 h Tropfen (9,5 mm/h) und anschließender einstündiger Trockenphase  $19,3 \pm 5,7$  %. Bei konstanter Tropfenbefeuchtung mit 1,9 mm/h (cumulativ 9,5 mm in 5 h) lag der cumulative Sporenausstoß in das Luftkompartiment durchschnittlich bei  $24 \pm 15$  %. Das Verhältnis der Sporenzahlen in Luft- und Ablaufkompartiment war bei schwacher Tropfberegnung 1:1. Bei Benetzung durch Labortropfen unterschiedlicher Intensität und Dauer sammelten sich nur geringe Spritzwassermengen. Der Sporenanteil im Spritzwasser war ohne Bedeutung (**Tab. 21**). Auch die Sporenkonzentration war immer weit niedriger gegenüber der Konzentration im ablaufenden Wasser. Selten wurden über 1000/ml gezählt, während sich im Ablaufwasser zwischen 2000 und 20000 Sporen/ml befanden.

**Tabelle 21:** Sporengehalt in Luft, Spritzwasser und Ablaufwasser (Prozent des GP) im Vergleich zur Positivkontrolle (PK) bei Tropfbenetzungen unterschiedlicher Dauer und Intensität.

Luft [%]	Spritzwasser [%]	Ablaufwasser [%]	PK [%]
2,0	1,3	19,3	77,4
20	0,2	14,7	65,0
11,6	0,3	12,7	75,4
12,2	0,2	13,1	74,6
9,6	0,2	20,0	70,2
6,3	0,05	21,0	72,6
8,0	0,3	22,3	69,4
9,7	0,25	40,5	49,5
7,7	0,05	56,0	36,3

### 3.5.2.1 Klimakammerversuche

Bei Versuch 3 unter kontrollierten Umweltbedingungen (vgl. 2.6.3) waren im ersten Versuchsteil (vier Befeuchtungsphasen bei Wechsellicht) insgesamt mehr Sporen im Ablauf als im Luftkompartiment. Im mittleren Versuchsteil (vier Befeuchtungsphasen bei Dunkelheit) waren die Sporenanteile in beiden Kompartimenten vergleichbar. In der abschließenden 60-stündigen Lichtphase wurden nur noch wenige Sporen im Ablaufkompartiment, aber erneut starker Sporenausstoß im Luftkompartiment registriert (**Tab. 22**). Bei Versuch 2 unter gleichen Bedingungen wurden ebenso in der ersten Hälfte des Versuchs wesentlich mehr Sporen im Ablauf gefunden als in der zweiten Hälfte, während die Sporenmengen im Luftkompartiment in beiden Versuchshälften gleich hoch waren.

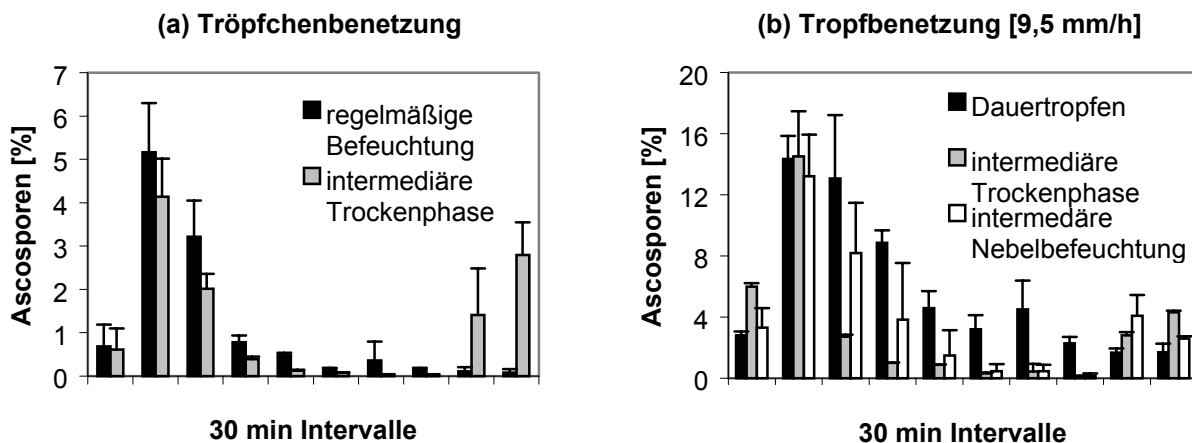
**Tabelle 22:** Sporengehalt im Luft- und Ablaufkompartiment (in Prozent des GP) bei Befeuchtungsphasen während Licht- und Dunkelperioden in der Klimakammer. Ergebnisse aus Versuch 3.

Ablaufkompartiment [%]		Luftkompartiment [%]		
dunkel	hell	dunkel	hell	
0,3	11,9	1,2	3,2	
0,5	0,4	0,05	3,1	
0,6		0,1		
0,5		0,2		
0,1		0,4		
0,1		0,3		
	0,2		2,7	
	0,1		0,7	
	0,04		1,3	
	0,2		2,0	
cumulativ	2,1 %	12,84 %	2,25 %	13,0 %

### 3.5.3 Auswirkung einer zwischenzeitlichen Trockenphase auf den Sporenausstoß

Trotz regelmäßiger Befeuchtung mit Sprühtröpfchen war nach dem Hauptsporenausstoß ein rascher Rückgang der Sporenemission auf Null zu beobachten. Ebenso rasch ging der Sporenausstoß zurück, wenn die Blätter nach der Befeuchtung trocknen konnten. Hatten die Blätter zwischen zwei Befeuchtungsphasen mindestens 3 h Zeit zum Trocknen, so wurde der Sporenausstoß durch erneute Tröpfchenbenetzung wieder angeregt, erreichte aber nicht mehr die Stärke des ersten Sporenausstoßes (**Abb. 51a**). Bei Dauerbefeuchtung durch Tropfen (9,5 mm/h) war der Gesamtsorenausstoß stärker, der Sporengehalt nahm langsamer ab und war auch nach 5 h noch bei etwa 2 %. Lag eine Pause von mindestens 3 h zwischen zwei Tropfphasen, kam der

Sporenausstoß zum Erliegen, gleichgültig ob die Blätter trocknen konnten oder durch Nebel feucht gehalten wurden. Wiederberegnung nach einer Tropfpause brachte einen deutlich kleineren Sporenzuwachs gegenüber dem Sporenausstoß bei der ersten Benetzung, vergleichbar mit dem Sporenausstoß zu diesem Zeitpunkt bei Dauertropfen (**Abb. 51b**). Wiederholtes Tauchen nach einer Trockenphase bewirkte keinen erneuten Sporenausstoß (vgl. 3.5.1, **Abb. 49**).



**Abb. 51:** Wirkung von Dauerbenetzung und intermediärer Trockenphase auf den Ascosporenausstoß (in Prozent des GP). **(a)** Tröpfchenbenetzung. Schwarz = Besprühen in jedem Intervall. Grau = Besprühen nur in 1. und 5. h. **(b)** Tropfenbenetzung (9,5 mm/h), Ascosporen in Luft- und Wasserkompartiment. Schwarz = durchgehende Tropfenbenetzung. Grau = Tropfen in 1. und 5. h. Weiß = Tropfen in 1. und 5. h, dazwischen 3 h Nebelbefeuchtung.

### 3.5.4 Schallwirkung auf benetzte Blätter

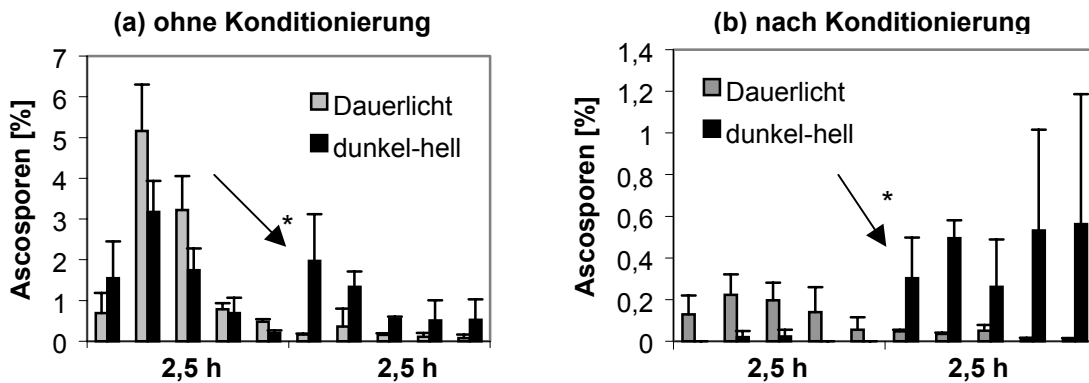
Zur Schallübertragung auf benetzte Blätter über die Luft wurden zwei Versuchsvarianten erprobt: sowohl die mittelbare Beschallung der Blätter über die Luft als auch die direkte Kopplung der Blätter mit der Lautsprechermembran blieben ohne Erfolg. Keine der verwendeten Beschallungsvarianten, Impulse, Rauschen oder Sinusschwingung, konnten einen von der unbehandelten Kontrolle abweichenden Sporenausstoß induzieren.

### 3.5.5 Lichtwirkung

#### 3.5.5.1 Dunkelkammer

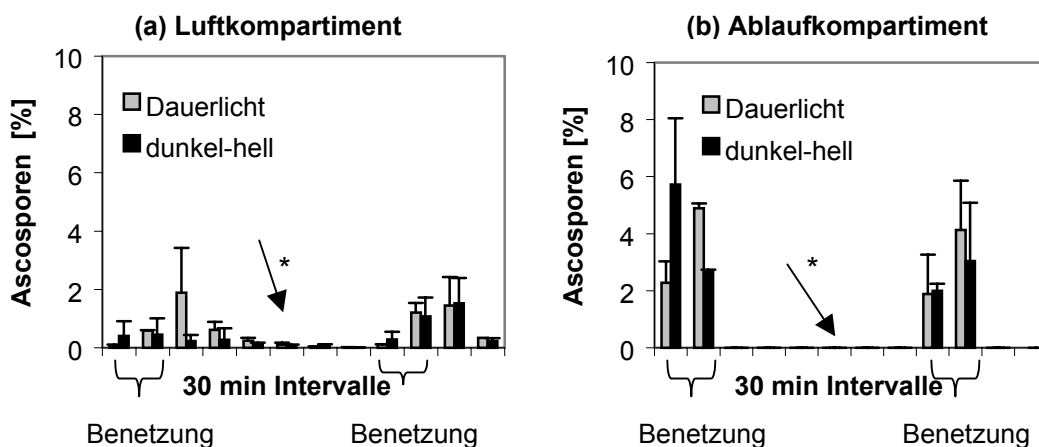
Nicht konditionierte Pseudothecien zeigten bei Tröpfchenbefeuchtung unter Lichtabschluss keine verminderte Sporenemission. Nach Anschalten der Beleuchtung wurde jedoch eine Steigerung der Ausstoßrate beobachtet, die bei Dauerbelichtung nicht stattfand und die nicht mit einer intermediären Trockenphase zusammenhing (**Abb. 52a**). Durch Konditionierung wurde der Sporenausstoß bei

Tröpfchenbefeuchtung unter Lichtabschluss fast vollständig gehemmt, aber auch bei Licht stark vermindert (**Abb. 52b**).



**Abb. 52:** Sporenausstoß bei Licht und Dunkelheit. Grau = kontinuierliche Beleuchtung; schwarz = 2,5 h Dunkelphase, 2,5 h Lichtphase. **(a)** Tröpfchenbefeuchtung ohne Konditionierung. **(b)** Tröpfchenbefeuchtung nach Konditionierung. \*Beginn der Beleuchtungsphase. Ascosporen in Prozent des GP.

Das gleiche Ergebnis war auch bei Tauchbenetzung zu beobachten: Sporenfreisetzung in stiller Luft während der beiden ersten Stunden lag teilweise über 20 % des GP, war also nicht geringer als bei Licht (vgl. 3.5.1, **Tab. 20c**). Bei Dunkelheit wurden in zwei Versuchen zur Sporenfreisetzung im Luftstrom 4,6 bzw. 2,8 % des GP gefangen (bei Licht:  $3,1 \pm 0,5$  %). Der Sporenausstoß nach Konditionierung war stark vermindert. Dunkelheit hemmte den Sporenausstoß zusätzlich und durch Beleuchtung konnte ein Anstieg in der Ausstoßrate beobachtet werden, während bei Dauerlicht der Sporenausstoß mit der Zeit abnahm. Der Sporenausstoß in Luft- und Ablaufkompartiment aus konditionierten Blättern bei Tropfbefeuchtung (9,52 mm/h) war unter Lichtabschluss und bei Beleuchtung vergleichbar. Die Sporenzahlen im Luftkompartiment stiegen bei Beginn der Beleuchtungsphase während der intermediären Trockenphase nicht an (**Abb. 53**).



**Abb. 53:** Sporenausstoß durch Tropfenbefeuchtung bei Licht und Dunkelheit nach Konditionierung. Benetzung in 1. und 5. h. Grau = kontinuierliche Beleuchtung; schwarz = 2,5 h Dunkelphase, 3,5 h Beleuchtungsphase. \* Start der Beleuchtungsphase. Ascosporen in Prozent des GP.

### 3.5.5.2 Klimakammer

Unter kontrollierten Bedingungen mit regelmäßiger Befeuchtung wurde der Sporenausstoß bei 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus sowie während 60-stündigen Dunkel- bzw. Lichtphasen aufgezeichnet. Die Blätter blieben ca. 6-8 h durchfeuchtet und trockneten dann bis zur nächsten Befeuchtung vollständig. Sporenausstoß begann in der selben Stunde wie die Befeuchtung, erreichte in der zweiten Stunde nach Befeuchtungsbeginn ein Maximum und war nach einer weiteren Stunde zum größten Teil abgeschlossen. Befeuchtung während der Dunkelphasen bewirkte immer Sporenausstoß, aber in kleinerem Ausmaß als in der vorangegangenen Lichtphase. Der cumulative Sporenausstoß in das Luftkompartiment war in den Lichtphasen 4- bis 8-mal größer als bei Dunkelheit, bei Versuch 4 mit sehr schwacher Befeuchtung war der Sporenausstoß bei Licht 1,5-mal größer (**Tab. 23**). In der Dauerdunkelphase wurden keine Schwankungen des Sporenausstoßes beobachtet, wie sie bei Wechselbeleuchtung auftraten, und der Sporenausstoß war konstant niedrig. Nach einer 60-stündigen Dunkelphase war der Sporenausstoß bei der ersten Befeuchtung im Licht in Versuch 2, 3 und 4 jeweils 26-, 14- und 7-mal höher als der durchschnittliche Sporenausstoß während der Dunkelphasenbefeuchtung, aber dieses hohe Niveau wurde bei den anschließenden Licht-Befeuchtungen nicht erreicht. Eine periodische Schwankung der Sporenzahlen wurde auch bei Dauerlicht nicht beobachtet.

**Tabelle 23:** Mehrtägige Versuche in der Klimakammer. Cumulativer Sporenausstoß in das Luftkompartiment in Prozent des GP bei Licht und Dunkelheit.

	Befeuchtung 185 ml/h			112 ml/h
	Versuch 1 [%]	Versuch 2 [%]	Versuch 3 [%]	Versuch 4 [%]
Licht	49,5	28,8	13,0	8,4
Dunkelheit	13,5	3,7	2,25	5,6

## 3.6 Chemische Einwirkungen auf die Sporenemission

### 3.6.1 Wirkung von Substratextrakten

Die in den Schüttelversuchen eingesetzten Blattextrakte entsprachen 15 bzw. 5 g Trockenblattgewicht. Mit beiden Konzentrationen wurde keine hemmende Wirkung im Vergleich zu einer Wasserkontrolle erzielt. Nach dem Ersetzen der Substratextrakte durch Wasser war keine Steigerung der Sporenemission sichtbar.

### 3.6.2 Osmoregulatoren und pH-Werte

Die pH-Werte 5, 7 und 10 zeigten keine Wirkung auf den Sporenausstoß. Unter den osmotischen Verbindungen waren Glycerin und Saccharose stark wirkende Hemmstoffe, die den Sporenausstoß ab Konzentrationen von 1 M nahezu vollständig verhinderten. Mit den Zuckeralkoholen wurden auch bei Konzentrationen von 1 M (Mannit) bzw. 2 M (Sorbit) noch geringe Sporenemissionen gemessen. Nach Ersetzen der Lösungen durch reines Wasser stieg die Sporenemission sofort an. Die niedrigste Konzentration mit einer messbaren Hemmwirkung wurde für Saccharose mit 0,15 M und für Mannit mit 0,2 M bestimmt.

### 3.6.3 Chemische Hemm- und Förderstoffe

Alle Substanzen, mit denen in der Wasserbadmethode die Sporenausschleuderung gehemmt werden konnte, sind in **Tab. 24** aufgeführt. Kupfersulfat hemmte zunächst die Sporenemission, aber in der zweiten Stunde wurde eine Abnahme der Hemmwirkung beobachtet. Eine fördernde Wirkung auf die Sporenemission wurde bei keinem der eingesetzten Stoffe festgestellt.

**Tabelle 24:** Substanzen, die in der Wasserbadmethode eine Hemmwirkung auf die Sporenemission zeigten, und die jeweilige minimal benötigte Konzentration. n.b. = nicht bestimmt.

Substanz	hemmende Konzentration	Reversibilität <sup>1</sup>
Chloramphenicol	5000 µg/ml	+
Oligomycin B	50 µg/ml	n.b.
Kresoxim-methyl	5 µg/ml	n.b.
Natriumazid	3 mM	+
Kupfersulfat	0,5 %	+

<sup>1</sup> Anstieg der Sporenemission bei Schütteln in Wasser nach der Hemmstoffbehandlung

## 4. DISKUSSION

### Kinetische Energie und Schwingungsereignisse des Regens

Ein Sensor zur Messung der kinetischen Energie des Regens sollte die große Bandbreite von Tropfengrößen (0,2-5 mm) und -energien wiedergeben können ohne störende Nebengeräusche aufzuzeichnen. Die Sensoroberfläche sollte einerseits möglichst groß in Relation zur Tropfengröße sein, damit die Mehrheit der Tropfen nicht am Rand auftrifft und nur ein Teil ihrer Energie gemessen würde (Madden *et al.*, 1998). Andererseits verringert eine große Oberfläche die Empfindlichkeit des Sensors, da der Tropfen in der Lage sein sollte, eine von den Nebengeräuschen unterscheidbare Auslenkung der Membran zu bewirken. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Sensor-Prototypen mit einem Durchmesser von 50 mm waren für den Zweck der Regenaufzeichnung gut geeignet, da sowohl schwache als auch starke Regenereignisse erfasst werden konnten. Die Amplituden der Ausschläge wurden durch die kinetische Energie der Tropfen bestimmt. Die Anfälligkeit für Nebengeräusche war gering. Die Überspannung mit Epoxidharz beschichtetem Papier diente nicht nur der Wetterfestigkeit des Sensors für den Dauereinsatz, sondern war notwendig, um die Aufnahme von Nebengeräuschen (Windböen) zu verringern. Eine ähnlich gute Wirkung wurde mit der reißfesten Plastikfolie erzielt, die bei dem Lautsprechersensor für Kurzzeit-Versuche verwendet wurde. Beide Sensoren zeigten durch die Masse der Sensoroberfläche jedoch eine nicht ausreichende Empfindlichkeit bei schwachem Nieselregen. Da die verwendete Elektronik bereits eine ausreichende Empfindlichkeit gewährleisten konnte, sollte der Sensor selbst optimiert werden, um die Sensibilität zu steigern. Die Masse der Sensoroberfläche könnte verringert werden, indem mehrere kleine Sensoren statt eines großen Sensors verwendet werden. Dadurch würde allerdings der oben genannte „Rand-Effekt“ verstärkt werden und eine Eliminierung von Nebengeräuschen würde nicht erreicht werden. Das Frequenzspektrum der durch Tropfeneinschläge erzeugten Schwingungen war im Wesentlichen durch tieffrequente Anteile geprägt, die durch hohe Töne überlagert waren. Durch Einsatz eines Tiefpassfilters könnten die durch Nebengeräusche verursachten hochfrequenten Überlagerungen beseitigt werden, ohne die Empfindlichkeit des Sensors zu verringern. Zusätzlich wäre eine Geräuschkompensation denkbar. Durch eine gegenphasige Verschaltung eines zweiten Lautsprechers auf der regenabgewandten Seite des Sensors könnten die nicht durch Tropfen bewirkten Schwingungen kurzgeschlossen und dadurch entfernt werden. Eine weitere Schwäche betraf die Schreiberaufzeichnung, die bei heftigen Regenereignissen durch die Trägheit und den zu langsamen Papiervorschub des Schreibers zur Überlagerung der Ausschläge führte. Die Auswertung der riesigen Datenmenge über den Zeitraum einer vollständigen Primärsaison von *V. inaequalis* wäre in der Praxis nicht möglich. Zu einem gewissen Grad konnten diese Unzulänglichkeiten durch die Verwendung eines Integrators überwunden werden, der die Peakflächen und die Anzahl der Ausschläge berechnete. Jedoch war die Automation des Systems nicht

möglich und somit für einen dauerhaften Praxiseinsatz nicht geeignet. Durch Einsatz eines elektronischen Datenloggers, der Höhe, Fläche und Anzahl der Einzeleinschläge erfasst, könnten diese Schwierigkeiten in der Zukunft umgangen werden. Die Lautsprecher-Regensensoren waren trotz der beschriebenen Mängel der Kippwaagenmessung überlegen, da der Beginn eines Regenereignisses und der Verlauf genauer bestimmt werden konnten. Die Messfehler der Kippwaage bei geringen oder unterbrochenen Niederschlägen durch unvollständige Füllung des Messlöffels, durch die der Regenbeginn nicht oder nur verzögert detektiert werden konnte, waren bei den Lautsprechersensoren nicht vorhanden.

Durch die kontinuierlichen Regenenergiemessungen des Sensit Sensors konnten die aufgezeichneten Regenmengen nicht mit ihrem Energiegehalt charakterisiert werden. Die Empfindlichkeit des Sensors reichte nicht aus, um die Energien der typischen Regenereignisse im Frühjahr über das Grundrauschen hinaus signifikant anzuzeigen. In einer Evaluation des Sensors von Madden *et al.* (1998) konnten auch Regenereignisse von 0,4 mm/h detektiert werden. Die Temperaturabhängigkeit der Sensit-Daten wurde in dieser Arbeit ebenfalls beschrieben. Der Sensit Sensor integriert die kinetische Energie von Regentropfen über einen bestimmten Zeitraum und misst keine Einzelereignisse. Der selbst entwickelte Sensor hingegen ist in der Lage, die einzelnen Tropfeneinschläge aufzulösen.

Die Bestimmung der kinetischen Energie des Regens wird in der Praxis der Schorfprognose nicht verwendet. Bisher wurden Sensoren für kinetische Energie des Regens zur Vorhersage von Infektionen spritzverbreiteter Pathogene getestet (Madden *et al.*, 1998; Lovell *et al.*, 2002). Die Größe und Geschwindigkeit von Regentropfen beeinflussen die Effektivität eines Tropfeneinschlags, z.B. Distanz, Größe und Zahl der Spritzer und Zahl der freigesetzten Sporen, bei der Spritzwasserverbreitung phytopathogener Pilze (Gregory *et al.*, 1959; Fitt *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1991; 1992). Bei diesen Pathosystemen (z.B. *Phytophthora cactorum* oder *Colletotrichum acutatum* auf Erdbeere) ist die Sporenverbreitung somit abhängig von der kinetischen Energie der einzelnen Tropfen (Madden *et al.*, 1996; Ntahimpera *et al.*, 1997). Auch die Sporenfreisetzung durch von Tropfeneinschlägen ausgelösten Vibrationen oder Luftverwirbelungen ist von der kinetischen Energie der Regentropfen abhängig (Deadman & Cooke, 1989; Wadia *et al.*, 1998), da durch größere Fallhöhen oder größere Tropfen eine größere Sporenzahl verbreitet wird (Geagea *et al.*, 1999). Bei Versuchen zur Sporenfreisetzung von *V. inaequalis* wurde die kinetische Energie der Regentropfeneinschläge bisher nicht in Betracht gezogen. Der Regensimulator in der von Gadoury *et al.* (1996) verwendeten Umweltkammer besaß eine Fallhöhe von ca. 30 cm und erzeugte feine Tröpfchen. Die computergesteuerte Umweltkammer von Gottwald *et al.* (1997) erzeugte definierte Tropfen mit einer Fallhöhe von 70 cm, aber die Versuche zur Sporenfreisetzung von *V. inaequalis* wurden nicht in Bezug auf die verwendeten kinetischen Energien der Regensimulation bewertet. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Sensor für kinetische Energie des Regens kann zur



Verbesserung der Sporenflugprognose eingesetzt werden, da er insbesondere die kurzen und schwachen Regenereignisse unter 0,1 mm, die unterhalb der Sensitivitätsschwelle der Kippwaage liegen, genau charakterisiert. Für die Schorfprognose im Freiland wurde bisher auf die vereinfachte Formel zurückgegriffen, dass mit Sporenflug zu rechnen ist, wenn messbarer Regen fällt. Aber auch kleinere Regenmengen (0,05 mm) waren bei Windtunnelversuchen ausreichend für die Auslösung der Sporenemission (Hirst & Stedman, 1962a). Daher verspricht eine genauere Regenmessung besonders bei Schwachregen eine genauere Schorfprognose.

Die vier Lautsprecher eigneten sich als Mikrofone zur Aufzeichnung der bei einem Tropfenaufrall entstehenden Schwingungen. Die besten Ergebnisse wurden mit den beiden Mikrofonlautsprechern MS-55 (50 mm Durchmesser) und LE 77 (70 mm Durchmesser) erzielt. Diese Systeme besaßen eine relativ große Membranmasse und wurden nur durch Tropfentreffer in starke Schwingung versetzt, nicht aber durch Wind- oder andere Hintergrundgeräusche. Die Systeme MSP-30 und BL-28 (jeweils 30 mm Durchmesser) waren durch die geringere Membranmasse anfälliger für Störgeräusche. Das Prinzip der Mikrofonlautsprecher beruht auf der direkten Schwingungsanregung und imitiert in einer geeigneten Weise die Vorgänge des Tropfenaufralls. Das Elektretmikrofon und das Kondensatormikrofon werden durch den Luftschall, den ein Tropfeneinschlag verursacht, in Schwingungen versetzt, wodurch sie für den speziellen Einsatz zur Schwingungsanalyse ungeeignet waren, da die Aufnahmen von natürlichem Regen im Freiland durch sehr viele Hintergrundgeräusche überlagert wurden. Dadurch waren die aufgezeichneten Schwingungsereignisse sehr komplex und die Frequenzanalyse ergab eine höhere Vielfalt verschiedener Frequenzanteile, wodurch die Benennung einer vorherrschenden Frequenz im Sinne einer Grundfrequenz unmöglich wurde.

Jeder Mikrofonlautsprecher erzeugte bei der Anregung durch einen Tropfenaufrall eine Schwingung mit charakteristischer Frequenz. Die nach dem Entfernen der Überlagerungen erhaltene Sinusschwingung entsprach der erzwungenen Membranschwingung des jeweiligen Systems, beeinflusst von dessen Resonanzfrequenz. Im Gegensatz zu den erhaltenen Amplituden wurde das Frequenzverhalten von der kinetischen Energie der Tropfen nicht beeinflusst. Daher erzeugten Regentropfen und Labor-Wassertropfen keine unterschiedlichen Frequenzen. Auch die während eines natürlichen Regenereignisses auftretende Bandbreite an Regentropfengrößen hatte keinen Einfluss auf das Frequenzverhalten. Die durch die Lautsprechermembranen erzeugten Schwingungen lagen im Tieftonbereich (250-600 Hz) und dominierten das Schwingungsverhalten selbst dann, wenn ein nasses Apfelblatt auf die Membran gelegt wurde. Die durch den Tropfen selbst verursachte Schwingung konnte durch das Entfernen der Lautsprechermembran und die Fixierung der Schwingspule an einem überwinterten Apfelblatt definiert werden. Durch die Lautsprechermembran verursachte Artefakte konnten somit ausgeschlossen werden. Das nasse Blatt erzeugte eine Frequenz von

91 Hz gegenüber 350 Hz der Lautsprechermembran und vermittelte eine Vorstellung der natürlichen Schwingungsvorgänge bei Regen. Verschiedene Flüssigkeiten belegten die grundsätzlich tropfeninduzierte und –geprägte Schwingung und zeigten die Dominanz der Flüssigkeitsschwingung. Alle Flüssigkeitstropfen zeigten das gleiche Verhalten: der erste Tropfenimpuls mit hohen Amplituden setzte sich in Form einer kurzen periodischen Ausschwingung fort. Die Vorgänge bei dem Einschlag eines Wassertropfens auf eine flüssige oder feste Oberfläche wurden bisher nur mit optischen Aufzeichnungen verfolgt (Worthington & Cole, 1897; Rioboo *et al.*, 2002), eine Schwingungsaufzeichnung mit Lautsprechern zur digitalen Analyse wurde bisher nicht durchgeführt. Durch die digitale Verarbeitungstechnik und das verwendete Audioprogramm war es möglich, die Schwingungsereignisse ohne eine Datenreduktion aufzunehmen und mit hoher Qualität zu analysieren.

### **Externe Einflüsse und physiologische Voraussetzungen der Sporenemission**

Die Ascosporenausschleuderung ist unmittelbar an den osmotischen Druck innerhalb des Ascus geknüpft und es wird allgemein angenommen, dass die Wasseraufnahme durch Osmose geschieht (MacHardy, 1996), denn hypertonische Lösungen können den Vorgang der Sporenausschleuderung hemmen (Aylor & Anagnostakis, 1991; Trail *et al.*, 2002). In unseren Versuchen mit der Wasserbadmethode bewirkte Saccharose bereits ab der Konzentration 0,15 M eine Einschränkung der Sporenemission, Mannit ab 0,2 M. Unsere Ergebnisse zeigten zudem, dass eine graduelle Abstufung der Hemmwirkung durch verschiedene Konzentrationen möglich ist. Aylor und Anagnostakis (1991) bestimmten durch mikroskopische Beobachtungen die Saccharose-Konzentration, bei der kein Wasser mehr in den Ascus strömen kann und der Ascus seinen Turgordruck verliert, mit 2-2,5 molal (entsprechend ca. 1,2-1,4 M). Auch bei der Wasserbadmethode trat bei der Saccharose-Konzentration 1 M eine fast vollständige Hemmung der Sporenemission auf. Neben Saccharose wurden in dieser Arbeit auch Glycerin, Mannit und Sorbit als osmotische Hemmstoffe der Sporenausschleuderung eingesetzt. Die Zuckeralkohole Mannit und Sorbit werden von Pflanzen bei osmotischem Stress als „compatible solutes“ im Cytosol akkumuliert, um die Proteine und Membranen vor Trockenschäden zu schützen (Ahmad *et al.*, 1979; Stoop *et al.*, 1996; Mundree *et al.*, 2002). Auch Pilze produzieren Zuckeralkohole. In Studien mit *Gibberella zeae* fanden Trail *et al.* (2002) Mannit im Epiplasma der Asci und vermuteten eine Beteiligung dieses Zuckeralkohols am Aufbau des osmotischen Drucks in den Asci. Mannit wird auch von *V. inaequalis* gebildet (Bühler, 1995), daher wäre ebenfalls eine Rolle als osmotisch aktive Komponente für die Erniedrigung des Wasserpotentials des Ascus denkbar. Da die Sporenemission rasch nach der Befeuchtung einsetzt, müsste die osmotisch aktive Komponente bereits präformiert oder als schnell umsetzbare Vorstufe im Fruchtkörper vorliegen. Trail *et al.* (2002) wiesen eine hohe Aktivität der Mannitol-Dehydrogenase in Proteinextrakten reifer Pseudothecien nach, die die Bildung von Mannit aus Fructose katalysiert, für *V. inaequalis* liegen noch keine

vergleichbaren Untersuchungen vor. Ein spezifisches Ionenmilieu bzw. pH-Wert waren für die Sporenemission nicht notwendig. Eine Beteiligung von substrat- oder fruchtkörpergebundenen Hemmstoffen an der Regulation der Sporenausschleuderung konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Sporenemission konnte durch verschiedene Substanzen verhindert werden. Außer Kupfersulfat waren alle wirkenden Stoffe spezifische Inhibitoren mitochondrialer Vorgänge. Angriffspunkte der Hemmstoffe waren die Elektronentransportkette (Kresoxim-methyl; Azid), die ATP-Synthese (Oligomycin B, Azid) und die mitochondriale Proteintranslation (Chloramphenicol), nicht aber die Transkription. Kupferionen besitzen eine cytotoxische Wirkung, indem sie mit Proteinen interagieren und Membranen schädigen (Hock & Elstner, 1988). Der Rückgang der Hemmwirkung von Kupferionen mit der Zeit könnte auf eine induzierte Stressantwort in den Fruchtkörpern hinweisen, etwa die Synthese von Metallothioneinen. Diese niedermolekularen, cysteinreichen Proteine werden von Tieren, Pilzen und Pflanzen bei Schwermetallstress induziert und komplexieren die Schwermetallionen (Munger *et al.*, 1985; Zhou & Goldsbrough, 1994). Die Ergebnisse der Hemmstoffversuche bewiesen erstmals, dass die Ascosporenemission abhängig von der ATP-Bereitstellung ist. Es konnte innerhalb dieser Studie jedoch nicht festgestellt werden, für welche Vorgänge die Energie benötigt wird. Inhibitoren oder Förderstoffe von ATP-verbrauchenden Transportproteinen hatten keinen Einfluss auf die Sporenemission. Trail *et al.* (2002) hingegen konnten durch Inhibitoren der  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ - Ionenkanäle den Sporenausstoß von *Gibberella zeae* hemmen und vermuteten neben Mannit auch eine Beteiligung von Ionenflüssen am Aufbau des Turgordruckes in den Asci dieses Pilzes. Auch die Plasmaströmung durch die Aktivität der Actinfilamente war laut unseren Versuchsergebnissen nicht beteiligt. Ebenso wenig konnte eine Beteiligung von Proteinkinasen an einer möglicherweise stattfindenden Signalverarbeitung festgestellt werden. Proteinase K, Detergenzien und membrankanalbildende Antibiotika zielten auf eine Störung der Membranintegrität oder den Abbau von membrangebundenen Rezeptorproteinen, die eine Rolle für die Sporenemission spielen können, waren aber ebenfalls ohne Wirkung. Chemikalien, die im Zuge dieser Versuche keine Wirkung zeigten, sind aber nicht notwendigerweise keine Hemmstoffe der Sporenemission. Dies gilt z. B. für Puromycin, das wie Chloramphenicol die Proteintranslation bei Prokaryonten inhibiert. In einigen Fällen ist der Stoff vielleicht nicht bis zum Wirkort vorgedrungen, weil er zuvor abgebaut bzw. adsorbiert wurde. Auch die meisten positiv getesteten Substanzen wirkten erst in der höchsten angewendeten Konzentration, was vielleicht auf die Tatsache zurückzuführen war, dass sie durch die Blatt- und Pilzgewebestrukturen gelangen mussten, um die Asci zu erreichen und z. T. bis in die Mitochondrien vordringen mussten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zu chemischen Hemmstoffen bilden einen vielversprechenden Anfang der Erforschung der zellulären Mechanismen der Sporenemission. Eine Bekämpfungsstrategie, die sich aus den gewonnenen Erkenntnissen entwickeln kann, wäre die Verhinderung der Ascosporenemission durch osmotisch oder chemisch wirksame Hemmstoffe, die keine toxische Wirkung auf die Umwelt haben sollten. Die Verwendung von Zucker

und Zuckeralkoholen, aber auch von Kresoxim-methyl, dem Wirkstoff in Discus, und Kupfer als zugelassene Pflanzenschutzmittel wäre hier denkbar. Zu überprüfen wäre in diesem Zusammenhang eine Auswirkung der protektiven Fungizidspritzungen im Frühjahr auf die Sporenemission. Die Bekämpfung der saprophytischen Phase von *V. inaequalis* zielte bisher auf die Hemmung der Pseudothecienentwicklung oder die Beschleunigung des Blattabbaus, um das Ascosporenpotential zu minimieren (Wiesmann, 1935; Keitt & Palmiter, 1937; Keitt *et al.*, 1941; Hirst & Stedman, 1962b; Burchill & Hutton, 1965; Burchill, 1972). In Kombination mit einer Hemmstoffbehandlung vor Regenfällen könnte eine noch wirksamere Verringerung der Sporenzahlen in der Luft erreicht und so die Infektionsgefahr minimiert werden.

Bei der Nachreifung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen stellte sich die Lagerung der Pseudothecien bei 4°C als vorteilhaft heraus, da die Blätter dort am längsten Feuchtigkeit bewahren konnten. Eine Inkubation bei 20°C und 50 % rF war für eine Nachreifung der Pseudothecien nicht geeignet, da bei diesen Bedingungen die Blätter nach der Befeuchtung schnell wieder trockneten. Somit fehlte die Feuchtigkeit als wichtigster Reifungsfaktor für Pseudothecien (Wilson, 1928; Wiesmann, 1932) und die Nachreifung der Ascosporen wurde verhindert. Nach einer Erhöhung der Luftfeuchtigkeit auf 80 % konnte auch bei 20°C eine schnelle Reifung festgestellt werden. Auch die Nachreife im überdachten Freiland wurde durch eine 11-tägige Trockenphase (fünf Tage unter 60 % rF) zunächst verzögert und schritt erst mit ansteigender Luftfeuchtigkeit voran. Letztlich konnte jedoch bei allen Inkubationsbedingungen eine Steigerung des Ascosporenpotentials beobachtet werden, mit Ausnahme einer Blattcharge, die erst am Ende der exponentiellen Reifungsphase aus dem Freiland entnommen wurde und deren Ascosporenpotential bereits erschöpft war. Die optimale Temperatur für die Ascusreifung wird mit 17-20°C angegeben (Wiesmann, 1932; Gadoury & MacHardy, 1982b), jedoch unter der Voraussetzung, dass genug Feuchtigkeit zur Verfügung steht. Die schnelle Reifung der Pseudothecien wurde im Jahr 2002 mit wiederholter Befeuchtung erzielt. Die abwechselnden Feucht- und Trockenphasen begünstigen die Reifung der Fruchtkörper, da sie den normalen Wetterbedingungen entsprechen (Wilson, 1928; Wiesmann, 1932; Louw, 1951), während konstante Nässe die Reifung der Pseudothecien verlangsamt (Wilson, 1928). Hatten die Pseudothecien einen hohen Reifezustand erreicht, so konnten sie über längere Zeit (bis zu acht Monate) bei 4°C aufbewahrt werden, ohne ihr Ausstoßverhalten zu ändern. Eine längere Inkubation bei 50 % rF und Temperaturen von 5°C (bei Dunkelheit) und 17°C (bei Licht) hingegen führte zu einer Verzögerung des Sporenausstoßes bei Benetzung. Diese Verzögerung war vermutlich auf die Seneszenz reifer Pseudothecien zurückzuführen, deren Asci ihre schnelle Reaktion auf die Reizung verloren haben. Die Tiefkühlung der getrockneten Blätter erwies sich als sicherste Methode zur Langzeitaufbewahrung, da die Seneszenz der Pseudothecien verhindert wurde. Das Ausstoßverhalten war nach dem Auftauen unverändert, jedoch schien nach der Tiefkühlung bei -80°C ein höherer Prozentsatz an Sporen in einer unbehandelten Probe ausgestoßen zu werden, was auf die zelluläre Zerstörung der Asci hinweisen

könnte. Das Tiefkühlen überwinterter Blätter zur Langzeitaufbewahrung wurde auch in anderen Studien erfolgreich angewendet (Stensvand *et al.*, 1997; Gadoury *et al.*, 1998).

Eine Konditionierung der Pseudothecien durch Inkubation bei Kammersättigung verminderte die Bereitschaft zum Sporenausstoß. Die starken Reizeinwirkungen durch Tropfbefeuchtung oder Schütteln schienen die Hemmung des Sporenausstoßes aber zu überwinden. Die während der Inkubation freigesetzten Sporen stellten eventuell eine unspezifische Reaktion auf die Benetzung dar. Hierbei könnten Asci beteiligt sein, die bei dem vorherigen Nässeereignis bereits durch die Öffnung der Pseudothecien getreten sind und vor dem Abtrocknen der Blätter nicht mehr ihre Sporen ausstoßen konnten. Brook konnte in mikroskopischen Beobachtungen trockener Blätter feststellen, dass solche gefüllten Asci als Büschel aus dem Ostiolum hervortraten (Brook, 1969a). Diese Asci könnten für eine schnelle Antwort bei der nächsten Benetzung verantwortlich sein (Brook, 1975). Der Effekt, den eine „Erst-Benetzung“ auf trockene Blätter haben könnte, wäre eventuell auch für die Verhältnisse im Freiland relevant, wenn Regen nach einer ausgedehnten Trockenphase einsetzt und trockene Blätter durchnässt werden. Eine Konditionierung durch Inkubation befeuchteter Blätter wurde auch von Gadoury *et al.* (1998) im Zusammenhang mit Windtunnelversuchen beschrieben. Sie beobachteten nach 17 h Konditionierung befeuchteter Blätter einen schwachen Sporenausstoß bei Dunkelheit, der sich aber mit zunehmender Dauer der Vorinkubation (bis zu 264 h) steigerte. Da in der vorliegenden Arbeit keine längeren Inkubationsperioden als 18 h durchgeführt wurden, bleibt zu klären, ob die Hemmung des Sporenausstoßes mit der Zeit ebenfalls zurückgeht. Es handelte sich jedoch bei unseren und den von Gadoury *et al.* (1998) beschriebenen Beobachtungen vermutlich um den gleichen Effekt, also einen Hemmeffekt, der nach einer Befeuchtung auftrat, nach einiger Zeit wieder abgeschwächt wurde und der unabhängig vom Reifegrad der Pseudothecien ist. Gadoury *et al.* (1998) erklärten die Ergebnisse mit Seneszenzerscheinungen bei weit fortgeschrittener Fruchtkörperreife, die zu einer Aufhebung der Dunkelhemmung führten und verglichen diesen Effekt mit den unter Freilandbedingungen beobachteten zunehmenden Sporenfängen bei Nacht gegen Ende der Primärsaison, wenn die letzten 10–15 % der Ascosporen freigesetzt wurden. Dabei wurde nicht zwischen sporengefüllten Pseudothecien (Windtunnel) und größtenteils entleerten Pseudothecien (Freiland) unterschieden. Die Ausschleuderbereitschaft reifer Pseudothecien war im Versuchszeitraum unserer Studie über den gesamten Verlauf der Primärsaison gleichmäßig, das heißt, dass keine Abhängigkeit der Ascosporenemission vom Reifegrad der Pseudothecien beobachtet wurde. Es wurden keine Seneszenzerscheinungen festgestellt, selbst nachdem im Freiland bereits über 95 % der Ascosporen freigesetzt worden waren. Auch zu Beginn der Saison war der zeitliche Verlauf des Sporenausstoßes nicht anders als zur Zeit der exponentiellen Reifungsphase mit hohem Sporenpotential.

Bei den Konditionierungsversuchen von Brook (1969a) wurden die überwinterten Blätter ohne vorherige Befeuchtung bei trockenen und feuchten Bedingungen inkubiert. Brook beobachtete einen stärkeren Sporenausstoß aus Blättern, die unter Kammersättigung inkubiert wurden als aus trocken inkubierten Blättern. Die höhere Sporenzahl bei den feucht inkubierten Blättern kann jedoch auf einen Nachreifungseffekt zurückzuführen sein, der bei den trocken gelagerten Blättern nicht auftritt. Die Nachreifung von Ascosporen benötigt nur 7,5 h (Hirst & Stedman, 1962a). Auch Brooks Beobachtung, dass der Sporenausstoß durch hohe Temperaturen (27,5°C) während der Konditionierung begünstigt wurde, konnte in dieser Arbeit nicht verifiziert werden, da alle Blattproben, gleichgültig ob bei RT, 4°C oder -20°C inkubiert, eine vergleichbare Sporenemission zeigten.

Bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde durch Freilandstudien bestätigt, dass die Sporenemission von *V. inaequalis* unmittelbar an Regenereignisse geknüpft ist (Frey & Keitt, 1925; Keitt & Jones, 1926). Schon ab Regenhöhen von 0,1 mm wurden im Freiland Ascosporen gefangen (Brook, 1966), in Windkanalstudien genügte sogar die Hälfte. Dabei wurde der Regen stets als Befeuchtungsereignis angesehen, das zur Quellung der Asci führt, die Auswirkung der Regenintensität auf den Sporenausstoß wurde kaum berücksichtigt. In dieser Arbeit wurden die Regenereignisse verglichen, die zu Ascosporenausstoß führten. Die Niederschlagsdaten sollten durch die Messung der kinetischen Energie ergänzt werden und Aufschluss darüber geben, ob und wie sich die Regenintensität auf den Ascosporenausstoß auswirkt. Die kinetische Energie des Regens konnte jedoch durch die o.g. Mängel der Sensoren nur an zwei Sporenflugtagen als zusätzliche Information eingesetzt werden, alle übrigen Tage mussten mit den Niederschlagsdaten der Wetterstation ausgewertet werden. In den Versuchsjahren 2001 und 2002 wurden 32 bzw. 34 Sporenflugtage zwischen Mitte März und Ende Mai registriert. 20-30 Sporenflugtage innerhalb einer Primärsaison wurden auch aus England (Hirst & Stedman, 1961), Neuseeland (Curtis, 1922) und Dossenheim (Kohl *et al.*, 1994) berichtet. An allen bewerteten Tagen wurde Sporenflug durch Regen ausgelöst. Es wurden keine Ascosporen an Tagen ohne messbaren Regen oder bei Tauereignissen registriert. Ascosporenemissionen an Schönwettertagen wurden in mehreren Studien berichtet (Miller & Waggoner, 1958; Hirst & Stedman, 1962a; Brook, 1966; MacHardy & Gadoury, 1986). Die Pseudothecien blieben laut Gadoury & MacHardy (1986) in den meisten Fällen nach vorangegangenen Regen am Vorabend oder in der Nacht bis zum nächsten Morgen ausreichend nass, um bei Tagesanbruch erneut Sporen zu emittieren. Die Sporenanteile an solchen Tagen waren in allen Studien vernachlässigbar. Auch Taubenetzung von verschorften Blättern wurde in zahlreichen Studien als nicht ausschlaggebend für die Sporenemission von *V. inaequalis* bestätigt. In den Aufzeichnungen der letzten zehn Jahre konnte kein einziges Tauereignis in der Dossenheimer Versuchsanlage mit Sporenflug in Verbindung gebracht werden (Kohl, 1993; Kohl *et al.*, 1994; Kollar 1996-2000), selbst wenn es zu tropfnassen Blättern führte. Eine vierjährige Studie aus den USA (MacHardy & Gadoury, 1986) berichtete von geringfügigen

Sporenemissionen bei zwei Tauereignissen (von insgesamt 27), die mit 2 h Abstand auf ein vorangegangenes Regenereignis folgten, bevor die Blätter trocknen konnten. Auch Hirst und Stedman (1962a) konnten nur unwesentliche Sporenmengen bei Tau nachweisen, im Gegensatz zu den bei Regen gefangenen. Ähnliche Ergebnisse wurden aus der Schweiz von Wiesmann (1932) berichtet. Die Taubenetzung wurde daher als wirkungslos auf die Sporenemission betrachtet, wenn sie nicht kurz nach einem Regenereignis folgte (Hirst & Stedman, 1962a; MacHardy & Gadoury, 1986). Stensvand *et al.* (1998) aus Norwegen berichteten bisher als einzige von größeren Sporenfängen (über 10 % des Jahresgesamtwertes) in Tauperioden. Die Ursachen für diese Tausporenausschleuderung sehen die Autoren in Seneszenzeffekten und hohem Sporenpotential in der Periode der exponentiellen Reifungsphase (Gadoury & MacHardy, 1982a) und nach längeren Trockenperioden. Wir registrierten fünf von acht Tauperioden zum Ende der Ascosporensaison und die Hälfte aller Tauperioden nach zwei oder mehr regenfreien Tagen und konnten diese Hypothese somit nicht bestätigen. Als Grund für den ausbleibenden Sporenflug bei natürlichen Tauereignissen wurden bislang vor allem folgende Hypothesen diskutiert: (1.) Durch die taubegleitende Windstille werden die Sporen nicht in höhere Luftschichten ausgebreitet (MacHardy, 1996). (2.) Tiefe Lufttemperaturen und Dunkelheit zur Zeit der Taubildung hemmen den Ascosporenausstoß (Brook, 1969a; MacHardy & Gadoury, 1986). Tiefe Temperaturen als Hemmfaktor konnten bei Niederschlägen bereits mehrfach widerlegt werden (Stensvand *et al.*, 1998; Kohl, 1993). Auch in unseren Aufzeichnungen lagen die Temperaturen in Tauperioden durchschnittlich bei 7°C und bei diesen Temperaturen ist ein Temperatureffekt noch nicht ausschlaggebend (Stensvand *et al.*, 1997). Die Tauperioden hielten die Blätter bis Tagesanbruch benetzt, die Dunkelhemmung fiel als Ursache somit aus, wie auch von Stensvand *et al.* (1998) beobachtet. (3.) Der dicke Wasserbelag bei Tau verhindert, dass die Sporen in die Luft gelangen (Moore, 1958). Ausschleuderbereite Asci ragen circa 40 µm aus dem Ostiolum (Brook, 1969a) und der 300-600 µm dicke Taubelag (Garrat & Segal, 1988) kann nicht durchschleudert werden, da die Ascosporen schnell an Energie verlieren, wenn sie in Wasser ausgeschleudert werden (Aylor & Anagnostakis, 1991). Diese Hypothese konnte letztlich weder bestätigt noch widerlegt werden. Eine genaue Quantifizierung der im Taufilm gefangenen Ascosporen wäre durch eine Hemmstoffbehandlung nach der Betauung möglich. Moore erwähnte die Möglichkeit, dass Regen eine gewisse Wirkung auf den Sporenausstoß ausübt, die bei Tau fehlt (Moore, 1958). Für den Apfelschorferreger würde die Ausschleuderung in Tauperioden zur sinnlosen Entleerung der Sporenvorräte führen, da die Blattnässe bei Tauperioden zur Keimung und Etablierung einer Infektion nicht ausreicht und die ausgeschleuderten Ascosporen nicht länger als 24 h bei Trockenheit überleben (MacHardy, 1996).

Im Verlauf der Ascosporenflugsaisonen 2001 und 2002 gab es Hinweise, die für eine auslösende Wirkung des Regens auf den Sporenausstoß sprechen. Alle Sporenflugperioden standen in direktem oder indirektem Zusammenhang mit Regenereignissen. Auch bei eindeutig positiven Bedingungen (nämlich Blattnässe

und Licht) konnte Sporenemission erst mit dem am Mittag einsetzenden Regen registriert werden. Knapp die Hälfte aller untersuchten Sporenflugperioden waren auf Niederschlagsereignisse bei Tag zurückzuführen, davon begannen mehr als drei Viertel unmittelbar mit Einsetzen des Regens bzw. bis zu 60 min nach Regenbeginn. Auch in Freilandstudien von Miller & Waggoner (1958) und Warner & Braun (1992) wurden innerhalb einer Stunde nach Regenbeginn Ascosporen in der Luft nachgewiesen. Die Regenintensität hatte in unserer Studie keine Auswirkung auf den Beginn des Sporenfluges. Auch der typische zeitliche Verlauf der Ascosporenemission mit einem Maximum gegen Mittag schien von der Regenstärke unbeeinflusst und war bei spät einsetzendem Regen zum Abend hin verschoben. Ein zweiter Anstieg, der in knapp einem Fünftel aller Fälle beobachtet wurde, war unabhängig vom Niederschlag und immer wesentlich kleiner als der erste. Er trat nicht auf, wenn das Hauptmaximum nach 12:00 registriert wurde und könnte wahrscheinlich auf einen Nachreifeeffekt zurückzuführen sein. Auch Hirst & Stedman (1962a) und Miller & Waggoner (1958) berichten von einem kleineren Anstieg der Sporenemission nach 8-10 h. Eindeutig regenabhängige Steigerungen der Ascosporenemission waren in unseren Aufzeichnungen höher oder nur wenig niedriger als das erste Maximum des jeweiligen Tages. Durch erneuten oder verstärkten Regen am Nachmittag konnte also der Ascosporenausstoß in einem Ausmaß erneut induziert werden, das durch anhaltende Blattnässe nicht erreicht wurde. Für die nur 2001 beobachtete Verzögerung des Sporenflugs nach Niederschlagsbeginn während des Tages gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Starker Regen könnte in einem Fall zu einer verstärkten Auswaschung der Ascosporen aus der Luft geführt haben (Aylor & Sutton, 1992). Die Temperatur zur Zeit des Regenbeginns lag in allen Fällen nicht oder nur wenig unter 10°C und konnte daher nicht allein für die starke Verzögerung verantwortlich gemacht werden. Im Jahr 2002 wurde trotz Dunkelheit und Temperaturen von ca. 5°C Sporenflugbeginn während der Nacht registriert. Der Temperaturfaktor wird demnach erst ab Temperaturen am Gefrierpunkt limitierend (Stensvand *et al.*, 2000). Die gefangenen Sporenmengen waren in der Primärsaison 2001 gering und erreichten selten über 200 pro Tag. Dies kann auf die Burkard Sporenfallen bzw. das vorgestellte Blattdepot zurückgeführt werden. Besonders niedrig waren die Tages-Gesamtwerte an drei Tagen mit verzögertem Sporenflug, daher ist es möglich, dass der Sporenausstoß zwar gleichzeitig mit dem Regen begann, aber unterhalb der Nachweisgrenze der Burkard Sporenfalle lag. Eine Kombination dieser Faktoren könnte auch zum Ausbleiben des Sporenflugs trotz Regen an einigen Tagen geführt haben. Bei exemplarischen Versuchen im Freiland mit dem Biosampler wurde durch die gleichzeitige Aufzeichnung mit dem Regensensor für kinetische Energie und Beobachtung des Niederschlags sowie die hohe zeitliche Auflösung der Sporenemissionsmessung eine sensible Steuerung der Ascosporenausschleuderung beobachtet. Der oben beschriebene zeitliche Verlauf des Sporenflugs nach Einsetzen des Regens sowie die Verzögerung des Beginns der Sporenemission durch Temperaturen nahe des Gefrierpunktes wurden bestätigt. Auch in diesen Versuchen konnte jeder Sporenausstoß mit einem Regenereignis in Verbindung



gebracht werden, die geringen Regenmengen, die zum Auslösen der Sporenemission notwendig sind, wurden ebenfalls bestätigt (Hirst & Stedman, 1962a).

In der Primärsaison 2001 wurden so gut wie keine Ascosporen während nächtlicher Ereignisse gefangen. In 2002 wurde auch während der Nacht Sporenflug gemessen. Es konnte zwischen drei unterschiedlichen Situationen unterschieden werden: (1.) Regen begann abends kurz nach Sonnenuntergang. (2.) Regenfälle begannen am Tag und setzten sich bis in die Nacht bzw. zum nächsten Tag fort. (3.) Regen setzte in der Nacht ein. In allen drei Situationen wurden Ascosporenemissionen festgestellt, die jedoch zahlenmäßig immer unter dem Wert des folgenden Tagessporenausstoßes lagen. Die Unterdrückung der Ascosporenemission im Dunkeln wurde bisher in zahlreichen Arbeiten beschrieben (Keitt & Jones, 1926; Baumeister, 1954; Hirst & Stedman, 1962a; Brook, 1966; MacHardy & Gadoury, 1986; Aylor & Sutton, 1992; Kohl *et al.*, 1994; Stensvand *et al.*, 1998). Der Einfluss von Licht auf die Ascosporenemission von *V. inaequalis* wurde von Brook (1969a) in seiner Bedeutung nur der Blattnässe nachgeordnet. Eine diurnale Periodizität des Sporenausstoßes während mehrtägiger Regenphasen wurde durch unsere Daten bestätigt, aber die Verminderung der Dunkelhemmung (Gadoury *et al.*, 1998) am Saisonende gegenüber der Hauptsaison wurde nicht beobachtet. Eine Verzögerung des Sporenflugbeginns auf den nächsten Morgen bei nachts einsetzendem Regen wurde während der Ascosporenflugsaison 2002 nicht beobachtet. Auch bei den Freilandstudien von Warner & Braun (1992) wurde die Sporenemission unabhängig vom Licht bei Beginn der künstlichen Benetzung registriert. Der Anteil der bei Nacht ausgestoßenen Ascosporen lag im Jahr 2002 bei knapp 5 % des jährlichen Sporenpotentials und bestätigte somit die Angaben mehrerer Studien (Frey & Keitt, 1925; Keitt & Jones, 1926; Miller & Waggoner, 1958; Hirst & Stedman, 1962a; Brook, 1966). Andere Autoren berichteten von Anteilen zwischen 12 und 18 % des jährlichen Ascosporenpotentials bei Nacht (Warner & Braun, 1992; Kohl *et al.*, 1994). Versuche mit regelmäßiger Befeuchtung in der Klimakammer zeigten ebenfalls eine Lichtabhängigkeit des Ascosporenausstoßes. Diurnale Schwankungen der Sporenzahl wurden verstärkt durch die Erschöpfung des Ascosporenpotentials nach starken Emissionen in Lichtphasen. Eine lichtunabhängige, endogene circadiane Rhythmik konnte ausgeschlossen werden. Sollte *V. inaequalis* eine innere Uhr besitzen, wie sie bisher nicht nur für Pflanzen und Tiere (Dunlap, 1999; Somers, 1999), sondern auch für Pilze beschrieben wurde (Feldman & Dunlap, 1983), so funktioniert sie nicht ohne externe Taktgeber, also möglicherweise durch ein Zusammenspiel der verschiedenen Umweltfaktoren Licht, Temperatur, Luftdruck, Feuchtigkeit, Wind, die sich im Tagesverlauf verändern. Zur Klärung der Auswirkungen des Faktors Licht auf den Sporenausstoß, könnten Freilandaufzeichnungen mit künstlicher Beleuchtung bei Nacht hilfreich sein, da ein Synergismus mit den anderen Umweltfaktoren nicht auszuschließen ist. In mehreren Laborversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Benetzung von „raumluft-trockenen“ Blättern immer starke Sporenemission hervorrief, gleichgültig ob bei Licht

oder bei Dunkelheit. Im Freiland kommen niedrige Luftfeuchtigkeiten (50-60 %) im Frühjahr in der Regel selten vor, jedoch herrschte im März/April 2002 eine dreiwöchige Trockenperiode und auch im Frühjahr 2003 war es im Lauf der Primärsaison mehrere Wochen lang außergewöhnlich trocken. Bei dem ersten Regenereignis nach dieser Trockenzeit 2003 wurden trotz Dunkelheit sofort große Sporenmengen in der Luft festgestellt (Kollar, persönliche Mitteilung). Auch im Jahr 2002 wurde der nächtliche Sporenausstoß bei Regenbeginn nach kurzen Trockenphasen (ein bzw. zwei Tage) und am ersten Tag der Primärsaison nach einer längeren Trockenphase festgestellt. Auch hier kann durch eine Benetzung von trockenen Blättern ein Sporenausstoß trotz Dunkelheit gefördert worden sein. Diese Beobachtung deckt sich mit den Aussagen von Gadoury *et al.* (1998), die durch Zufuhr von trockener Luft (10-15 % rF) bei Windkanalstudien die Dunkelhemmung umgehen konnten. Unterstützt wird diese Hypothese auch durch unsere Beobachtungen der Dunkelhemmung der Sporenemission, die nur in konditionierten Pseudothecien erreicht wurde.

Die Stimulation der Ascosporenemission von *V. inaequalis* durch bewegtes Wasser wurde zur Bestimmung des Ascosporenpotentials in mehreren Arbeiten verwendet. Pseudothecientragende Blattstücke wurden in durch Luftblasen aufgewühltem Wasser behandelt (Hutton & Burchill, 1965; Sutton & Jones, 1976) oder in Wasserbehältern geschüttelt (Gadoury & MacHardy, 1982b; Kollar, 1998a,b; 2000). Bei der von Kollar verwendeten Wasserbadmethode wurden in Wasser flottierende pseudothecientragende Apfelblätter in eine gleichmäßige Kreisbewegung versetzt, aber da durch Reibung und Wirbelbildung Energie verloren ging, war es schwierig, von der Geschwindigkeit der Schüttelbewegung auf die tatsächliche Fließgeschwindigkeit des Wassers zu schließen. Die Wasserbadmethode lieferte dennoch erste Hinweise auf eine geschwindigkeitsabhängige Induktion der Sporenemission durch kinetische Energien in Form von Strömung. Da eine Schwenkfrequenz von 100 U/min maximalen Sporenausstoß induzierte, wurde die Methode als Referenz für alle weiteren Methoden eingesetzt. Lineare und oszillierende Wasserströmungen waren ebenfalls sehr effektiv in ihrer Wirkung auf die Ascosporenemission. Hohe Ausstoßraten selbst in den Negativkontrollen der Versuche mit Wasserströmungen zeigten die außerordentlich starke Wirkung bewegten Wassers auf die Ascosporenemission und stellten gleichzeitig die Schwäche der angewendeten Methoden dar: die regelmäßigen Wechsel der Flüssigkeiten verursachten zusätzliche Reizungen, die ebenfalls den Ascosporenausstoß induzierten. Je kürzer die Abstände zwischen den Probenwechseln waren, desto mehr glich der Sporenausstoß der Negativkontrolle dem jeweiligen Strömungsversuch. Es war daher nicht möglich, oszillierende Strömungen zur Aufklärung von minimalen Reizschwellen zu verwenden. Durch den kontinuierlichen Durchfluss waren Wasserwechsel bei der Methode der linearen Strömung nicht notwendig, der Nachteil dieser Methode war jedoch die starke Verdünnung von Ascosporen mit steigender Fließgeschwindigkeit und Versuchsdauer, die zu Artefakten führte. Ungeachtet der angesprochenen

Schwächen der Systeme konnte durch die Versuche ein übereinstimmendes Bild der Geschwindigkeitsabhängigkeit der Sporenemissionsrate gezeichnet werden. Dabei reagierten die Pseudothecien gleich gut auf lineare und oszillierende Strömungen. Oberhalb eines Schwellenwertes, der mit 3 mm/s bestimmt wurde, konnte der Effekt nicht mehr gesteigert werden. Hohe Frequenzen komplementierten eine niedrige Amplitude und umgekehrt, die Frequenz und die Auslenkung hatten daher keine unterschiedlich starke Auswirkung auf die Sporenemission.

In Beschallungsexperimenten wurde durch Schalldruck Energie auf das Wasser in der Beschallungskammer übertragen, die es in erzwungene Schwingungen versetzte. Trotz der maximal möglichen Einschränkung des verwendeten Wasservolumens war die zu bewegende Masse erheblich, da die Energie nicht direkt übertragen werden konnte, sondern über das Luftpolster zwischen Lautsprecher und Wasseroberfläche. Folglich waren beträchtliche Schalldrücke notwendig, um das Wasser in Bewegung zu versetzen. Nur die Sinusschwingungen im Infraschallbereich waren auf diese Weise in der Lage, den Sporenausstoß zu induzieren, gleichgültig ob es sich um reine oder überlagerte Schwingungen handelte. Die durch die Wasserbadmethode bewirkten Effekte wurden jedoch nicht erreicht. Entgegen den Erwartungen konnten Impulse als Imitation von Tropfeneinschlägen auch bei hoher Taktfrequenz keine Sporenemission induzieren. Möglicherweise ist dies auf die o.g. Schwäche der Energieübertragung zurückzuführen, da die kurzen Ereignisse durch die Kompression der Luftsäule und die Trägheit des Systems nicht in der Lage waren, das Wasser in eine reizauslösende Bewegung zu versetzen. Aber auch bei den Schwingungen, die zu Sporenemission führten, war letztlich nicht klar, welche Energiemenge effektiv auf das Wasser übertragen wurde, da zum einen die Schalldruckpegelmessung nur den Luftschall bestimmen konnte, bevor er auf die Wasseroberfläche traf. Zum anderen war das Schalldruckpegelmessgerät nicht zur Messung im Infraschallbereich ausgelegt. Somit stellten die ermittelten Schalldrücke nur Richtwerte dar, die eine grundsätzliche Einordnung ermöglichten. Durch die genannten Schwächen des Systems ließ sich nicht mit Sicherheit ausschließen, dass die Impulse und hochfrequente Schwingungen keine Wirkung auf die Ascosporenemission ausübten. Eine modifizierte Methode unter Umgehung des Luftschalls könnte hier die fehlenden Erkenntnisse bringen. Als Beispiel wäre eine Methode denkbar, bei der die Blätter direkt über die Schwingspule in Schwingung versetzt werden. Die Energieübertragung über das Medium Luft erwies sich als ineffektiv zur Induktion der Sporenemission und war ein weiterer Hinweis auf die Wirkung der Beschallung durch die Wasserströmungen. Die ursprüngliche Überlegung, Pseudothecien in am Boden überwinterten Blättern in der Apfelanlage durch Beschallung zur Sporenemission zu reizen, war somit eine utopische Vorstellung.

Die Beschallung mit Infraschall stellte letztlich eine weitere Möglichkeit zur Strömungserzeugung dar und ermöglichte durch die einfache Handhabung eine quantitative Charakterisierung der Reizantwort hinsichtlich zeitlicher Auflösung,

Reizschwellen und die für maximalen Sporenausstoß notwendige Quelldauer der Pseudothecien. Die Wasseraufnahme der Pseudothecien ist die wichtigste Bedingung für den Ascosporenausstoß (Hirst & Stedman, 1962a; Brook, 1969a), der innerhalb von Minuten nach der Befeuchtung einsetzt (MacHardy & Gadoury, 1986), aber die für maximalen Sporenausstoß notwendige Quelldauer wurde bisher nicht definiert. Eine Korrelation zwischen Reiz und Reizantwort in unseren Experimenten wurde nach einer Ruhezeit von 30 min erreicht. Erst nach Ablauf dieser Zeit hatte wahrscheinlich die Mehrzahl der reifen Pseudothecien bzw. der in ihnen befindlichen Asci ausreichend Wasser aufgenommen, um bei Einsetzen der Reizung reagieren zu können. Ascosporen wurden auch schon nach einer Minute Quelldauer im Wasser gefunden. Hierbei könnte es sich um die bereits erwähnte unspezifische Freisetzung von Sporen handeln. Möglicherweise waren diese Asci während der Lagerung auch degeneriert und die Ascosporen, die man nach kurzen Quellzeiten findet, wurden nicht aktiv freigesetzt sondern lediglich ins Wasser gespült. Wie bei den o.g. Versuchen mit Wasserströmung stellten auch bei den Beschallungsexperimenten die Probenwechsel eine Reizung dar. Daher waren bei Experimenten mit häufiger Probennahme die cumulativen Sporenzahlen zwischen behandelten und unbehandelten Proben kaum unterscheidbar. Eine deutliche Abhängigkeit der Ascosporenemission von der Reizung war trotzdem zu bestimmen anhand des unterschiedlichen Musters, das sich bei abwechselnd behandelten und unbehandelten Intervallen ergab. Grundsätzlich wurde die quantitative Antwort der Ascosporenemission auf eine Reizeinwirkung durch die Anzahl der ausschleuderbereiten Asci limitiert, und damit durch die Inkubationsdauer, daher konnte der Effekt durch längere Reizeinwirkung nicht gesteigert werden. War die Mehrheit der Pseudothecien innerhalb einer Blattprobe ausschleuderbereit, wurde eine Reizantwort unmittelbar und ohne Nachwirkungen beobachtet. Einzelreize über eine bestimmte Zeitspanne schienen von den Pseudothecien aufgenommen und addiert zu werden und führten zur gleichen Antwort wie die gleiche Reizsumme am Stück. Die Wirkung von so geringen Reizmengen wie 10 oder 20 Sekunden und die unmittelbare Antwort zeigten einen sensibel gesteuerten Mechanismus der Reizverarbeitung und bestätigten die Beobachtungen im Freiland, dass schon sehr kurze und sanfte Regenereignisse die Sporenemission induzieren. In den Versuchen mit Wasserströmungen wurde bewiesen, dass untergetauchte Pseudothecien ohne zusätzliche Reizeinwirkung eine deutlich geringere Sporenemission zeigten. Wasserströmungen können in der Natur entstehen, indem ein Wasserfilm durch Wind, Ablauf oder Aufprall eines Wassertropfens in Bewegung versetzt wird. Bei letztgenanntem Ereignis handelt es sich um ein Schwingungsereignis, wie mit den Tropfenanalysen gezeigt wurde. Die Möglichkeit der Vibrationserzeugung zur Induktion der Sporenemission wurde bei *V. inaequalis* bisher nicht verwendet und wurde in dieser Arbeit durch oszillierende Wasserströmungen imitiert. Zur Frage, welche Strukturen und Mechanismen an der Reizaufnahme und -weiterleitung beteiligt sind, gibt es bisher nur Vermutungen. Eine Beteiligung der Setae an der Reizaufnahme wäre auf den ersten Blick durch ihre äußere Ähnlichkeit zu Sinneshärchen nicht auszuschließen. Diese Borsten werden jedoch nicht an allen

Fruchtkörpern gefunden (Aderhold, 1896). Es wurde bisher nicht aufgeklärt, ob die Borsten sekundär abgefallen oder gar nicht erst angelegt worden sind. Sollte ersteres zutreffen, wäre zu klären, ob solche borstenlosen Pseudothecien noch zur Sporenausschleuderung befähigt sind. Auch der Ascus selbst kann die notwendigen Strömungsrezeptoren besitzen. Das Aufreißen der äußeren Hülle ist die Voraussetzung für die Ausdehnung des Endoascus durch den osmotischen Druck, der zum Ausschleudern der Ascosporen führt. In diesem Zusammenhang wurde bereits eine direkte Einwirkung von Licht auf die Ascusspitze vermutet (Brook, 1975), die zum Zerreißen des Exoascus führt. Da durch Wasserströmungen erzeugte Sporenemission in der Dunkelheit nicht unterdrückt wurde, könnte hier eine Art Kurzschluss vorhanden sein. Die offensichtlich starke Reizeinwirkung könnte den fehlenden Lichtreiz ersetzen. Möglicherweise ist die Strömung auch mechanisch an dem Aufreißen des Exoascus beteiligt, das würde bedeuten, dass die Reizung durch Wasserströmung unter Umständen zu intensiv und daher in der Lage ist, die natürlichen Hemm-Mechanismen zu überwinden. Die Hemmung durch tiefe Temperaturen und chemische Hemmstoffe zeigte jedoch, dass der normale Mechanismus durch die Strömung nicht zerstört wurde. In der Natur könnten starke Reizungen bei Regenfällen hoher Intensität zu einer Überwindung der Dunkelhemmung führen, möglicherweise additiv zu einem Effekt, der durch Benetzung nach langer Trockenheit entsteht.

Die erstmalige Untersuchung der Wasserkompartimente bei natürlichem Regen und Labortropfen-Benetzung bestätigte, dass von den Blättern ablaufendes Wasser immer Ascosporen enthielt. Eine bisher unbekannte Größe, nämlich die Zahl der in den Boden gewaschenen Sporen, konnte definiert werden. Die Deposition von Partikeln aus der Luft ist hauptsächlich abhängig von der Regenintensität (Chamberlain, 1975; Pruppacher & Klett, 1980; Aylor & Sutton, 1992). Durch die gleichzeitige Bestimmung des Ascosporengehaltes in den Luft- und Wasserkompartimenten wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass bei hoher Regenintensität sogar mehr Ascosporen ausgewaschen wurden als in die Luft gelangten. Die Spritzverbreitung wurde bei Ascosporen von *V. inaequalis* ebenfalls bisher noch nie quantitativ bestimmt. Im Spritzwasser bei prasselndem Regen konnten in unseren Versuchen Ascosporen gefunden werden, jedoch nie mehr als im Luftkompartiment. Die in Wassertröpfchen gefangenen Sporen könnten entweder zu Boden gewaschen werden oder in die Luft gelangen und vom Wind transportiert werden (Fitt *et al.*, 1989). Hierbei könnte es sich um einen bisher nicht beachteten Verbreitungsmechanismus von *V. inaequalis* handeln, der von der Regenintensität abhängig ist, aber die epidemiologische Bedeutung der Sporen im Spritzwasser ist noch zu klären. Die Regenintensität war für die Auslösung der Sporenemission und den Anteil der in die Luft gelangenden Ascosporen auch in diesen Versuchen nicht der entscheidende Faktor. Jedoch konnten nur lang anhaltende Regenfälle den Ascosporengehalt in Luft- und Wasserkompartimenten über mehrere Stunden auf gleichbleibend hohem Niveau halten. Der sich bildende dicke Wasserfilm auf den Blättern könnte eine Ursache dafür sein, dass viele der ausgeschleuderten Sporen

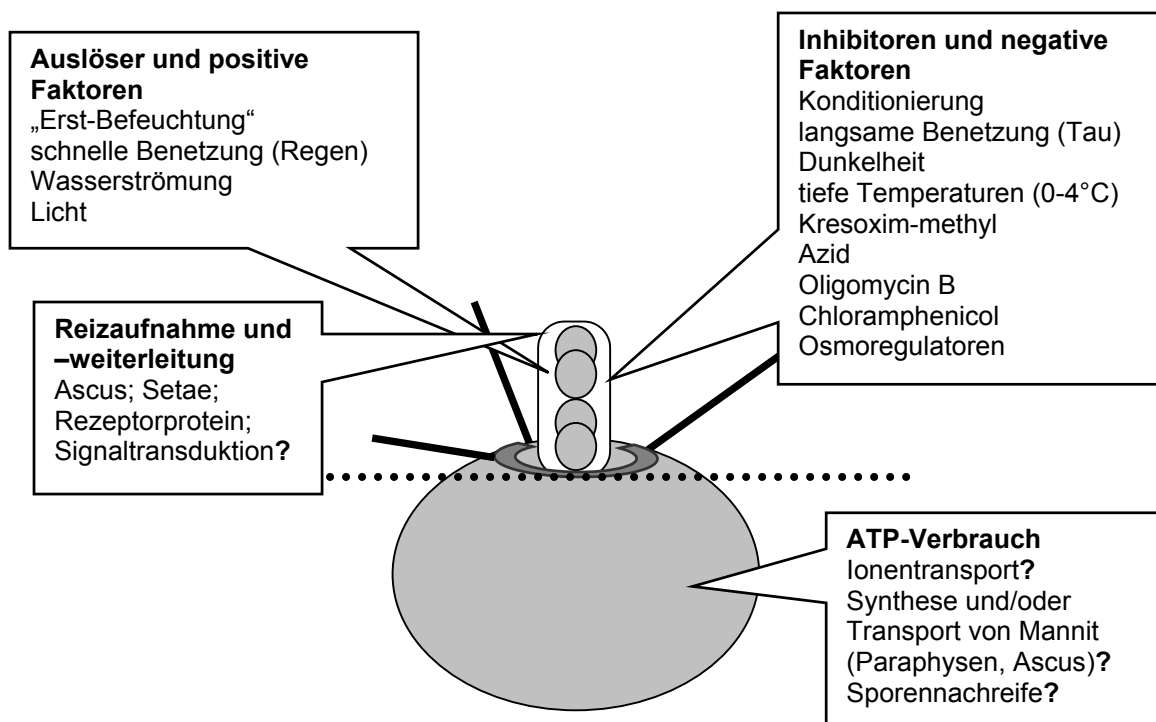
nicht in die Luft gelangten, sondern mit dem ablaufenden Wasser abgewaschen oder durch Tropfeneinschläge weggespritzt wurden. Dass ein dicker Wasserfilm die Sporen daran hindern kann, in die Luft zu gelangen, wurde bereits von Moore (1958) untersucht, der daher unbeständigen Regen mit intermediären Trockenphasen für die beste Voraussetzung für die Ascosporenemission hielt. Bei erneutem Regen oder Laborbefeuchtung nach einer Pause beobachteten wir eine erneute Sporenemission, nachdem der Sporenausstoß bei abnehmender Blattnässe zurückgegangen war. Die auslösende Wirkung von Blattnässe und Regen zu trennen war in den Freilandversuchen nur schwer möglich, da die Blätter nach dem Regenende schnell trockneten. In den entsprechenden Laborversuchen jedoch konnte beobachtet werden, dass der Sporenausstoß aus feucht gehaltenen Blättern mit der Zeit abnahm und erst wieder durch eine erneute Tropfenbefeuchtung induziert wurde. Die Ergebnisse sprechen für eine nachhaltigere Wirkung von prasselndem Regen auf die Dauer des Sporenausstoßes. Aylor & Sutton (1992) fanden jedoch bei ihren Freilandbeobachtungen keine Abhängigkeit zwischen Regenrate und Emissionsrate der Ascosporen.

Die Ascosporenfreisetzung in die Luft zeigte unabhängig von Luftbewegungen oder der Benetzungsvariante in der ersten Stunde nach Start der Benetzung den gleichen zeitlichen Verlauf. Andauernde Blattnässe alleine war für eine kontinuierliche Sporenemission nicht ausreichend, nur durch Tropfen konnte über mehrere Stunden ein kontinuierlicher Ascosporenausstoß induziert werden. In Labor- und Windkanalstudien oder in Freilandstudien mit künstlicher Benetzung wurden verschorfte Blätter immer durch Besprühen mit fein verteilten Tröpfchen (Brook, 1969b; 1975; Warner & Braun, 1992; Gadoury *et al.*, 1996; 1998) bzw. Tauchen befeuchtet (Brook, 1969a). Die aufgebrachten Wassermengen waren nur in wenigen Fällen definiert (Gadoury *et al.*, 1996; 1998). Trotzdem wurde mit diesen Benetzungsmethoden stets signifikanter Sporenausstoß induziert. Der Ascosporenausstoß in stille Luft wurde bisher nicht quantitativ untersucht. In der einzigen vergleichbaren Studie wurden die Blattproben in einem Winkel von 90° zum Kammerboden positioniert, um die Schleuderweiten zu bestimmen (Aylor & Anagnostakis, 1991), die Benetzungsart für die Blattproben wurde von den Autoren nicht spezifiziert. Die starke Variation des Ascosporenausstoßes in unseren Versuchen ließ auf einen unspezifischen Effekt der Tauchbenetzung auf trockene Blätter schließen, denn er war unabhängig von der Dauer der Tauchphase und konnte durch einen erneuten Tauchvorgang nicht wiederholt werden. Trotz vorsichtiger Handhabung war die Tauchbenetzung nicht vollständig frei von kinetischen Reizen, so konnten zum Beispiel Wasserströmungen beim Herausnehmen aus dem Tauchbad entstehen, die eventuell für die Auslösung der Sporenemission verantwortlich waren. Durch die Orientierung der Blätter über der Wasseroberfläche sollte verhindert werden, dass ausgeschleuderte Ascosporen auf die Blätter zurückfielen und nicht quantifiziert werden konnten. Aber nach dem Tauchen lag zunächst ein dicker Wasserfilm (ca. 200 µm) auf den Blättern, den manche Ascosporen vielleicht nicht durchbrechen konnten. Einige Ascosporen gelangten

daher nicht an die Oberfläche und hafteten bei Rückgang des Wasserfilms eventuell am Blatt an. Diese Annahme wurde durch zwei Beobachtungen bestätigt: die vergleichsweise höhere Ascosporenmenge, die im Tauchbad nach der zweiten Tauchbenetzung gefunden wurde und die Ascosporen, die durch anschließendes Schütteln in Glycerinlösung erhalten wurden. Eine maximale Schichtdicke des Wasserfilms, den die Ascosporen nicht mehr durchbrechen können, wurde von Aylor & Anagnostakis (1991) mit 200-250  $\mu\text{m}$  angegeben. Auch bei Tropfenbenetzung und natürlicher Regenbenetzung entstanden dicke Wasserschichten, die aber die Freisetzung von Ascosporen in die Luft nie vollständig unterbanden. Auch in diesem Fall könnte eine Hemmstoffbehandlung aufklären, ob die im Ablaufkompartiment gefundenen Ascosporen durch die Strömung induziert wurden, oder ob sie lediglich im Wasserfilm gefangen waren und mit der Strömung abgewaschen wurden. Ascosporenausstoß war bei Befeuchtung durch Sprühtröpfchen im Labor bzw. Sprühregen im Freiland auch unabhängig von Wasserströmungen induzierbar. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Biosampler lieferten jedoch Hinweise auf eine stimulierende Wirkung von Wasserströmungen auf den Sporenausstoß, da der Sporengehalt bei mehrstündiger Beregnung/Betropfung im Wasser kaum zurückging (auch wenn die Tropfen ohne kinetische Energie auftrafen), während die Sporenemission in die Luft fast ganz gegen Null ging. Die mehrtägigen Versuche unter kontrollierten Bedingungen deuteten ebenso eine unabhängige Steuerung der Ascosporenemission in Luft- und Wasserkompartimente an. Die Ergebnisse sprechen für die Existenz zweier unterschiedlicher Mechanismen, die die Sporenemission bei kurzer und dauerhafter Reizeinwirkung regulieren. Es wäre denkbar, dass bei einer Benetzung von ausgetrockneten Blättern immer eine sofortige und starke Reaktion der reifen Asci ausgelöst wird. Asci, die erst im Verlauf einer längeren Benetzungsdauer nachreifen, benötigen dagegen eventuell eine stärkere und kontinuierliche Reizung, die nur durch Wasserströmungen geliefert werden kann. Eine derartige Steuerung der Sporenemission wäre auch für die Verhältnisse im Freiland plausibel, denn nur wenn es ausdauernd und stark regnet, ist auch durch die fortgesetzte Nässe junger Blätter eine erfolgreiche Infektion gewährleistet. Hier wäre zu klären, ob die erste Reaktion ohne spezifische Reizfaktoren ausgelöst wird und energieunabhängig ist, während die zweite Antwort auf ATP und spezifische Reize angewiesen ist. Die Verwendung von spezifischen Hemmstoffen der ATP-Bildung (Azid, Kresoxim-methyl) wäre hierfür ein möglicher Weg, da eine Hemmwirkung auf die Sporenemission durch diese Stoffe bestätigt wurde. Denkbar wäre auch ein ATP-Verbrauch im Zusammenhang mit den Vorgängen bei der Nachreife von Ascosporen im Zuge einer länger andauernden Reizung. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Benetzungsarten handelte es sich um effektive und schnelle Methoden, mit denen rasch eine Durchfeuchtung der Blätter erzielt wurde. Da selbst durch die Befeuchtung mit künstlichem Nebel, also ohne eine kinetische Reizung, eine signifikante Sporenemission erzielt wurde, spielt in der Natur bei natürlichen Tauereignissen eventuell auch die lange Zeitdauer eine Rolle, die benötigt wird, um das verschorfte Blatt vollkommen zu durchfeuchten. Dies kann ein entscheidender Unterschied zwischen Regen und Tau sein, der die

Sporenemission bei Tau eventuell verhindern kann. Diese Fragestellung könnte durch Benetzung von Blättern über Kapillarkräfte oder durch Kondensation gelöst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen kinetischen Auslösern und der Sporenemission von *V. inaequalis* und sprechen für eine auslösende Wirkung des Regens auf den Sporenausstoß, die über die rein benetzende Wirkung des Wassers hinausgeht. Endgültige Beweise konnten in dieser Arbeit jedoch ohne die Messung der kinetischen Energie nicht geliefert werden. Ein Zusammenspiel der hier besprochenen Faktoren, die bei der Sporenemission mitwirken (könnten), ist in **Abb. 54** dargestellt.



**Abb. 54:** Schematische Darstellung der auslösenden und inhibitorischen Faktoren der Ascosporenausschleuderung, potentielle Mechanismen der Reizaufnahme und -weiterleitung sowie der ATP-verbrauchenden Vorgänge.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den kinetischen Auslösern der Sporenausschleuderung bei *V. inaequalis* eröffnen die Möglichkeit einer Schorfbekämpfung, bei der eine künstliche Beregnung in Trockenphasen den Sporenausstoß induziert, die Sporen im Anschluss jedoch keine Infektionsbedingungen vorfinden. Denkbar wäre z. B. die Sporenemission durch eine 30- bis 60-minütige intensive Beregnung zu induzieren, wobei der größte Teil der Ascosporen mit dem ablaufenden Wasser in den Boden gewaschen wird und daher keine Infektionsrelevanz besitzt. Die Blattnässe der jungen Blätter am Baum wäre zudem unter diesen Bedingungen für die Keimung und Etablierung der Infektion durch die Ascosporen nicht ausreichend und das Sporenpotential in einer folgenden



natürlichen Regenphase wäre reduziert. Die künstliche Beregnung wurde als Bekämpfungsstrategie von Mondal *et al.* (2003) für den Ascomyceten *Mycosphaerella citri* vorgeschlagen, der in einigen Punkten der Ascosporenfreisetzung große Ähnlichkeiten zu *V. inaequalis* aufweist. Eine geeignete Beregnungsstrategie bzw. Ergebnisse aus der Praxis wurden jedoch nicht beschrieben.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Sensor-Prototyp zur Messung der kinetischen Energie des Regens wurde entwickelt und exemplarisch eingesetzt. Der Sensor basierte auf einem Lautsprecher als Schwingungsaufnehmer, der die Energie auftreffender Tropfen in elektrische Impulse umwandelte und über eine Verstärker- und Gleichrichterelektronik auf einen Schreiber übertrug. Unterschiedliche Regenintensitäten waren anhand von Höhe und Dichte der Ausschläge unterscheidbar und mit den von der Wetterstation gemessenen Regenhöhen zu verifizieren. Ein käuflich erworbener Sensor für die kinetische Energie erwies sich als ungeeignet.

Durch die Aufnahme und digitale Analyse von Schwingungsimpulsen in einem Audioprogramm mit unterschiedlichen Mikrofonlautsprechern, insbesondere mit Blättern als natürlichen Schwingungsaufnehmern, konnte ein Tropfeneinschlag als Sinusimpuls mit hoher Anfangsamplitude und periodischem Ausschwingen definiert werden, dessen Frequenz etwa 156 Hz (trockenes Blatt) bzw. 91 Hz (nasses Blatt) betrug. Frequenzveränderungen bei Paraffinöl- und Ethanoltröpfchen wiesen auf die Dominanz der Flüssigkeitsschwingung hin. Die Membranen der Mikrofonlautsprecher verursachten Artefakte. Hochwertige Mikrofone waren durch ihre indirekte Aufnahmeweise über Luftschall nicht zur Schwingungsanalyse geeignet.

Die besten Bedingungen zur Nachreife von Ascosporen im Frühjahr wurden durch abwechselnde Feuchte- und Trockenintervalle erreicht, die Temperatur war zwischen 4°C und 20°C kein limitierender Faktor. Die mehrmonatige trockene Lagerung bei 50% rF und Temperaturwechseln zwischen 5°C und 17°C führte zu Seneszenzerscheinungen bei der Sporenemission. Die sicherste Konservierungsmethode reifer Pseudothecien war die Tiefkühlung getrockneter Blätter bei -20°C. Eine Konditionierung durch Benetzung der Blätter und Inkubation für 14-16 h bei RT verminderte den Sporenausstoß und war die Voraussetzung für die hemmende Wirkung der Dunkelheit auf den Sporenausstoß. Durch kinetische Reize mittels Wasserströmungen und künstlicher Tropfenbenetzung wurden diese Hemmwirkungen überwunden. Ein Einfluss des Entwicklungszustandes der Pseudothecien im Verlauf einer Primärsaison auf das Sporenausstoßverhalten wurde nicht festgestellt.

Die Gegenüberstellung der Sporenflugaufzeichnungen im Freiland mit den Blattnässe-, Niederschlags- und Temperaturdaten zeigte die Abhängigkeit der Sporenemission von Regenfällen und den Einfluss des Regens auf die Dauer des Sporenausstoßes und die erneute Induktion in Blattnässephasen. Die Regenintensität hatte keine Auswirkungen auf den Sporenflugbeginn. Sporenausschleuderungen in Tauperioden wurden nicht beobachtet. Die Lichtabhängigkeit der Sporenemission wurde im Freiland und in Klimakammerversuchen bestätigt, konnte aber in Laborversuchen durch die

kinetischen Reize überwunden werden. Eine endogene circadiane Steuerung der Sporenemission wurde nicht beobachtet.

Kinetische Reize durch bewegtes Wasser induzierten eine starke und dauerhafte Sporenemission. Geschwindigkeiten von 3 mm/s bewirkten sowohl bei linearer wie oszillierender Strömung eine maximale Ausstoßrate. Die Beschallung unter Wasser getauchter Blätter mit Sinusschwingungen im Infraschallbereich (5-15 Hz) versetzte das Wasser in Abhängigkeit des Schalldruckpegels in erzwungene Schwingungen, die die Ascosporenausschleuderung induzierten. Keine Induktion wurde durch Beschallung mit Impulsen, Frequenzen oberhalb von 50 Hz oder durch Schallübertragung über die Luft erreicht. Die Ascosporenemission war nach einer 30-minütigen Queldauer maximal, erfolgte ohne Zeitverzögerung und ohne Nachwirkung. Reizeinwirkungen von 10 bis 20 Sekunden waren ausreichend, um in Abhängigkeit der Wiederholungshäufigkeit Sporenausstoß zu induzieren.

Die Sporenfreisetzung war unabhängig von Luftbewegungen. Die Benetzungsvarianten durch Tauchen, künstlichen Nebel oder Tropfen erwiesen sich als gleichwertig bei der Induktion der Sporenemission. Blattnässe alleine war im Gegensatz zu kontinuierlicher Tropfbenetzung als Reiz für lang anhaltenden Sporenausstoß nicht ausreichend. Nach einer zwischenzeitlichen Trockenphase wurde der Sporenausstoß durch Tropfbenetzung wieder angeregt, während Tauchbenetzung dazu nicht in der Lage war. Bei Tropfbenetzung und Regenbenetzung wurden im ablaufenden Wasser immer Ascosporen gefunden, deren Anteil unter Laborbedingungen bis zu fünfmal höher und bei starkem natürlichen Regen bis zu zweimal höher war als der Anteil der Sporen im Luftkompartiment. Die Ascosporenmengen im Spritzwasser überstiegen nie den Sporenanteil im Luftkompartiment.

Die Ionenzusammensetzung, der pH Wert, wässrige Blattextrakte, Detergenzien, Proteinase K, Staurosporin, Cytochalasin, Harnstoff, Ammoniumsulfat, Pyrimethanil, membrankanalbildende Antibiotika, Inhibitoren von Membrantransportproteinen, Transkription, Replikation und der eukaryontischen Proteintranslation beeinflussten den Sporenausstoß in Laborversuchen nicht. Eine spezifische Hemmung der Ascosporenausschleuderung durch Inhibitoren der Atmungskette (Azid, Kresoxim-methyl), der  $F_1F_0$ -ATPase (Oligomycin, Azid) und der Proteinsynthese (Chloramphenicol) in Mitochondrien konnte erstmals eine unmittelbare Energieabhängigkeit der Ascosporenemission belegen. Potente Hemmstoffe der aktiven Sporenausschleuderung waren auch die osmotisch aktiven Verbindungen Saccharose, Glycerin, Mannit und Sorbit ab Konzentrationen von 0,15 M.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aderhold, R. (1896). Die Fusicladien unserer Obstbäume. I. Teil. Landwirtschaftliche Jahrbücher **25**, 875-914.
- Ahmad, I., Larher, F. & Steward, G. R. (1979). Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritime*. New Phytologist **82**, 671-678.
- Aylor, D. E. (1990). The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. Annual Review of Phytopathology **28**, 73-92.
- Aylor, D. E. (1998). The aerobiology of apple scab. Plant Disease **82**, 838-849.
- Aylor, D. E. & Anagnostakis, S. L. (1991). Active discharge distance of ascospores of *Venturia inaequalis*. Phytopathology **81**, 548-551.
- Aylor, D. E. & Sutton, T. B. (1992). Release of *Venturia inaequalis* ascospores during unsteady rain: relationship to spore transport and deposition. Phytopathology **82**, 532-540.
- Bailey, L.H. (1895). The recent apple failures of western New York. Cornell University Agricultural Experiment Station Bulletin **84**, 1-34.
- Baumeister, G. (1954). Weitere Untersuchungen zur Biologie des Apfelschorfes. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem) **80**, 98-102.
- Becker, W. F., von Jagow, G., Anke, T. & Steglich, W. (1981). Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazole: new inhibitors of the bc<sub>1</sub> segment of the respiratory chain with an E-β-methoxyacrylate system as common structural element. FEBS Letters **132**, 329-333.
- Bertrand, P. F. & English, H. (1976). Release and dispersal of conidia and ascospores of *Valsa leucostoma*. Phytopathology **66**, 987-991.
- Brook, P. J. (1966). The ascospore production season of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., the apple black spot fungus. New Zealand Journal of Agricultural Research **9**, 1064-1069.
- Brook, P. J. (1969a). Effects of light, temperature, and moisture on release of ascospores by *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. New Zealand Journal of Agricultural Research **12**, 214-227.
- Brook, P. J. (1969b). Stimulation of ascospore release in *Venturia inaequalis* by far red light. Nature **222**, 390-392.
- Brook, P. J. (1975). Effect of light on ascospore discharge by five fungi with bitunicate asci. New Phytologist **74**, 85-92.

- Brook, P. J. (1976). Seasonal pattern of maturation of *Venturia inaequalis* ascospores in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **19**, 103-109.
- Bühler, B. (1995). Einfluss des Strobilurins BAS 490 F auf Wachstum, Kohlenhydratverwertung und zellwandabbauende Enzyme des Apfelschorfpilzes *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Diplomarbeit Universität Heidelberg.
- Burchill, R. T. (1966). Air-dispersal of fungal spores with particular reference to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) Winter). In: M. F. Madelin (Hrsg.), *The Fungus Spore*, 135-140. Butterworths, London.
- Burchill, R. T. (1968). Field and laboratory studies of the effect of urea on ascospore production of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Annals of Applied Biology* **62**, 297-307.
- Burchill, R. T. (1972). Comparison of fungicides for suppressing ascospore production by *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. *Plant Pathology* **21**, 19-22.
- Burchill, R. T. & Hutton, K. E. (1965). The suppression of ascospore production to facilitate the control of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). *Annals of Applied Biology* **56**, 285-292.
- Burchill, R. T., Hutton, K. E., Crosse, J. E. & Garrett, C. M. E. (1965). Inhibition of the perfect stage of *Venturia inaequalis* (Cooke.) Wint., by urea. *Nature* **205**, 520-521.
- Carter, M. V. (1963). *Mycosphaerella pinodes*. II. The phenology of ascospore release. *Australian Journal of Biological Science* **16**, 800-817.
- Carter, M. V. & Moller, W. J. (1961). Factors affecting the survival and dissemination of *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Vesterg. in south Australian irrigated pea fields. *Australian Journal of Agricultural Research* **12**, 878-888.
- Chamberlain, A. C. (1975). The movement of particles in plant communities. In: J. L. Monteith (Hrsg.), *Vegetation and the Atmosphere*. Vol. 1, 155-203. Academic Press, London.
- Connor, S. R. & Heuberger, J. W. (1968). Apple scab: Effect of late-season applications of fungicides on prevention of perithecial development by *Venturia inaequalis*. *Plant Disease Reporter* **52**, 654-658.
- Cook, R. T. A. (1969). Studies on the overwintering of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Ph. D. dissertation. University of London, England.
- Curtis, K. M. (1922). Ascospore ejection of the apple and pear black-spot fungi. *New Zealand Journal of Science and Technology* **5**, 83-90.

- Deadman, M. L. & Cooke, B. M. (1989). An analysis of rain-mediated dispersal of *Drechslera teres* conidia in field plots of spring barley. *Annals of Applied Biology* **115**, 209-214.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Dutra, P. M. L., Dias, F. A., Santos, M. A. A., Rodrigues, C. O., Romeiro, A., Attias, M., De Souza, W., Lopes, A. H. C. S. & Meyer-Fernandes, J. R. (2001). Secreted phosphatase activities in trypanosomatid parasites of plants modulated by platelet-activating factor. *Phytopathology* **91**, 408-414.
- Feldman, J. F. & Dunlap, J. C. (1983). *Neurospora crassa*: A unique system for studying circadian rhythms. *Photochemistry and Photobiology Reviews* **7**, 319-368.
- Fitt, B. D. L., McCartney, H. A., Creighton, N. F., Lacey, M. E. & Walklate, P. J. (1988). Dispersal of *Rhynchosporium secalis* conidia from infected barley leaves or straw by simulated rain. *Annals of Applied Biology* **112**, 49-59.
- Fitt, B. D. L., McCartney, H. A. & Walklate, P. J. (1989). The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 241-270.
- Fitt, B. D. L., Walklate, P. J., McCartney, H. A., Bainbridge, A., Creighton, N. F., Hirst, J. M., Lacey, M. E. & Legg, B. J. (1986). A raintower and wind tunnel for studying the dispersal of plant pathogens by rain and wind. *Annals of Applied Biology* **109**, 661-671.
- Frey, C. N. & Keitt, G. W. (1925). Studies of spore dissemination of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. in relation to seasonal development of apple scab. *Journal of Agricultural Research* **30**, 529-540.
- Gadoury, D. M. & MacHardy, W. E. (1982a). A model to estimate the maturity of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **72**, 901-904.
- Gadoury, D. M. & MacHardy, W. E. (1982b). Effects of temperature on the development of pseudothecia of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* **66**, 464-468.
- Gadoury, D. M. & MacHardy, W. E. (1984). Suppression of ascocarp development by Baycor, Benlate, and Vangard, 1983. *Fungicide and Nematicide Tests* **39**, 10.
- Gadoury, D. M. & MacHardy, W. E. (1985). Negative geotropism in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **75**, 856-859.
- Gadoury, D. M. & MacHardy, W. E. (1986). Forecasting ascospore dose of *Venturia inaequalis* in commercial apple orchards. *Phytopathology* **76**, 112-118.
- Gadoury, D. M., MacHardy, W. E. & Rosenberger, D. A. (1989). Integration of pesticide application schedules for disease and insect control in apple orchards of the northeastern United States. *Plant Disease* **73**, 98-105.

- Gadoury, D. M., Seem, R. C. & Stensvand, A. (1994). Ascospore discharge in *Venturia inaequalis*. Norwegian Journal of Agricultural Sciences. Supplement No. 17, 205-219.
- Gadoury, D. M., Stensvand, A. & Seem, R. C. (1996). A wind tunnel for controlled-environment studies of ascospore release by *Venturia inaequalis*. Phytopathology **86**, 596-601.
- Gadoury, D. M., Stensvand, A. & Seem, R.C. (1998). Influence of light, relative humidity, and maturity of populations on discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. Phytopathology **88**, 902-909.
- Garrat, J. R. & Segal, M. (1988). On the contribution of atmospheric moisture to dew formation. Boundary-Layer Meteorology **45**, 209-236.
- Geagea, L., Huber, L. & Sache, I. (1999). Dry-dispersal and rain-splash of brown (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) and yellow (*P. striiformis*) rust spores from infected wheat leaves exposed to simulated raindrops. Plant Pathology **48**, 472-482.
- Golba, B., Lux-Endrich, A., Treutter, D. & Kollar, A. (2000). Wirkung pflanzlicher Phenole und deren Oxidationsprodukte auf die Proteine des Apfelschorfpilzes, *Venturia inaequalis*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem) **376**, 158.
- Gottwald, T. R., Trocine, T. M. & Timmer, L. W. (1997). A computer-controlled environmental chamber for the study of aerial fungal spore release. Phytopathology **87**, 1078-1084.
- Gregory, P. H. (1973). The Microbiology of the Atmosphere. Leonard Hill, London.
- Gregory, P. H., Guthrie, E. J. & Bunce, M. E. (1959). Experiments on splash dispersal of fungus spores. Journal of General Microbiology **20**, 328-354.
- Grove, G. G., Madden, L. V. & Ellis, M. A. (1985). Splash dispersal of *Phytophthora cactorum* from infected strawberry fruit. Phytopathology **75**, 611-615.
- Gunn, R. & Kinzer, G. D. (1949). The terminal velocity of fall for water droplets in stagnant air. Meteorology **6**, 243-248.
- Gupta, G. K. (1992). Apple Scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Winter). In: J. Kumar, H. S. Chaube, U. S. Singh & A. N. Mukhopadhyay (Hrsg.), Plant Diseases of International Importance. Vol. III. Diseases of Fruit Crops, 1-31. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Hall, R. L. & Calder, I. R. (1996). Drop size modification by forest canopies-measurements using a disdrometer. Journal of Geophysical Research **90**, 465-470.

- Hirst, J. M. (1953). Changes in atmospheric spore content: diurnal periodicity and the effects of weather. *Transactions of the British Mycological Society* **36**, 375-392.
- Hirst, J. M. & Stedman, O. J. (1961). The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). I. Frequency of airborne spores in orchards. *Annals of Applied Biology* **49**, 290-305.
- Hirst, J. M. & Stedman, O. J. (1962a). The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). II. Observations on the liberation of ascospores. *Annals of Applied Biology* **50**, 525-550.
- Hirst, J. M. & Stedman, O. J. (1962b). The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). III. The supply of ascospores. *Annals of Applied Biology* **50**, 551-567.
- Hirst, J. M. & Stedman, O. J. (1963). Dry liberation of fungus spores by raindrops. *Journal of General Microbiology* **33**, 335-344.
- Hock, B. & Elstner, E. F. (1988). *Schadwirkungen auf Pflanzen*. 2. Auflage. Wissenschaftsverlag, Mannheim.
- Hutton, K. E. (1954). Eradication of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. *Nature* **174**, 1017-1018.
- Hutton, K. E. & Burchill, R. T. (1965). The effect of some fungicides and herbicides on ascospore production of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Annals of Applied Biology* **56**, 279-284.
- Ingold, C. T. (1964). Possible spore discharge mechanism in *Pyricularia*. *Transactions of the British Mycological Society* **47**, 573-575.
- Ingold, C. T. (1971). *Fungal Spores: Their Liberation and Dispersal*. Clarendon Press, Oxford.
- Ingold, C. T. & Marshall, B. (1962). Stimulation of spore discharge by reduced humidity in *Sordaria*. *Annals of Botany* **26**, 563-568.
- James, R. S. & Sutton, T. B. (1982). Environmental factors influencing pseudothecial development and ascospore maturation of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **72**, 1073-1080.
- Jehlicka, R. & Kollar, A. (2000). Die Wirkungsweise von Pyrimethanil auf den Apfelschorfpilz, *Venturia inaequalis*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem)* **376**, 104.
- Keitt, G. W., Clayton, C. N. & Langford, M. H. (1941). Experiments with eradicant fungicides for combating apple scab. *Phytopathology* **31**, 296-322.
- Keitt, G. W. & Jones, L. K. (1926). Studies of the epidemiology and control of apple scab. *Wisconsin Agricultural Experiment Station Research Bulletin* **73**.



- Keitt, G. W. & Palmiter, D. H. (1937). Potentialities of eradicant fungicides for combating apple scab and some other plant diseases. *Journal of Agricultural Research* **55**, 397-436.
- Kohl, R. (1993). Untersuchungen zur Epidemiologie des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). Diplomarbeit Universität Heidelberg.
- Kohl, R., Blanco, J. & Kollar, A. (1994). Detection of infection periods and evaluation of the parameters for the epidemiology of the apple scab disease. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **101**, 378-385.
- Kollar, A. (1996). Primäre Infektionsperioden des Apfelschorfes (*Venturia inaequalis*) und die Bewertung der biologischen und meteorologischen Faktoren. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem)* **321**, 543.
- Kollar, A. (1997a). Aktuelle Forschung an dem bedeutendsten Erreger im Apfelanbau, dem Apfelschorfpilz *Venturia inaequalis*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **49**, 131-136.
- Kollar, A. (1997b). Present research on the most important pathogen on apple, the apple scab fungus *Venturia inaequalis*. *Plant Research and Development* **46**, 88-96.
- Kollar, A. (1998a). A simple method to forecast the ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105**, 489-495.
- Kollar, A. (1998b). Eine einfache Methode zur Bestimmung der potentiellen Ascosporenausschleuderung von *Venturia inaequalis*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem)* **357**, 259.
- Kollar, A. (2000). A waterbath method for detection of potential ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. In: L. Parisi (Hrsg.) *Integrated Control of Pome Fruit Diseases*, 53-60. *IOBC wrps Bulletin* **23**.
- Leach, C. M. (1975). Influence of relative humidity and red-infrared radiation on violent spore release by *Drechslera turcica* and other fungi. *Phytopathology* **65**, 1303-1312.
- Leach, C. M. (1980a). Influence of humidity, red-infrared radiation, and vibration on spore discharge by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* **70**, 201-205.
- Leach, C. M. (1980b). Vibrational release of conidia by *Drechslera maydis* and *D. turcica* related to humidity and red-infrared radiation. *Phytopathology* **70**, 196-200.

- Leach, C. M. (1980c). Influence of humidity and red-infrared radiation on spore discharge by *Drechslera turcica* - additional evidence. *Phytopathology* **70**, 192-196.
- Leach, C. M. (1980d). Evidence for an electrostatic mechanism in spore discharge by *Drechslera turcica*. *Phytopathology* **70**, 206-213.
- Lipson, E. D., Lopez-Diaz, I. & Pollock, J. A. (1983). Mutants of *Phycomyces* with enhanced tropisms. *Experimental Mycology* **7**, 241-252.
- Louw, A. J. (1951). Studies of the influence of environmental factors on the overwintering and epiphytology of apple scab (*Venturia inaequalis* [Cke.] Wint.) in the winter-rainfall area of Cape Province. *South Africa Department of Agricultural Science Bulletin* **310**.
- Lovell, D. J., Parker, S. R., Van Peteghem, P., Webb, D. A. & Welham, S. J. (2002). Quantification of raindrop kinetic energy for improved prediction of splash-dispersed pathogens. *Phytopathology* **92**, 497-503.
- MacHardy, W. E. (1996). *Apple Scab. Biology, Epidemiology, and Management*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- MacHardy, W. E. & Gadoury, D. M. (1986). Patterns of ascospore discharge by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **76**, 985-990.
- Madden, L. V. (1992). Rainfall and the dispersal of fungal spores. *Advances in Plant Pathology* **8**, 39-79.
- Madden, L. V., Wilson, L. L. & Ntahimpera, N. (1998). Calibration and evaluation of an electronic sensor for rainfall kinetic energy. *Phytopathology* **88**, 950-959.
- Madden, L. V., Yang, X. & Wilson, L. L. (1996). Effects of rain intensity on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* **86**, 864-874.
- Marshall, J. S. & Palmer, W. M. (1948). The distribution of raindrops with size. *Journal of Meteorology* **5**, 165-166.
- Mayr, U., Michalek, S., Treutter, D. & Feucht, W. (1997). Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *Journal of Phytopathology* **145**, 69-75.
- McFadden-Smith, W., Northover, J. & Sears, W. (2000). Dynamics of ascospore release by *Apiosporina morbosa* from sour cherry black knots. *Plant Disease* **84**, 45-48.
- Meredith, D. S. (1961). Spore discharge in *Deighthoniella torulosa* (Syd.) Ellis. *Annals of Botany* **25**, 271-78.
- Meredith, D. S. (1963a). Further observations on the zonate eyespot fungus, *Drechslera gigantea*, in Jamaica. *Transactions of the British Mycological Society* **40**, 201-207.

- Meredith, D. S. (1963b). Violent spore release in some Fungi Imperfecti. *Annals of Botany* **27**, 39-47.
- Meredith, D. S. (1973). Significance of spore release and dispersal mechanisms in plant disease epidemiology. *Annual Review of Phytopathology* **11**, 313-341.
- Michalek, S. & Treutter, D. (1998). Stimulierung der Phenolbiosynthese des Apfels (*Malus domestica*) in Hinblick auf induzierte Resistenz. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem)* **357**, 162-163.
- Miller, P. M. (1970). Reducing discharge of ascospores of *Venturia inaequalis* with a spring application of benomyl, thiabendazole, or urea. *Plant Disease Reporter* **54**, 27.
- Miller, P. M. & Rich, S. (1968). Reducing spring discharge of *Venturia inaequalis* ascospores by composting overwintering leaves. *Plant Disease Reporter* **52**, 728-730.
- Miller, P. M. & Waggoner, P. E. (1958). Dissemination of *Venturia inaequalis* ascospores. *Phytopathology* **48**, 416-419.
- Mondal, S. N., Gottwald, T. R. & Timmer, L. W. (2003). Environmental factors affecting the release and dispersal of ascospores of *Mycosphaerella citri*. *Phytopathology* **93**, 1031-1036.
- Moore, M. H. (1958). The release of ascospores of apple scab by dew. *Plant Pathology* **7**, 4-5.
- Müller, E. & Loeffler, W. (1982). *Mykologie*. 4. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart .
- Mundree, S. G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Willigen, C. V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J. M. & Thomson, J. A. (2002). Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnology* **1**, 28-38.
- Munger, K., Germann, U. A. & Lerch, K. (1985). Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene. *The EMBO Journal* **4**, 2665-2668.
- Ntahimpera, N., Madden, L. V. & Wilson, L. L. (1997). Effect of rain distribution alteration on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* **87**, 649-655.
- Oberhofer, H. (1985). *Der Apfelschorf. Lebensweise und Bekämpfung*. Südtiroler Beratungsring für Obst- und Weinbau.
- O'Leary, A. L. & Sutton, T. B. (1986). The influence of temperature and moisture on the quantitative production of pseudothecia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **76**, 199-204.

- Paul, V. (1981). Zur Biologie von *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, dem Erreger des Apfelschorfes. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer **34**, 60-74.
- Pielaat, A., Madden, L. V. & Gort, G. (1998). Spores splashing under different environmental conditions: a modeling approach. Phytopathology **88**, 1131-1139.
- Pinkerton, J. N., Johnson, K. B., Stone, J. K. & Ivors, K. L. (1998). Factors affecting the release of ascospores of *Anisogramma anomala*. Phytopathology **88**, 122-128.
- Pruppacher, H. R. & Klett, J. D. (1980). Microphysics of Clouds and Precipitation. Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, Holland.
- Reynolds, K. M., Bulger, M. A., Madden, L. V. & Ellis, M. A. (1987). New Methods using simulated rain to study the splash dispersal of plant pathogens. Phytopathology **77**, 921-926.
- Rioboo, R., Marengo, M. & Tropea, C. (2002). Time evolution of liquid drop impact onto solid, dry surfaces. Experiments in Fluids **33**, 112-124.
- Rowe, R. C. & Beute, M. K. (1975). Ascospore formation and discharge by *Calonectria crotalariae*. Phytopathology **65**, 393-398.
- Samuel, Y. & Garrett, S. D. (1933). Ascospore discharge in *Ophiobolus graminis* and its probable relation to the development of whiteheads in wheat. Phytopathology **23**, 721-728.
- Shaw, M. W. (1987). Assessment of upward movement of rain splash using a fluorescent tracer method and its application to the epidemiology of cereal pathogens. Plant Pathology **36**, 201-213.
- Shaw, M. W. (1991). Variation in the height to which tracer is moved by splash during natural summer rain in the UK. Agricultural and Forest Meteorology **55**, 1-14.
- Smith, R. S. (1966). The liberation of cereal stem rust uredospores under various environmental conditions in a wind tunnel. Transactions of the British Mycological Society **49**, 33-41.
- Somers, D. E. (1999). The physiology and molecular bases of the plant circadian clock. Plant Physiology **121**, 9-20.
- Stensvand, A., Amundsen, T., Semb, L., Gadoury, D. M. & Seem, R. C. (1998). Discharge and dissemination of ascospores by *Venturia inaequalis* during dew. Plant Disease **82**, 761-764.
- Stensvand, A., Gadoury, D. M., Amundsen, T. & Seem, R. C. (2000). Recent research on ascospore discharge in *Venturia inaequalis*. In: L. Parisi (Hrsg.) Integrated Control of Pome Fruit Diseases, 39-51. IOBC wrps Bulletin **23**.

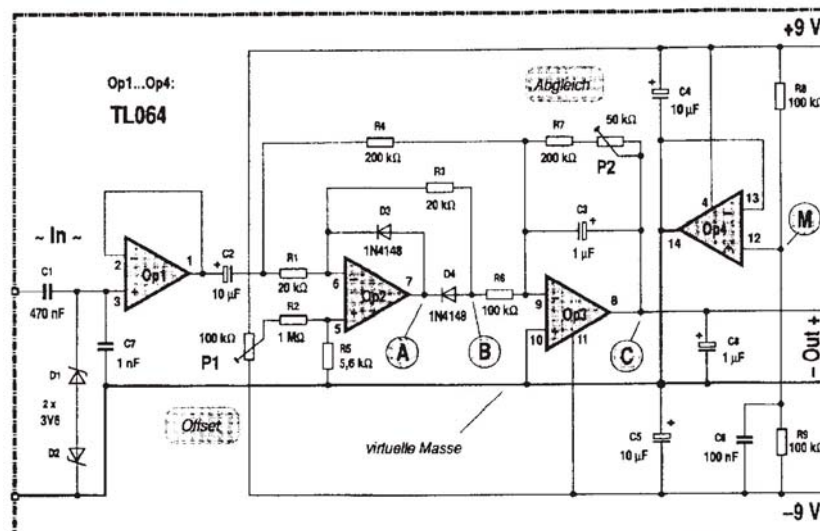
- Stensvand, A., Gadoury, D. M., Amundsen, T., Semb, L. & Seem, R. C. (1997). Ascospore release and infection of apple leaves by conidia and ascospores of *Venturia inaequalis* at low temperatures. *Phytopathology* **87**, 1046-1053.
- Stepanov, K. M. (1935). Dissemination of infectious diseases of plants by air currents. *Phytopathology* **8**, 1-68.
- Stoop, J. M. H., Williamson, J. D. & Pharr, D. M. (1996). Mannitol metabolism in plants. A method for coping with stress. *Trends in Plant Science* **1**, 139-141.
- Sutton, T. B. (1981). Production and dispersal of ascospores and conidia by *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards. *Phytopathology* **71**, 584-589.
- Sutton, T. B. & Jones, A. L. (1976). Evaluation of four spore traps for monitoring discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **66**, 453-456.
- Trail, F., Xu, H. X., Loranger, R. & Gadoury, D. M. (2002). Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia* **94**, 181-189.
- Vukovičs G. (1980). Obstkrankheiten. Erkennung, Ursachen und Bekämpfung. Teil II. Kernobst. Leopold Stocker Verlag, Graz.
- Wadia, K. D. R., McCartney, H. A. & Butler, D. R. (1998). Dispersal of *Passalora personata* conidia from groundnut by wind and rain. *Mycological Research* **102**, 355-360.
- Wallace, E. (1913). Scab disease of apple. Cornell University Agricultural Experiment Station Bulletin **335**.
- Warner, J. & Braun, P. G. (1992). Discharge of *Venturia inaequalis* ascospores during daytime and nighttime wetting periods in Ontario and Nova Scotia. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 315-321.
- Wiesmann, R. (1932). Untersuchungen über die Überwinterung des Apfelschorfpilzes *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fckl. im toten Blatt sowie die Ausbreitung der Sommersporen (Konidien) des Apfelschorfpilzes. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **36**, 620-679.
- Wiesmann, R. (1935). Untersuchungen über die Bedeutung der Ascosporen (Wintersporen) und der Konidien an den schorfigen Trieben für die Entstehung der Primärinfektionen des Apfelschorfpilzes *Fusicladium dendriticum*. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **39**, 147-175.
- Wilson, E. E. (1928). Studies of the ascigerous stage of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. in relation to certain factors of the environment. *Phytopathology* **18**, 375-417.
- Wischmeier, W. H. & Smith, D. D. (1958). Rainfall energy and its relationship to soil loss. *Transactions of American Geophysical Union* **29**, 285-291.

- 
- Worthington, A. M. & Cole, R. S. (1897). Impact with a liquid surface, studied by the aid of instantaneous photography. Philosophical Transactions of the Royal Society, London, Series A **189**, 137-148.
- Yang, X., Madden, L. V., Reichard, D. L., Fox, R. D. & Ellis, M. A. (1991). Motion analysis of drop impaction on a strawberry surface. Agricultural and Forest Meteorology **56**, 67-92.
- Yang, X., Madden, L. V., Reichard, D. L., Wilson, L. L. & Ellis, M. A. (1992). Splash dispersal of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* from strawberry fruit by single drop impactions. Phytopathology **82**, 332-340.
- Zhou, J. & Goldsbrough, P. (1994). Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. The Plant Cell **6**, 875-884.

## 7. ANHANG

### 7.1 Schaltpläne und technische Daten der Elektronikbausteine

- DC/DC Wandler (Conrad): NMA 0505 S
- Stabilisiertes Netzteil (Conrad): Ausgangsspannung: 5V; max. Ausgangsstrom 100 mA.
- Stabilisiertes Netzteil (Conrad): Ausgangsspannung: 9V; max. Ausgangsstrom 85 mA.
- Gleichrichter (Conrad): Betriebsspannung: 9 V=; Stromaufnahme: 1,5 mA; Eingangsspannung: max. 2 V~; Frequenzbereich: 10 Hz-100 kHz (**Abb. 7.1**).
- Gleichrichter (ELV): Betriebsspannung: +2 bis +12 V (Masse -2,5 V bis -12 V); Eingangsspannung: max. 200 mV; Frequenzbereich: 1 MHz (**Abb. 7.2**).
- Mikrofon-Vorverstärker (Conrad): Betriebsspannung: 9-15V=; Stromaufnahme: 2,5 mA; Eingangsempfindlichkeit: ca. 0,2–2 mV; Verstärkung einstellbar: 150 - 1500fach; Frequenzbereich: 50 Hz-20 kHz (**Abb. 7.3**).
- Elektret-Mikrofon mit Vorverstärker und Spannungsversorgung (Conrad): Betriebsspannung: 9-12 V=; Stromaufnahme: ca. 700µA; Eingangswiderstand: selbstanpassend; Ausgangswiderstand: ca. 47 kΩ; max. Ausgangsspannung: ca. 500 mV; Verstärkung: 46 dB (bei 1 kHz); Frequenzbereich: 10 Hz-40 kHz (**Abb. 7.4**).
- Universal-Vorverstärker (Conrad): Betriebsspannung: 9-27V=; Stromaufnahme: ca. 3-7 mA; Eingangsspannung: 100 mV; Ausgang: 150 mV – 4 V (regelbar); Frequenzbereich: 20 Hz-20 kHz (**Abb. 7.5**).



**Abb. 7.1:** Gleichrichter (Conrad).

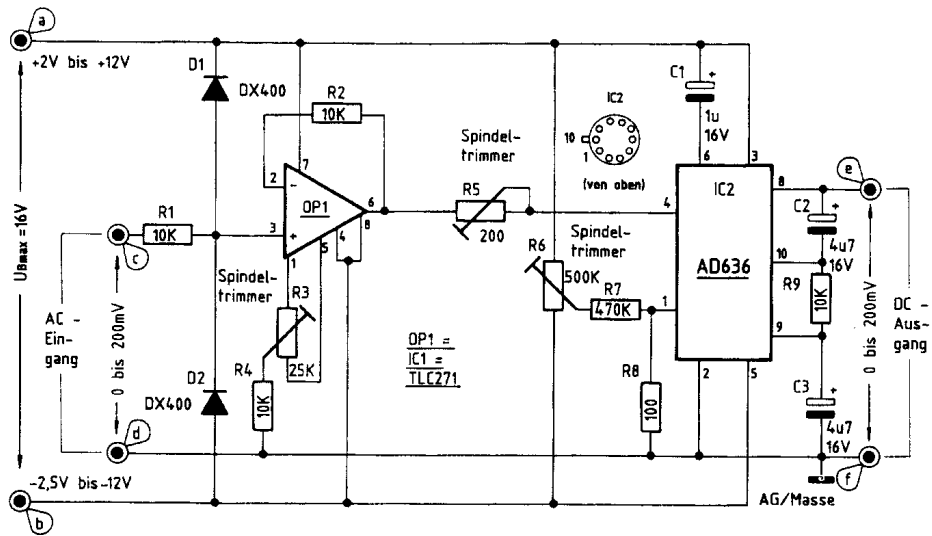


Abb. 7.2: Gleichrichter (ELV).

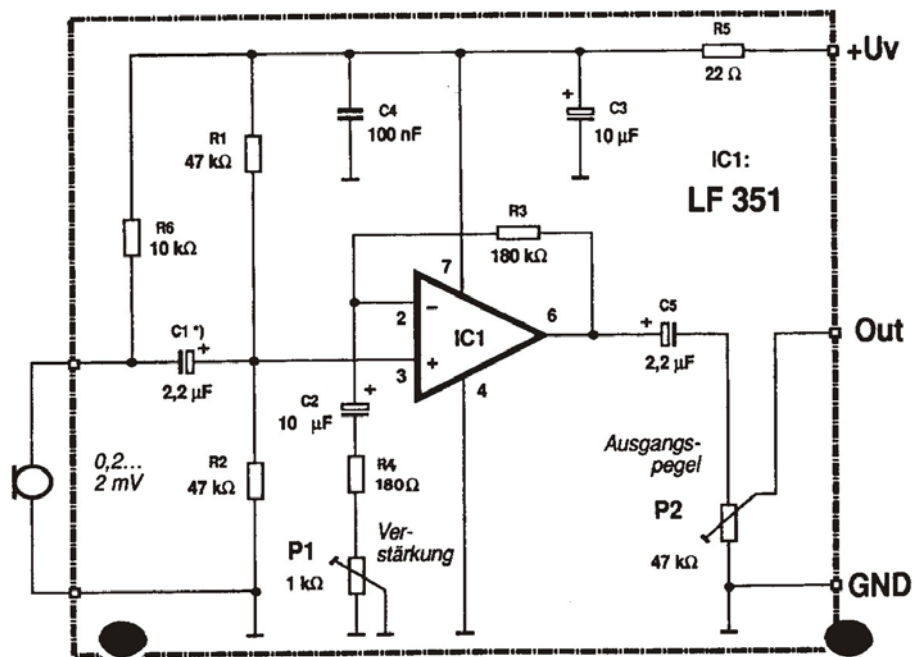
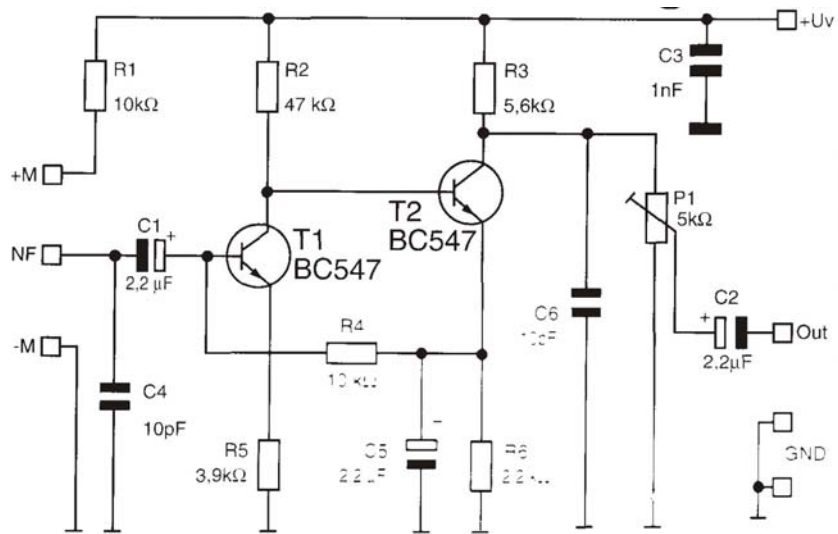
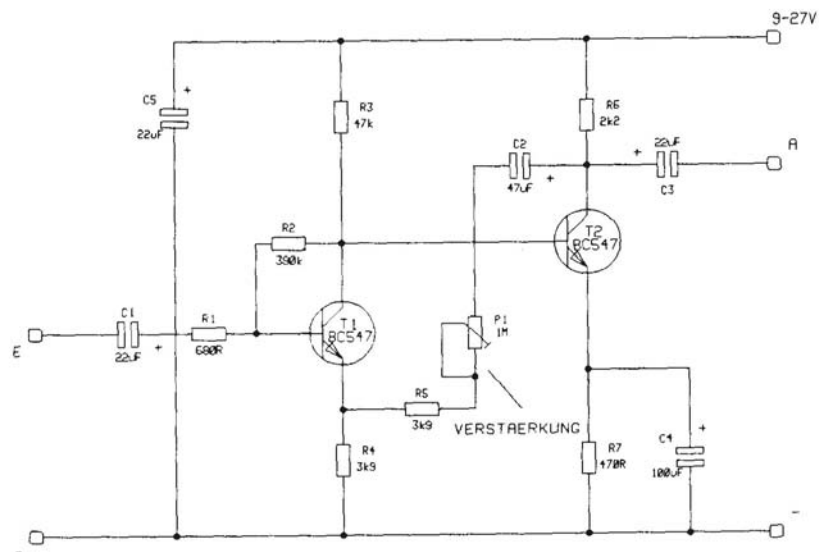


Abb. 7.3: Mikrofon-Vorverstärker (Conrad).



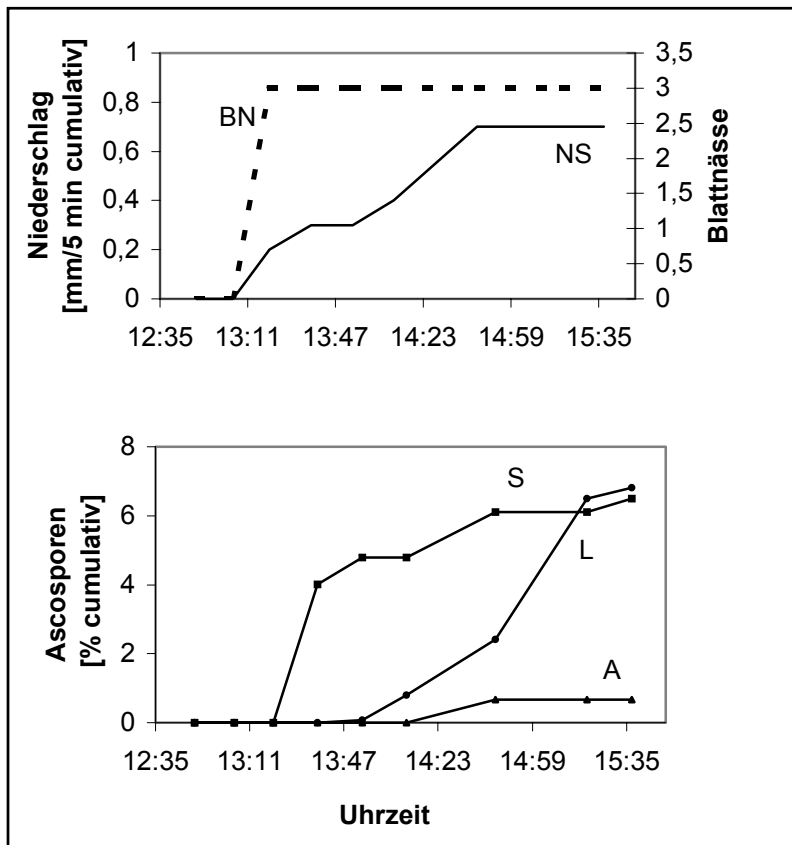


**Abb. 7.4:** Vorverstärker und Spannungsversorgung für das Elektret-Mikrofon (Conrad).

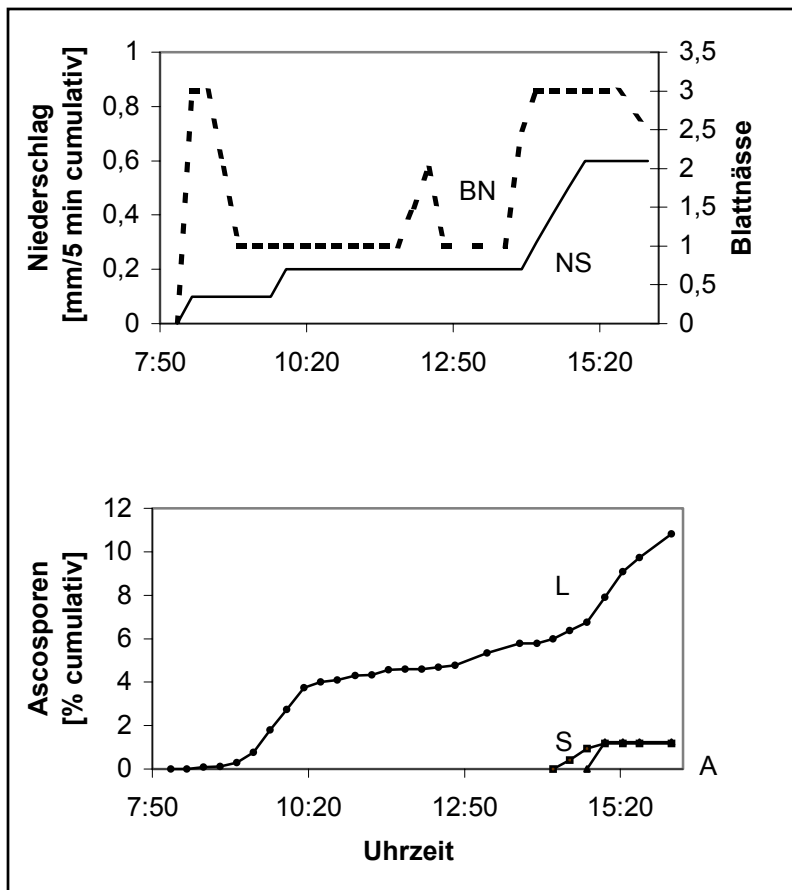


**Abb. 7.5:** Universal-Vorverstärker (Conrad).

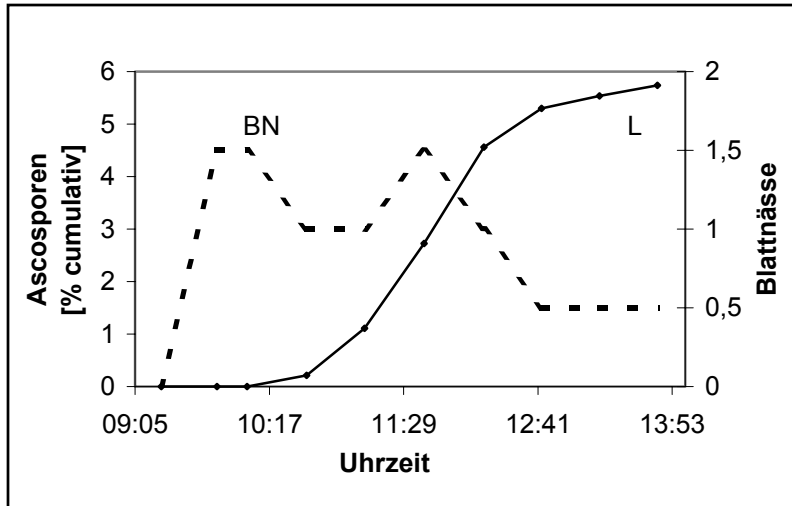
7.2 Detailanalyse von Regeneffekten. Einzelereignisse I-VI.



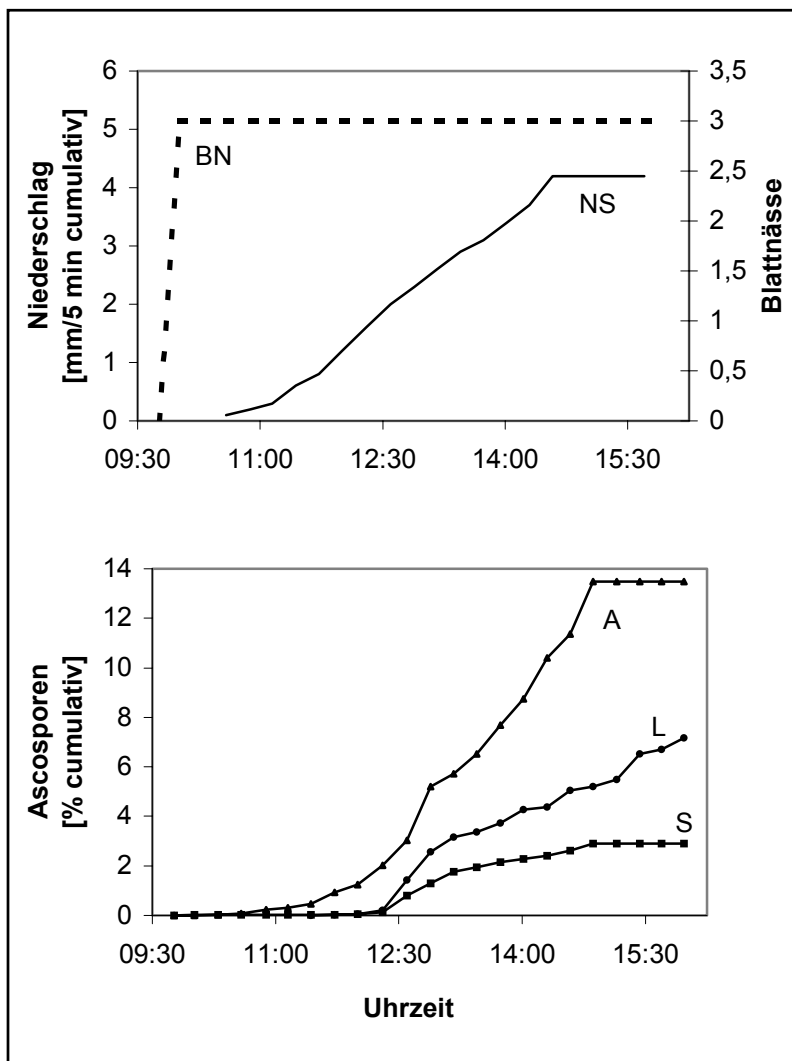
**Abb. 7.6:** Ereignis I.  
 L: Sporenflug  
 S: Spritzwasser  
 A: Ablaufwasser  
 NS: Niederschlag (mm)  
 BN: Blattnässe  
**Blattnässe (Benetzungsgrad)**  
 1: matt  
 2: Seidenglanz  
 3: Wasserglanz



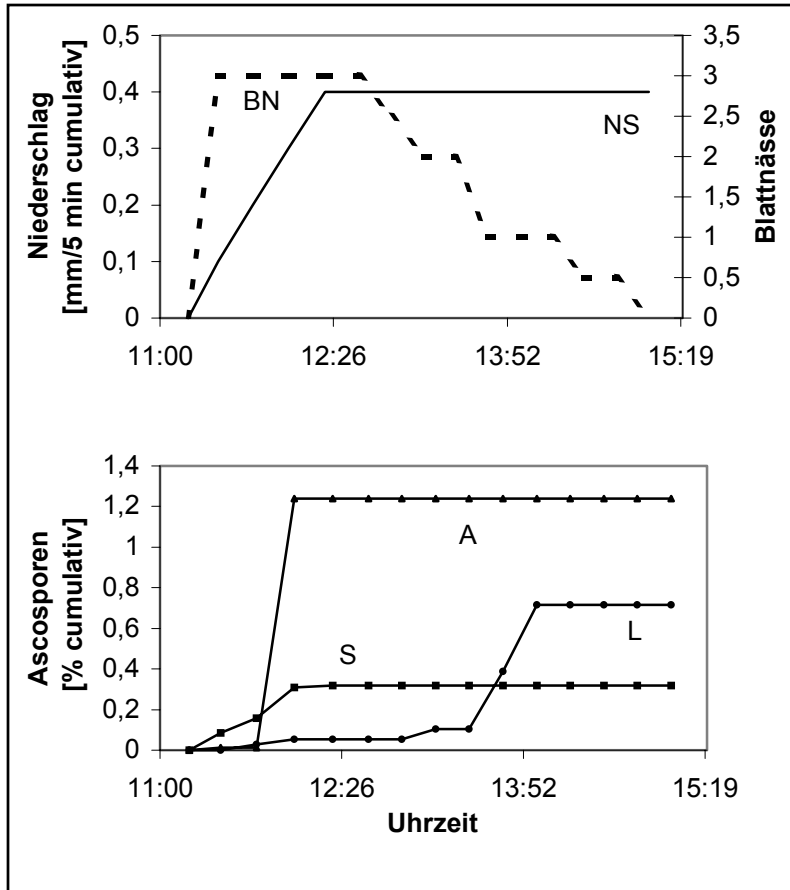
**Abb. 7.7:** Ereignis II.  
 L: Sporenflug  
 S: Spritzwasser  
 A: Ablaufwasser  
 NS: Niederschlag (mm)  
 BN: Blattnässe  
**Blattnässe (Benetzungsgrad)**  
 1: matt  
 2: Seidenglanz  
 3: Wasserglanz



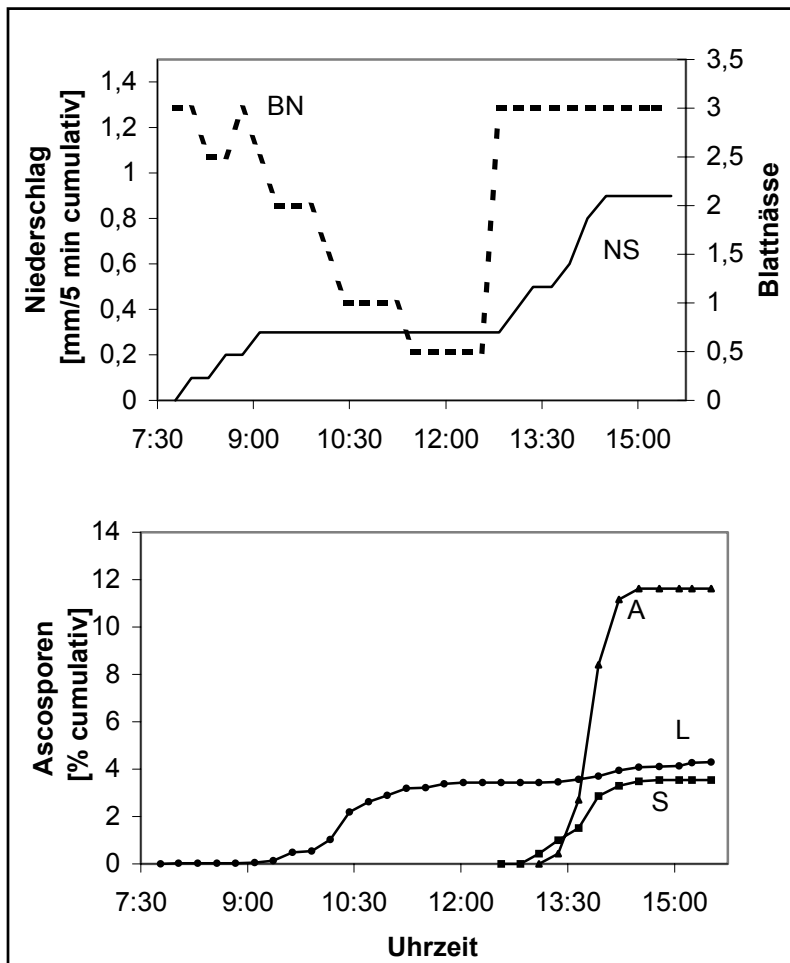
**Abb. 7.8:** Ereignis III.  
 L: Sporenflug  
 BN: Blattnässe  
**Blattnässe (Benetzungsgrad)**  
 1: matt  
 2: Seidenglanz



**Abb. 7.9:** Ereignis IV.  
 L: Sporenflug  
 S: Spritzwasser  
 A: Ablaufwasser  
 NS: Niederschlag (mm)  
 BN: Blattnässe  
**Blattnässe (Benetzungsgrad)**  
 1: matt  
 2: Seidenglanz  
 3: Wasserglanz



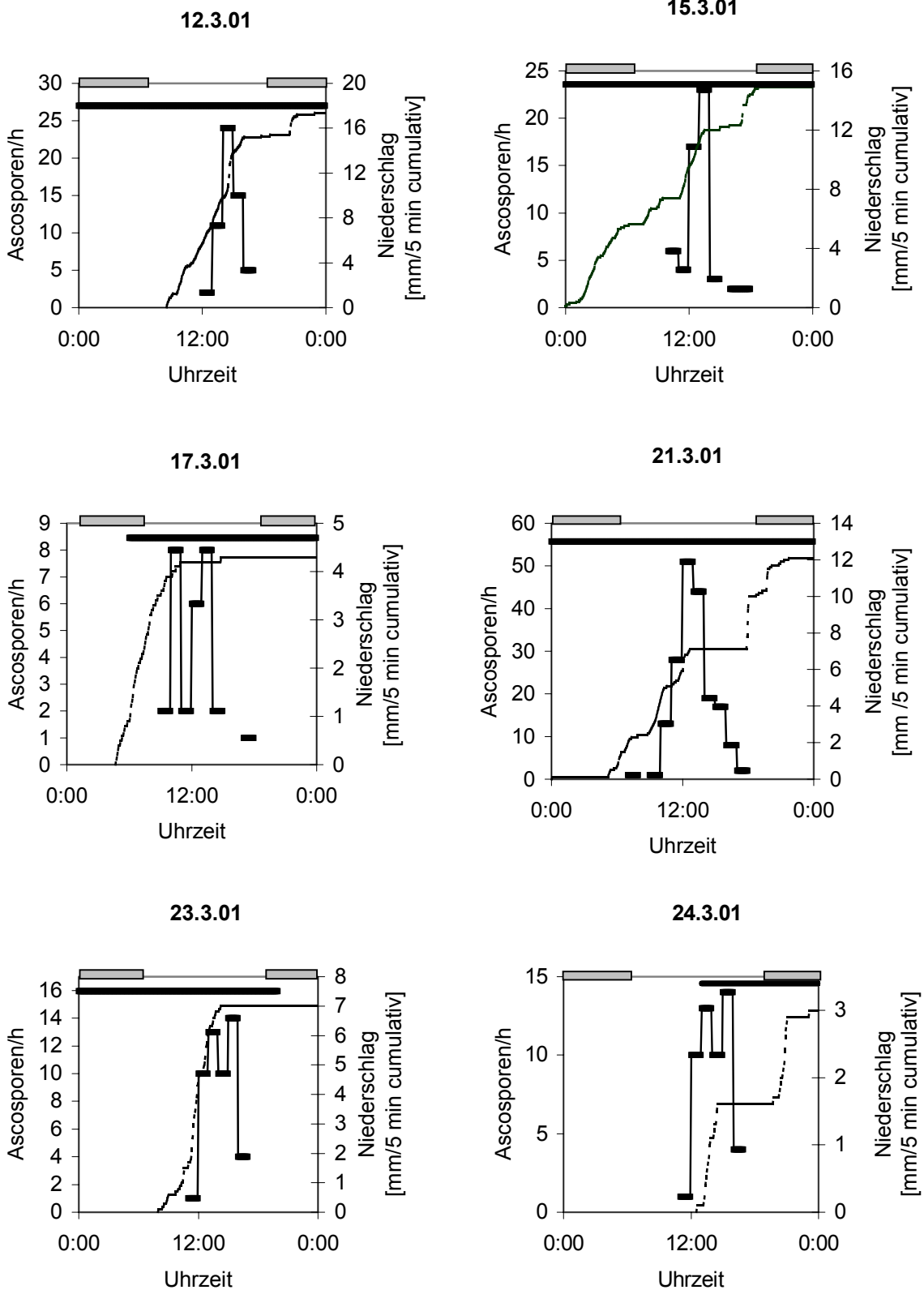
**Abb. 7.10:** Ereignis V.  
 L: Sporenflug  
 S: Spritzwasser  
 A: Ablaufwasser  
 NS: Niederschlag (mm)  
 BN: Blattnässe  
**Blattnässe (Benetzungsgrad)**  
 1: matt  
 2: Seidenglanz  
 3: Wasserglanz

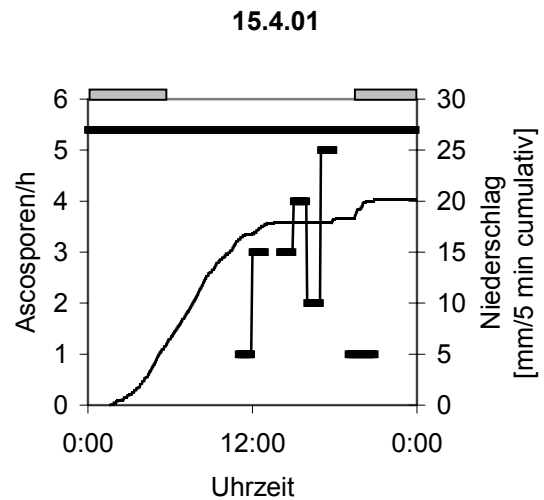
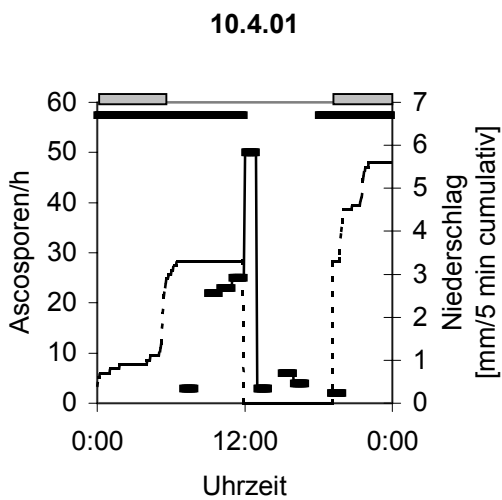
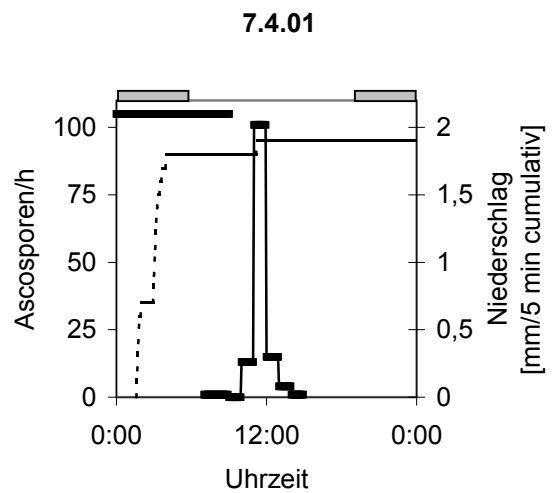
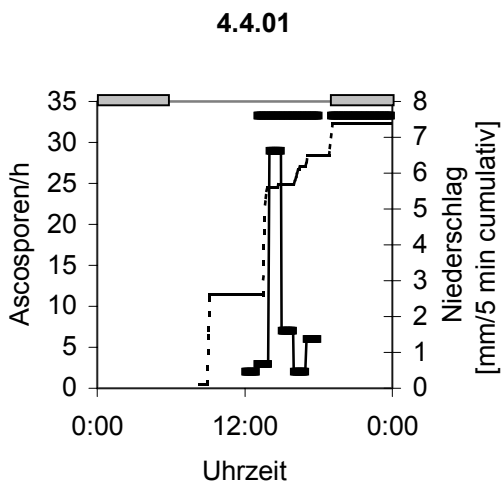
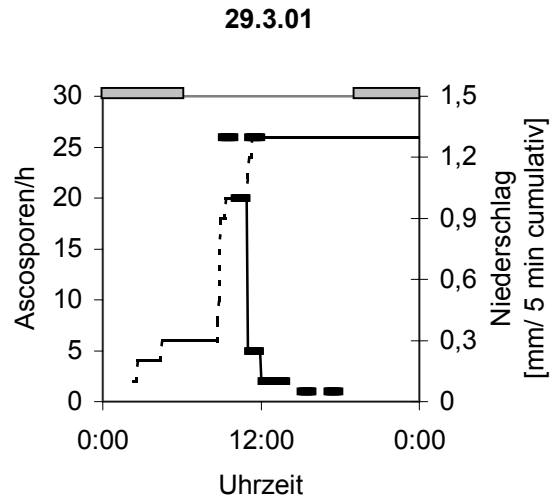
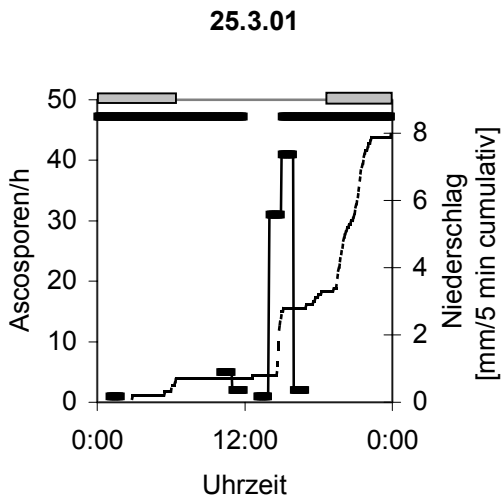


**Abb. 7.11:** Ereignis VI.  
 L: Sporenflug  
 S: Spritzwasser  
 A: Ablaufwasser  
 NS: Niederschlag (mm)  
 BN: Blattnässe  
**Blattnässe (Benetzungsgrad)**  
 1: matt  
 2: Seidenglanz  
 3: Wasserglanz

### 7.3 Ascosporenflugtage 2001 und 2002

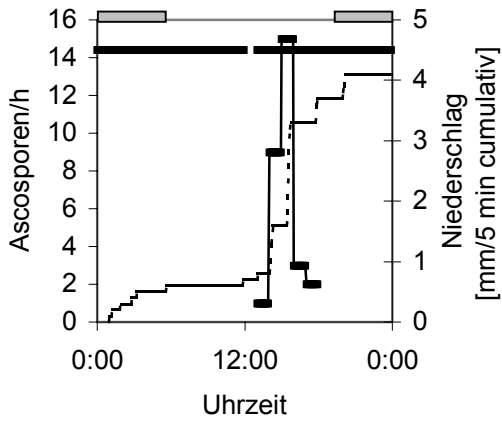
**Legende:** Schwarze Balken: Blattnässe (Schorfwargerät); gestrichelte Linie: Niederschlag, cumulat (Wetterstation); durchgehende Linie: Ascosporenflug/h (Burkard Sporenfalle); graue Balken: Dunkelphase zwischen Sonnenuntergang und Sonnenaufgang.



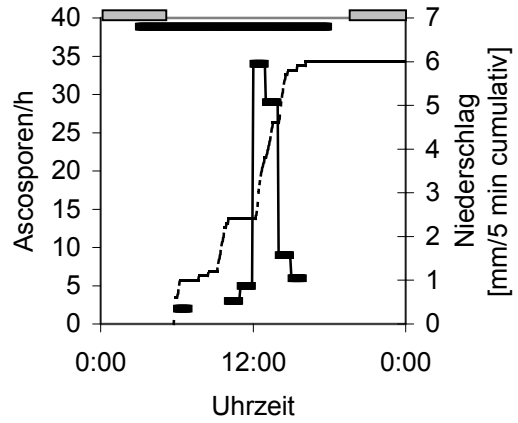


Niederschlagsdaten fehlen teilweise durch Ausfall der Wetterstation

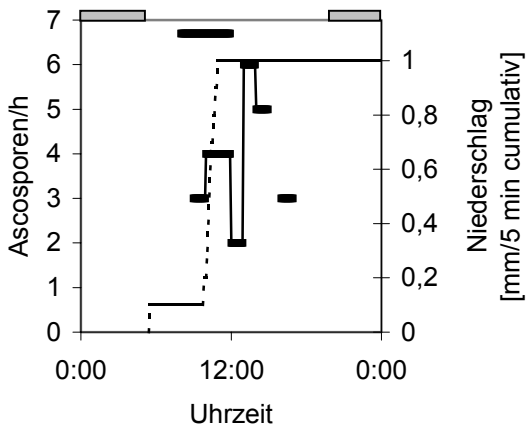
16.4.01



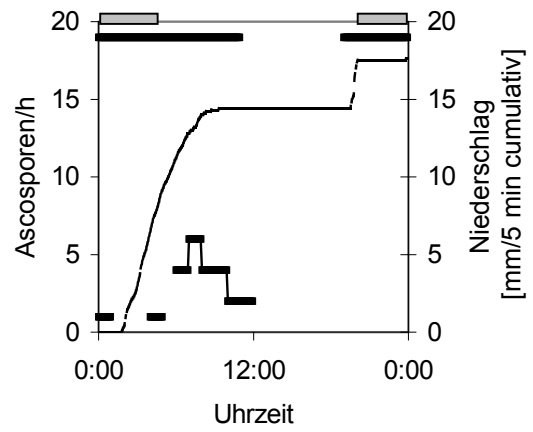
25.4.01



6.5.01

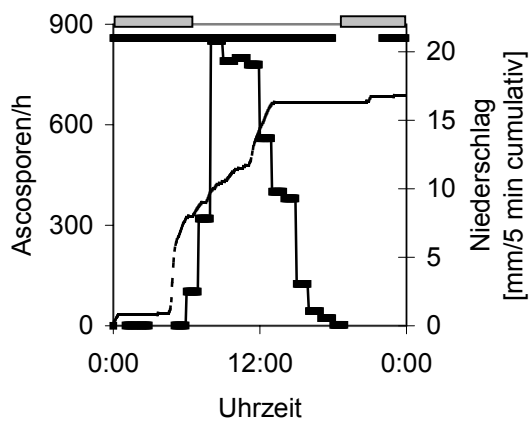


17.5.01

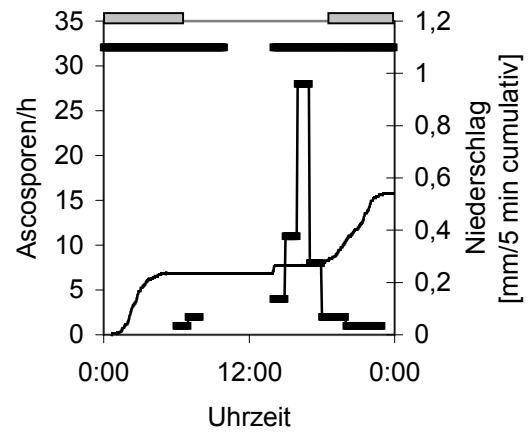


**Ascosporenflugtage 2002**

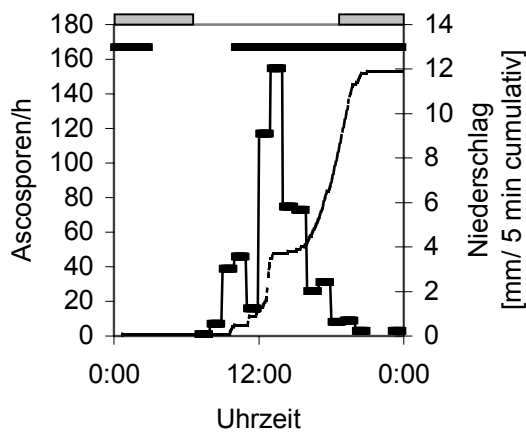
**19.3.02**



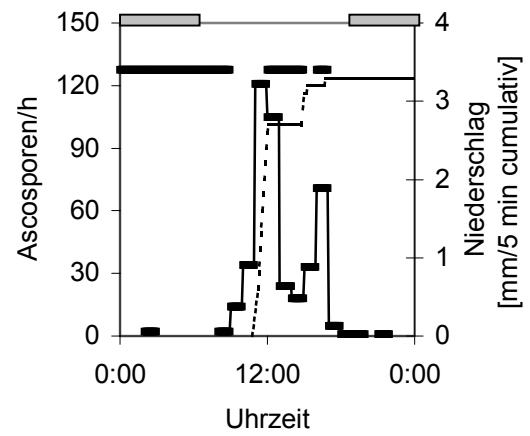
**20.3.02**



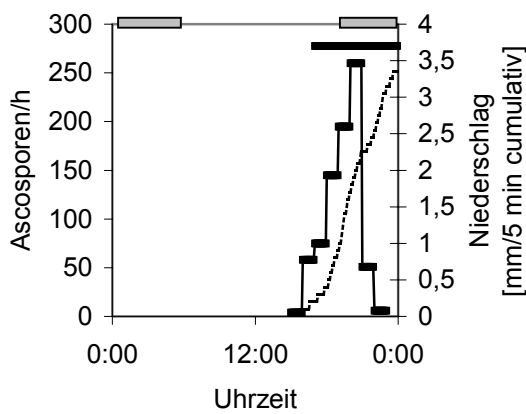
**21.3.02**



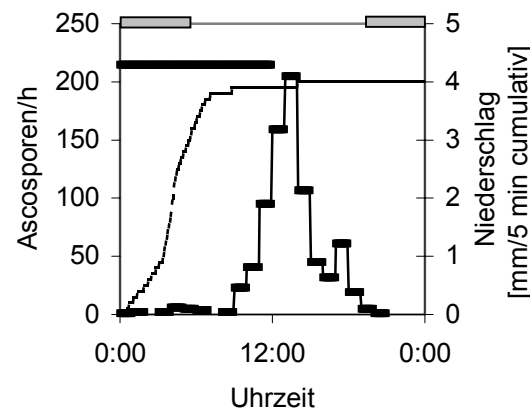
**22.3.02**



**13.4.02**

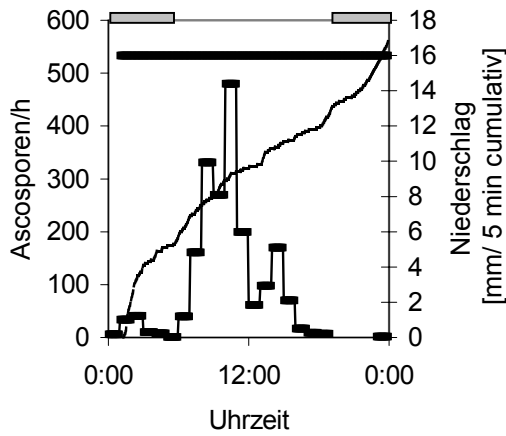


**14.4.02**

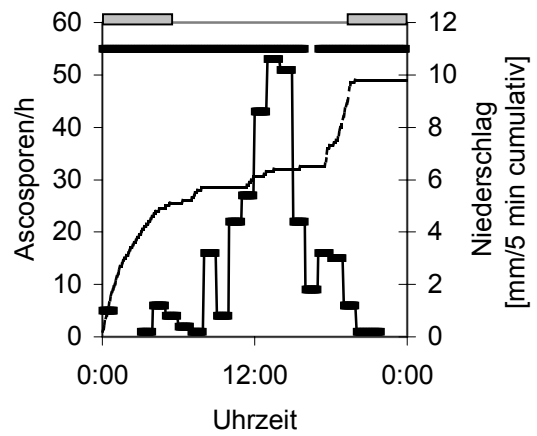




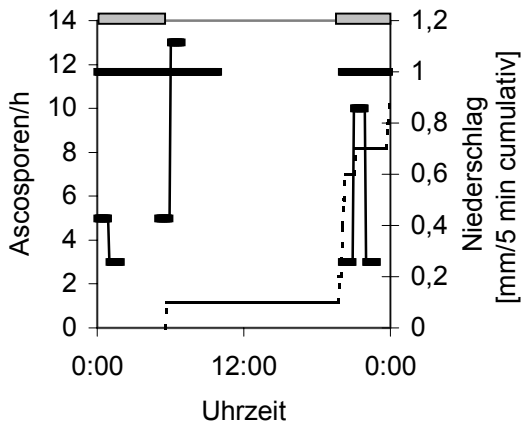
16.4.02



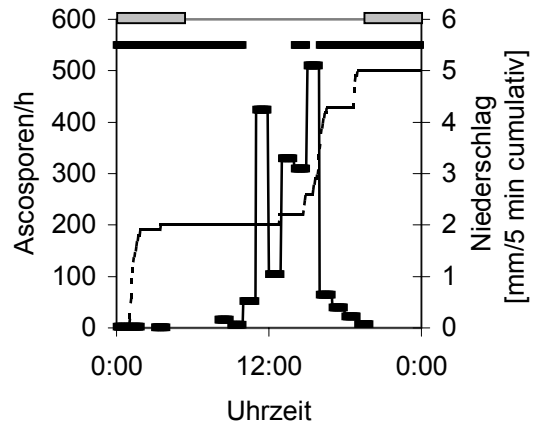
17.4.02



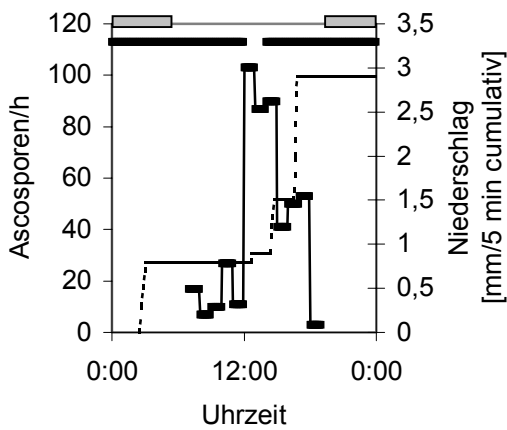
18.4.02



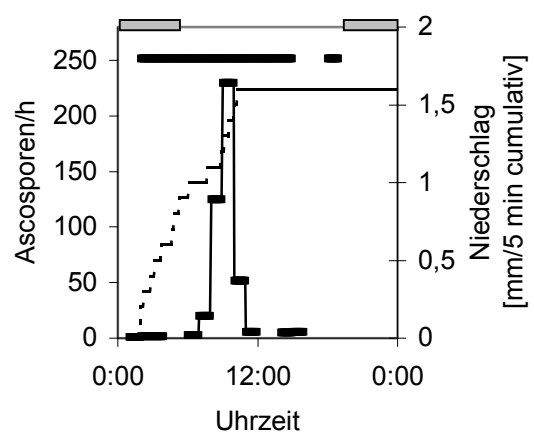
19.4.02



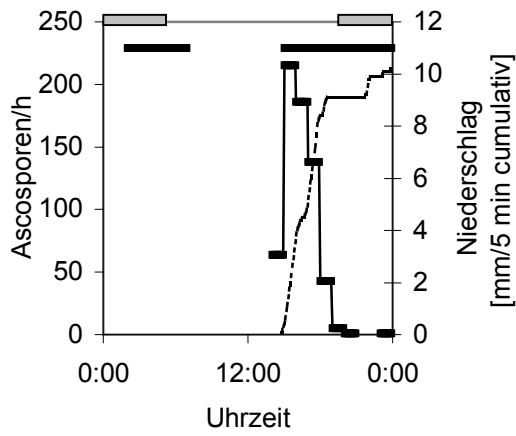
20.4.02



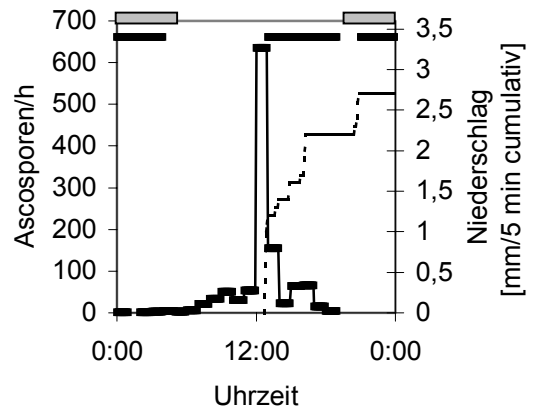
24.4.02



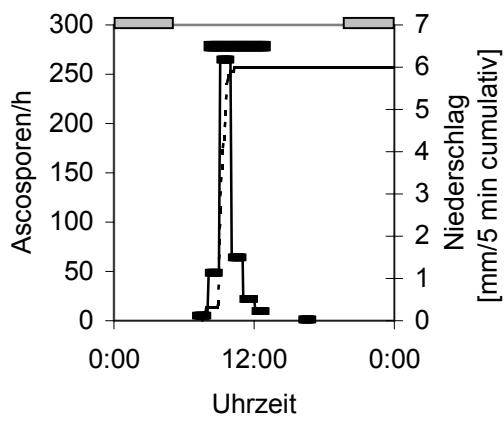
26.4.02



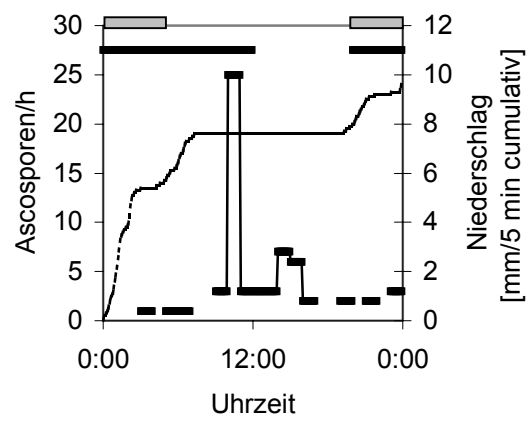
27.4.02



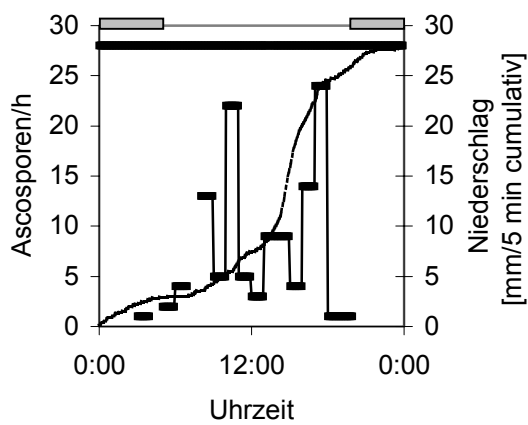
29.4.02



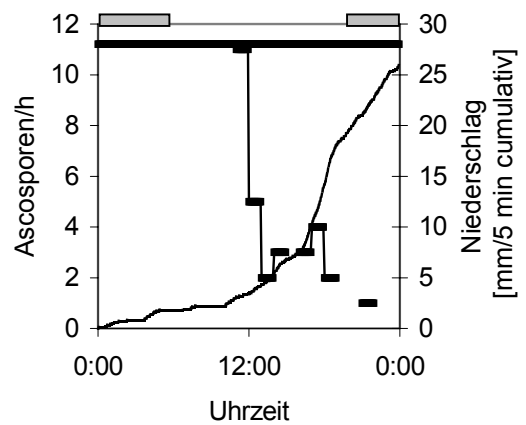
2.5.02



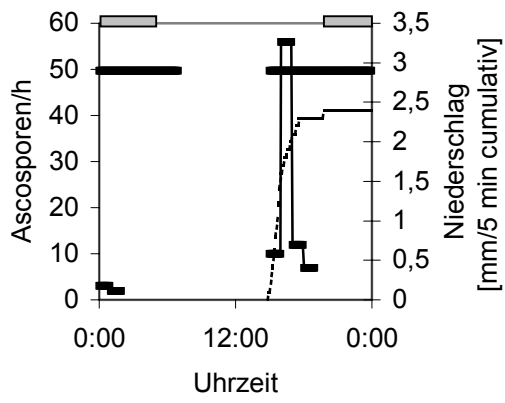
3.5.02



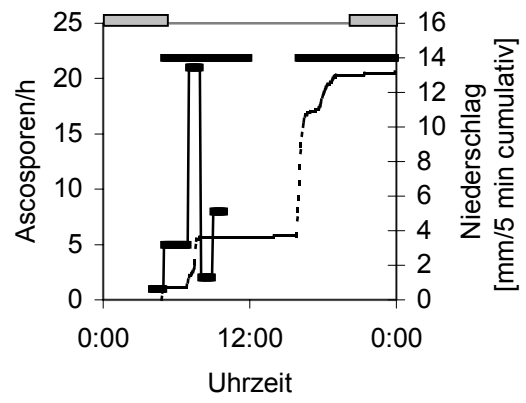
4.5.02



6.5.02



11.5.02



12.5.02

