
Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz
Universität für Bodenkultur, Wien

Untersuchungen zur Wirkung insektenpathogener Pilze gegen Borkenkäfer

Masterarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Ingenieur der Bodenkultur
Studienrichtung Forstwissenschaft

Vorgelegt von B.Sc. Florian Herrmann

Wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung
Ao. Univ. Prof. Dr. phil. Rudolf Wegensteiner

Wien, im November 2013

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Dr. phil. Rudolf Wegensteiner der mich trotz aller Rückschläge im Verlauf der Arbeit immer unterstützte. Desweiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des IFFF im Phytopathologie-Labor, insbesondere Mag. Susanne Mottinger-Kroupa, die mir bei der Vervielfältigung und der erfolgreichen Vermehrung der verschiedenen entomopathogenen Pilzarten geholfen hat und immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand, herzlichst bedanken.

Auch vielen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz gilt mein großer Dank für die zahlreichen Hilfen bei fachlichen, sowie organisatorischen Fragen und die herzliche Aufnahme im Institut.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract	VII
Zusammenfassung	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Biologie von <i>I. typographus</i>	2
1.2 Biologische Kontrolle	3
1.3 Mikrobiologische Schädlingskontrolle mit entomopathogenen Pilzen.....	5
1.4 Infektionshemmende Umweltfaktoren und Vorkommen der Pilzarten	7
1.5 Pathogenese.....	9
1.6 Parasitische Phase	9
1.7 Saprophytische Phase.....	12
1.8 Beschreibung von <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> und <i>I. fumosorosea</i>	12
1.9 Fragestellungen	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Versuchsstämme.....	23
2.2 <i>Ips typographus</i>	24
2.3 In vitro Pilzkulturen	24
2.4 Keimungstest.....	25
2.5 Herstellung der Sporensuspension	26
2.6 Methodik der direkten und indirekten Inokulationsversuche	26
2.7 Statistische Auswertungen	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Direkte Inokulationen.....	31
3.2 Indirekte Inokulationen	53
3.3 Vergleiche zwischen den Inokulationsarten bei den drei ausgewählten Testtemperaturen.....	69

4 Diskussion	73
4.1 Wirkung der Pilzarten auf die Mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./n-inf.) bei 20°C Inkubationstemperatur und direkter Inokulation	74
4.2 Veränderungen in der Wirksamkeit der Pilzarten durch indirekte Inokulation auf die Mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./n-inf.) bei 20°C Inkubationstemperatur.....	77
4.3 Folgen der Temperaturerhöhung auf 25°C Inkubationstemperatur auf die Mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./n-inf.)	80
4.4 Wirkungen der Pilzarten auf die Mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./n-inf.) bei auf 15°C reduzierter Inkubationstemperatur.....	82
5 Resümee	84
Abbildungsverzeichnis	88
Tabellenverzeichnis	91
Literaturverzeichnis	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
B	Breite
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
etc.	et cetera
et al.	et alii
fm	Festmeter
g	Gramm
H	Höhe
HCH	Hexachlorcyclohexan
ha	Hektar
h	Stunde
i. d. S.	in diesem Sinne
IFFF	Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz
i. e. S.	im eigentlichen Sinne
i.d.R.	in der Regel
i. Vgl.	im Vergleich
L	Länge
LT ₅₀	letale Zeit zum Erreichen einer 50% Mortalität
m	Meter
mm	Millimeter
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MLD	Mittlere Lebensdauer
m. ü. M.	Meter über dem Meeresspiegel
µm	Mikrometer
n	Anzahl der getesteten Käfer
nm	Nanometer
n-inf.	Anzahl der infizierten Käfer (absolut)
NÖ	Niederösterreich
pH	pondus Hydrogenii
rd.	rund
Sign./MLD	Signifikanz der Mittleren Lebensdauer

Sign./% inf.	Signifikanz der Infektionsrate
Tab.	Tabelle
z.B.	zum Beispiel
% inf	Anzahl der infizierten Testkäfer (relativ)

Abstract

The european bark beetle, *Ips typographus* (LINNAEUS, 1758) is one of the most serious destructive pests of *Picea abies* (H. KARST, 1881) in Austria. In order to find an effective biocontrol agent against this pest adults were inoculated with *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* or *Isaria fumosorosea* alternatively by dipping the beetles directly into conidiospore suspensions or by forcing them to walk on spore suspension treated spruce bark. Effect of temperature was tested by incubating experiments at 15°C, 20°C or 25°C and different inoculation times.

Direct inoculation and indirect inoculation was more or less successful with all three fungal species tested. Infection rates varied between the three fungal species (2% - 98.1%) depending on incubation temperature and inoculation method. Infection rate was significantly higher only with *B. bassiana* at 20°C compared to the other two fungus species. Mean life span was prolonged at 15° and shortest at 25°C with all three fungus species.

Direct inoculation caused always higher infection rates and shorter mean life span compared to indirect inoculation with all three fungal species. Limited contact with suspension treated bark resulted in successful infection, but duration of beetles' contact with the conidia on bark influenced the infection success. Infection was highest when beetles had contact with freshly suspension treated bark for three minutes with *B. bassiana* and *I. fumosorosea* at 20°C and for five minutes with *M. anisopliae* at 25°C. Infection rates were significantly lower in most cases after shorter contact with treated bark compared to shorter contact or testing beetles after one week incubation of log sections compared to freshly treated bark.

Zusammenfassung

Die europäische Borkenkäferart *Ips typographus* (LINNAEUS, 1758) ist der bedeutendste Forstschädling an der Hauptwirtschaftsbaumart *Picea abies* (H. KARST, 1881) in Österreich. Auf der Suche nach einer effizienten biologischen Kontrollmaßnahme wurden in dieser Arbeit Adulstkäfer jeweils mit einer der drei entomopathogenen Pilzarten *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* und *Isaria fumosorosea* inokuliert. Die Inokulation geschah dabei direkt durch dreisekündiges Schwenken der Käfer in Sporensuspension oder indirekt nach Aufbringen der Sporensuspension auf Fichtenrinde. Die Käfer wurden bei unterschiedlichen Testintervallen (1,5min/3min/5min) auf den inokulierten Stammstücken angesetzt und anschließend unter Verwendung dreier verschiedener Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C inkubiert. Der Erfolg der beiden Inokulationsarten war erwartungsgemäß unterschiedlich. Die Infektionsraten variierten zwischen (2,00%-98,10%) und waren stark abhängig von Inokulationsart und Inkubationstemperatur. Die Infektionsrate war hierbei unter Verwendung der Pilzart *B. bassiana* bei 20°C höher als bei den beiden anderen getesteten Pilzarten. Die durchschnittliche Lebensdauer war verglichen über alle Pilzarten bei 15°C Inkubationstemperatur länger als bei 25°C. Die direkte Inokulation verursachte durchweg höhere Infektionsraten und es konnten auch kürzere Mittlere Überlebensraten (MLD) als bei indirekter Inokulation festgestellt werden. Kurzfristiger Kontakt besonders mit frisch sporeninokulierter Rinde der Teststämme führte zu erfolgreichen Infektionen. Umso länger die Aufenthaltsdauer der Käfer auf den inokulierten Stammstücken war umso höher war dabei der Infektionserfolg. Die Infektionsraten waren auf den frisch inokulierten Stammstücken und der längsten getesteten Aufenthaltsdauer (5min) vergleichsweise hoch. Besonders mit den Pilzarten *B. bassiana* und *M. anisopliae* konnten bei 25°C gute Infektionsergebnisse erzielt werden. Die Infektionsraten waren vor allem in den Varianten mit nur 1:30min und in den Testvarianten nach 1 Woche signifikant niedriger im Vergleich zu den frisch inokulierten Versuchsvarianten.

1 Einleitung

Gegenwärtig kann die endemische Borkenkäferart *Ips typographus* (LINNAEUS, 1758) (*Coleoptera, Scolytidae*) aus anthropogener Sicht als einer der bedeutendsten Forstschädlinge an unserer Hauptwirtschaftsbaumart *Picea abies* (H. KARST, 1881) angesehen werden. Dokumentiert werden die jährlich für Österreich durch diese Art anfallenden wirtschaftlichen Schäden u. a. im österreichischen Forstschutzbericht. KREHAN & STEYRER (2006) schätzten im Jahre 2005 eine Schadholzmenge von rd. 2,15 Millionen Festmeter verursacht durch *I. typographus*. Noch drei Jahre später wurde im Forstschutzbericht für 2008 eine Schadholzmenge von rd. 1,91 Millionen fm ausgewiesen (STEYRER & KREHAN 2009). Dies entspricht etwa 10% des jährlichen Einschlags und zeigt, welche große ökonomische Schäden durch lang anhaltende Gradationen der Art *I. typographus* für die Forstbetriebe entstehen können. In Wirtschaftswäldern stehen derzeit nur wenige effektive Kontrollmaßnahmen zur Verringerung der Populationsdichte zur Verfügung. Ohne anthropogene Kontrolle fallen die Schäden dementsprechend größer aus und es dauert durchschnittlich auch länger bis die Gradationen durch natürliche Faktoren z.B. Krankheiten, Untauglichkeit des noch vorhandenen Brutmaterials etc. begrenzt werden, um schließlich in die Latenzphase und unter die Schadschwelle zurückzutreten.

Als besonders eindrückliches Beispiel welche Flächenausmaße ein regional begrenzter *I. typographus*-Befall ohne wesentliche anthropogene Einflussnahme erreichen kann, nennt WERMELINGER (2004) den Nationalpark Bayerischer Wald. Hier brachte eine lang anhaltende Kalamität von 1992 bis 2000 r und 3700 ha natürlichen montanen Fichtenwald zum Absterben. Ungeachtet der menschlichen Nutzungsinteressen zeigt *I. typographus* aber gerade an diesem Beispiel seine ambivalente Rolle im Wirkungskreislauf Umwelt-Insekt-Mensch. Einerseits ist *I. typographus* einer der bedeutendsten Konkurrenten im Wirtschaftswald mit einem enormen Schadpotenzial, andererseits ist die Art ein bedeutender Sukzessionsinitiator sowohl in natürlichen wie auch in sekundären Fichtenwäldern und fördert deren Verjüngung bzw. Überführung. Vorrangig prädisponiert für einen Befall sind vor allem die wirtschaftlich bedeutenden sekundären Fichtenwälder in planar bis submontanen Höhenstufen. Obgleich in jüngster Vergangenheit auch in immer höheren Lagen Bestände befallen werden, in denen *I. typographus* bisher kein Forstschutzproblem darstellte. Besonders die Bestände der tiefen und mittleren Lagen weisen heute auf der Mehrzahl der Standorte eine erhöhte Labilität und damit eine gesteigerte Prädisposition gegenüber biotischen Schädlingen auf. Die

Borkenkäferart *I. typographus* zeigt heute deutlich, wo die Grenzen der Fichtenbewirtschaftung außerhalb ihres natürlichen Verbreitungsgebietes liegen. Unzweifelhaft kommt dieser Art deshalb eine wichtige Rolle im ökosystemaren Kreislauf Wald zu. Diese Arbeit wurde vorrangig mit dem Ziel geschrieben die anthropogenen Nutzungsinteressen zu bewahren und zu erhalten. Deshalb wird eine Bekämpfung von *I. typographus* favorisiert, wissend dass aus ganzheitlicher ökologischer Sicht aber auch Ansätze zu überlegen wären keine anthropogene Einflussnahme bzw. Kontrolle stattfinden zu lassen.

1.1 Biologie von *I. typographus*

Die koevolutive Anpassung von *I. typographus* an seine Hauptwirtsbaumart *P. abies* befähigt die Art, besonders in Kombination mit günstigen Witterungsverhältnissen wie sie in den letzten Jahren häufiger zu beobachten waren, zu anhaltend hohen Vermehrungsraten und zum Ausbrechen aus dem Latenzstadium. Werden in einem warmen Frühjahr zeitig Temperaturen von $> 16,5^{\circ}\text{C}$ erreicht, beginnt ein früher Schwarm. Die poikilothermen adulten Käfer vermehren sich bei entsprechendem Nahrungsangebot schneller. Zudem schwächen warme und trockene Sommer die Bäume in ihren Abwehrmechanismen¹ und machen sie als Nahrungs- und Bruthabitat attraktiver. Mildere und kürzere Winter wiederum führen zu einer geringeren Mortalität² und tragen so additiv zu einer höheren Abundanz bei. Auftretende Extremwetterereignisse wie Sturmwurf, Sturmbruch, Wurzelzerreibungen, Hagelschäden, Sonnenbrand etc. sorgen regelmäßig verstärkt für ideales Brutmaterial und sind Initialereignisse vor Ausbildung einer Gradation (WERMELINGER, 2004). Kombinationen aus günstigen klimatischen Bedingungen sowie einem Überangebot an befallstauglichem Material sind die entscheidenden Einflüsse zur Initiierung einer Progradation. Gewöhnlich kulminiert eine durch Windwurf eingeleitete Gradation erst im zweiten oder dritten Folgesommer (WERMELINGER, 2004).

Treibende Faktoren in der Ausbildung einer Gradation sind das exponentielle Vermehrungspotential, der arteigene Voltinismus und das effiziente Ausbreitungsverhalten durch aktive Flugdistanzen von bis zu 500m (WERMELINGER, 2004). Das Vermehrungspotenzial ist in der Polygamie und der hohen Eizahl (>80) pro befruchtetem weiblichen Adulstkäfer begründet (WERMELINGER, 2004). Ein männlicher Adulstkäfer kann sich mit bis zu drei weiblichen Adulstkäfern verpaaren. Unter Voltinismus versteht man die Anzahl der jährlich vollendeten Generationen pro weiblichen Parentalkäfer. Weibliche

¹ z.B. verminderter Harzfluss infolge von Wassermangel

² Steigende Überlebenschance der Larven und Jungkäfer in der Borke und in der Bodenstreu

Adultkäfer können einen Teil der Eier in dem Baum ablegen in dem sie befruchtet wurden, um sich danach auszubohren und einen anderen Teil der befruchteten Eier in neuen Stämmen abzulegen. Man nennt dieses Verhalten Geschwisterbrutenanlage. Bei besonders günstigen Witterungsbedingungen, z.B. Erreichen von Optimaltemperaturen von 29°C bis 30°C (WERMELINGER, 2004) können auch Filialgenerationen (Brutanlagen von Jungkäfern) beobachtet werden. Es können so bis zu drei Filialgenerationen und mehrere Geschwisterbruten im Jahr entstehen. Für eine umfangreichere Beschreibung der Biologie von *I. typographus* sei an dieser Stelle auf SCHWERDTFEGER (1981), SCHWENKE (1996) und WERMELINGER (2004) verwiesen.

Ein wesentlicher weiterer Überlebensvorteil von *I. typographus* ist die minierende Lebensweise der phloeophagen Insektenart. Bis auf kurze Phasen des Schwärmens und der Suche nach einer passenden Einbohrstelle am Stamm, verbringt die Art den größten Teil ihres Lebenszyklus (Entwicklung/Reifung/Reproduktion) endophytisch. Diese versteckte Lebensweise erschwert im besonderen Maße auch die Anwendung wirkungsvoller Kontrollmaßnahmen. Im Bestand sind der Bekämpfung deshalb enge Grenzen gesetzt. Es gibt derzeit nur unspezifisch wirkende Pyrethroide ohne Tiefenwirkung und es sind auch keine systemisch wirkenden Insektizide registriert (STEINWENDER, 2007). Neben wenigen technisch-mechanischen und biotechnischen Methoden zur Bekämpfung, die meistens die Schlägerung des Bestandes als ultima ratio bedingen, wird sowohl i. S. der möglichst langfristigen Bewahrung des Ökosystems Wald mit seinen Funktionen als auch i. S. forstbetrieblicher Ziele³ zunehmend auf die Möglichkeiten der Anwendung von biologischen Bekämpfungsmaßnahmen gesetzt werden müssen.

1.2 Biologische Kontrolle

EILENBERG ET AL. (2001) geben eine allgemein akzeptierte Definition zur biologischen Kontrolle an. Dabei wird biologische Kontrolle als Möglichkeit definiert, unter deren Hilfenahme lebende Organismen bestimmte Schaderregerpopulationen in ihrer Zahl und ihrem Schadpotential unter einen zumeist wirtschaftlich vertretbaren Schwellenwert bringen können, den sie ohne diese Maßnahme überschreiten würden. Die biologische Bekämpfung stellt einen weitaus schwächeren Eingriff in ein Ökosystem dar, als der kurative Einsatz mit chemischen Bekämpfungsmitteln zur Folge hätte, die nicht ursprünglich im Ökosystem vorhanden sind. Es kann demzufolge als unbestritten gelten -dass im Waldschutz- aufgrund

³ Kalamitätsnutzungen sind i. S. der Wirtschaftlichkeit zu vermeiden. Geringerer Marktpreis und höhere Holzerntekosten stehen den steuerlichen Vergünstigungen entgegen. Gegebenenfalls sind starke Einschränkungen für die Betriebsplanung der ff. Jahre unausweichlich.

vielfältiger Vorteile (Gewässerschutz, Schutz der Biodiversität etc.) biologischen Bekämpfungsmaßnahmen der Vorrang gegenüber chemischen Bekämpfungsmitteln einzuräumen ist. Vor allem sind sie dort anzuwenden, wo bei der chemischen Bekämpfung gravierende Nebenwirkungen zu erwarten sind und der zu bekämpfende Schadorganismus gegen Wirkstoffe in chemischen Präparaten resistent ist oder zu werden droht (ALTENKIRCH, ET AL., 2002).

Rezente besteht vermehrte öffentliche Aufmerksamkeit gegen aktuelle und potentielle ökologische Schäden durch chemische Insektizide. Auch ist deren Einsatz, abgesehen von der anwenderfreundlichen Handhabung, oftmals nicht erfolgreich. HAJEK (2004) gibt zu bedenken, dass es oftmals nach einer Anwendung von Insektiziden sogar zu dem sogenannten verstärkenden Effekt des „target pest resurgence“ kommen kann. Hierbei kommt es aufgrund des Fehlens von natürlichen Antagonisten zu einem verstärkten Wiederaufleben der Schädlingspopulation, wenn diese z.B. in das zuvor behandelte Gebiet rückwandern. Auch können bisher unschädliche Arten, aufgrund des Pestizid bedingten Ausfalls des Antagonistenkomplexes, in ihrer Abundanz zunehmen und plötzlich zu einem neuen bisher unbekanntem Schädlingsproblem werden. Vermehrt wird die abnehmende Effektivität bestimmter Wirkstoffe als Folge von Resistenzerhöhungen in den Schaderregerpopulationen gegen länger und häufiger eingesetzte Pflanzenschutzmittel diskutiert (HAJEK, 2004). Resistenzen jedoch kann nur entgegen gewirkt werden, wenn der Einsatz von Pestiziden in höheren Dosen oder aber die Verwendung neuer Substanzklassen erfolgt. Beides geht jedoch mit einer steigenden Umweltbelastung und einem steigenden Kostenaufwand einher (WEBER, 1993).

Diese Tendenzen induzieren den Einsatz von „biologischen Pflanzenschutzmitteln“ in Form von Anwendungsmethoden und –präparaten mit Hilfe von natürlichen Antagonisten (WEBER, 1993). Allerdings darf an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, dass trotz der unbestrittenen Vorteile der biologischen Schädlingsbekämpfung, deren Anwendung einen höheren Wissensstand als die Anwendung von „Nicht-biologischen Verfahren“ erfordert. So muss sowohl die Biologie des Schädlings als auch die seines Antagonistenkomplexes, sowie deren jeweilige Entwicklungsansprüche, gekannt und laufend kontrolliert werden. Ebenfalls nicht zu erwarten sind ein schneller „Knock-Down-Effekt“ bzw. eine kurzfristig hohe Abtötungswirkung, die eine rasche populationsdynamische Regelung, vergleichbar derjenigen eines chemischen Insektizids, verspricht.

Allgemein muss an dieser Stelle auch darauf hingewiesen werden, dass die Vorteile der biologischen Schädlingsbekämpfung eher im prophylaktischen Schädlingsmanagement

liegen. Ein permanentes Schädlingsmonitoring ist untrennbar mit der biologischen Bekämpfung verknüpft.

Geleitet von diesen Überlegungen steht der Aspekt der mikrobiologischen Bekämpfung von forstschädlichen Insekten i.e.S. *I. typographus* unter Zuhilfenahme von Pathogenen im Vordergrund der vorliegenden Arbeit, denn Pathogene können bei der natürlichen Begrenzung von Insektenpopulationen eine bedeutende Rolle spielen. Ansätze dieser Maßnahmen reichen bis ins 20. Jh. zurück (SCHAERFFENBERG, 1957; FRANZ & KRIEG, 1972). Neben Viren, Bakterien und Protozoen sind es vor allem sehr viele Pilze aus der Gruppe der Ascomycota, von denen eine entomopathogene Wirkung bekannt ist (ROY ET AL., 2010).

1.3 Mikrobiologische Schädlingskontrolle mit entomopathogenen Pilzen

Weltweit gibt es etwa 700 Pilzarten die als entomopathogen eingestuft werden können (HAJEK, 2004). Herauszustellen ist, dass insektenpathogene Pilze das Potential besitzen Gradationen von Insekten zu begrenzen. Nach WEBER (1993) sind sie hierbei sogar erfolgreicher als Viren oder Bakterien und können effizient zum Zusammenbrechen von Populationen führen. Das besondere an Pilzen i. Vgl. zu anderen Pathogenen ist hierbei, dass die meisten Pilzarten nicht aktiv mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, sondern über die Kutikula den Insektenkörper penetrieren können (HAJEK, 2004). Eine passive Aufnahme von Sporen bietet entscheidende Vorteile in Verbindung mit den verschiedensten Anwendungsstrategien. Die Pathogenese wird nachfolgend unter Punkt 1.4 erläutert. Bis auf weiteres gilt die Anwendung von Pilzen im Freiland als vergleichsweise ungefährlich für Nicht-Zielorganismen (ZIMMERMANN, 2008). Es eignen sich durchschnittlich aber nur solche Pilzarten, die auch saprophytisch zu vermehren sind, da sie nur dann biotechnologisch in ökonomisch vertretbaren Dimensionen in größerem Ausmaß produziert werden können (WEBER, 1993). SCHMUTTERER & HUBER (2005) halten für den Einsatz von entomopathogenen Pilzen alle gängigen Anwendungsstrategien für durchführbar. Nachfolgend sind diese in Tab.1 aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht möglicher Anwendungsstrategien (aus MÜLLER-KÖGLER, 1965; HAJEK, 2004; SCHMUTTERER UND HUBER, 2005;)

<u>Anwendungsstrategie</u>	<u>Anwendungsziel</u>	<u>Anwendungsmethode</u>	<u>Anwendungsbeispiel</u>
Klassische biologische Bekämpfung	Permanente Anreicherung des Pilzes im Ökosystem	Einführung eines co-evolutiven entomopathogenen Pilzes gegen ein Schadinsekt in ein neues Gebiet	Einführung von <i>Entomophaga maimaiga</i> (1911) von Japan nach Nordamerika/ Begrenzung einer <i>Lymantria dispar</i> Gradation (1989)
Inundative Methode (Verwendung als Mykoinsektizid)	kurzfristige aber schnelle Etablierung des Pilzes um Schädlingspopulation zu begrenzen, besonders wenn natürl. Antagonisten fehlen, in zu geringer Dichte auftreten oder zu spät zu einer Verringerung der Schädlingspopulation beitragen würden	Anwendung wie ein herkömmliches synthetisches Insektizid, meist ist die Wirkung nur auf die einmalige Anwendung in einem kleinen Gebiet begrenzt ohne bleibende Effekte	Anwendung von Sprühsuspensionen auf Basis von <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> gegen versch. Wanderheuschreckenarten in Südafrika
Inokulationsmethode		Größere Mengen künstl. vermehrter einheimischer Pilzsporen werden in einem größeren Gebiet verteilt, dabei kommt es meist zu bleibenden Wirkungen solange es genügend Wirte gibt und sich der Pilz vermehren kann	Sprühapplikation von <i>M. anisopliae</i> gegen <i>Dendrolimus</i> spp. in China
Trap & Release-, Attract & Kill- oder Autodisseminationsmethode	Bekämpfung von Zielorganismen in Kombination mit chemischen und physikalischen Hilfsstoffen	Anlockung mit Hilfe von Pheromonfallen und mechanische Inokulation mit Sporen	Bockkäferbekämpfung in Japan mittels um Baumstämme gelegte und mit Sporen kontaminierte Faserbänder
biolog. Kombinationsmethode	Verknüpfung von Kurz- und Langzeitwirkung	Kombination mit <i>Bacillus thuringensis</i>	
chem. Kombinationsmethode	Förderung der Krankheitsdisposition	Mischung der Sporensuspension mit Hexachlorcyclohexan oder Dichlordiphenyltrichloräthan	<i>B. bassiana</i> + DDT/HCH gegen <i>Leptinotarsa decemlineata</i>

1 Einleitung

Neben der Anwendungsstrategie ist die Anwendungseignung bestehend aus den Komponenten Pathogenität und Virulenz entscheidend. Der verwendete Pilzstamm der jeweilig gewählten Art sollte über Pathogenität (konstitutive Fähigkeit eines Organismus eine Krankheit hervorrufen zu können) und einen ausreichenden Grad an Virulenz (adaptive Fähigkeit eine schnelle und/oder hohe Mortalität erzielen zu können) verfügen. Ein Nachweis für die drei in der vorliegenden Arbeit behandelten Arten *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* und *Isaria fumosorosea* ist weltweit an verschiedenen Insektenarten in zahlreichen praktischen Anwendungsversuchen erbracht worden (VGL. ZIMMERMANN, 2007a/b, 2008). Bei jedem Anwendungsversuch ist jedoch eine Prüfung auf Virulenz für den Infektionserfolg vor Anwendung des jeweiligen Pilzstammes erforderlich.

1.4 Infektionshemmende Umweltfaktoren und Vorkommen der Pilzarten

Neben der individuellen Resistenz (präinfektionelle Abwehrmechanismen) und der Immunität die eine erfolgreiche Infektion verhindern, sind nach INGLIS ET AL. (2001) besonders auch exogene Faktoren bestimmend für eine Infektion. Es sind die Solarstrahlung, die Temperatur, die relative Luftfeuchte sowie der Niederschlag und der Wind als infektionshemmende Umweltfaktoren zu nennen. Dabei sind die genannten Faktoren keinesfalls als isoliert anzusehen, vielmehr beeinflussen sie sich gegenseitig und verstärken in ihrer Kombination die einzelnen Effekte⁴. Pilze reagieren sehr sensitiv auf die Faktoren Strahlung, relative Luftfeuchte, Niederschlag, Temperatur und Zusammensetzung des Bodenmilieus⁵ (ALTENKIRCH ET AL., 2002).

Besonders negativ wirken UV-B Strahlen in einem Spektrum von 285 bis 315nm (INGLIS ET AL., 2001). Wobei INGLIS ET AL. (2001) für die Pilzarten *B. bassiana*, *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* eine Arbeit von FARGUES ET AL. (1996) zitieren, wonach sie die größte Resistenz gegenüber künstlichem Sonnenlicht in einem Strahlenspektrum von 295 bis 1100nm aufwiesen würden. Wichtig im Zusammenhang mit der Strahlung ist das Mikrohabitat in dem sich die Sporen befinden. Die Überlebensfähigkeit der Konidien ist auf strahlungsexponierten Standorten deutlich vermindert. Dagegen steigen die Überlebenschancen in geschützten Mikrohabitaten bzw. unter Schutz einer Vegetationsdecke deutlich an.

INGLIS ET AL. (2001) geben an, dass die schnelle Inaktivierung der infektiösen Konidiosporen durch Solarstrahlung als das wesentlichste Hindernis in der erfolgreichen Kommerzialisierung in Hinblick auf die Anwendung von entomopathogenen Pilzen gegen Insektengradationen in

⁴ Z.B. führen Strahlung und Wind additiv zu beschleunigten Austrocknungserscheinungen

⁵ Textur, Kationenaustauschkapazität, pH-Wert und Humuszusammensetzung

1 Einleitung

der Landwirtschaft gilt. Unbeachtet bleiben darf auch nicht die indirekte Wirkung der UV-Strahlung auf den Wirt. So kann eine erhöhte UV-Strahlung zu einem veränderten Wirtsverhalten führen, das eine erfolgreiche Pilzinfektion verhindert (INGLIS ET AL., 2001). So ist es zum Beispiel Heuschrecken möglich ihre Körpertemperatur durch aktives Sonnenbaden auf 38 - 40°C zu erhöhen um damit Pilzinfektionen zu kurieren (HAJEK, 2004).

Entomopathogene Pilze können zudem nur in einem eng begrenzten Feuchte- und Temperaturbereich ihre pathogene Wirkung entfalten. Eine unzureichend hohe relative Luftfeuchte kann die Effizienz der Pilze nachteilig beeinflussen. Die Konidiogenese auf der Oberfläche von Insektenkadavern ist ebenfalls von hoher Feuchte abhängig. INGLIS ET AL. (2001) weisen jedoch darauf hin, dass für eine Infektion, ausreichende Feuchteverhältnisse wiederum vom Mikrohabitat abhängig sind und dass auch das Integument von Insekten durchaus ausreichend Feuchtigkeit bieten kann, um eine Infektion erfolgreich werden zu lassen. Zudem sind Pilzarten wie z.B. *B. bassiana* befähigt im Haemocoel von Insektenkadavern auch unter geringen äußeren Luftfeuchtebedingungen erfolgreich Blastosporen zu bilden. Niederschlag hingegen kann zur Abwaschung der Konidien führen und das, obwohl Konidien von Pilzen vergleichsweise stark an der Insektenkutikula anhaften. Der Grad der Abwaschung ist hierbei von den Faktoren Niederschlagsstärke, Insektenverhalten, Körperbau und Lebensweise⁶ abhängig (INGLIS ET AL. 2001).

Die Temperatur ist einer der wesentlichsten Faktoren, die zu einer erfolgreichen Infektion beitragen. Sie beeinflusst dabei sowohl die Infektionsrate als auch die LT_{50} ⁷. Als Temperaturoptimum für die meisten entomopathogenen Pilzarten gilt der Bereich zwischen 20°C und 25°C, wobei bei Temperaturen ab 38°C für gewöhnlich das Wachstum beendet wird. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass Genotypen tropischer Provenienz höheren Optimal- und Kardinaltemperaturen unterliegen. In der praktischen Anwendung bedeutet dies, dass Isolate wärmerer Temperaturzonen toleranter gegenüber höheren Temperaturen sind als Isolate aus kälteren Temperaturzonen. Die aus der Literatur ermittelten Minimum- und Optimaltemperaturen werden für drei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pilze in der Tab. 2 auf Seite 21 wiedergegeben.

Prinzipiell kommen insektenpathogene Pilze in vielen unterschiedlichen Lebensräumen vor, in denen sich ihre Wirtsinsekten bzw. ihre jeweiligen Entwicklungsstadien befinden. So lassen sich Konidiosporen regelmäßig in der Luft, an der Borke von Bäumen, in Nestern, Exkrementen von Wildgeflügel und im Wurzelbereich von verschiedenen Pflanzen

⁶ Z.B. sind minierende Arten weniger dem Niederschlag ausgesetzt

⁷ LT 50: Zeit in der 50 % der inokulierten Individuen absterben

1 Einleitung

nachweisen (ZIMMERMANN, 2008). Besonders im Boden kommt es vermehrt zu Infektionen z.B. wenn der Waldboden für Insekten als Überwinterungsort dient. Die drei in dieser Arbeit behandelten Pilzarten *B. bassiana*, *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* kommen weltweit in Böden vor (KELLER & ZIMMERMANN, 1989). INGLIS ET AL. (2001) beschreibt den Boden als extrem komplexes Milieu, indem viele Faktoren eingeschlossen der Bodentyp (z.B. Textur, Kationenaustauschkapazität, organisches Material, pH-Wert etc.), der Feuchtegehalt (z.B. Wasserverfügbarkeit) und die Gegenwart einer lebenden Bodenmikroflora, die Persistenz und/oder die Effizienz von entomopathogenen Pilzen beeinflussen können. Besonders die Bodentextur und das organische Material sind wichtige Faktoren, die die vertikale Verbreitung der Sporen fördern oder begrenzen. So enthalten wassergesättigte, sandige oder Böden mit geringer organischer Substanz vergleichsweise weniger Konidien als lehmige oder stärker mit organischem Material angereicherte Böden (INGLIS ET AL. 2001). Der pH-Wert hingegen hat keinen oder nur einen minimalen Effekt auf das Überleben der Konidiosporen und auf ihre Keimfähigkeit, während der Feuchtegehalt einen signifikanten Einfluss auf die Effizienz entomopathogener Pilze hat.

1.5 Pathogenese

Die Pathogenese verläuft bei den hier untersuchten Pilzarten *B. bassiana*, *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* vergleichbar. Exemplarisch werden hier die wichtigsten Stufen des Infektions- und Entwicklungsverlaufs der Pilzart *B. bassiana* stellvertretend für die anderen beiden Pilzarten wiedergegeben. Grundsätzlich können zwei Phasen der Mykose unterschieden werden, die parasitische Phase und die saprophytische Phase.

Als parasitische Phase wird hierbei der Zeitraum von der Anlagerung der Spore an die Insektenkutikula bis zum Tod des Wirtstiers definiert. Anschließend folgt die saprophytische Phase mit dem Auswachsen des Pilzmyzels und der Bildung neuer Konidien.

1.6 Parasitische Phase

Nur wenn es zum erfolgreichen Abschluss der parasitischen Phase kommt, folgt das Absterben des infizierten Wirtes. Der perkutane Infektionsweg kann als regelmäßig auftretend beobachtet werden (ZIMMERMANN, 2007a). Eine frühe Publikation von MÜLLER-KÖGLER (1965) nennt auch andere Infektionswege als regelmäßig auftretend, es sind dies die perorale, perstigmale, pergenitale, peranale und pertraumatische Infektion. ZIMMERMANN (2007a) beschreibt im Wesentlichen fünf Schritte der parasitischen Phase. Beginnend lagert sich die Spore an der Kutikula an. Die Anlagerung der Sporen selbst ist ein passiver Mechanismus, der durch das Wirken der Adhäsionskraft in Kombination mit der Sporenoberflächenstruktur zu

1 Einleitung

Stande kommt. Chemische Wechselwirkungen mit Substanzen wie Haemagglutinin, Glukose und N-acetylglucosamin auf der Oberfläche des Insekts spielen im Anlagerungsprozess ebenfalls eine Rolle (TANADA & KAYA, 1993). Der zweite Schritt besteht aus der Keimung der Spore. Die Keimung ist eine sehr sensible Phase und hängt sowohl von der Feuchtigkeit, der Temperatur, den Strahlungsverhältnissen als auch von der Nährstoffversorgung ab. Keimungshemmend können dabei bestimmte Kutikularfette wie z.B. kurzkettige Fettsäuren, Aldehyde, Wachsester, Ketone und Alkohole sein, die antimikrobiell wirken (ZIMMERMANN, 2007a). Zusätzlich zum Keimfaden wird zur besseren Anhaftung ein Appressorium ausgebildet. Nach Ausbildung des Appressoriums beginnt der Penetrationsprozess bevorzugt durch dünnere, schwach oder nicht-sklerotisierte Stellen in der Kutikula. Entsprechend beschreiben TANADA & KAYA (1993) zusätzlich die Möglichkeit der Penetration des Pilzes durch Körperöffnungen wie z.B. der Buccalhöhle und den Tracheen. ZIMMERMANN (2007b) beschreibt den Penetrationsprozess als eine Kombination aus mechanischem Druck und enzymatischer Reaktion, bei der verschiedene Kutikula degradierende Enzyme wie z.B. Proteasen, Esterasen, Chitinasen und Lipasen das aktive Eindringen durch die Kutikula ermöglichen. Das angegriffene Insekt versucht sich seinerseits durch die Aktivierung seines Immunsystems gegen die Penetration durch verschiedene wirtsspezifische Reaktionen zu wehren. Diese Autoimmunreaktionen umfassen die Produktion von Phenoloxidase, verschiedenen Haemozyten, der Produktion von antimykotischen Komponenten, der Melanisierung sowie die Produktion von Proteinen zur Entgiftung pilzbürtiger Toxine. Morphologisch ist zu Beginn der Infektion eine Schwarz- bzw. Braunfleckung erkennbar (ZIMMERMANN, 2007b). Nach dem erfolgreichen Eindringen des Pilzes bildet die Produktion von Blastosporen in der Hämolymphe den Abschluss der parasitischen Phase. Die Blastosporen verteilen sich passiv in der Hämolymphe des Wirts. Während dieser invasiven Phase verbrauchen die wuchernden Hyphen die in der Hämolymphe und die im Fettkörper vorhandenen Nährstoffe. Es erfolgt die Zerstörung der Blutzellen, in deren Folge der Kreislauf sistiert. Außerdem übt das Hyphenwachstum innerhalb des Insektenkörpers mechanischen Druck auf den Insektenkörper aus und verbraucht Sauerstoff bzw. Energie. Zusätzlich werden während der Ausbreitung der Blastosporen in der Hämolymphe verschiedene pilzbürtige Toxine⁸ gebildet, die eine Vergiftung bewirken. Die parasitische Phase verläuft letal. Im Zusammenhang mit dem Ablauf der parasitischen Phase muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass bereits vor dem eigentlichen Tod Einflüsse auf den Wirt wahrzunehmen sind. Aus Sicht einer gewünschten insektiziden Wirkung sind dies eine

⁸ Auflistung der pilzbürtigen Toxine in Tab. 2

1 Einleitung

untypische bzw. verminderte Nahrungsaufnahme, die Reduktion von Gewicht, sowie Missbildungen im Rahmen der Häutung oder allgemein Verhaltensänderungen, wie z. B. Wipfeln. Diese Reaktionen sind als besonders positiv einzuschätzen, vermindern sie doch zunehmend das Schadpotenzial der betreffenden Insektenart. Der Tod des Wirtsinsekts resultiert aus einer Kombination aus Nährstoffauszehrung, des physikalischen Druckes auf die Organe und der Vergiftung durch toxische Metabolite (INGLIS ET AL., 2001). Eine Abtötung findet abhängig von der Virulenz der Pilzart, Wirtsart, Konstitution des Wirtes, Wirtsstadium und äußeren Parametern nach 1-2 Wochen statt. Damit endet die parasitische Entwicklung des Pilzes. Nachfolgende Abb. 1 zeigt die parasitische Phase.

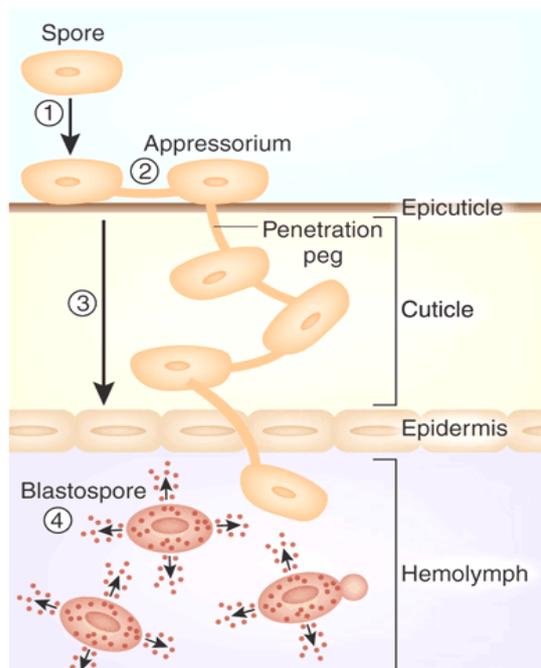


Abb. 1: Illustrativer Überblick des Wachstums eines entomopathogenen Pilzes durch das Integument eines Insekts (www.nature.com). Darstellung zeigt: 1. Perkutaner Infektionsweg durch Anlagerung der Spore an das Integument des Insekts, 2. Keimung der Spore und Ausbildung des Appressoriums 3. Penetrationsprozess 4. Ausbildung der Blastosporen in der Hämolymphe und Bildung verschiedener pilzbürtiger Toxine

1 Einleitung

1.7 Saprophytische Phase

Auf den Tod des Wirtsinsekts folgt übergangslos das saprophytische Wachstum des Pilzes im Insekt und aus dem Integument heraus. Hierbei werden viele verschiedene Metabolite produziert, deren Funktion nach INGLIS ET AL. (2001) in der Ausschaltung konkurrierender Mikroorganismen besteht. Er endet mit der Durchwucherung und Mumifizierung des Wirtsinsekts. Charakteristisch für eine Mykose ist der verhärtete Insektenkörper. Die Hyphen des Pilzes wachsen aus dem Wirtskadaver aus und produzieren konidiogene Zellen. Unter geeigneten Bedingungen kommt es daraufhin zur Sporulation auf der Oberfläche des Wirtskadavers. Auf der Oberfläche des Wirtes werden die Konidien mittels Mitose gebildet und sind wiederum für andere Wirtstiere hoch infektiös. Die erneute Verbreitung und damit der Neustart des Infektionszyklus geschehen passiv z.B. durch Berührung oder den Luftzug. Nachfolgend ist in Abb. 2 ein Teil des saprophytischen Zyklus fotografisch dargestellt. Es zeigt die verschiedenen Stadien des Auswachsens des Myzels vom ersten bis zum zehnten Tage nach Absterben eines mit *B. bassiana* infizierten *I. typographus*.



Abb. 2: Auswachsen der Pilzart *B. bassiana* aus einem mittels Sporensuspension ($1-2 \times 10^7$) infizierten *I. typographus*

1.8 Beschreibung von *B. bassiana*, *M. anisopliae* und *I. fumosorosea*

Erstmals wurde *B. bassiana* 1835 von dem Italiener AGOSTINO BASSI DI LODI an *Bombyx mori* (1835) beschrieben (ZIMMERMANN, 2007a). *B. bassiana* gehört in das Reich der Pilze, zur Abteilung der *Ascomycota*, zur Ordnung der *Hypocreales*, in die Klasse *Sordariomycetes* sowie der Unterklasse *Hypocreomycetidae* und schließlich in die Familie der *Cordycipitaceae* systematisch einordnen (Index fungorum, 3/2009). ZIMMERMANN (2007a) beschreibt *B. bassiana* als charakteristisch in weiß, gelb oder gelegentlich rötlich farbigen Kolonien

1 Einleitung

aufretend. Die Rückseite des Myzels ist dabei entweder farblos, gelb oder rosafarben. Das lockere flaumige Myzel auf der Oberfläche eines infizierten *I. typographus* wird in Abb. 3 als makroskopische Aufnahme gezeigt.



Abb. 3: Makroskopische Aufnahme des auswachsenden Myzels und der Konidiosporen der Pilzart *B. bassiana*

Die kondinogenen Zellen bestehen aus einem kugelförmigen bis abgeflachten Basalteil mit einer bis zu 20µm langen Rachis, die meist zick-zack geformt ist. Die Konidien sind transparent kugelförmig bis leicht ellipsoid mit einer Größe von 2-3x 2-2,5µm. Die Abb. 4 zeigt Konidien, die von der Kutikula eines infizierten *I. typographus* isoliert und unter dem Mikroskop bestimmt wurden.

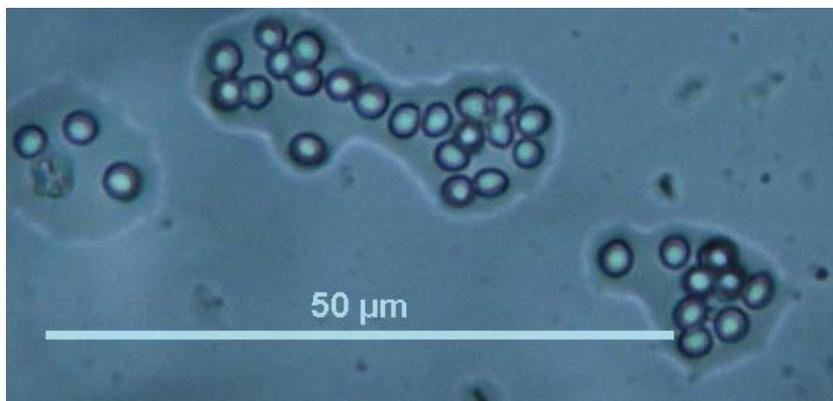


Abb. 4: Mikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart *B. bassiana*

1 Einleitung

Die Abb. 5 zeigt die Konidien und deren Struktur als Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Deutlich kann man hierbei die zick-zack förmige Anordnung und die rundliche Form der Konidien erkennen.

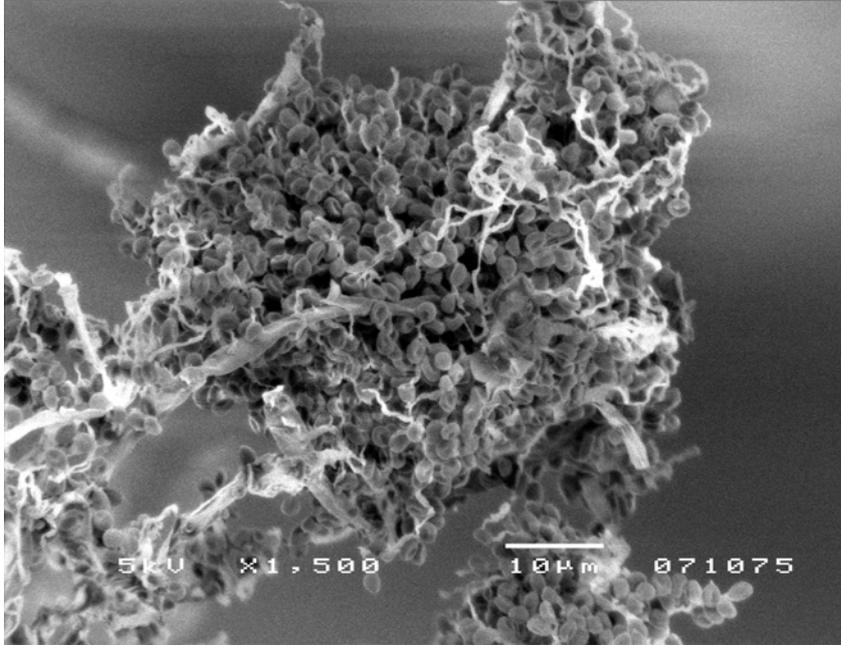


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Detailaufnahme von Sporen der Pilzart *B. bassiana* am Exoskelett eines infizierten *I. typographus*

MCLEOD (1954) weist für *B. bassiana* ein weltweites Vorkommen aus. Das Pathogen kann sowohl in tropischen als auch in temperaten Klimazonen regelmäßig nachgewiesen werden. Neben den unter Punkt 1.1 genannten Habitaten kann *B. bassiana* dabei regelmäßig auch von alpinen Böden mit langer Schneeeauflage, von Heidegewächsen, Mooren, Savannenböden, Wald und landwirtschaftlich genutzten Böden, Sanddünen, Flugsanden, Wüstenböden und Fließgewässern isoliert werden. Gelegentlich wird *B. bassiana* auch von Kleewurzeln und Borke isoliert. Darüber hinaus kann *B. bassiana* auch in den Lungen von Nagern, in Nestern und im Gefieder von Wildgeflügel gefunden werden (MCLEOD, 1954). Weitere Fundorte listet ZIMMERMANN (2007a) auf. Seinem Wirtsspektrum unterliegen 707 Insektenarten der unterschiedlichsten Gattungen, diese werden nachstehend in Tab. 2 auf S. 21 aufgelistet. An dieser Stelle sei deshalb darauf verwiesen, dass aufgrund des breiten Wirtsspektrums auch Arten des natürlichen Antagonistenkomplexes von *I. typographus* der Borkenkäferbekämpfung via entomopathogener Pilze im Freiland zum Opfer fallen werden. Diesem Umstand könnte durch die Anwendung selektiver Pilzstämme oder die Verwendung

1 Einleitung

von Pheromonfallen, die mit selektiven Duftstoffen zur Anlockung speziell von *I. typographus* vorbereitet wurden, entgegengewirkt werden.

Der **zweite** in der vorliegenden Arbeit untersuchte entmopathogene Pilz ist *M. anisopliae*. Dieser wurde erstmalig 1879 von METSCHNIKOFF beschrieben. Systematisch ist *M. anisopliae* dem Reich der Pilze, der Abteilung der *Ascomycota*, zur Ordnung der *Hypocreales*, in die Klasse *Sordariomycetes* sowie der Unterklasse *Hypocreomycetidae* und schließlich in die Familie der *Clavicipitaceae* einzuordnen (Index fungorum, 4/10). Die Gattung ist durch die Anordnung ihrer Phialiden definiert. Diese stützen Ketten und Säulen von trockenen und für gewöhnlich grünen, zylindrischen oder schwach eiförmigen Konidien. Die Säulen werden durch die Aneinanderordnung von Konidienketten gebildet (ZIMMERMANN, 2007b). Die Konidiengröße von *M. anisopliae* beträgt dabei 5-8µm und gilt im Gegensatz zu einer weiteren Metarhiziumart *M. flavoviride* als kurzsporig.

Die makroskopische Aufnahme in Abb. 6 zeigt das typische dunkelbraune bis schwarze Myzel einige Tage nach Auswachsen aus dem Integument eines *I. typographus*.



Abb. 6: Makroskopische Aufnahme des auswachsenden Myzels und der Konidiosporen der Pilzart *M. anisopliae*

1 Einleitung

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 7 zeigen die typisch zylindrisch bis eiförmige Form der Konidien. Visuell lässt sich erkennen, dass bei Verwendung des gleichen Maßstabs die Konidien von *M. anisopliae* deutlich größer als bei *B. bassiana* und *I. fumosorosea* sind.

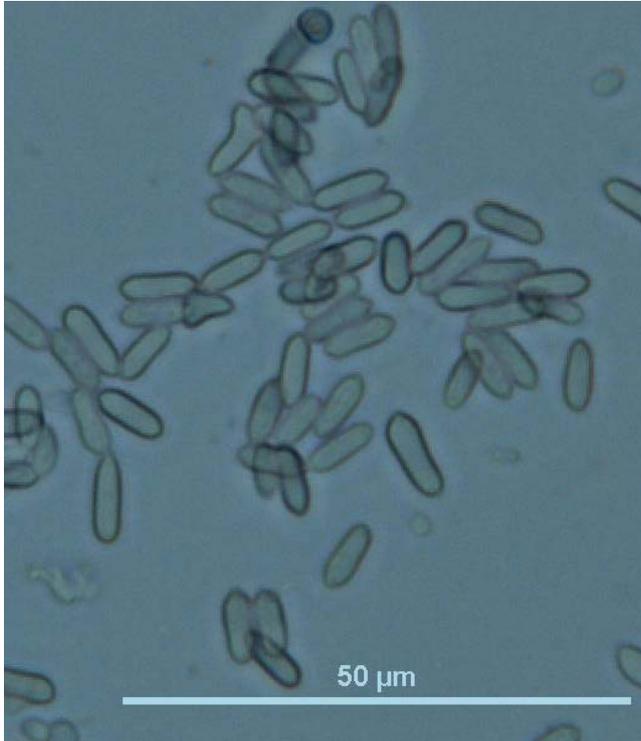


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart *M. anisopliae*

1 Einleitung

Die Abb. 8 zeigt die charakteristischen Konidienpakete auf dem Halsschild und Caput eines infizierten *I. typographus*.

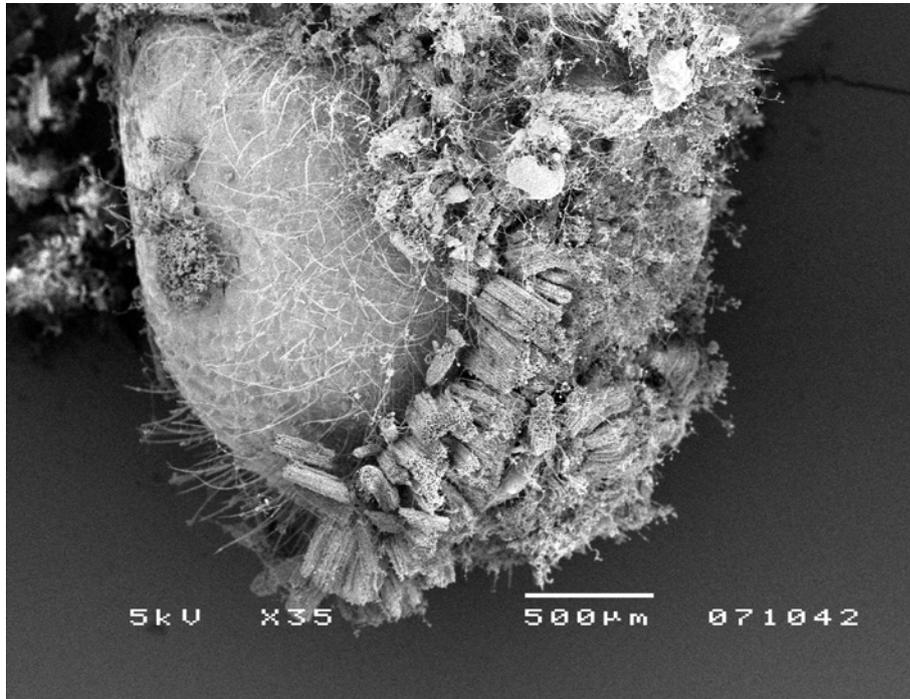


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart *M. anisopliae* auf dem Caput und Halsschild eines infizierten *I. typographus*

Obwohl *M. anisopliae* einen großen Wirtskreis besitzt, ist dieser doch enger verglichen mit *B. bassiana*. VEEN (1966) gibt 204 Insektenarten aus 7 Gattungen an. *M. anisopliae* findet eine häufige Anwendung in der Bekämpfung von Termiten (*Isoptera*), Heuschrecken (*Ensifera/ Caelifera*), Kakerlaken (*Blattodea*) und Schaumzikaden (*Aphrophoridae*). Das Pathogen ist ein Kosmopolit. Es kommt von der Arktis bis in die Tropen sowohl auf Insekten als auch in Böden vor. Die Pilzart wurde dabei in der Vergangenheit aus Getreidefeldern und Waldböden in Kanada, Böden aus Bananenplantagen in Honduras, Bohnen und Getreidefeldern in Brasilien, Weiden in Neuseeland, Weizenfeldern in Deutschland, Waldböden nach Waldbränden, Mooren, in Ablagerungen an Fließgewässern, in Mangrovenböden, auf Abraumhalden sowie von Hühnerstangen und Erdbeerwurzeln isoliert.

1 Einleitung

Abschließend soll die **dritte** hier verwendete Pilzart *I. fumosorosea* (WIZE, 1904) vorgestellt werden. WIZE isolierte den Pilz erstmals von *Cleonus punctiventris*. Heute lässt sich *I. fumosorosea* in das Reich der Pilze, zur Abteilung der *Ascomycota*, zur Ordnung der *Hypocreales*, in die Klasse *Sordariomycetes* sowie der Unterklasse *Hypocreomycetidae* und schließlich in die Familie der *Cordycipitaceae* systematisch einordnen (Index fungorum, 3/2010). ZIMMERMANN (2008) beschreibt, dass *I. fumosorosea* rosa Hyphenstränge sogenannte Synemata mit einer Länge zwischen 10-20mm ausbildet. Die Phialiden sind flaschenförmig mit einem kugelförmigen bis ellipsoid geformten Bereich. Die Konidien sind zylindrisch bis spindelförmig transparent bis schwach rosa und etwa 3-4 x 1-2µm groß. Wie in Abb. 9 zu erkennen ist, konnte während der Untersuchungen durchweg ein rosa farbenes Myzel auf infizierten Käfern festgestellt werden.



Abb. 9: Makroskopische Aufnahme des auswachsenden Myzels und der Konidiosporen der Pilzart *I. fumosorosea*

Die Abb. 10 zeigt Konidien von *I. fumosorosea*, die von einem *I. typographus* abisoliert und unter dem Lichtmikroskop bestimmt wurden. Deutlich sind die in langen Ketten hängenden Konidien zu erkennen.

1 Einleitung

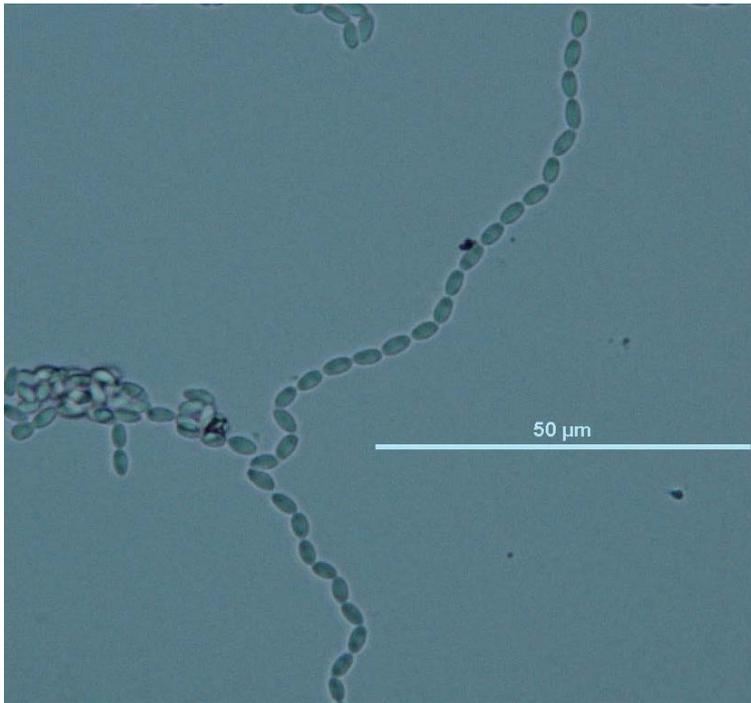


Abb. 10: Mikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart *I. fumosorosea*

Zusätzlich zeigt Abb. 11 Konidien von *I. fumosorosea* als elektronenmikroskopische Aufnahme.

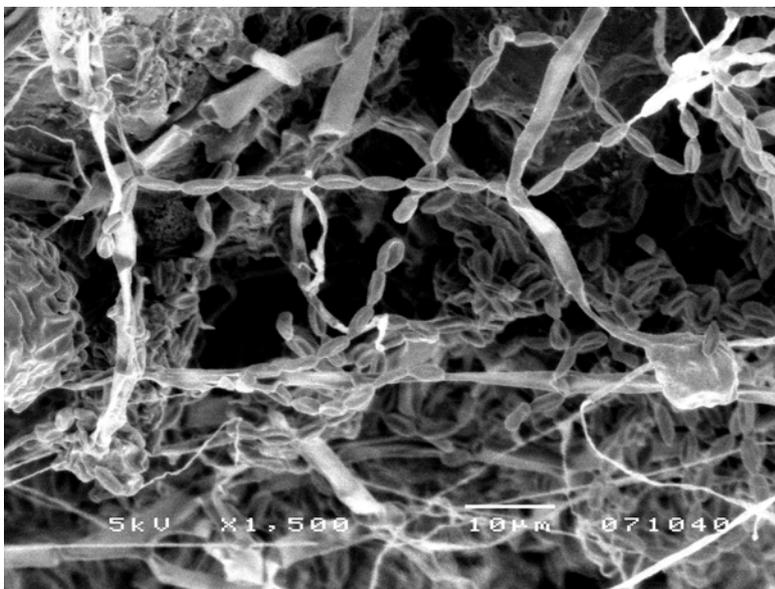


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart *I. fumosorosea*

1 Einleitung

Das Wirtsspektrum ist wie bei allen drei genannten Pilzarten vielfältig und umfasst viele Insektenarten. Verglichen mit *B. bassiana* ist das Wirtsspektrum von *I. fumosorosea* aber begrenzter und wird durch den Befall an *Lepidoptera* dominiert. Besonders häufig kommt das Pathogen im subtropischen und tropischen Raum bei Nymphen und Adulten der Arten *Bemisia* spp. vor sowie bei *Trialeurodes vaporariorum*. SMITH (1993) verweist auf 40 Insektenarten. Auch *I. fumosorosea* ist weltweit verbreitet. Die Art wurde von allen Entwicklungsstadien von Insekten, der Luft, dem Wasser, in Pflanzen und im Boden isoliert. Ein abschließender Überblick zu allen drei Arten wird in Tab. 2 gegeben. Zusätzlich findet sich darin eine aus der Literatur übernommene Auflistung der Wirtsgattungen, Angaben zur Optimaltemperatur für die Sporenbildung/-keimung und das Myzelwachstum, die jeweiligen letal auf die Pilzart wirkenden Min./Max.-Temperaturen sowie die relative Luftfeuchte, das Strahlungsspektrum und die von den Pilzen gebildeten Metabolite.

Tab. 2: Gesamtübersicht zu den Pilzarten *B. bassiana*, *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* (aus BUTT, ET AL. (2001); TANADA & KAYA (1993); ZIMMERMANN (2007a,b); ZIMMERMANN (2008))

	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>
<u>Erstbeschreibung</u>	Guiseppe Gabriel Balsamo-Crivelli 1835	Metschnikoff 1879	Wize 1904
<u>Gattung, Ordnung, Klasse, Unterklasse</u>	Ascomycota, Hypocreales, Sordariomycetes, Cordycipitaceae	Ascomycota, Hypocreales, Sordariomycetes, Clavicipitaceae	Ascomycota, Hypocreales, Sordariomycetes, Cordycipitaceae
<u>Klimate/ Standorte</u>	in allen Klimaten und auf allen Standorten vorkommend	weltweit (sowohl in den Tropen als auch in der Arktis)	weltweit, in verschiedenen Klimaten, vorwiegend auf Flächen mit einem hohen Baumanteil und in Wäldern
<u>Wirtsspezies</u>	707 Insektenarten (Lepidoptera Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera Orthoptera, Siphonaptera Isoptera Heteroptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae und Embioptera)	Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Coleoptera (besondere Anwendung gegen Termiten, Heuschrecken und Schaben)	vornehmlich an Lepidoptera aber auch an Acari, Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera, Neuroptera und Thysanoptera
<u>Färbung Myzel u. Konidien</u>	anfänglich weiß später gelblich bis leicht rötlich gefärbt. Rückseite des Myzels ist farblos, gelblich oder blassrosa	grün, schwarz	weiß, später violett bis pink
<u>Optimal Temperatur (Sporenbildung/ Keimung/ Myzelwachstum)</u>	23°C bis 28°C	25°C bis 30°C	20°C bis 25°C
<u>Temperatur Min.</u>	5°C bis 10°C	2°C bis 15°C	8°C
<u>Temperatur Max.</u>	30°C bis 38°C	40°C	35°C
<u>Optimal rel. Luftfeuchte</u>	94% bis 100%	100%	94% bis 98%
<u>Strahlung</u>	UV-A (290-330nm) und UV-B (330-400nm) empfindlich	UV-A (320nm-400nm) und UV-B (280-320nm) empfindlich	UV-A (320-400nm) und UV-B (280-320nm) empfindlich
<u>Metabolite</u>	Beauvericin, Bassianin, Bassianolide, Beauverolide, Tenellin, Oosporein, Oxalsäure, Bassiacridin	Destruxin A,B,C,D Cytochalasin C Swainsonine	Beauvericin, Beauverolide, Pyridine-2,6-Dicarboxylsäure

1.9 Fragestellungen

Obwohl die Wirkung der hier untersuchten Pilzarten *B. bassiana*, *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* gegen Schädlinge global an vielen Insektenarten nachgewiesen ist, beschränken sich die meisten Ansätze auf die Untersuchung von Schädlingen in der Landwirtschaft. Es gibt bisher wenige Untersuchungen, die speziell auf die biologische Kontrolle mit Hilfe von entomopathogenen Pilzen gegen *I. typographus* abzielen. Die Zielsetzung nachfolgender Arbeit besteht deshalb in der Betrachtung folgender Fragestellungen:

- 1.) Ist es möglich durch eine gezielte und kurze direkte Inokulation (3sec.) mit einer wässrigen Sporensuspension (Konzentration: $1-2 \times 10^7$ pro ml) mit den drei hier zu testenden Pilzarten Infektionen zu verursachen? Wenn eine letale Wirkung zu erzielen ist, wie schnell erfolgt sie? Sind die drei Pilzarten in ihrer Wirkung vergleichbar? Wie hoch ist die Mortalitätsrate? Welche Temperaturstufe ($15^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$) eignet sich für eine erfolgreiche Infektion und mortale Wirkung?

Erwartungsgemäß ist die selektive direkte Inokulation von phloeophagen Borkenkäfern im praktischen Einsatz nur schwer zu erreichen. Deshalb soll neben der direkten Inokulation auch die indirekte Inokulation getestet werden. Auch hier sollen folgende Fragen geklärt werden:

- 2.) Ist es möglich mit Hilfe der indirekten Inokulation über den Kontakt mit sporenkontaminierter Borke Infektionen hervorzurufen? Welche Zeitintervalle (1:30min/3min/5min) und bei welcher Temperaturstufe ($15^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$) sind hierbei die besten Ergebnisse zu erzielen? Sind auch die Versuche 1 Woche nach Applikation der Sporensuspension auf dem Stammabschnitt und nach deren Eintrocknung geeignet um Infektionen zu erzielen?

2 Material und Methoden

Alle Arbeitsschritte, verwendete Materialien und angewandte Methoden werden in chronologischer Reihenfolge dargestellt. Beginnend werden die vorbereitenden Maßnahmen bezüglich des Materials erläutert, nachfolgend werden die Versuchsdurchführungen beschrieben und abschließend das Forschungsdesign zu den Versuchen im Überblick dargestellt.

2.1 Versuchsstämme

Im Herbst 2009 wurden in einem Privatforstbetrieb, der sich in der Gemeinde Prinzersdorf (252m ü. NN) in Niederösterreich befindet, acht Stämme der Baumart *Picea abies* eingeschlagen. Es handelte sich dabei um Stämme aus dem Herkunftsgebiet Nördliches Alpenvorland 7.2 Ostteil. Die Stämme sollten während der ganzen Versuchszeit sowohl als Brut-, Frass-, und Teststämme für die Inokulationsversuche dienen, da aber die Stämme schnell aufgebraucht waren, wurden während der Versuchslaufzeit zusätzlich im Frühjahr und Sommer 2010 kontinuierlich Stämme aus Prinzersdorf und aus dem Lehrforst der Universität für Bodenkultur geholt. Die Lagerung der Stämme erfolgte in 122cm langen Teilstücken im Garten des IFFF. Bei der Fällung, Entastung, dem Antransport und der Lagerung wurde versucht möglichst schonend mit dem Material umzugehen. Die Borke sollte nicht übermäßig verletzt und eine Kontamination mit dem Erdreich sollte weitgehend verhindert werden. Es wurde nicht stammeben entastet, sondern ein paar Zentimeter vom jeweiligen Ast stehen gelassen. Mit dieser schonenden Vorbereitung der Stämme sollten ideale Brutverhältnisse simuliert werden und eine ungewollte Kontamination mit Pilzen aus dem Fällungsgebiet weitgehend vermieden werden. Unmittelbar vor jedem neuen Zuchtansatz, der der kontinuierlichen Käferproduktion diene, wurden die benötigten Stammstücke auf 60cm abgelängt und in einen Käfig (75cmx50cmx49cm) mit jeweils zwei Seitenwänden aus Glas und zwei Seitenwänden aus feinmaschigem Gitter gestellt. Sollten die im Versuchsgarten gelagerten Stämme als Fraßmaterial verwendet werden, so war darauf zu achten, dass stark mit Erdreich kontaminierte Stellen ausgespart wurden. Da die inkubierten Testkäfer während des jeweiligen Beobachtungszeitraumes kontinuierlich mit Bast versorgt werden mussten, wurden fortlaufend die Stämme entrindet und in kleine, wenige Zentimeter lange Baststücke zerkleinert. Mit diesen wurden die inkubierten Käfer gefüttert.

2.2 *Ips typographus*

Ab November 2009 wurden kontinuierlich Zuchtansätze aus Parentalkäfern der Institutszucht angesetzt. Pro Ansatz wurden je nach Verfügbarkeit 120 Käfer pro Stammstück mit einer Länge von 60 cm angesetzt. Die Temperatur im Zuchtraum der Tierhaltung betrug kontinuierlich 24°C +/-1°C bei einer rel. Luftfeuchte von ungefähr 60%. Die Zuchtansätze wurden unter Langtagbedingungen bei 16h Licht und 8h Dunkelheit gehalten. Alle Kästen wurden vor einem Neubesatz mit 70% Alkohol gereinigt und die Stammstücke wurden auf thermisch behandelte Unterlagehölzer, die zuvor 3h bei 80°C erhitzt worden waren, gestellt. Jeweils einmal täglich erfolgte die optische Kontrolle der Käfige und mind. zweimal pro Woche wurde das Bohrmehl aus den Käfigen entfernt. Trotz intensiver Hygienebemühungen und Quarantänestellung der verwendeten Käfer, konnte eine Kontamination mit *B. bassiana* nicht verhindert werden. Infolge starb bei den angesetzten Versuchen ein Großteil der Testkäfer aus der Kontrolle an einer *B. bassiana*-Infektion bis Februar/März 2010. Nach erfolgreicher Desinfektion der Räume der Institutszucht konnten keine weiteren ungewollten *B. bassiana* - Infektionen in der Zucht festgestellt werden.

2.3 In vitro Pilzkulturen

Die drei hier getesteten Pilzisolat *B. bassiana*, *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* entstammten einer Bodenprobenserie aus Hohenlehen (NÖ/TKACZUK) und lagen bereits als Emerskulturen vor. Sie wurden im Herbst 2009, Frühjahr und Sommer 2010 im Ø alle 6 Wochen regelmäßig neu auf 2%igen Malzextraktagar Nährböden (MEA) vermehrt. Pro 250ml Malzextraktagar wurden 4g Agar und 5g Malz mit Wasser verrührt. Um das Risiko einer bakteriellen Infektion zu verringern wurde jeweils 0,025g des Antibiotikums Streptomycin [Streptomycinsulfat (Calbiochem®) 57411] nach der Hitzesterilisation im Autoklaven zu den 250ml MEA hinzugefügt. Der MEA wurde in Plastikpetrischalen mit 9cm Durchmesser gegossen. Nach 24h waren die ausgegossenen Nährböden fest und es konnte eine Übertragung der jeweiligen Sporen mittels einer sterilisierten Pipette erfolgen. Dazu wurde ein Tropfen der Sporensuspension auf die Nährböden getropft.

Die Zubereitung der Sporensuspension zur Überimpfung und damit zur Vermehrung der Pilzarten erfolgte in der Impfbank der Instituts-Arbeitsgruppe Forstpathologie. Dazu wurde vor Arbeitsbeginn die Lüftung der Impfbank eingeschaltet, die komplette Impfbank ausgeräumt und die gesamte Impfbank mit 70%igen Alkohol desinfiziert, um Kontaminationen zu vermeiden. Während der Überimpfungen wurde die Lüftung ausgeschaltet, um ein Verwehen der Sporen durch Luftzug zu verhindern. Die Herstellung der

Sporensuspensionen verlief dann wie folgt. Es wurden ca. 10ml Wasser in eine sterile Injektionsspritze gezogen und anschließend durch einen Nalgene Syringe 0,2µm Filter auf den Originalnährboden gedrückt. Die sich auf dem Originalnährboden befindenden Sporen wurden dadurch aufgeschwemmt. Danach wurde durch vorsichtiges Schwenken des Nährbodens versucht, möglichst viele Sporen zu lösen. Zusätzlich wurden die Sporen mit einem abgeflamnten Glasspatel ausgebreitet. Zum besseren Suspendieren der Sporen wurde besonders bei den zwei Arten *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* ein Tropfen Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonoleat) hinzugefügt (Herstellerangabe: Merck-Schuchardt Spezifikation Hydroxylzahl 65-80, Verseifungszahl 45-55, Dichte 1,080 -1,083), denn die Sporen dieser beiden Pilzarten ließen sich oft schwer vom Nährboden lösen. Durch optische Prüfung ließ sich feststellen, ob genug Sporen gelöst worden waren. War dies der Fall wurden mit Hilfe einer vorher abgeflamnten Pasteurpipette einige Tropfen der Suspension aus der Originalpetrischale entnommen. Danach wurde jeweils ein Tropfen aus der Pasteurpipette auf den neuen Nährboden getropft. Anschließend wurde der Tropfen mit einem abgeflamnten Glasspatel auf dem Nährboden verstrichen. Abschließend wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 20°C +/-1 in einem Temperaturschrank (Köttermann 2771) gelagert. Ein erfolgreiches Anwachsen des Myzels wurde ca. 4-5 Tage nach Beimpfung festgestellt.

2.4 Keimungstest

Begleitend zu jeder Herstellung einer Sporensuspension wurde ein Keimungstest durchgeführt. Er sollte Aufschluss darüber geben, ob die hergestellte Suspension einen genügend hohen Prozentsatz an keimungsfähigen Sporen beinhaltet. Ein Wert zwischen 90 bis 100% war hierbei ausreichend. Dazu wurde jeweils ein Tropfen Sporensuspension auf zwei, einen Tag zuvor mit MEA eingegossene Objektträger getropft und mit einem sterilen Glaspatel verstrichen. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und sie wurden im Temperaturschrank bei 15°C/20°C/25°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag (24h) wurde auf die Objektträger Lactophenolblaulösung zur Pilzfärbung (MERCK 1.13741.0100) getropft. Dies führte zum Absterben der gekeimten Sporen, sowie zu deren Fixierung und Färbung. Unter dem Mikroskop wurden dann auf dem Objektträger zufällig ausgewählte Bereiche ausgezählt. Es wurden jeweils 100 Sporen ausgezählt und dabei zwischen gekeimt bzw. nicht-gekeimt unterschieden. Nach vier Zählungen von zwei verschiedenen Objektträgern pro Pilzart wurde der Mittelwert gebildet. Lag der Wert über 90% so konnte die Suspension verwendet werden.

2.5 Herstellung der Sporensuspension

Im Labor wurde die jeweilige Sporensuspension immer frisch vor dem Versuch hergestellt. Dazu wurden -nach Vorbereitung der Impfbank- die vollständig bewachsenen Petrischalen der jeweiligen Pilzart vorsichtig geöffnet und mit 10ml Wasser, das mit einer sterilen Injektionsspritze durch einen Nalgene 0,2µm Syringe Filter gedrückt wurde, aufgeschwemmt. Teilweise war ein Aufrühren des sporentragenden Myzels mit einem abgeflamten Glaspateel oder die Zugabe von einem Tropfen Tween 80 (Merck-Suchardt) nötig um genügend Sporen lösen zu können. Nach Lösung der Sporen wurden jeweils 10ml Sporensuspension mit einer sterilisierten Pasteurpipette oder einer 10ml Spritze abisoliert. Um den genauen Wert der Sporenanzahl in der Konzentration zu berechnen, wurde jeweils ein Tropfen der Suspension entnommen und in eine Blutkörperchenzählkammer nach Bürker-Türk getropft. Unter dem Mikroskop konnten bei 200-facher Vergrößerung die einzelnen Konidien identifiziert und ausgezählt werden. Dabei wurden jeweils vier Zählquadrate in diagonaler Linie ausgezählt. Gezählt wurden alle Sporen innerhalb des definierten Meßbereichs. Mitgezählt wurden die an der linken und unteren Maßlinie liegenden Sporen. Als letztes wurde ein fünftes Zählquadrat rechts oben ausgezählt. Die durch Zählung erreichte Gesamtzahl wurde durch die Anzahl der ausgezählten Quadrate geteilt und so erhielt man die mittlere Anzahl der Sporen in jedem Quadrat. Anschließend wurde durch Multiplikation mit 250 und 1000 die Gesamtsporenkonzentration pro ml berechnet. Durchschnittlich ergaben sich Werte im Bereich von $1-2 \times 10^7$ Sporen pro ml.

2.6 Methodik der direkte und indirekte Inokulationsversuche

Es konnten im Zeitraum vom 25.01.2010 bis zum 31.07.2010 insgesamt 6 direkte Inokulationsversuche und 6 indirekte Inokulationsversuche erfolgreich abgeschlossen werden. Es wurden jeweils drei verschiedene Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C geprüft.

Die **direkten** Infektionsversuche verliefen bei den drei Pilzarten methodisch gleich. Im Vorfeld wurden für jede Pilzart und die jeweilige Kontrollgruppe je nach Verfügbarkeit, entweder große Glasschalen mit einem Ø von 18,5cm oder für entsprechend weniger Käfer, mehrere kleinere Glaspetrischalen mit einem Ø von 14cm gereinigt, Hitze sterilisiert und anschließend sowohl mit Zellstoff als auch mit Baststücken (3-6cm Länge und bis zu 1cm Breite) beschickt. Sowohl Zellstoff als auch Bast sollten den Käfern als Fraßmaterial und Versteckmöglichkeit dienen. Die Baststücke wurden alle 3 bis 4 Tage ausgetauscht. Zudem wurde der Zellstoff mit autoklaviertem Wasser nachbenetzt um die Feuchtigkeit während des Versuchs hoch zu halten. Es wurde versucht, je nach Größe der Petrischalen den einzelnen

Individuen möglichst viel Platz zu bieten. Einerseits um den intraspezifischen Stress und etwaigem Kannibalismus entgegenzuwirken, andererseits um die gegenseitige Ansteckung durch regelmäßigen dichten Kontakt zu minimieren.

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Käfer durch Berührung unmittelbar nach Inokulation einige Sporen gegenseitig abstreifen würden und es zu einer direkten horizontalen Übertragung gekommen ist. Eine Neuinfektion durch eine von der Zielpilzart verursachte Mykose wäre allerdings innerhalb der Petrischale erst zu Stande gekommen, wenn ein im Glas lebender Käfer an einem abgestorbenen Käfer nach dessen beginnender oder abgeschlossener Mumifizierung auch tatsächlich Sporen abgestreift hätte. Da aber eine tägliche Kontrolle erfolgte, wurden alle jeweils abgestorbenen Käfer täglich im frisch abgestorbenen Zustand und vor einer etwaigen Mumifizierung aus den Schalen entnommen.

Am Tag der Infektion wurde im Forstpathologischen Labor die jeweilige Sporensuspension frisch hergestellt. Dazu wurden -nach Vorbereitung der Impfbank- die vollständig Pilzbewachsenen Petrischalen der jeweiligen Pilzart geöffnet. Diese wurden daraufhin mit 10ml Wasser, das mit einer sterilen Injektionsspritze durch einen Nalgene 0,2µm Syringe Filter gedrückt wurde, aufgeschwemmt. Teilweise war ein Aufrühren des Myzels mit einem abgeflamnten Glaspatel oder die Zugabe von einem Tropfen Tween 80 (Merck-Suchardt) nötig um genügend Sporen lösen zu können. Nach Lösung der Sporen wurden jeweils 10 ml Sporensuspension mit einer sterilisierten Pasteurpipette oder einer sterilen 10ml Spritze abisoliert.

Die aus der Zucht abgesammelten Käfer wurden dann zu Gruppen von jeweils 50 Stück zusammen in Glaspetrischalen mit einem Ø von 9,5cm gegeben. Anschließend wurden sie in einen mit 10ml Sporensuspension angefüllten Erlenmeierkolben geschüttet. Die Käfer wurden ca. 3sec. in der wässrigen Suspension geschwenkt und dann durch ein Sieb (Metallsieb; 5,5cm x 5,5cm) geschüttet. Für jede der zu untersuchenden Pilzarten wurde jeweils ein gesondertes hitzesterilisiertes Sieb verwendet. Die Sporensuspension wurde danach in einem anderen Erlenmeierkolben aufgefangen und sofort nach Versuchsende autoklaviert um Kontaminationen zu vermeiden. Nach dem Durchschütten der Testkäfer wurde unter das Sieb ein Stück Zellstoff gelegt, damit die restliche Flüssigkeit von den Käfern schnell abgesaugt werden konnte. Anschließend wurden die Käfer in die vorbereiteten großen Glaspertischalen (Ø 14cm - 18,5cm) gesetzt, in denen sich zwei zugeschnittene Stücke Zellstoff und frische Futterrindestücke von *Picea abies* befanden. Die Testschalen wurden bei den drei unterschiedlichen Testtemperaturen bei jeweils 15°C/20°C/25°C inkubiert. Die Baststücke

wurden alle drei bis vier Tage erneuert. Die Kontrolle der Käfer wurde täglich durchgeführt und erst nach dem Tod des letzten Käfers beendet.

Die **indirekten** Inokulationsversuche schlossen sich an die direkten Infektionsversuche an. Nachdem erstere erfolgreich abgeschlossen werden konnten und eine Infektion mit allen drei Pilzarten bestätigt wurde. Es sollte getestet werden, ob auch analog zur direkten Inokulation eine indirekte Inokulation ebenfalls zu einer erfolgreichen Infektion möglichst mit allen drei Pilzarten führen kann. Dazu wurde ein Stammstück mit der Motorsäge halbiert und auf das Maß 38,5cm Länge/ 22cm Ø zurechtgeschnitten. Daraufhin wurde das Stammstück in ein Aquarium aus Glas (L: 39cm/ B: 25cm/ H:15,5cm) auf 3 Lagen befeuchteten Zellstoff gelegt. Mittels einer sterilen 10ml Spritze wurde die jeweilige Sporenkonzentration $1-2 \times 10^7$ +1 Tropfen Tween 80 (Merck-Suchardt) mit einem Metallspatel auf zuvor definierte Bereiche des Stammstücks aufgetragen. Bei der Kontrolle wurde jeweils der definierte Bereich nur mit autoklaviertem Wasser + 1 Tropfen Tween 80 inokuliert. Es wurden jeweils 8 Bereiche zum Teil mit Hilfe einer Kartonage unterteilt. Auf diese Bereiche, mit einer Fläche von etwa 5x5cm, wurden die entsprechenden Sporensuspensionen mit einem Metallspatel aufgetragen. Nach 5min Antrocknungszeit wurden jeweils immer 15 Käfer mit Hilfe eines Deckels einer Plastikpetrischale für drei unterschiedliche Testzeiten von 1:30min, 3min und 5 min auf der Stammoberfläche fixiert. Die Käfer konnten so auf der Stammoberfläche umherlaufen und sich mit den Sporen inokulieren. Nach Ablauf der Zeit wurden die Käfer eingesammelt und getrennt nach Testgruppen im Brutschrank bei 15°C/20°C/25°C inkubiert. Nach sieben Tagen wurden erneut Käfer auf demselben Stammabschnitt aufgesetzt um die Wirkung der Sporensuspension nach 7 Tagen zu testen. In der nachfolgenden Abb. 12 soll ein chronologischer Überblick zu den Versuchen gegeben werden.

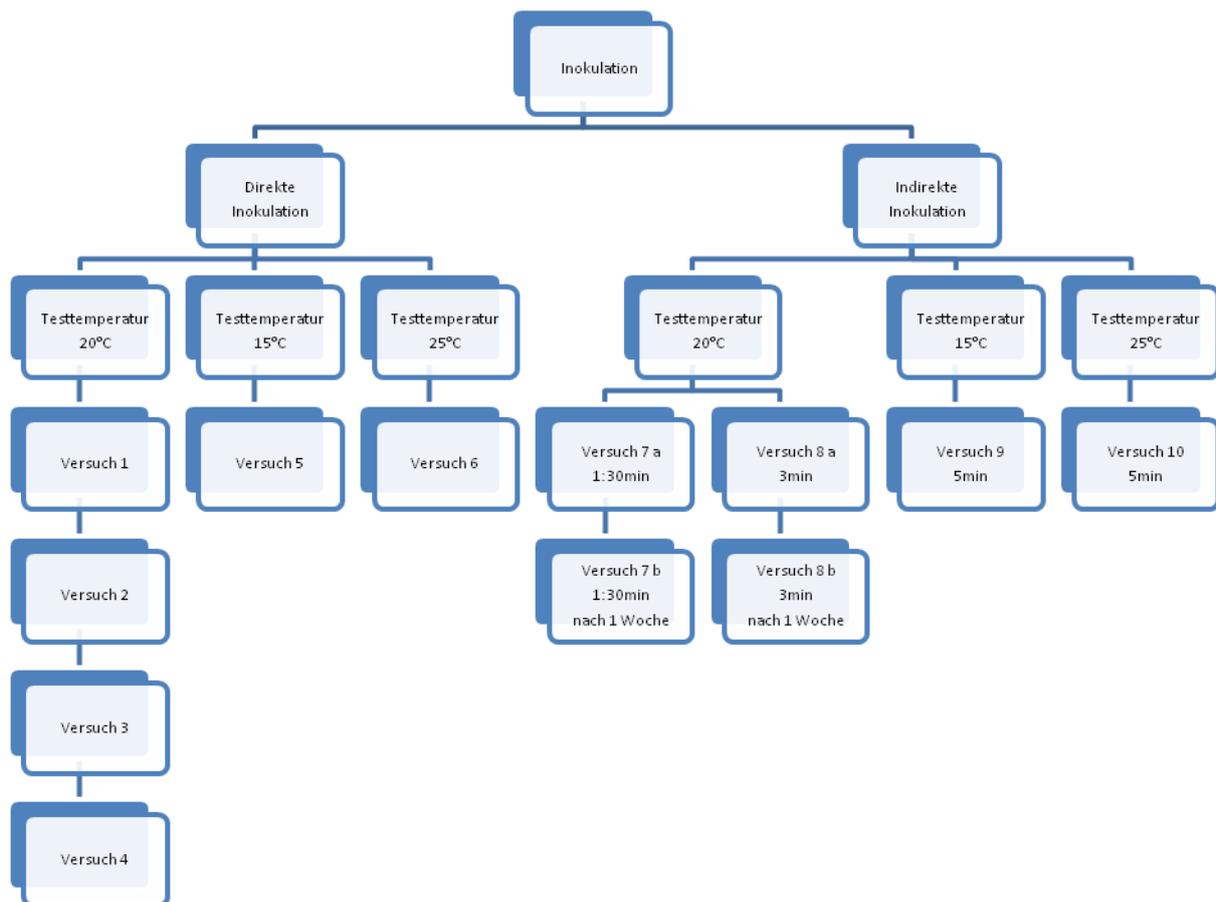


Abb. 12: Gesamtüberblick zu den direkten und indirekten Inokulationsversuchen

2.7 Statistische Auswertungen

Nach der Datensammlung erfolgte die Eingabe der Daten in Excel 2007. Die Ergebnisse in den nachfolgenden Abbildungen und Tabellen (siehe Abschnitt 3) wurden mit Hilfe des statistischen Datenauswertungsprogramms SPSS 15.0 und mit Excel 2007 berechnet. Die mittleren Überlebensdauern (MLD) wurden mit einem Test auf Mittelwertvergleich zwischen dem Mittelwert der Kontrollgruppe und dem Mittelwert der jeweiligen Pilzart berechnet, durchgeführt als Varianzanalyse analog dem t-Test (hier für Stichproben ≥ 50). Es handelt sich hierbei um einen einfaktoriellen Anovatest. Hierbei wird die Varianz einer Zielvariablen durch den Einfluss einer oder mehrerer Einflussvariablen (Faktoren) erklärt. In dieser Arbeit waren die Einflussvariablen Pilzart, Zeit und Temperatur. Werte über der Signifikanzgrenze $p > 0,050$ gelten als nicht signifikant. (VGL. FAHRMEIR ET AL., 2003).

Die Unterschiede der Infektionsraten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrattests geprüft. Beim Chi-Quadrattest handelt es sich um ein statistisches Verfahren für Häufigkeiten bzw. Anteile in Kreuztabellen. In dieser Arbeit wurde mittels des Chi-Quadrattests untersucht, wie hoch die Anteilswerte n ($i=1, \dots, k$) der Ist-Infektionen im Vergleich zu Kontrollgruppen und wie die Anteilswerte über die Stichprobe verteilt waren. Voraussetzung für den Chi-Quadratetest war die Einhaltung gewisser Mindestbedingungen bezüglich der erwarteten Häufigkeiten in den einzelnen Kategorien. Errechnete Wahrscheinlichkeiten von $p > 0,050$ werden im Folgenden als nicht signifikant bezeichnet. (VGL. FAHRMEIR ET AL.; 2003).

3 Ergebnisse

Die ersten sechs direkten Inokulationsversuche (siehe Abb. 13 bis 18) wurden bei drei unterschiedlichen Testtemperaturen (20°C/15°C/25°C) durchgeführt. Insgesamt wurden 1668 Versuchskäfer mit der direkten Inokulationsmethode getestet. Die Mehrzahl von 1268 *I. typographus* wurde mit der 20°C Variante, und jeweils 200 wurden bei 15°C bzw. 25°C Inkubationstemperatur untersucht. Die 20°C Varianten wurden aufgrund der guten Verträglichkeit dieser Temperatur für die Testkäfer in vierfacher Wiederholung durchgeführt. Nachfolgend werden unter Punkt 3.1 die Ergebnisse dieser vier Versuche und die Ergebnisse der Versuchsansätze bei 15°C und 25°C beschrieben. Es wurde jeweils getrennt nach der **Mittleren Lebensdauer (MLD)** und nach der **Infektionsrate (n-inf. bzw. % inf.)** analysiert. Insgesamt zeigte sich eine unerwartet hohe Variation, die sowohl die Länge der Mittleren Lebensdauer (MLD) in den nicht infizierten Referenzkontrollen als auch die MLD der mit der jeweiligen Zielpilzart infizierten Testkäfer betraf. Die zweite zu prüfende Variable war die Infektionsrate (n-inf. bzw. % inf.). Diese war durchschnittlich sehr hoch und zeigte nur in wenigen Fällen bei den direkten Inokulationsversuchen eine große Variation, blieb aber stets auf hohem Niveau. In den Kontrollen wurden keine mit den Zielpilzarten infizierte Käfer festgestellt. Andere Pilzarten (z.B. saprophytische Arten) konnten teilweise beobachtet werden, wurden aber nicht exakt identifiziert und quantifiziert.

Die indirekten Inokulationsversuche werden getrennt unter Punkt 3.2 betrachtet. Es konnten mit den indirekten Inokulationen insgesamt 1200 Käfer getestet werden. Aufgrund der hohen Mobilität der Käfer -zum Teil sofortige Abflugversuche und aktives Aufsuchen von Verstecken- auf den Stammstücken konnten pro Versuch und damit insgesamt durchschnittlich weniger Käfer getestet werden, als bei den direkten Versuchen. Es wurde unter Beibehaltung der drei im Vorfeld der Untersuchung festgelegten Testtemperaturen 15°C/20°C und 25°C geprüft. Bei den Tests zur Wirkung einer indirekten Inokulation (via Sporensuspension behandelte Borke), zeitlich limitiertem Aufenthalt (1:30 min/3:00min/5:00min) sofort nach dem Auftragen (und Antrocknen der Suspension) im Vergleich zu einer Woche danach, wurden im Vergleich zur direkten Inokulation der Käfer niedrigere Infektionsraten erwartet. Auch bei indirekter Inokulation der Käfer wurde in den Kontrollen eine 100% Mortalität ohne Auftreten einer Zielpilzinfektion registriert. Bei den indirekten Versuchen war die Variationsbreite bei den Infektionen bei insgesamt geringeren Infektionsraten deutlich höher als bei den vorangegangenen direkten Inokulationen.

3.1 Direkte Inokulationen

Mit dem **ersten** direkten Inokulationsversuch wurden insgesamt 280 Individuen getestet. Die Testtemperatur betrug 20°C. Bei dieser Temperaturstufe wurde mit allen drei Pilzarten, *B. bassiana*, *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* in längstens 10 Tagen eine 100% Mortalität beobachtet. Entgegen den Erwartungen, dass die nicht infizierte Kontrollgruppe bei den guten Haltungsbedingungen wesentlich länger leben würde, starben allerdings auch hier alle Käfer wesentlich früher bis zum 16. Tag nach Versuchsbeginn als erwartet. Anfänglich wurde für die Kontrolle noch ein längerer Zeitraum bis zum Erreichen der 100% Mortalität angeschätzt, mit 16 Tagen wurde hier der kürzeste Wert für alle Versuche gemessen. Insgesamt variierte der Zeitraum bis zum Erreichen der 100% Mortalität in der Kontrolle erheblich.

Der Mortalitätsverlauf war bei den drei Pilzarten sehr ähnlich. So sind die mit *B. bassiana* und *M. anisopliae* infizierten Testkäfer zu 100% bis zum 8. Tag gestorben, die mit *I. fumosorosea* infizierten Käfer waren einen Tag später zu 100% verstorben. Den Mortalitätsverlauf für die drei Pilzisolat und für die Kontrolle als Referenzverlauf zeigt die Abb. 13.

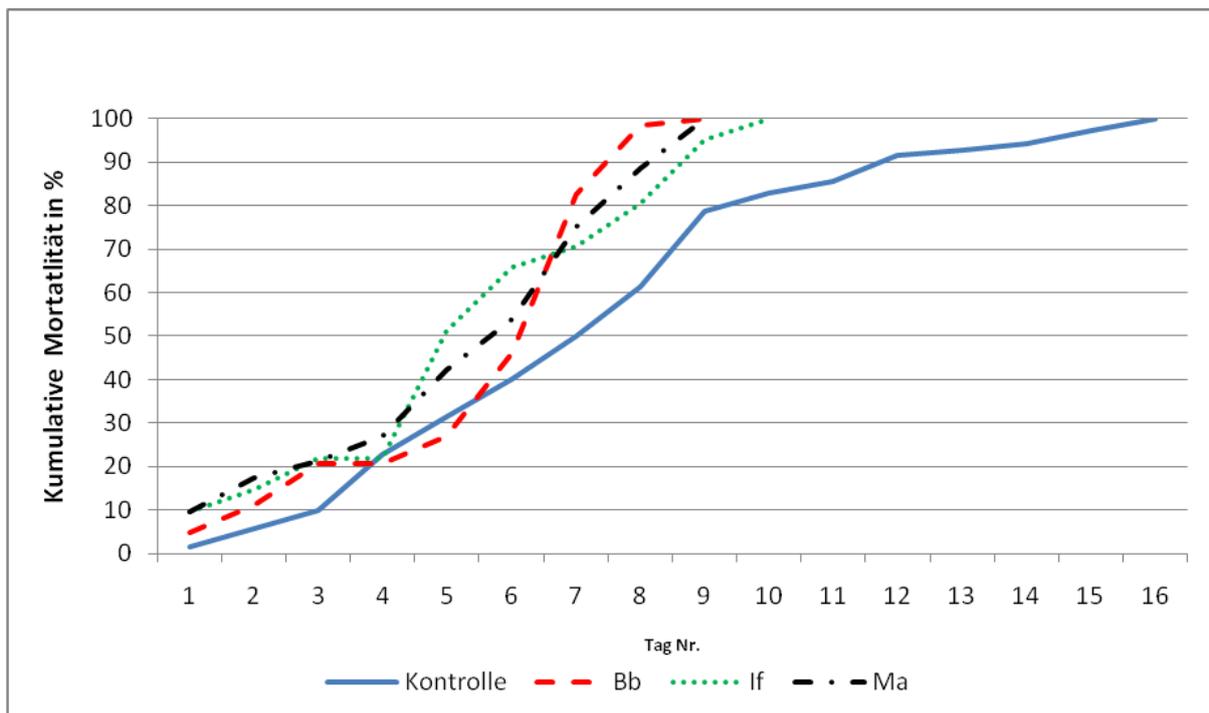


Abb. 13: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (1. Versuch)

Die mittlere Lebensdauer (MLD) der Testkäfer in den Pilzvarianten unterschied sich geringfügig und die berechneten Werte lagen nahe beieinander mit 5,89/5,68 und 5,65 Tagen. Die MLD der Kontrollkäfer war mit 7,54 Tagen signifikant länger. Insgesamt aber überlebten die Käfer in der Kontrolle im Mittel aber auch nur etwas mehr als eine Woche. Der Vergleich der MLD zwischen den drei Pilzarten und der Kontrolle ergibt für alle Pilzarten hochsignifikante Unterschiede mit $p = 0,001$ für *B. bassiana*, $p = 0,004$ für *I. fumosorosea* und $p = 0,001$ für *M. anisopliae*.

Die Infektionsraten waren mit 90% bei *B. bassiana* am höchsten, gefolgt von *M. anisopliae* mit 74,3%. Bei *I. fumosorosea* konnte mit 58,6% eine deutlich niedrige Infektionsrate beobachtet werden. Der Test der drei einzelnen Infektionsraten gegen die Rate der Kontrollgruppe (0-Wert) ergab für die drei Pilzarten jeweils einen erwarteten hochsignifikanten Unterschied mit $p = 0,000$. Alle MLD, Infektionsraten und Signifikanzen zeigt Tab. 3.

Tab. 3: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (1. Versuch)

Direkte Inokulation 3sec./ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	70	7,54				
Bb	70	5,89	63	90,00	0,001	0,000
If	70	5,68	41	58,60	0,004	0,000
Ma	70	5,65	52	74,30	0,001	0,000

Im **zweiten** direkten Inokulationsversuch wurden insgesamt 428 Individuen getestet. Auch hier trat bei 20°C bei allen drei Pilzarten und in der Kontrollvariante eine 100% Mortalität auf, bei *I. fumosorosea* nach 9 Tagen, bei *B. bassiana* und *M. anisopliae* nach 12 Tagen. Die Käfer in der Kontrolle überlebten diesmal deutlich länger und waren nach 28 Tagen zu 100% abgestorben (Abb. 14).

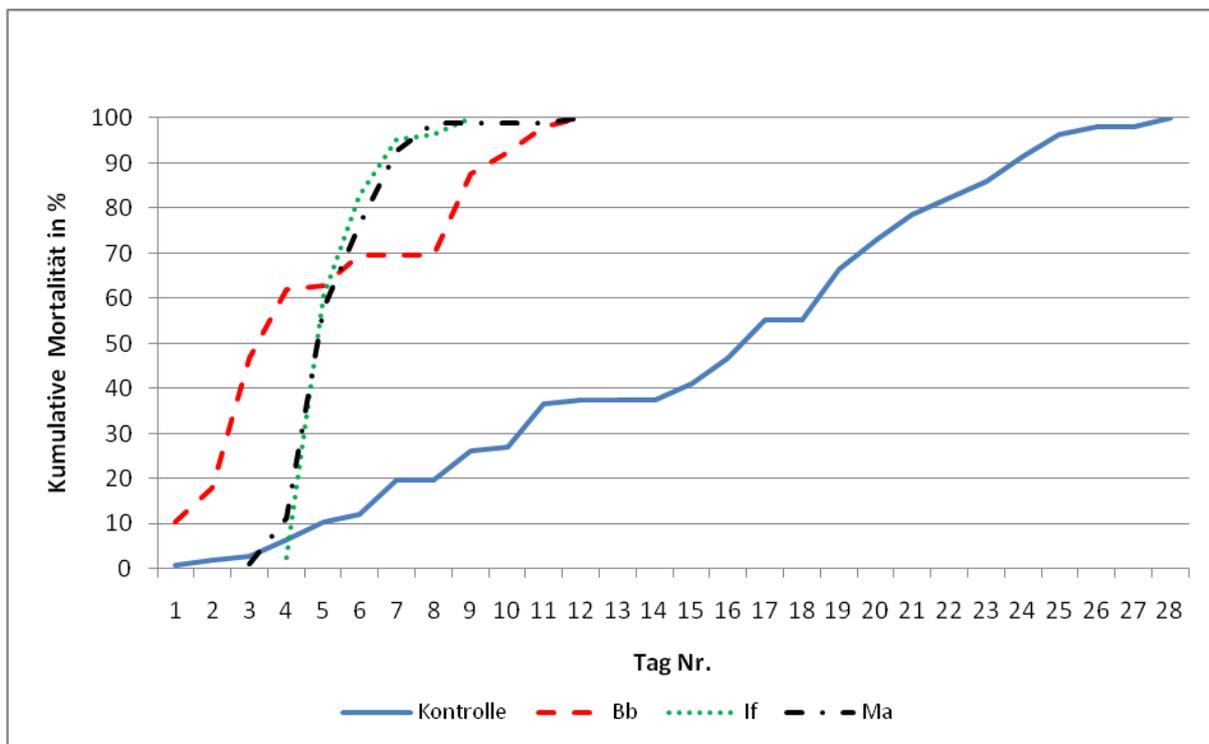


Abb. 14: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (2. Versuch)

Während bei *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* die mittlere Lebensdauer (MLD) ähnlich lange dauerte (5,63/5,65 Tage) wie jene im 1. Versuch, war die MLD bei *B. bassiana* deutlich länger (7,91 Tage). Alle drei Werte für die Pilzarten waren hochsignifikant kürzer als die MLD der Kontrolle mit 15,56 Tagen.

Mit einer Infektionsrate von 98,1% war der Infektionserfolg mit *B. bassiana* insgesamt der höchste gemessene Infektionserfolg in allen Tests. Die Infektionsraten der beiden anderen Pilze betragen für *I. fumosorosea* 75,7% und für *M. anisopliae* 90,7%. Mit der Pilzart *M. anisopliae* konnte mit über 90% ebenfalls ein besonders hoher Anteil in der

Versuchsgruppe infiziert werden. Dieser Wert ist analog zu dem für *B. bassiana* gemessenen Wert, der höchste gemessene für alle 20°C–Versuche. Die Infektionswerte aller drei Pilzarten unterscheiden sich mit $p = 0,000$ hochsignifikant zur Kontrolle (Tab. 4).

Tab. 4: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (2. Versuch)

Direkte Inokulation 3sec./ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	107	15,56				
Bb	107	7,91	105	98,10	0,000	0,000
If	107	5,63	81	75,70	0,000	0,000
Ma	107	5,65	97	90,70	0,000	0,000

Insgesamt wurden im **dritten** Inokulationsversuch 280 Käfer getestet. Bei einer Testtemperatur von 20°C konnte sowohl in der Kontrolle als auch bei den infizierten Varianten eine 100% Mortalität festgestellt werden. Am 9. Tag waren alle mit *I. fumosorosea* infizierten Käfer gestorben. Am Tag darauf waren die mit *M. anisopliae* und am 11. Tag schließlich waren die mit *B. bassiana* infizierten Individuen zu 100% verstorben. Die Käfer der Kontrolle lebten durchschnittlich 18,33 Tage und waren erst nach 34 Tagen zu 100% abgestorben (Abb. 15).

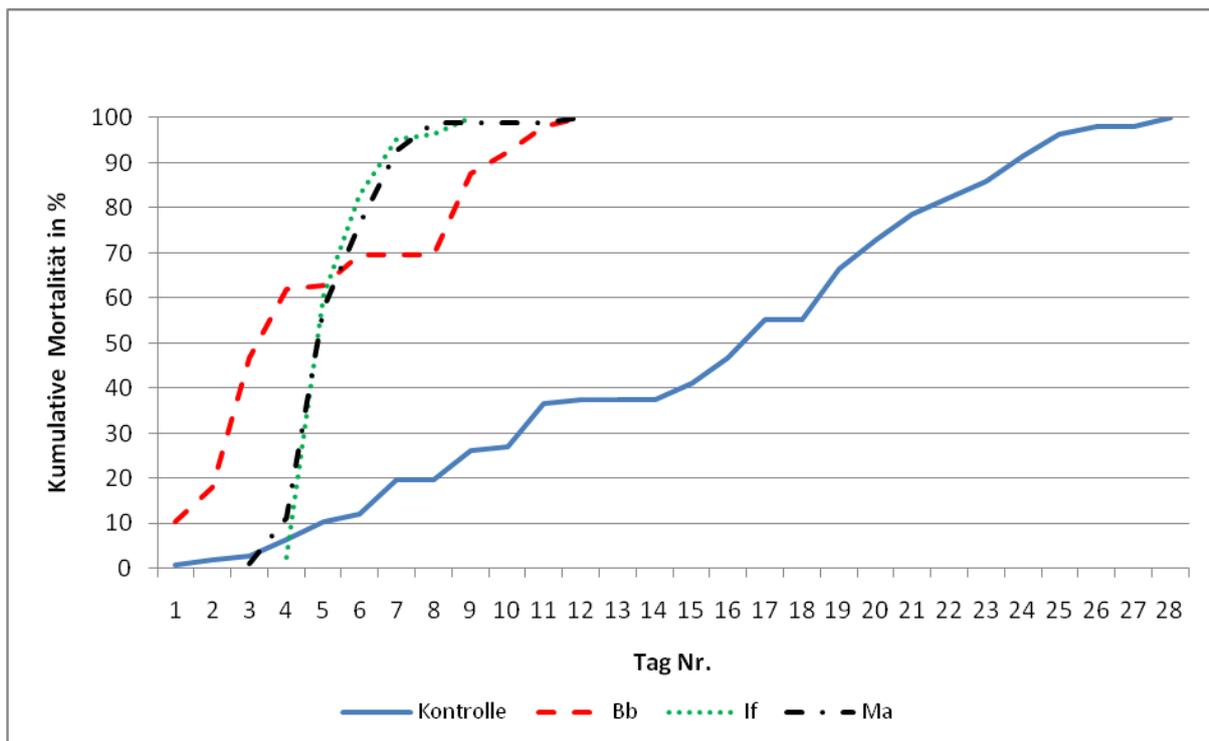


Abb. 15: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (3. Versuch)

Die MLD lag bei allen drei Pilzarten bei etwas über 5 Tagen, in allen Fällen war sie signifikant kürzer als die der Kontrollgruppe. Die kürzeste MLD mit 5,32 Tagen hatten die mit *B. bassiana* infizierten Käfer. Vergleichbar kurz waren die MLD von *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* mit jeweils 5,40 und 5,46 Tagen.

Die Infektionsraten waren auch im dritten 20°C-Versuch überdurchschnittlich hoch. Die Werte lagen mit jeweils mehr als 80% nahe beieinander. Es starben 85,7% der mit

B. bassiana inokulierten Individuen. Die Infektionsraten der mit *I. fumosorosea* und mit *M. anisopliae* infizierten Käfer lagen bei 82,9% bzw. 84,3%. Die Infektionswerte aller drei Pilzarten unterscheiden sich mit $p = 0,000$ hochsignifikant zur Kontrolle (Tab. 5).

Tab. 5: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen Sign./MLD/% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (3. Versuch)

Direkte Inokulation 3sec./ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	70	18,33				
Bb	70	5,32	60	85,70	0,000	0,000
If	70	5,40	58	82,90	0,000	0,000
Ma	70	5,46	59	84,30	0,000	0,000

Beim **vierten** direkten Inokulationsversuch trat eine 100% Mortalität bei der Kontrolle wesentlich später als bei den vorangegangenen Versuchen auf. Erst nach 42 Tagen waren alle Käfer der nicht infizierten Referenzgruppe gestorben. Verglichen mit den Werten der Kontrollgruppen (16/28/34 Tagen) der anderen direkten Inokulationsversuche (Versuche 1 bis Versuch 3) entsprach dies bei gleicher Inkubationstemperatur der längsten gemessenen Gesamtüberlebensdauer. Nach 9 Tagen waren die mit *I. fumosorosea* infizierten Käfer zu 100% gestorben. Bei *B. bassiana* war nach 12 Tagen und bei *M. anisopliae* nach erst nach 14 Tagen eine 100% Mortalität zu beobachten (Abb. 16).

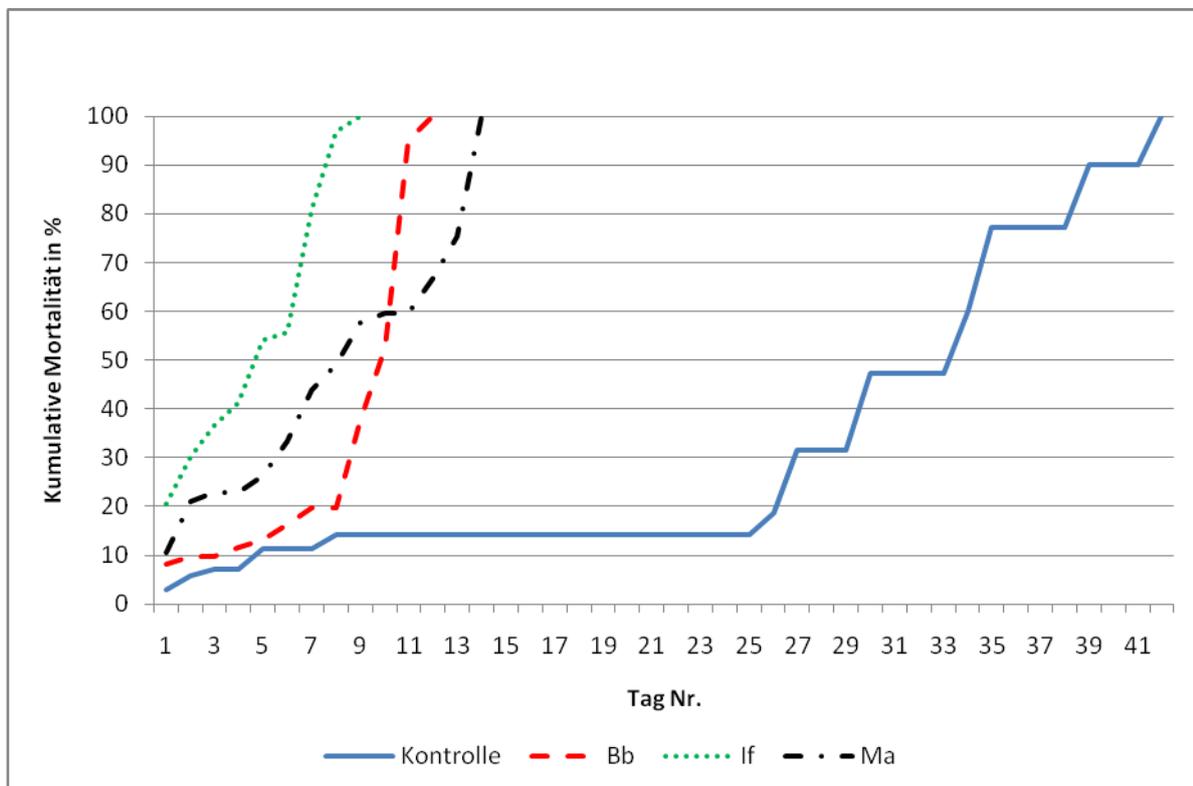


Abb. 16: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (4. Versuch)

Die MLD der infizierten Varianten unterschied sich bei diesem vierten Versuchsansatz sehr deutlich von den infizierten Varianten der vorangegangenen Versuchsansätze. Die kürzeste MLD wurde für *I. fumosorosea* mit 4,84 Tagen errechnet und liegt somit im Spektrum der vorangegangenen Versuche, bei den beiden anderen Pilzarten *B. bassiana* und *M. anisopliae* trat eine etwa doppelt so lange MLD der Käfer auf. Die mit *B. bassiana* und *M. anisopliae*

infizierten Testkäfer überlebten im Durchschnitt 9,07 bzw. 8,51 Tage. Alle 3 Pilzarten waren bezüglich der MLD wiederum hochsignifikant kürzer im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer Signifikanz von jeweils $p = 0,000$.

Die höchste Infektionsrate konnte für *I. fumosorosea* mit 90% ermittelt werden. Die beiden Pilzarten *B. bassiana* und *M. anisopliae* hatten mit 87,1% bzw. 81,4% vergleichbar hohe Infektionsraten. Die Infektionsraten aller drei Pilzarten waren hochsignifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit $p = 0,000$ (Tab. 6).

Tab. 6: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (Bb = *B. bassiana*, If = *I. fumosorosea*, Ma = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (4. Versuch)

Direkte Inokulation 3sec./ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./ % inf.
Kontrolle	70	29,46				
Bb	70	9,07	61	87,10	0,000	0,000
If	70	4,84	63	90,00	0,000	0,000
Ma	70	8,51	57	81,40	0,000	0,000

Da für die 20°C-Variante vier Versuche für dieselbe Temperaturstufe erfolgreich getestet werden konnten, sollen zur besseren Übersicht die Ergebnisse in Tab. 7 zusammengefasst werden. Es zeigt sich eine vergleichsweise homogene Ergebnisverteilung. Zumindest für die ersten drei Versuche konnten vergleichbare Ergebnisse erbracht werden, ohne dass starke Ausreisserwerte zu verzeichnen waren. Festzustellen ist, dass die Infektion mit der Pilzart *I. fumosorosea* zwei Mal die kürzeste vergleichbare MLD mit 4,84 (4. Versuch) und 5,4 Tagen (3. Versuch) bewirkte. Im dritten Versuch war je einmal die MLD von *M. anisopliae* (5,46 Tage) und von *B. bassiana* (5,32 Tage) geringer als in den vergleichbaren Versuchen. Die MLD der Kontrollgruppe nahm von Versuch 1 bis Versuch 4 stetig zu. Mit 29,46 Tagen war sie im 4. Versuch am längsten und mit nur 7,54 Tagen beim 1. Versuch am kürzesten. Während die MLD bei *B. bassiana* zwischen den vier Versuchen sehr variabel war (5,32 bis 9,07 Tage), erwies sich die MLD bei *I. fumosorosea* als relativ ähnlich mit einer geringeren Schwankungsbreite und einem ermittelten Minimalwert von 4,84 Tagen und einem Maximalwert von 5,68 Tagen. Auch bei *M. anisopliae* war diese Schwankungsbreite geringer als bei *B. bassiana* und die Werte lagen bei den ersten drei Versuchen mit zweimal 5,65 und einmal 5,46 Tagen nah beieinander nur im vierten Versuch konnte mit 8,51 Tagen eine deutlich längere MLD festgestellt werden.

Die Infektionsraten waren mit 90% bzw. 98,1% in den Versuchen 1 und 2 die höchsten bei *B. bassiana* und lagen insgesamt bei dieser Pilzart auf einem hohen Niveau (min. 87,1% und max. 98,1%). Bei *I. fumosorosea* konnten mit 58,6% bzw. 75,7% die niedrigsten Infektionsraten ermittelt werden, zudem war die Schwankungsbreite mit Werten von min. 58,6% bis max. 90% sehr hoch. Die Infektionsraten bei *M. anisopliae* schwankten auf hohem Niveau (min. 74,3% bis max. 90,7%), fielen aber weniger tief im Vergleich zu *I. fumosorosea*. Im 4. Versuch erzielte *M. anisopliae* mit 90% sogar die höchste Infektionsrate des Versuchs (Tab. 7)

3 Ergebnisse

Tab. 7: Gesamtergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (1.-4. Versuch)

	1. Versuch		2. Versuch		3. Versuch		4. Versuch	
	MLD	% inf.						
Bb	5,89	90,00	7,91	98,10	5,32	85,70	9,07	87,10
If	5,68	58,60	5,63	75,70	5,40	82,90	4,84	90,00
Ma	5,65	74,30	5,65	90,70	5,46	84,30	8,51	81,40
Kontrolle	7,54	-	15,56	-	18,33	-	29,46	-

Mit dem **fünften** direkten Inokulationsversuch konnten bei gleichbleibender Inokulationsdauer, aber um 5°C reduzierter Inkubationstemperatur (15°C), insgesamt 200 Käfer getestet werden. Nach 26 Tagen konnte eine 100% Mortalität in der Kontrolle festgestellt werden. Alle mit *B. bassiana* infizierten Individuen waren nach 10 Tagen zu 100% gestorben. Bei *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* wurde eine 100% Mortalität nach 14 bzw. 17 Tagen beobachtet (Abb. 17).

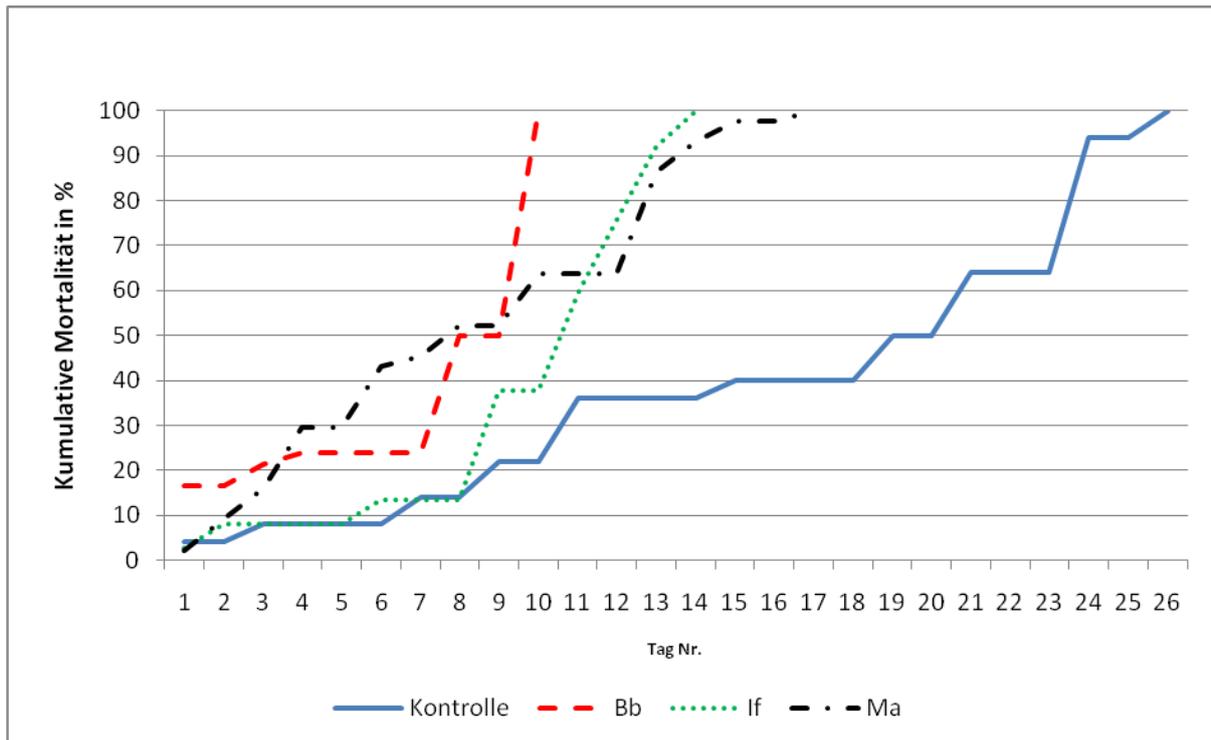


Abb. 17: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (5. Versuch)

Die MLD betrug in der Kontrolle 17,04 Tage. Die kürzeste MLD bei den infizierten Käfern betrug bei *B. bassiana* 7,5 Tage, während die mit den Pilzarten *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* infizierten *I. typographus* durchschnittlich 8,55 Tage bzw. 10,22 Tage lebten. Die MLD der infizierten Individuen war kürzer als die MLD der Kontrolle und mit $p = 0,000$ liegt wiederum ein hochsignifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

Die Infektionsraten waren mit 88% bei *M. anisopliae* am höchsten, während die von *B. bassiana* 84% und *I. fumosorosea* 74% erreichten. Im Vergleich zur Kontrolle ergibt sich für die drei Pilzarten jeweils eine Signifikanz von $p = 0,000$ (Tab. 8).

Tab. 8: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (5. Versuch)

Direkte Inokulation 3sec./ Testtemperatur 15°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	50	17,04				
Bb	50	7,50	42	84,00	0,000	0,000
If	50	10,22	37	74,00	0,000	0,000
Ma	50	8,55	44	88,00	0,000	0,000

Beim **sechsten** direkten Inokulationsversuch und Inkubation bei einer Testtemperatur von 25°C konnten nochmals 200 Käfer getestet werden. Bei dieser höchsten getesteten Temperaturstufe ließen sich bei allen drei Pilzarten kürzere Werte im Vergleich zu den anderen direkten Versuchen (15°C/20°C) bis zu einer 100% Mortalität ermitteln. Die kürzeste Mortalitätsdauer ließ sich für *M. anisopliae* mit 5 Tagen, für *B. bassiana* etwas länger mit 7 Tagen und bei *I. fumosorosea* am längsten mit 9 Tagen beobachten. In der Kontrollgruppe waren nach 23 Tagen 100% der Käfer gestorben (Abb. 18).

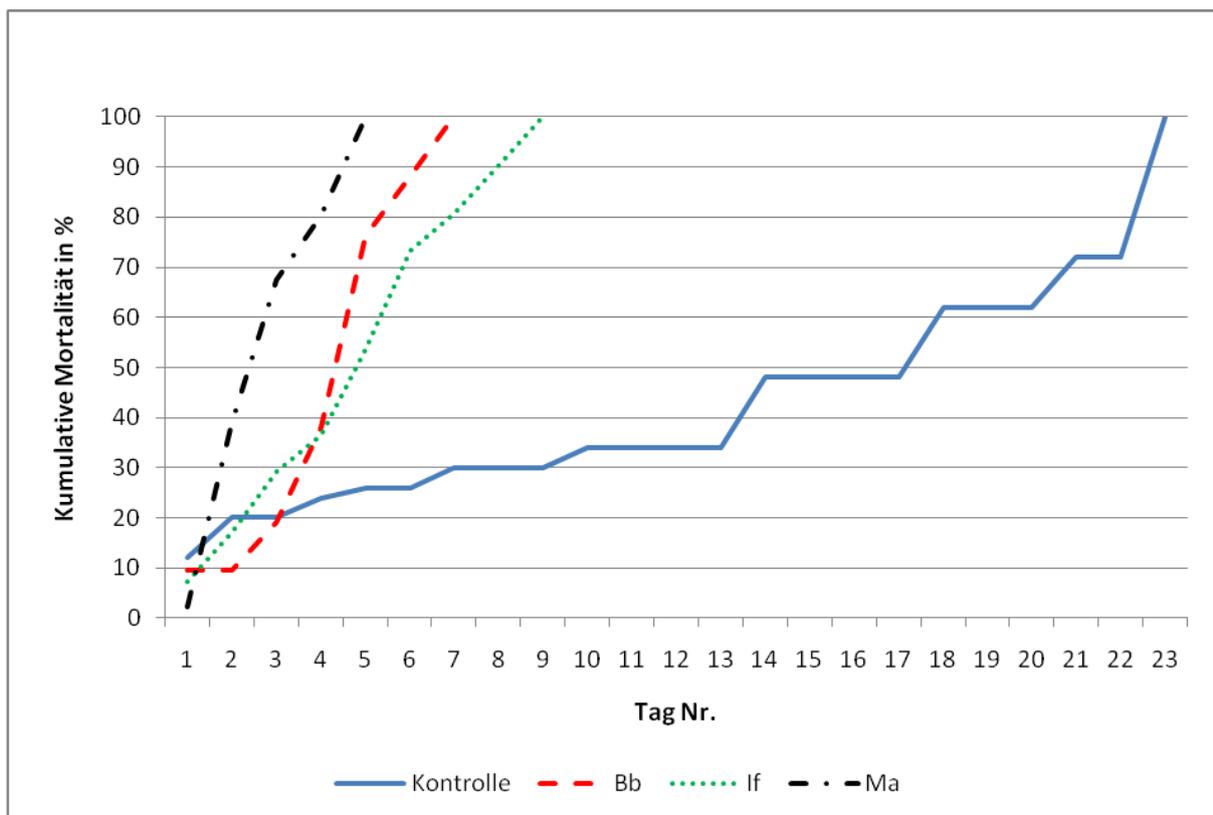


Abb. 18: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (6. Versuch)

Bei der Testtemperatur von 25°C verringerten sich äquivalent zur Gesamtüberlebensdauer die MLD deutlich. Die kürzeste MLD hatten die mit *M. anisopliae* infizierten Individuen mit 3,11 Tagen, dies entspricht der kürzesten für *M. anisopliae* ermittelten MLD. Vergleichbar hierzu waren auch die MLD von *B. bassiana* und *I. fumosorosea* mit 4,6 bzw. 5,12 Tagen sehr kurz. Für *B. bassiana* wurde die kürzeste MLD im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen

ermittelt. Alle 3 Pilze wirkten hochsignifikant lebensverkürzend (jeweils mit einer Signifikanz von $p = 0,000$) im Vergleich zur Kontrolle, bei der die MLD 14,24 Tage betrug.

Die Infektionsrate von 92% war bei *M. anisopliae* hoch bzw. die höchste aller direkten Infektionsversuche, während die von *B. bassiana* und *I. fumosorosea* bei vergleichbaren 84% bzw. 82% lag. Hochsignifikant waren die Unterschiede zwischen der Kontrolle und den jeweiligen Pilzraten; die berechnete Signifikanz betrug für alle Pilzarten $p = 0,000$ (Tab. 9).

Tab. 9: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (6. Versuch)

Direkte Inokulation 3sec./ Testtemperatur 25°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./ % inf.
Kontrolle	50	14,24				
Bb	50	4,60	42	84,00	0,000	0,000
If	50	5,12	41	82,00	0,000	0,000
Ma	50	3,11	46	92,00	0,000	0,000

Nachfolgend werden die Vergleiche aus den Signifikanztests zwischen den Pilzarten untereinander für die direkten Versuche als Ergebnisse in Tab. 10, 11 dargestellt. Um auf einen Blick das Leistungspotential der getesteten Pilzarten untereinander vergleichen zu können, wurde jede Pilzart mit jeder anderen auf Signifikanz getestet. Die Kombinationsmöglichkeiten lauteten dabei *B. bassiana* zu *I. fumosorosea* (B-I), *B. bassiana* zu *M. anisopliae* (B-M) und *I. fumosorosea* zu *M. anisopliae* (I-M). Die grau hinterlegten Felder sind Selbstkombinationen und schließen sich aus. Für alle Kombinationsmöglichkeiten wurden die Signifikanzen sowohl für die Länge der MLD als auch für die Höhe der Infektionsrate (% inf.) berechnet (vgl. Tab. 10, 11).

Wenn ein signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte, steht die jeweilige Pilzart zu deren Gunsten der Signifikanzwert ausfällt mit einem Kürzel ihres Anfangsbuchstaben (B, M, I) z.B. M für *M. anisopliae* hinter dem Zahlenwert in Klammern. Als Ergebnis lässt sich nun ein Ranking erstellen, mit wie vielen „Treffern“ welche Pilzart signifikant das beste Ergebnis bzgl. der beiden zu berechnenden Faktoren (MLD/% inf.) im Vergleich zu einer der beiden anderen Pilzarten erbracht hat.

Vergleicht man die berechneten Signifikanzen der ersten vier direkten Inokulationsversuche bei 20°C Testtemperatur so lässt sich feststellen, dass die Pilzart *I. fumosorosea* zweimal die signifikant kürzere MLD mit $p = 0,000$ hatte, im direkten Vergleich mit der Pilzart *B. bassiana*. Einmal führte die Infektion mit *I. fumosorosea* auch zu einer hochsignifikant kürzeren MLD verglichen zu den mit *M. anisopliae* infizierten Individuen des gleichen Versuchs. Der direkte Vergleich *B. bassiana* zu *M. anisopliae* ergibt einmal einen hochsignifikanten Unterschied für *M. anisopliae*. Bei 20°C Testtemperatur und direkter Inokulation liegt also die Pilzart *I. fumosorosea* mit den erzielten kürzeren MLD insgesamt vor den beiden anderen Pilzarten.

Bei der auf 15°C reduzierten Versuchstemperatur hingegen wurde einmal mit $p = 0,0005$ für *B. bassiana* ein hochsignifikanter Wert im direkten Vergleich *I. fumosorosea* und *B. bassiana* erzielt. Mit $p = 0,0592$ konnte ein kürzerer Wert knapp an der Signifikanzgrenze zu Gunsten von *M. anisopliae* im Vergleich zu *I. fumosorosea* ermittelt werden.

Bei 25°C wurden die kürzesten MLD zweimal für *M. anisopliae* im Unterschied zu *B. bassiana* und *I. fumosorosea* hochsignifikant mit $p = 0,000$ ermittelt. Insgesamt lässt sich feststellen, dass mind. einmal bei jeder Temperaturstufe für die Pilzart *M. anisopliae* eine kürzere MLD im Vergleich zu den beiden anderen zu testenden Pilzarten erzielt wurde. Bei 20°C fällt das Ranking deutlich zu Gunsten von *I. fumosorosea* vor den beiden anderen Pilzarten aus (Tab. 10).

3 Ergebnisse

Tab. 10: Ergebnisse für die Signifikanzen der Mittleren Lebensdauer (MLD) der einzelnen Pilzarten untereinander (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec) für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C

	If 15°	If 20°-1	If 20°-2	If 20°-3	If 20°-4	If 25°	Ma 15°	Ma 20°-1	Ma 20°-2	Ma 20°-3	Ma 20°-4	Ma 25°
Bb 15°	0,0005 (B)						0,2300					
Bb 20°-1		0,6650						0,5799				
Bb 20°-2			0,0000 (I)						0,0000 (M)			
Bb 20°-3				0,8508						0,8069		
Bb 20°-4					0,0000 (I)						0,4529	
Bb 25°						0,2480						0,0000 (M)
If 15°							0,0592 (M)					
If 20°-1								0,9552				
If 20°-2									0,9083			
If 20°-3										0,9031		
If 20°-4											0,0000 (I)	
If 25°												0,0000 (M)

Die Verteilung der Signifikanzwerte änderte sich maßgeblich bei der Ermittlung der Treffer für die Infektionsraten (% inf.) im Vergleich zwischen den Pilzarten. Die Pilzart *I. fumosorosea* hat in keinem Fall mehr die Bestplatzierung im Ranking. Es konnte hingegen vier Mal mit der Pilzart *B. bassiana* eine signifikant höhere Infektionsrate im Vergleich zu den anderen beiden Pilzarten ermittelt werden. So war die Infektionsrate von mit *B. bassiana* infizierten Käfern zweimal mit $p = 0,000$ gegenüber *I. fumosorosea* signifikant höher. Auch der Vergleich mit *B. bassiana* gegenüber *M. anisopliae* erbrachte jeweils zweimal mit $p = 0,0144$ und $p = 0,018$ hochsignifikant höhere Infektionsraten für die Pilzart *B. bassiana*. Für die Infektionsraten lässt sich somit *B. bassiana* als die erfolgreichste Pilzart für die 20°C Versuche ermitteln.

Bei den anderen beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C hingegen konnten zwischen den Pilzarten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (Tab. 11).

Tab. 11: Ergebnisse für die Signifikanzen der Infektionsraten (% inf.) der einzelnen Pilzarten untereinander (Bb = *B. bassiana*, If = *I. fumosorosea*, Ma = *M. anisopliae*) nach direkter Inokulation (3sec) für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C

	If 15°	If 20°-1	If 20°-2	If 20°-3	If 20°-4	If 25°	Ma 15°	Ma 20°-1	Ma 20°-2	Ma 20°-3	Ma 20°-4	Ma 25°
Bb 15°	0,2191						0,5650					
Bb 20°-1		,0000 (B)						0,0144 (B)				
Bb 20°-2			,0000 (B)						0,018 (B)			
Bb 20°-3				0,6493						0,8169		
Bb 20°-4					0,5905						0,3547	
Bb 25°						0,7906						0,2178
If 15°							0,0728					
If 20°-1								0,0480 (M)				
If 20°-2									0,0031 (M)			
If 20°-3										0,8233		
If 20°-4											0,1453	
If 25°												0,1359

Abschließend zu den direkten Inokulationsversuchen werden anhand von ausgewählten Beispielen vergleichend die Mittlere Lebensdauer und der Infektionserfolg für die drei Testtemperaturen (15°C/20°C/25°C) einander gegenübergestellt (Abb. 19). Damit soll der mögliche Zusammenhang zwischen Temperatur, MLD und Infektionsrate gezeigt werden. Hierfür wurde der erste Versuch aus den 20°C Wiederholungsversuchen aufgrund der vergleichbaren Anzahl der Individuen (70/50) und des Fehlens von Extremwerten exemplarisch ausgewählt. In den drei anderen 20°C-Versuchen wurden zudem jeweils erheblich längere MLD in den Kontrollen erfasst (vgl. Tab. 7).

Vergleicht man die mittlere Lebensdauer zwischen drei ausgewählten Versuchen aus der Versuchsreihe bei den getesteten Temperaturstufen 15°C/20°C/25°C so lässt sich mit ansteigender Temperatur kontinuierlich eine Verkürzung der MLD bei allen drei Pilzarten feststellen. Bei der Kontrollgruppe hingegen sinkt die MLD zunächst bei einer Temperaturerhöhung von 15°C auf 20°C von 17,04 auf 7,54 Tage, um bei einer nochmaligen Temperaturerhöhung auf 25°C nochmals auf 14,54 Tage anzusteigen (Abb. 19).

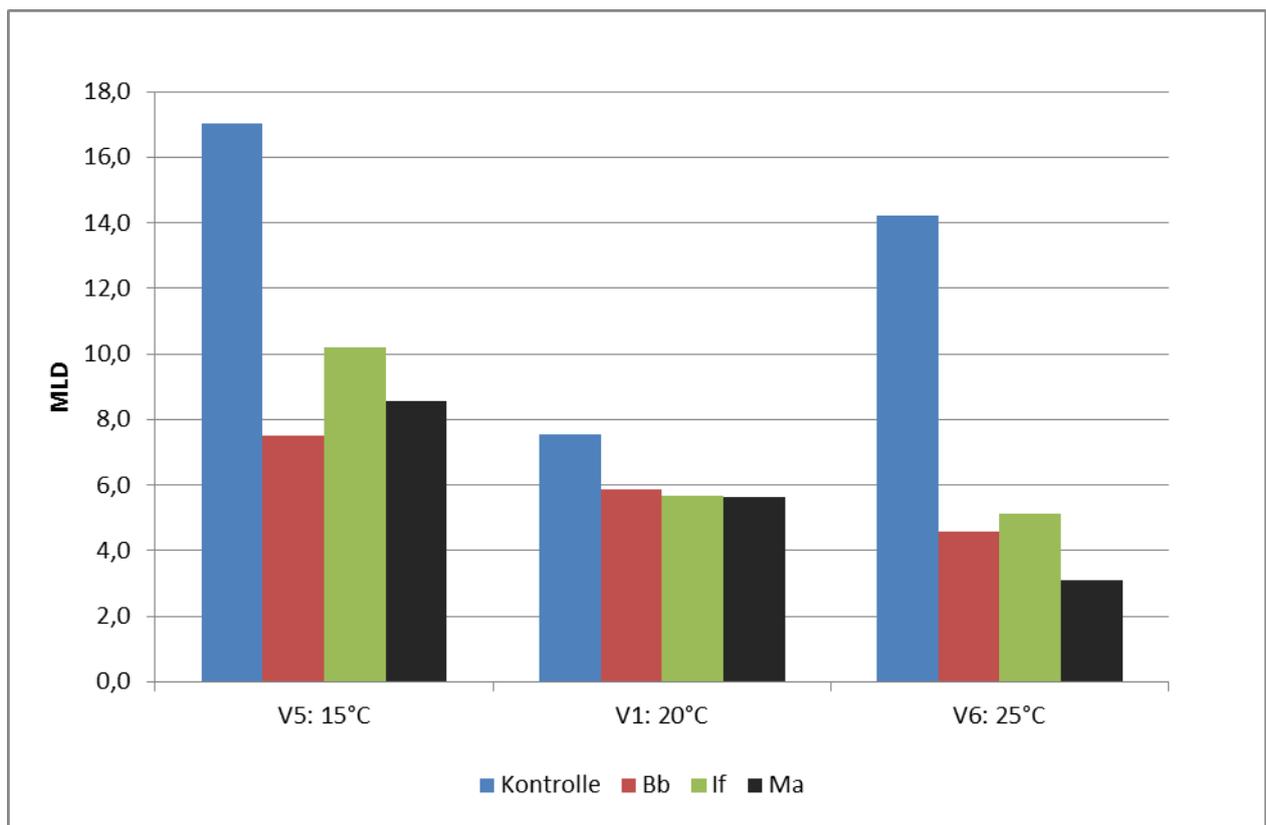


Abb. 19: Übersicht zu den MLD der drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach den direkten Inokulationen (3sec.) und MLD der unbehandelten Kontrollen bei den drei verschiedenen Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C (V5, V1 u. V6 = Versuch 5, 1 und 6)

Es zeigen sich für alle 3 Testtemperaturen hochsignifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle mit $p = 0,000$. Diese sind auf die Differenzen zwischen den MLD vor allem bei 15°C und 25°C zurückzuführen. Vergleicht man den ausgewählten 20°C-Versuch mit dem 25°C- Versuch, so zeigen sich geringere Unterschiede bei der Pilzart *I. fumosorosea* mit 5,68 gegenüber 5,12 Tagen. Bei den anderen beiden Pilzarten sind diese Unterschiede größer. So lässt sich besonders bei *M. anisopliae* ein deutlicher Unterschied erkennen, die MLD geht von 5,65 auf 3,11 Tage zurück, während der Wert bei *B. bassiana* von 5,89 auf 4,60 Tage sinkt (Tab. 12).

Tab. 12: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD) und Signifikanzen (Sign./MLD) der drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzwerte für die unbehandelten Kontrollen bei den drei Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C (V5, V1 und V6 = Versuch 5, 1 und 6)

Gruppe	MLD Temp. 15°C	MLD Temp. 20°C	MLD Temp. 25°C	Sign./MLD
Kontrolle	17,04	7,54	14,24	
Bb	7,50	5,89	4,60	0,000
If	10,22	5,68	5,12	0,000
Ma	8,55	5,65	3,11	0,000

Vergleicht man analog für die ausgewählten Versuche (V5,1,6) die Infektionsraten (% inf.) in Abhängigkeit von der gewählten Inkubationstemperatur 15°C/20°C/25°C, so zeigt Abb. 13 dass sich die Infektionsrate mit ansteigender Temperatur von 20°C auf 25°C zumindest bei den zwei Pilzarten *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* leicht erhöht. Vor allem die 20°C-Variante unterscheidet sich von der 25°C-Variante. Durchschnittlich liegt die Infektionsrate bei allen Pilzarten und allen Temperaturstufen über 50%. Die Pilzart *M. anisopliae* (> 80%) zeigt bei der 15°C und 25°C Temperaturstufe die höchsten Infektionsprozente, gefolgt von *B. bassiana* und *I. fumosorosea* (Abb. 20).

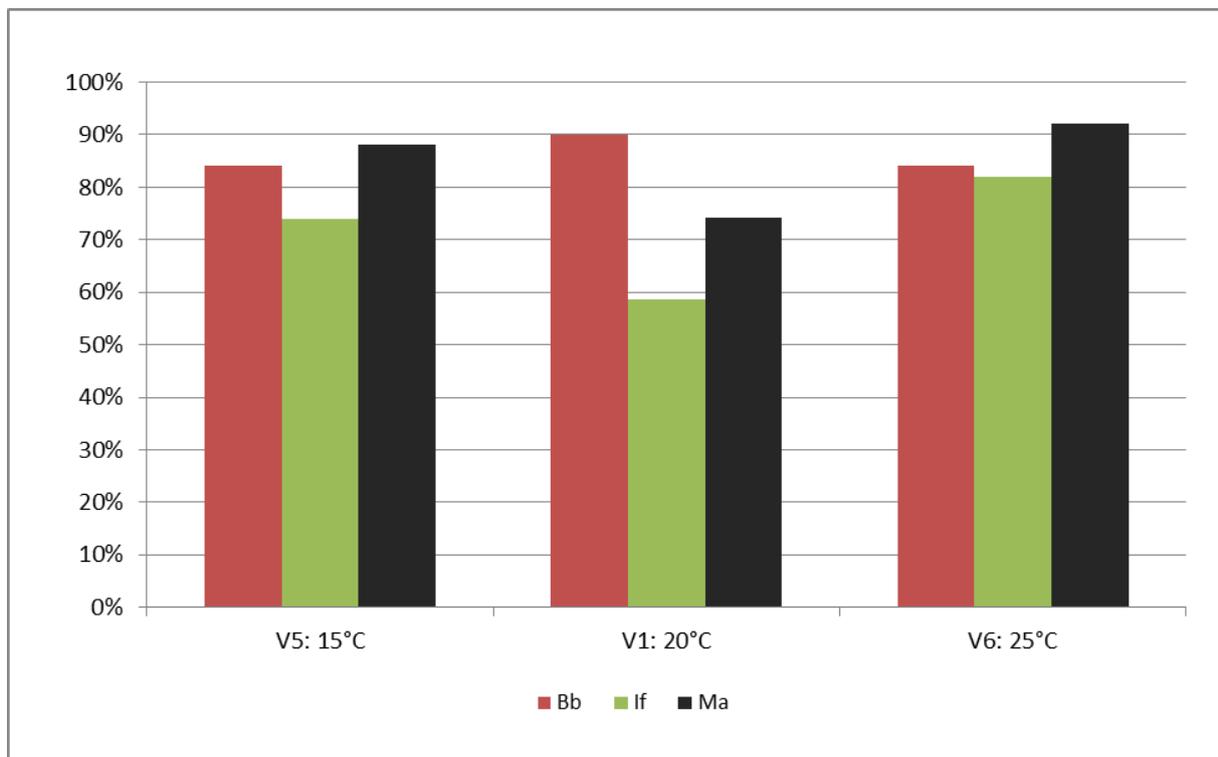


Abb. 20: Übersicht zu den Infektionsraten (% inf.) der drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) bei *I. typographus* nach den direkten Inokulation (3sec.) bei den drei verschiedenen Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C (V5, V1 und V6 = Versuch 6)

Sowohl der Vergleich der Infektionsraten bei der Pilzart *I. fumosorosea* als auch bei *M. anisopliae* zeigt mit $p = 0,017$ bzw. $p = 0,021$ signifikante Unterschiede bei den untersuchten Testtemperaturen. Besonders zwischen der 15°C- Temperaturstufe und der 25°C- Temperaturstufe bestehen große Unterschiede. Mit *M. anisopliae* konnten bei jeder Temperaturstufe in diesem Vergleich höhere Infektionsraten hervorgerufen werden. Bei der Pilzart *B. bassiana* steigt die Infektionsrate auf hohem Niveau zunächst mit steigender

3 Ergebnisse

Temperatur, fällt dann aber bei 25°C wieder exakt auf den 15°C-Wert ab. Gemittelt über die drei Temperaturstufen gibt es mit $p = 0,531$ keinen signifikanten Unterschied zwischen 15°C/20°C/25°C/ und den Infektionsraten bei *B. bassiana* (Tab. 13).

Tab. 13: Ergebnisse für die Infektionsraten (% inf.) und Signifikanzen (Sign./% inf.) bei *I. typographus* nach direkter Inokulation (3 sec.) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) bei den drei Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C

Gruppe	% inf. Temp. 15°C	% inf. Temp. 20°C	% inf. Temp. 25°C	Sign./% inf.
Kontrolle	0,00	0,00	0,00	
Bb	84,00	90,00	84,00	0,531
If	74,00	58,60	82,00	0,017
Ma	88,00	74,30	92,00	0,021

3.2 Indirekte Inokulationen

Mit den indirekten Inokulationen konnten insgesamt 1200 Käfer getestet werden. Die Versuchskäfer waren sofort nach dem Aufsetzen sehr aktiv. Aufgrund der erhöhten Aktivitätsbereitschaft der Käfer und ihres großen Mobilitätsdrangs nach Aufsetzen auf den Stammstücken konnten deshalb pro Versuch durchschnittlich weniger Käfer getestet werden als bei den direkten Inokulationsversuchen. Da sich die Testkäfer auf der Untersuchungsborke innerhalb des unterteilten Untersuchungsfeldes frei bewegen konnten, musste im Vorfeld davon ausgegangen werden, dass es immer auch Areale geben würde auf denen weniger Sporen vorhanden waren. Teilweise flogen die Käfer aktiv von den Untersuchungsstellen weg und zeigten ein aktives Meideverhalten der feuchten Stellen bei den Sofort-Versuchen. Im Vergleich zur gleichmäßigen direkten Inokulation via Schwenken der Käfer in der Sporensuspension im Erlenmeierkolben, muss daher als Vorannahme von einer vergleichsweise reduzierten Sporeninokulation ausgegangen werden. Deshalb wurden bei den Tests zur Wirkung einer indirekten Inokulation (via Sporensuspension behandelte Rinde) und zeitlich limitiertem Aufenthalt (1:30min/3:00min/5:00min) sofort nach dem Auftragen (und Antrocknen der Suspension) niedrigere Infektionsraten im Vergleich zum Wiederholungsversuch nach einer Woche angenommen.

Diese Annahme galt jedoch nicht für die MLD. Hier wurden zunächst ähnliche Zeitintervalle bis zum Eintreten des Todes wie bei den direkten Versuchen unterstellt. Auch bei indirekter Inokulation der Käfer (autoklaviertes Wasser und 1 Tropfen Tween 80) wurde keine Infektion mit den Testpilzen festgestellt. Es wurde in den Kontrollen eine 100% Mortalität registriert.

Die ersten 200 Käfer der indirekten Inokulationsversuchsreihe wurden bei sofortigem Aufsetzen nach der Oberflächenbehandlung der Borkenabschnitte getestet. Das Zeitintervall betrug 1:30min Aufenthalt auf dem inokulierten Stammabschnitt mit anschließender Inkubation bei 20°C Testtemperatur. Mit 47 Tagen Lebensdauer der Referenz-Kontrollgruppe war die gesamte Laufzeit des Versuchs verglichen zur gesamten Lebensdauer der Testkäfer bei den direkten Inokulationsversuchen und gleicher Testtemperatur deutlich länger (vgl. Tab. 3 bis 6). Durchschnittlich länger im Vergleich zur direkten Inokulation war auch der Zeitraum, bis die mit den Zielpilzarten infizierten Käfer gesamt verstorben waren. Die Gesamtmortalitätsdauer betrug 19 Tage bei *B. bassiana*, 12 Tage bei *I. fumosorosea* und 11 Tage bei *M. anisopliae* (Abb. 21).

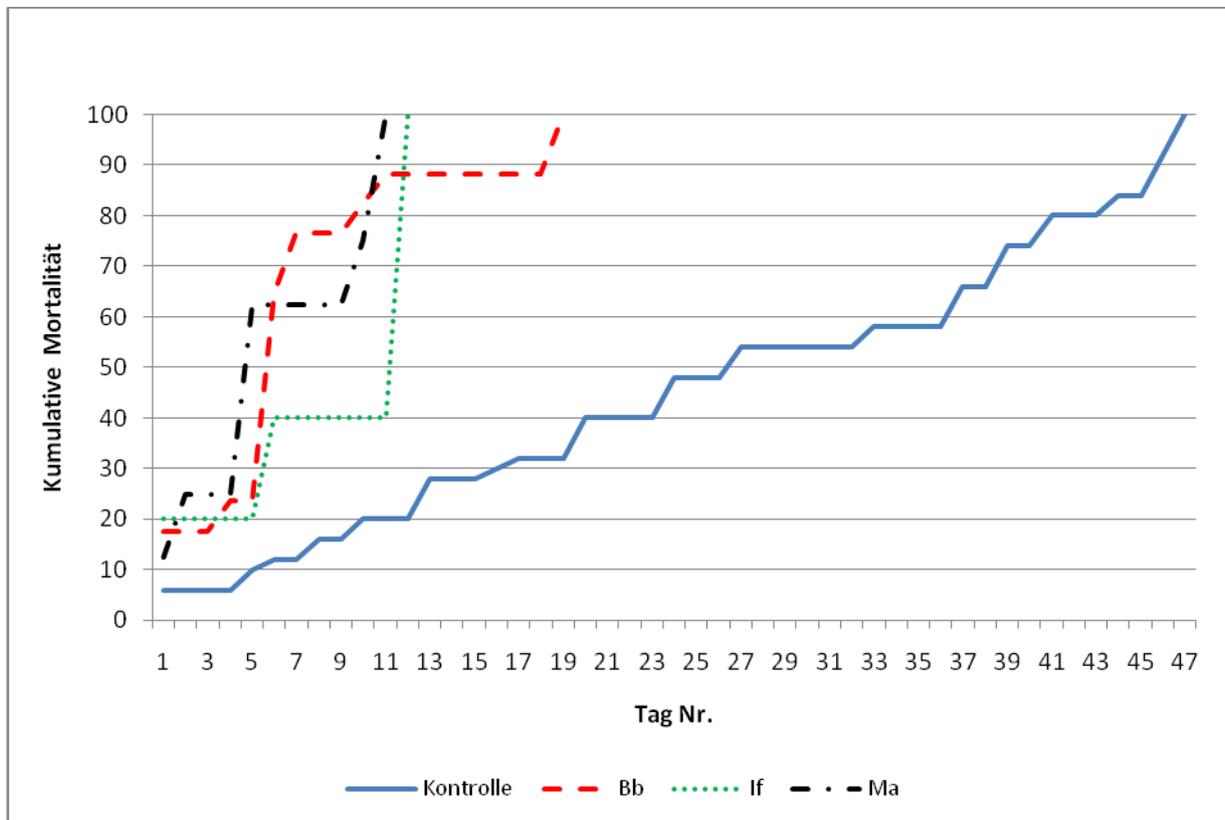


Abb. 21: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (1:30min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7a)

Die MLD der Kontrolle betrug 27 Tage. Die kürzeste MLD hatten die Individuen mit einer *M. anisopliae*-Infektion mit 6,25 Tagen, während die mit *B. bassiana* und *I. fumosorosea* infizierten Individuen im Durchschnitt 7,18 bzw. 8,60 Tage lebten. Alle drei Pilzarten bewirkten eine signifikante Verkürzung der Lebensdauer im Vergleich zur Kontrolle. Die Signifikanz betrug bei *B. bassiana* und *M. anisopliae* $p = 0,000$ im Unterschied zur MLD der Kontrollgruppe und bei *I. fumosorosea* $p = 0,010$.

Die Infektionsraten waren erheblich geringer als bei den direkten Inokulationsversuchen (vgl. Tab. 3 bis 6). Die geringste Infektionsrate in diesem Versuch wurde mit nur 10% bei der Pilzart *I. fumosorosea* erzielt. Deutlich höher war der Infektionserfolg bei *M. anisopliae* mit 16% gefolgt von *B. bassiana* mit 34%. Im Vergleich zur Kontrolle sind die berechneten Signifikanzen hochsignifikant unterschiedlich mit $p = 0,000$ für *B. bassiana*, $p = 0,022$ für *I. fumosorosea* und mit $p = 0,003$ für *M. anisopliae* (Tab. 14).

Tab. 14: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/ % inf.) bei *I. typographus* nach indirekter Inokulation (1:30min sofort) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7a)

Indirekte Inokulation 1:30min sofort/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	7,18	17	34,00	0,000	0,000
If	50	8,60	5	10,00	0,010	0,022
Ma	50	6,25	8	16,00	0,000	0,003

Eine Woche nach Inokulation wurden auf dem gleichen Stammstück wiederum 200 Käfer getestet. Dabei wurden die Käfer auf den bereits behandelten Stammpartien 1:30min angesetzt. In der *M. anisopliae*-Variante wurde die schnellste Gesamtmortalität bereits am 7. Tag erreicht, bei der *B. bassiana*-Variante am 11. Tag und bei *I. fumosorosea* am 12. Tag. Das Eintreten der Mortalität erfolgte bei *M. anisopliae* (innerhalb jeweils eines Tages) und bei *I. fumosorosea* (innerhalb von zwei Tagen) auffällig spontan. Durch Verwendung der gleichen Kontrolle wie im vorangegangenen Versuch, blieb der Referenzwert bei 47 Tagen bis die 100% Mortalität erreicht wurde. Äquivalent ist daher auch die MLD der Kontrolle mit 27 Tagen (Abb. 22).

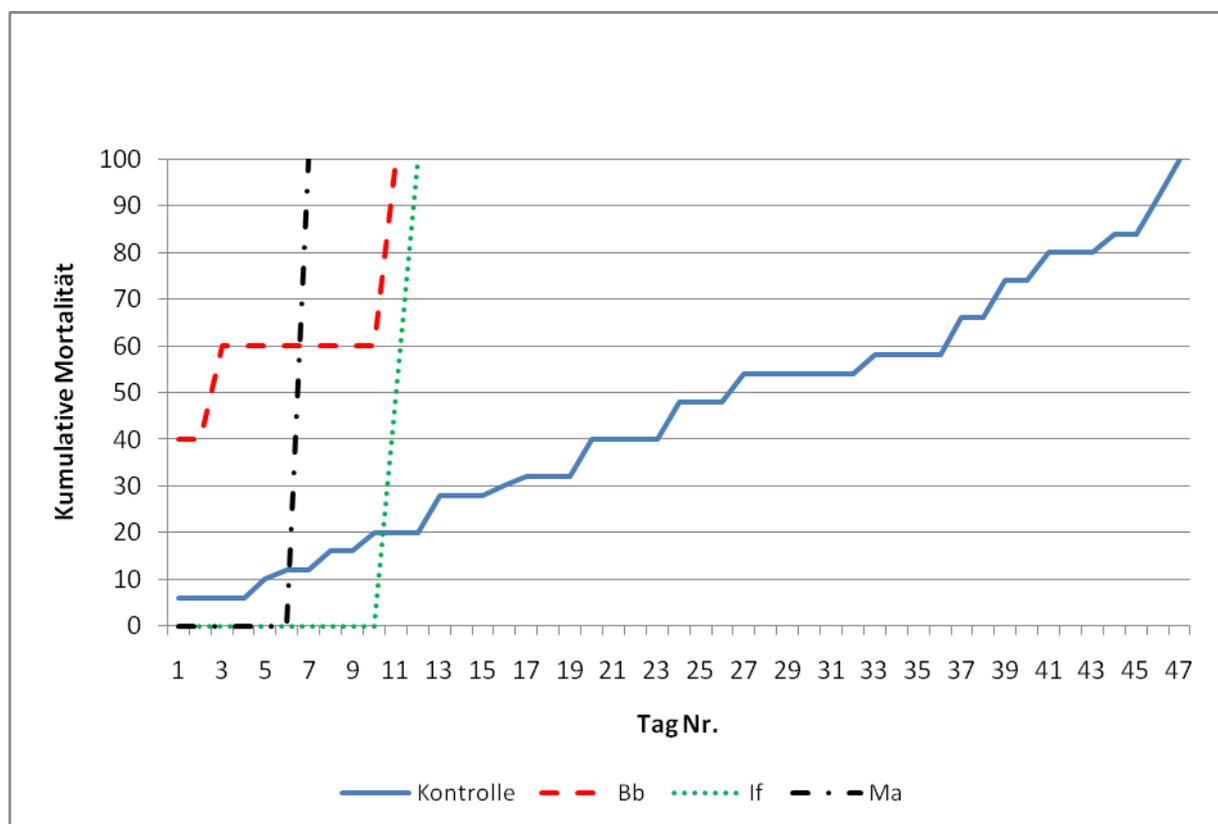


Abb. 22: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (1:30min) und Aufsetzen nach 1 Woche und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7b)

Von den Testkäfern lebten die mit *I. fumosorosea* infizierten Individuen mit 11,50 Tagen durchschnittlich am längsten, während die mit *M. anisopliae* infizierten im Durchschnitt 7,00 Tage lebten. Die kürzeste MLD hatten die mit *B. bassiana* infizierten Individuen mit 5,40

Tagen. Zwischen der MLD der Kontrolle und den Pilzarten *B. bassiana* und *I. fumosorosea* besteht ein hochsignifikanter Unterschied mit $p = 0,003$ bzw. $p = 0,048$. Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen der MLD der Kontrolle und der MLD von *M. anisopliae* mit $p = 0,197$. In diesem Fall ist $n = 1$ damit kann keine gesicherte Aussage für die Länge der MLD getroffen werden.

Der Infektionserfolg war nochmals deutlich niedriger als bei der Variante sofortiger Kontakt mit frisch kontaminierter Borke. Die höchste Infektionsrate erzielte *B. bassiana* mit 10%, gefolgt von *I. fumosorosea* mit nur 8%. Den geringsten Infektionserfolg erbrachte die indirekte Inokulation nach 1 Woche mit der Pilzart *M. anisopliae*. In dieser Gruppe konnte nur 1 Testkäfer (2%) erfolgreich infiziert werden. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Infektionsrate von *M. anisopliae* ist mit $p = 0,315$ nicht signifikant, da $n = 1$ da mit kann äquivalent zur MLD auch für die Infektionsrate keine gesicherte Aussage getroffen werden. Bei *B. bassiana* und *I. fumosorosea* liegt ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,022$ und $p = 0,041$ vor (Tab. 15).

Tab. 15: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/ % inf.) bei *I. typographus* nach indirekter Inokulation (1:30min) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Aufsetzen nach 1 Woche und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7b)

Indirekte Inokulation 1:30min + 1Woche/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	5,40	5	10,00	0,003	0,022
If	50	11,5	4	8,00	0,048	0,041
Ma	50	7,00	1	2,00	0,197	0,315

Wurde die Aufenthaltszeit von 1 :30min auf 3min verdoppelt und die Testkäfer sofort aufgesetzt, so veränderten sich die Ergebnisse sowohl MLD als auch die Infektionsrate betreffend. Insgesamt wurden mit der indirekten Inokulation bei 3min Aufenthaltsdauer am Stamm 200 Käfer getestet. Die 100%-Mortalität der Käfer in der Kontrolle wurde nach 47 Tagen erreicht. Die Kontrollgruppe überlebte in diesem Versuch exakt solange wie die im ersten indirekten Versuch. Die mit *I. fumosorosea* - Sporensuspensionsbelag in Kontakt gekommenen Testkäfer, waren insgesamt nach 9 Tagen gestorben. Bei den anderen beiden Arten wurde ein Wert von 12 Tagen beobachtet (Abb. 23).

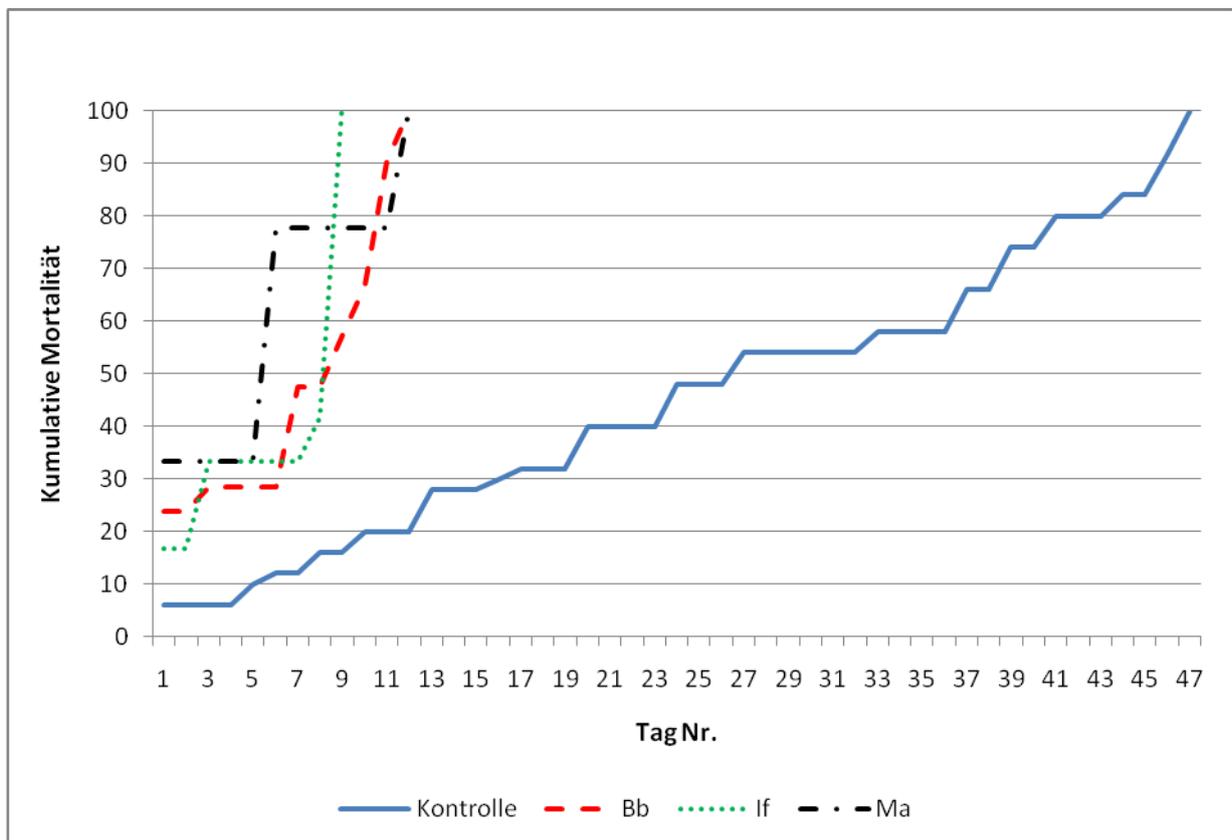


Abb. 23: Kumulative Mortalität (in %) bei *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (3:00min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8a)

Alle Pilze haben eine signifikant kürzere MLD als die der Kontrolle mit 27,00 Tagen. Die kürzeste MLD hat hier *M. anisopliae* mit 5,67 Tagen, gefolgt von *I. fumosorosea* mit 6,58 Tagen. Die längste MLD hat *B. bassiana* mit 7,29 Tagen. Die berechneten Signifikanzen sind alle hochsignifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit $p = 0,000$.

Die Infektionsraten sind bei doppelter Aufenthaltsdauer (3min) durchaus höher als bei vergleichbarer Temperaturstufe (20°C) und halb so langer Aufenthaltsdauer (1:30min) auf der inokulierten Borke. So infizierten sich 42% der Testkäfer mit *B. bassiana*, 24% mit *I. fumosorosea* und 18% mit *M. anisopliae*. Diese Unterschiede sind hochsignifikant gegenüber der Kontrollgruppe mit $p = 0,000$ für *B. bassiana* und *I. fumosorosea* sowie mit $p = 0,002$ für *M. anisopliae* (Tab. 16).

Tab. 16: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/ % inf.) bei *I. typographus* nach indirekter Inokulation (3:00min) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8a)

Indirekte Inokulation 3:00min/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./ % inf.
Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	7,29	21	42,00	0,000	0,000
If	50	6,58	12	24,00	0,000	0,000
Ma	50	5,67	9	18,00	0,000	0,002

Bei gleicher Aufenthaltsdauer (3min) und gleicher Temperaturstufe (20°C) wurden 1 Woche später nochmals 200 Käfer auf den inokulierten Stammabschnitten getestet. Im Vergleich zum sofortigen Aufsetzen der Käfer, zeigte sich bei allen drei Pilzarten in diesem Versuch wieder eine 100% Mortalität, allerdings war die Anfangsmortalität bei *I. fumosorosea* schon nach dem 1. Tag und bei *M. anisopliae* ab dem 3. Tag auffällig hoch. Eine 100% Mortalität wurde mit der *M. anisopliae*-Variante bereits am 4. Tag und damit am schnellsten erreicht. Bei *B. bassiana* dauerte es 7 Tage bzw. bei *I. fumosorosea* 11 Tage; die Kontrollvariante war dieselbe wie bei dem vorhergehenden Versuch. Der Wert bis zum Erreichen der 100% Mortalität betrug deshalb äquivalent zum vorangegangenen Versuch 47 Tage (Abb. 24).

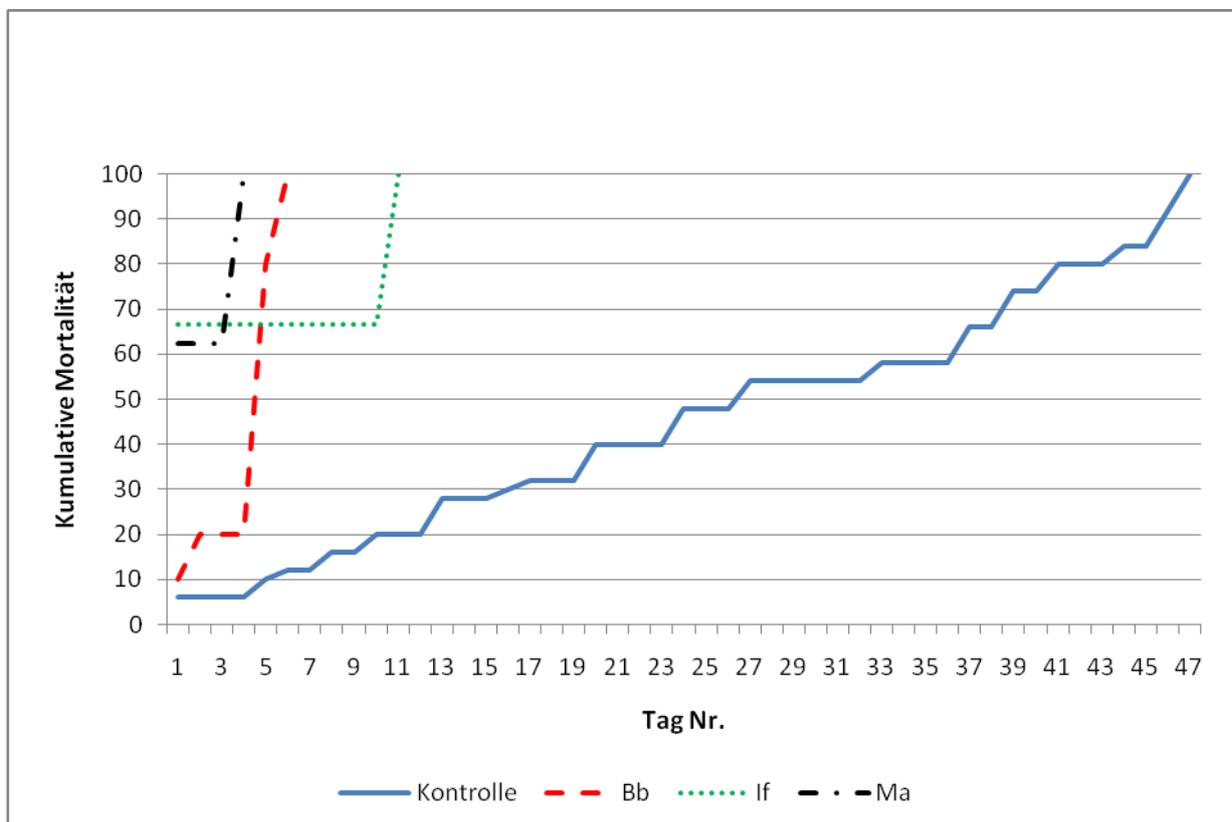


Abb. 24: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (3:00min) und Aufsetzen nach 1 Woche und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8b)

Die MLD waren die kürzesten im Vergleich zu allen Versuchen. Besonders kurz war die MLD der mit *M. anisopliae* infizierten Individuen mit nur 2,13 Tagen, gefolgt von *I. fumosorosea* mit 4,33 Tagen und *B. bassiana* mit 4,50 Tagen. Die Unterschiede zur MLD

der Kontrolle waren hochsignifikant. Die errechneten p-Werte betragen bei *B. bassiana* und *M. anisopliae* jeweils $p = 0,000$ und bei *I. fumosorosea* $p = 0,001$.

Wurden die Käfer 1 Woche später auf die mit Sporensuspension inokulierten Stammabschnitten gesetzt, so verringerten sich trotz 3min Aufenthaltsdauer die Infektionserfolge drastisch. Es konnten lediglich 20% der Testindividuen mit *B. bassiana* infiziert werden, etwas weniger mit *M. anisopliae* 16% und am wenigsten mit *I. fumosorosea* 12%. Im Unterschied zur Kontrolle waren die Infektionsraten aller drei Pilzarten mit $p = 0,001$ für *B. bassiana*, mit $p = 0,012$ für *I. fumosorosea* und mit $p = 0,003$ für *M. anisopliae* hochsignifikant unterschiedlich (Tab. 17).

Tab. 17: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/ % inf.) bei *I. typographus* nach indirekter Inokulation (3:00min + 1 Woche) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8b)

Indirekte Inokulation 3:00min + 1 Woche/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	4,50	10	20,00	0,000	0,001
If	50	4,33	6	12,00	0,001	0,012
Ma	50	2,13	8	16,00	0,000	0,003

Aufgrund der deutlich langsameren Mortalität bei der direkten Inokulation und Inkubation bei 15°C (vgl. Tab. 8) wurde die Kontaktzeit der Käfer auf den kontaminierten Borkenabschnitten nochmals auf 5 Minuten bei indirekter Inokulation erhöht. Dabei zeigte sich als auffälligstes Ergebnis, dass einige Käfer in der *B. bassiana* Variante länger lebten (bis zum 26. Tag) als in der Kontrollvariante (bis zum 23. Tag). Eine 100% Mortalität der Käfer war bei *I. fumosorosea* am 16. Tag und bei *M. anisopliae* am 17. Tag erreicht. Es konnten 200 Käfer getestet werden (Abb. 25).

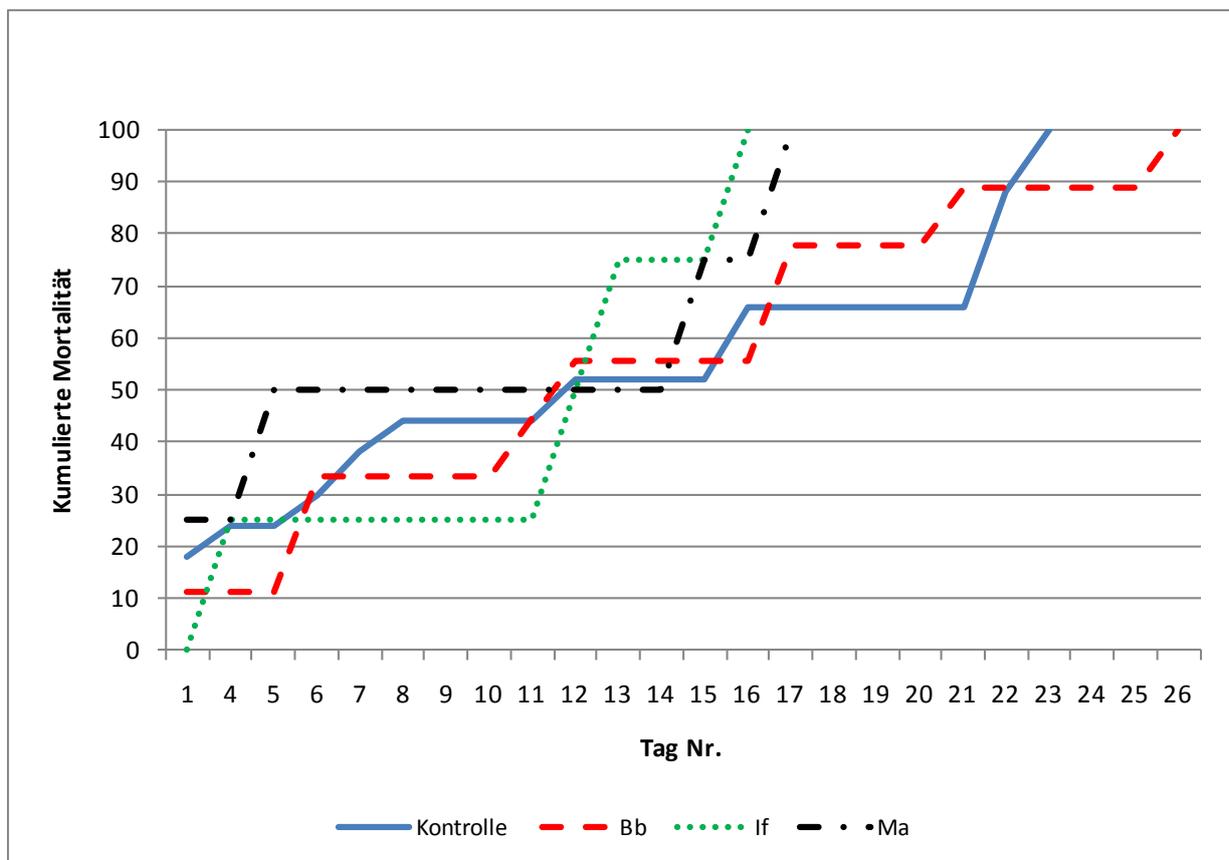


Abb. 25: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (5:00min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (9. Versuch)

Die MLD der Kontrolle betrug 10,98 Tage und war somit um rund 0,82 Tage kürzer als die errechnete MLD von *B. bassiana* mit 11,8 Tagen. In diesem Fall starb also die unbehandelte Kontrollgruppe im Mittel schneller ab, als die mit *B. bassiana* infizierte. Die MLD von *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* betragen 9,25 Tage bzw. 8,00 Tage und waren kürzer als

die MLD der Kontrolle. Es gab bei allen drei Pilzarten keine signifikanten Unterschiede zu der MLD der Kontrollgruppe, mit $p = 0,764$ für *B. bassiana*, $p = 0,670$ für *I. fumosorosea* und mit $p = 0,469$ für *M. anisopliae*.

Infektionen ließen sich auch mit der indirekten Inokulation und einer Aufenthaltsdauer von 5 min erzielen. Die Infektionsraten waren jedoch bei einer Temperatur von 15°C und trotz der längsten Aufenthaltszeit der Käfer auf dem Stamm im Vergleich zu allen anderen Versuchen gering. Die Infektionsraten betragen 20% bei *B. bassiana*, 8% bei *I. fumosorosea* und ebenfalls 8% bei *M. anisopliae*. Die Infektionsraten unterscheiden sich hochsignifikant zur Kontrolle mit $p = 0,001$ für *B. bassiana*, $p = 0,041$ für *I. fumosorosea* und mit $p = 0,041$ für *M. anisopliae* (Tab. 18).

Tab. 18: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/ % inf) bei *I. typographus* nach indirekter Inokulation (5:00min) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (9. Versuch)

Indirekte Inokulation 5:00min/ Testtemperatur 15°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./ % inf.
Kontrolle	50	10,98				
Bb	50	11,80	10	20,00	0,764	0,001
If	50	9,25	4	8,00	0,670	0,041
Ma	50	8,00	4	8,00	0,469	0,041

Insgesamt wurden 200 Testkäfer bei dem letzten Versuch der indirekten Versuchsreihe und unter Verwendung einer Testtemperatur von 25°C getestet. Diese Käfer wurden nach 5-minütigem Kontakt auf sporensuspensions-kontaminierter Rinde bei 25°C inkubiert. Die Testgruppen erreichten in der *I. fumosorosea* - Variante am 8. Tag eine 100% Mortalität. Die mit den beiden anderen Pilzarten infizierten Testkäfer erreichten am 12. Tag eine 100% Mortalität. Die Käfer in der Kontrolle starben bis zum 17. Tag (Abb. 26).

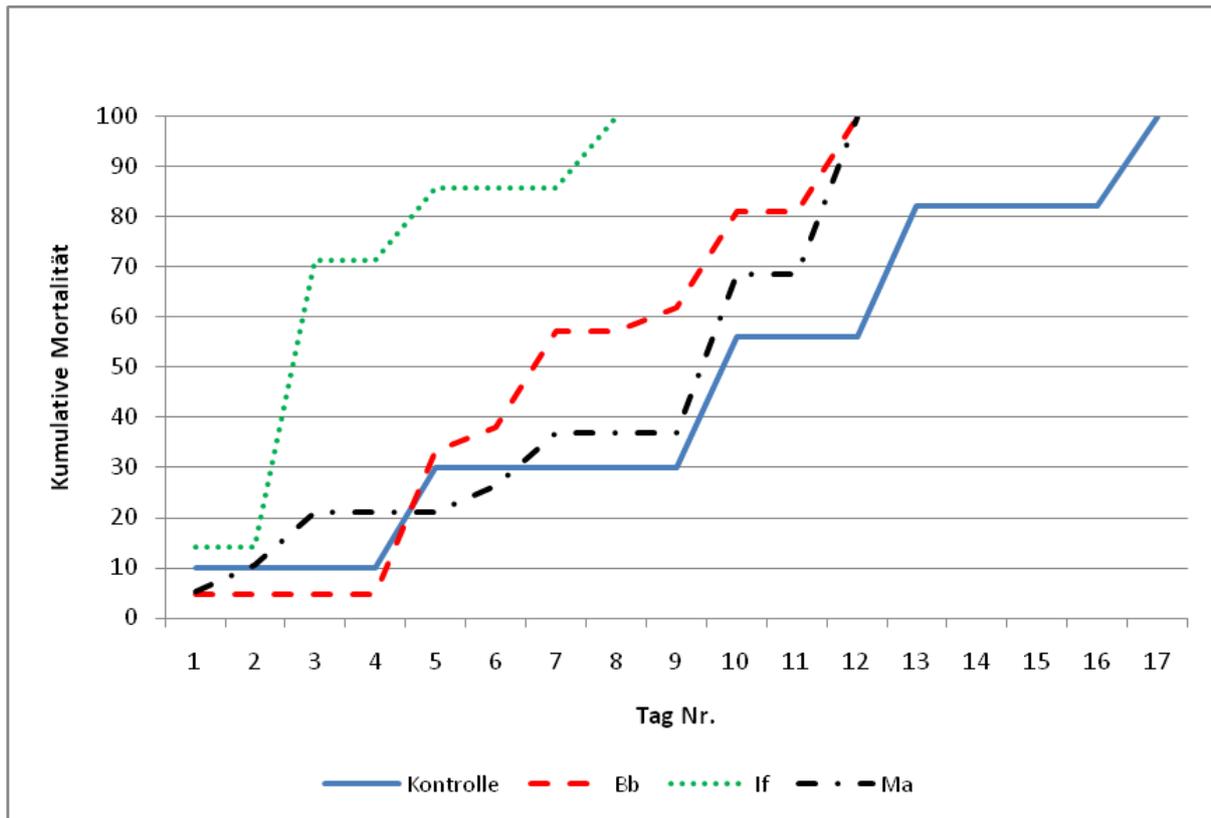


Abb. 26: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (5:00min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (10. Versuch)

Bei der höchsten Inkubationstemperatur (25°C) aller indirekten Versuche und einer Testzeit von 5:00 min, lagen die MLD der getesteten Pilzarten nur bei *I. fumosorosea* mit 3,71 Tagen signifikant unter der MLD der Kontrollgruppe mit $p = 0,001$. Mit 8,47 Tagen lag *M. anisopliae* nahe an dem Referenzwert der Kontrolle (10,14 Tage) und unterschied sich mit einer Signifikanz von $p = 0,191$ nicht signifikant vom Referenzwert der Kontrolle. Die MLD von *B. bassiana* betrug 7,71 Tage und unterschied sich mit $p = 0,420$ auch nicht signifikant

von dem Kontrollwert. Ein hochsignifikanter Unterschied mit $p = 0,001$ ließ sich aber für *I. fumosorosea* feststellen. Mit nur 3,71 Tagen MLD konnte hier einer der kürzesten Werte für diese Pilzart beobachtet werden.

Die Infektionsraten waren bei 25°C und 5-minütigem indirekten Kontakt der Käfer mit der Sporensuspension deutlich niedriger als nach direkter Inokulation und g leicher Inkubationstemperatur (vgl. Tab. 9). Allerdings waren die Infektionsraten für die indirekten Versuche bei dieser Variante die höchsten, verglichen mit den anderen indirekten Versuchen und den niedrigeren Temperaturstufen. Mit *B. bassiana* konnten 42%, mit *I. fumosorosea* 14% und mit *M. anisopliae* 38% der Testkäfer infiziert werden. Die Infektionsraten bei *B. bassiana* entsprechen denen nach 3-minütigem Kontakt bei 20°C und sofortigem Aufsetzen unmittelbar nach Behandlung der Rinde. Im Vergleich zur Variante mit 15°C und 5min waren die Infektionsraten hier deutlich höher (vgl. Tab. 14). Alle drei Infektionsraten unterschieden sich mit $p = 0,000$ für *B. bassiana* und *M. anisopliae* sowie mit $p = 0,006$ für *I. fumosorosea* hochsignifikant von dem Referenzwert der Kontrolle (Tab. 19)

Tab. 19: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/ % inf.) bei *I. typographus* nach indirekter Inokulation (5:00min) mit den drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (10. Versuch)

Indirekte Inokulation 5:00min/ Testtemperatur 25°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./% inf.
Kontrolle	50	10,14				
Bb	50	7,71	21	42,00	0,420	0,000
If	50	3,71	7	14,00	0,001	0,006
Ma	50	8,47	19	38,00	0,191	0,000

Analog zu den direkten Versuchen wurden auch für die indirekten Versuche zwei Tabellen (Tab. 20, 21) für die Unterschiede zwischen den Pilzarten untereinander erstellt. Auch hier sollte möglichst komprimiert das Leistungspotential der getesteten Pilzarten untereinander auf einen Blick in tabellarischer Form wiedergegeben werden. Die Kombinationsmöglichkeiten waren äquivalent zu denen in Tab. 10. Die Signifikanzen wurden wiederum sowohl für die Länge der MLD als auch für die Höhe der Infektionsrate (% inf.) über alle Kombinationen hinweg berechnet, wobei Selbstkombinationen herausfielen (vgl. Tab. 20, 21).

Vergleicht man die MLD der beiden Pilzarten *I. fumosorosea* und *B. bassiana* nach indirekter Inokulation miteinander, so lässt sich für 20°C feststellen, dass einmal mit *B. bassiana* ein signifikant kürzerer Wert ermittelt werden konnte ($p = 0,0347$). Der Vergleich der Pilzarten *B. bassiana* und *M. anisopliae* ergibt für 20°C einmal einen kürzeren Wert diesmal zu Gunsten von *M. anisopliae* mit $p = 0,0065$. Abschließend lässt sich beim Vergleich *M. anisopliae* zu *I. fumosorosea* mit $p = 0,0006$ ein einziger signifikant kürzerer Wert bei 20°C ermitteln. Für diese Temperaturstufe kann folglich für die indirekte Inokulation *M. anisopliae* vor den anderen beiden Pilzarten mit signifikant kürzeren MLD ermittelt werden.

Bei 25°C hingegen wurde zweimal mit *I. fumosorosea* ein hochsignifikant kürzerer Wert mit $p = 0,001$ ermittelt werden. Für den Vergleich *I. fumosorosea* zu *B. bassiana* kann mit $p = 0,006$ ein hochsignifikanter Wert für *I. fumosorosea* ermittelt werden. Schließlich kann auch für den Vergleich zwischen *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* mit $p = 0,0006$ ein signifikant kürzere MLD erzielt werden.

Im Gegensatz dazu konnten 15°C bei den indirekten Versuchen keine Unterschiede bei den paarweisen Vergleichen zwischen den Pilzarten ermittelt werden (Tab. 20).

Tab. 20: Ergebnisse für die Signifikanzen der Mittleren Lebensdauer (MLD) der einzelnen Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) untereinander nach indirekter Inokulation für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C

	If 15°	If 20°-1	If 20°-2	If 20°-3	If 20°-4	If 25°	Ma 15°	Ma 20°-1	Ma 20°-2	Ma 20°-3	Ma 20°-4	Ma 25°
Bb 15°	0,4774						0,3863					
Bb 20°-1		0,5856						0,6268				
Bb 20°-2			0,0347 (B)						0,5275			
Bb 20°-3				0,6005						0,3464		
Bb 20°-4					0,9387						0,0065 (M)	
Bb 25°						0,0010 (I)						0,4928
If 15°							0,7834					
If 20°-1								0,3906				
If 20°-2									0,0006 (M)			
If 20°-3										0,6066		
If 20°-4											0,3325	
If 25°												0,0006 (I)

Die Signifikanzwerte für die Infektionsraten im Vergleich zwischen den Pilzarten bei indirekter Infektion zeigten eine deutliche Verschiebung (analog zu den direkten Versuchen) zu Gunsten der Pilzart *B. bassiana* bei 20°C Testtemperatur. Das Ranking wurde maßgeblich von *B. bassiana* dominiert. Es konnte drei Mal mit der Pilzart *B. bassiana* eine signifikant höhere Infektionsrate als bei den anderen beiden Pilzarten ermittelt werden mit $p = 0,0032$ gegenüber *I. fumosorosea* und mit $p = 0,0361$ und $p = 0,0079$ gegenüber *M. anisopliae*. Für die Infektionsraten lässt sich somit *B. bassiana* als die erfolgreichste Pilzart für die 20°C-Varianten bei den indirekten Versuchen ermitteln. Dies bestätigt insgesamt – verglichen über alle Versuchsarten – die Annahme, dass mit *B. bassiana* beste Ergebnisse bei 20°C zu erzielen sind.

Bei 25°C Testtemperatur konnte jeweils mit *B. bassiana* und *M. anisopliae* ein hochsignifikanter Unterschied mit $p = 0,0014$ bzw. $p = 0,054$ zu *I. fumosorosea* ermittelt werden (Tab. 21).

3 Ergebnisse

Tab. 21: Ergebnisse für die Signifikanzen der Infektionsraten (% inf.) der einzelnen Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) untereinander nach indirekter Inokulation für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C

	If 15°	If 20°-1	If 20°-2	If 20°-3	If 20°-4	If 25°	Ma 15°	Ma 20°-1	Ma 20°-2	Ma 20°-3	Ma 20°-4	Ma 25°
Bb 15°	0,0823						0,0823					
Bb 20°-1		0,0032 (B)						0,0361 (B)				
Bb 20°-2			0,7274						0,0907			
Bb 20°-3				0,0540						0,0079 (B)		
Bb 20°-4					0,2751						0,6033	
Bb 25°						0,0014 (B)						0,6837
If 15°							1,0000					
If 20°-1								0,3726				
If 20°-2									0,1678			
If 20°-3										0,4619		
If 20°-4											0,5650	
If 25°												0,0054(M)

3.3 Vergleiche zwischen den Inokulationsarten

Um die Effizienz der beiden Inokulationsarten in Hinblick auf die Länge der MLD und der prozentualen Höhe des Infektionserfolges abschätzen zu können, ist es abschließend zweckmäßig einen Vergleich der direkten Inokulation mit der indirekten Inokulation bei jeweils gleicher Temperaturstufe vorzunehmen. Aufgrund der guten Vergleichbarkeit bietet es sich wiederum an, den ersten 20°C Versuch aus den vier 20°C-Varianten auszuwählen, denn der Stichprobenumfang (70:50) ist zwischen dem ersten Versuch und Versuch 7a vergleichbar und es sind keine „Ausreißerwerte“ vorhanden (hoher Wert Kontrollgruppe und bei der Pilzart *B. bassiana*).

Vergleicht man den Versuch „20°C - direkt“ mit dem „20°C - indirekt“, so lässt sich für die MLD feststellen, dass die Kontrollgruppe bei der indirekten Variante durchschnittlich um 19,46 Tage länger überlebte (7,54 Tage im Vergleich zu 27 Tagen) als bei der direkten Variante. Nur zwischen *I. fumosorosea*-direkte Inokulation und *I. fumosorosea*-indirekte Inokulation besteht ein signifikanter Unterschied, mit $p = 0,039$. Die MLD ist hier wesentlich länger mit insgesamt 8,6 Tagen zu 5,68 Tagen. Bei den beiden anderen Pilzarten bestehen mit $p = 0,121$ für *B. bassiana* und $p = 0,563$ für *M. anisopliae* keine signifikanten Unterschiede.

Die Infektionsraten waren erwartungsgemäß bei der direkten Inokulation bei gleicher Temperaturstufe wesentlich höher als bei der indirekten Inokulation. So wurden bei *B. bassiana* und *M. anisopliae* in der direkten Variante über 74% der Testkäfer erfolgreich infiziert und auch mit *I. fumosorosea* konnten über 58% infiziert werden. Zwischen den Infektionsraten der direkten und der indirekten Inokulation gibt es für alle Pilzarten hochsignifikante Unterschiede mit $p = 0,000$. Mit *B. bassiana* konnte eine Infektionsrate von 34% erzielt werden, die beiden anderen Raten lagen bei 10% bzw. 16% (Tab. 22).

Tab. 22: Vergleich zwischen direkter Inokulation (3sec.) und indirekter Inokulation (1:30min sofort) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten

Direkte Inokulation 3sec./ Testtemperatur 20°C					Indirekte Inokulation 1:30min sofort/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./%inf.
Kontrolle	70	7,54			Kontrolle	50	27,00				
Bb	70	5,89	63	90,00	Bb	50	7,18	17	34,00	0,121	0,000
If	70	5,68	41	58,60	If	50	8,60	5	10,00	0,039	0,000
Ma	70	5,65	52	74,30	Ma	50	6,25	8	16,00	0,563	0,000

Werden die MLD der indirekten 20°C-Varianten „1:30min sofort“ und „1:30min + 1 Woche“ miteinander verglichen, so lassen sich zwischen den Pilzarten keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die errechneten p-Werte sind für *B. bassiana* $p = 0,511$, für *I. fumosorosea* $p = 0,291$ und für *M. anisopliae* $p = 0,863$. Die MLD der Kontrolle ist bei beiden Versuchen gleich.

Anders verhält es sich mit den Infektionsraten. Für *B. bassiana* und *M. anisopliae* bestehen signifikante Unterschiede mit $p = 0,004$ für *B. bassiana* und mit $p = 0,014$ für *M. anisopliae*. Mit *B. bassiana* und *M. anisopliae* konnten in der „1:30min sofort-Variante“ erheblich mehr Käfer infiziert werden als in der „1:30min+1 Woche-Variante“. Mit 34% zu 10% und 16% zu 2% bestehen signifikant geringere Infektionsraten bei Aufsetzen der Käfer nach 1 Woche in Kombination mit der Verwendung von *B. bassiana* und *M. anisopliae*. Bei *I. fumosorosea* gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Infektionserfolgs, und es konnten jeweils nur 10% bzw. 8% der Testkäfer infiziert werden. Der Signifikanzwert beträgt $p = 0,727$ (Tab. 23).

Tab. 23: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (1:30min sofort) und indirekter Inokulation (1:30min + 1 Woche) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten

Indirekte Inokulation 1:30min sofort/ Testtemperatur 20°C					Indirekte Inokulation 1:30min + 1 Woche/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./%inf.
Kontrolle	50	27,00			Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	7,18	17	34,00	Bb	50	5,40	5	10,00	0,511	0,004
If	50	8,60	5	10,00	If	50	11,50	4	8,00	0,291	0,727
Ma	50	6,25	8	16,00	Ma	50	7,00	1	2,00	0,863	0,014

Der Vergleich der Varianten „1:30min sofort“ mit der Variante „3:00min sofort“ – bei gleicher Temperaturstufe (20°C) – ergibt keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Länge der MLD bei den drei Pilzarten. Die Werte liegen nahe beieinander. Die berechneten Signifikanzen betragen für *B. bassiana* $p = 0,943$, für *I. fumosorosea* $p = 0,349$ und für *M. anisopliae* $p = 0,775$. Trotz doppelter Verweilzeit der Käfer auf den inokulierten Stammabschnitten können bei diesem Vergleich für die MLD keine kürzeren Werte festgestellt werden.

Die Infektionswerte sind bei beiden Varianten der indirekten Versuche vergleichsweise hoch. Es gibt allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten. Nur beim dem Vergleich der Infektionsraten der Pilzart *I. fumosorosea* konnte ein Wert knapp an der

Signifikanzgrenze ermittelt werden. Eine Verdopplung der Aufenthaltsdauer auf der kontaminierten Borke führt nur in diesem Fall zu einem höheren Infektionserfolg, wenn auch auf niedrigem Niveau, verglichen mit der direkten Inokulation. Insgesamt zeigt die 3min-Variante leicht höhere Infektionsraten, wobei für *B. bassiana* mit $p = 0,410$ und *M. anisopliae* mit $p = 0,790$ keine signifikanten Unterschiede bestehen (Tab.24).

Tab. 24: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (1:30min sofort) und indirekter Inokulation (3:00min sofort) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten

Indirekte Inokulation 1:30min sofort/ Testtemperatur 20°C					Indirekte Inokulation 3:00min sofort/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./%inf.
Kontrolle	50	27,00			Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	7,18	17	34,00	Bb	50	7,29	21	42,00	0,943	0,410
If	50	8,60	5	10,00	If	50	6,58	12	24,00	0,349	0,062
Ma	50	6,25	8	16,00	Ma	50	5,67	9	18,00	0,775	0,790

Vergleicht man die Variante „1:30min sofort“ mit der Variante „3:00min + 1 Woche“ hinsichtlich ihrer MLD, so lässt sich nur für *M. anisopliae* ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,009$ feststellen. Allerdings ist in diesem Fall entgegen der Erwartung die MLD der Variante „3:00min + 1 Woche“ kürzer als bei der Variante „1:30min sofort“, d.h. obwohl die Suspension sich schon eine Woche auf dem Stamm befand und eingetrocknet war konnte eine kürzere MLD beobachtet werden. *B. bassiana* und *I. fumosorosea* weisen mit $p = 0,130$ und $p = 0,199$ keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Länge der MLD auf.

Die Infektionsraten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Bei der Pilzart *M. anisopliae* ließ sich mit 16% die gleich niedrige Infektionsrate nachweisen. Mit *I. fumosorosea* ließ sich entgegen der Erwartungen sogar ein Testkäfer mehr infizieren Die berechneten Signifikanzen betragen für *B. bassiana* $p = 0,115$, für *I. fumosorosea* $p = 0,749$ und für *M. anisopliae* $p = 1,000$ (Tab.25).

Tab. 25: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (1:30min sofort) und indirekter Inokulation (3:00min + 1Woche) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten

Indirekte Inokulation 1:30min sofort/ Testtemperatur 20°C					Indirekte Inokulation 3:00min + 1 Woche/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./%inf.
Kontrolle	50	27,00			Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	7,18	17	34,00	Bb	50	4,50	10	20,00	0,130	0,115
If	50	8,60	5	10,00	If	50	4,33	6	12,00	0,199	0,749
Ma	50	6,25	8	16,00	Ma	50	2,13	8	16,00	0,009	1,000

Bei der getesteten 20°C-Temperaturstufe werden als letztes die beiden 3 Minuten-Varianten miteinander verglichen. Bei den Varianten „3:00min sofort“ und „3:00min + 1Woche“ lassen sich für die MLD der Pilzarten *B. bassiana* und *M. anisopliae* signifikante Unterschiede feststellen, mit $p = 0,053$ und $p = 0,043$. Entgegen der Erwartungen waren in diesen beiden Fällen die Käfer in der Variante „3:00min + 1 Woche“ also deutlich kürzer am Leben. Kein signifikanter Unterschied konnte bei *I. fumosorosea* mit $p = 0,284$ ermittelt werden.

Während die MLD in der „3:00min + 1 Woche-Variante“ deutlich kürzer sind, ist der Infektionserfolg bei der „3:00min sofort-Variante“ deutlich höher und bestätigte die Erwartungen. Die errechneten Signifikanzen liegen zumindest bei der Pilzart *B. bassiana* bei $p = 0,017$ und sind damit signifikant höher als bei der Variante „3:00min + 1 Woche“. Bei *I. fumosorosea* mit $p = 0,118$ und *M. anisopliae* mit $p = 0,790$ gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten (Tab. 26).

Tab. 26: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (3:00min sofort) und indirekter Inokulation (3:00min + 1Woche) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten

Indirekte Inokulation 3:00min sofort/ Testtemperatur 20°C					Indirekte Inokulation 3:00min + 1Woche/ Testtemperatur 20°C					Signifikanzen	
Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Gruppe	N	MLD	n-inf.	% inf.	Sign./MLD	Sign./%inf.
Kontrolle	50	27,00			Kontrolle	50	27,00				
Bb	50	7,29	21	42,00	Bb	50	4,50	10	20,00	0,053	0,017
If	50	6,58	12	24,00	If	50	4,33	6	12,00	0,284	0,118
Ma	50	5,67	9	18,00	Ma	50	2,13	8	16,00	0,043	0,790

4 Diskussion

Die nachfolgende praxisorientierte Diskussion fasst die im Ergebnisteil gemachten Beobachtungen zusammen und prüft, ob die drei getesteten Pilzarten in Hinblick auf die Länge der MLD und die erreichte Infektionsrate eine erfolgreiche Anwendung als potentielle Antagonisten gegen *I. typographus* erlauben. Darüber hinaus werden als wissenschaftlicher Diskussionsteil die Ergebnisse aus den Inokulationsversuchen bei der jeweilig getesteten Inkubationstemperatur mit den vorhandenen Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten verglichen. An dieser Stelle muss jedoch betont werden, dass vor allem zu dem Themenkomplex Wirkung von *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* auf *I. typographus* wenige Veröffentlichungen Bestandteil der bisherigen Forschung sind.

In früheren Forschungsprojekten wurden Infektionsversuche an *I. typographus* hauptsächlich mit *B. bassiana* durchgeführt. Bei der Verwendung von *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* handelt es sich um erste Versuche zur Beschreibung der Wirkung dieser Pilzarten gegen *I. typographus*. Entsprechend werden die hier gemachten Beobachtungen und erzielten Ergebnisse vorrangig diskutiert. Die Pilzart *M. anisopliae* wurde schon erfolgreich an der Borkenkäferart *Scolytus scolytus* (Coleoptera:Scolytidae) getestet (DOBERSKI, 1981a). Deshalb soll mittels der beobachteten Ergebnisse und Quervergleichen die Wirkung von *M. anisopliae* abgeschätzt werden. Sowohl *M. anisopliae* als auch *I. fumosorosea* wurden zudem schon an *Dendroctonus micans* (Coleoptera:Scolytidae) (SEVIM ET AL., 2010) getestet, auch hier bietet sich ein Quervergleich an.

Anteilmäßig überwiegen die 20°C-Versuche vor den anderen Testtemperaturen. Für alle Pilzarten konnten bei dieser Temperatur sowohl für die direkten als auch für die indirekten Inokulationen, mehrere Wiederholungen durchgeführt werden. Aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit der direkten Inokulationen im Vergleich zu den aufwendigeren indirekten Inokulationen, war es möglich von ersteren mehrere Wiederholungen durchzuführen. Die hohe Variationsbreite der ermittelten Ergebnisse innerhalb der 20°C -Wiederholungsversuche überraschte und konnte trotz gleicher Durchführung nicht vollständig geklärt werden. Durchgängig lebten die mittels direkter Inokulation benetzten Testkäfer kürzer als die indirekt inokulierten. Ein Grund dafür könnte in einer schwächenden Wirkung des Tropfens Tween 80 liegen. Anders als bei den indirekten Versuchen kann auch das Tween 80 unmittelbar bei der direkten Inokulation auf das Testinsekt wirken. Die Zugabe des Tropfens zur besseren Benetzung der Testkäfer mit den Sporen könnte also für die Käfer negative Folgen gehabt haben. Es ließe sich somit auch die Vermeidung der feuchten Stellen auf den Teststämmen bei den indirekten Versuchen besser erklären, womöglich hatte das Tween 80 repellente Wirkung.

In nachfolgenden Untersuchungen sollte eine Fitness reduzierende Wirkung dieses Supplements überprüft werden.

Sowohl die Versuchsdurchführung als auch die verwendeten Pilzstämme waren in der Versuchsphase identisch. Gründe für die dennoch entstandenen teilweise hohen Mortalitätsschwankungen könnten darüber hinaus evtl. auch bei den verwendeten Zuchtkäfern oder aber bei der verwendeten Sporensuspension liegen. Die Käfer stammten aus verschiedenen Zuchtansätzen. Größtenteils wurden sie nach einem kürzeren Beobachtungszeitraum (1 bis max. 7 Tage), in dem etwaige andere Pilzinfektionen erkannt hätten werden können, vermischt. Durch die Vermischung der Käfer aus verschiedenen Zuchtansätzen sollte ein möglichst heterogenes und vitales Testmaterial entstehen. Umgekehrt ist es aber nicht ausgeschlossen, dass durch diese Vorgehensweise zufällig auch weniger vitales Ausgangsmaterial ausgewählt wurde.

Auch die Verarbeitung und Anwendung der Sporensuspension geschah unter der Maßgabe höchster Sorgfalt, dennoch könnte durch die Verwendung unterschiedlicher Ausgangschargen auch hier ein Grund für die entstandenen Variationen liegen. Zusätzlich könnte es besonders bei den indirekten Versuchen zu ungleichmäßiger Sporenübertragung gekommen sein. So könnten einzelne Individuen unbeabsichtigt eine höhere Dosis aufgenommen haben, wenn sie bei Aufsetzen auf den Stamm in Areale mit höherem Sporenanteil gesetzt wurden. Ein homogenes Auftragen der Sporensuspension war nahezu unmöglich.

4.1 Wirkungen der Pilzarten auf die mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./n-inf.) bei 20°C Inkubationstemperatur und direkter Inokulation

Die Untersuchungen zeigen insgesamt, dass die Käfer durch die direkte Inokulation (3sec.) bei der 20°C-Temperaturstufe erfolgreich mit allen drei Pilzarten aus der Bodenprobe infiziert werden konnten. In den Vergleichskontrollen befanden sich keine mit der Zielpilzart infizierten Käfer. Eine Infektion mit der jeweiligen getesteten Pilzart bei der Inkubationstemperatur von 20°C führte durchschnittlich zu einem raschen Absterben.

Zunächst soll als erstes Untersuchungskriterium die Länge der MLD betrachtet werden. Diese ist aus zwei Gründen entscheidend. Umso kürzer die MLD desto weniger wird ein infizierter Käfer Fraßschäden verursachen können und umso geringer wird sein Anteil an der Reproduktionsleistung sein. Allerdings beschreibt KREUTZ ET AL. (2004b) in seiner Untersuchung zur Sporenübertragung von *B. bassiana* zwischen schwärmenden *I. typographus*, dass bei längeren Inkubationszeiten die Wahrscheinlichkeit einer horizontalen

Übertragung voraussichtlich ansteigt. So erhöhen mobile infizierte weibliche Käfer die Übertragungsrate von Sporen, wenn sie sich einbohren in neue Stämme und mit männlichen Individuen paaren. Insgesamt weisen die im Ergebnisteil gemessenen MLD eine hohe Variation in der Länge auf. Bei der Testtemperatur von 20°C wurden die niedrigsten Werte in den direkten Versuchen bei den untersuchten Pilzarten ermittelt. An erster Stelle im Ranking der kürzesten MLD steht die Pilzart *I. fumosorosea*. Mit ihr wurde zweimal der kürzeste Wert (5,46/4,84 Tage) innerhalb eines Versuchs erreicht. Im Ranking (Tab. 10) mit welcher Pilzart die kürzeste MLD erreicht werden konnte liegt *I. fumosorosea* insgesamt bei der 20°C - Temperaturstufe vor den beiden anderen Pilzarten. Mit 5,65 T agen wurde einmal der niedrigste Wert für *M. anisopliae* ermittelt und mit 5,32 Tagen konnte schließlich einmal der niedrigste Wert für *B. bassiana* ermittelt werden. Insgesamt reichte die MLD-Spanne über alle vier Versuche von 4,84 Tagen (*M. anisopliae*) als niedrigster Wert bis 9,07 Tage (*B. bassiana*) als höchster Wert (vgl. Abschnitt 3). Die Werte der Pilzart *I. fumosorosea* liegen mit 4,84/5,40/5,63 und 5,68 T agen nahe beieinander, bei der Pilzart *M. anisopliae* waren zumindest drei Werte direkt vergleichbar mit 5,46/5,65/5,65 Tagen, nur ein Wert war mit 8,51 Tagen erheblich länger. Die Sporenkonzentrationen lagen bei diesen vier Versuchen zwischen $1-2 \times 10^7$ Konidien/ml, damit lagen sie etwas niedriger als bei einer vergleichbaren Untersuchung von WEGENSTEINER (1996) für die Pilzart *B. bassiana*. WEGENSTEINER (1996) führte Inokulationsversuche mit $7,5$ und $3,0 \times 10^7$ Konidien/ml durch. Die ermittelten Werte für die Pilzart *B. bassiana* bei Versuch 2 und 4 ergaben ähnliche Werte mit 7,91/9,07 Tage vgl. zu 7,80/10,10 Tagen. Die kurze Lebensspanne der infizierten Individuen zeigt, dass sich *B. bassiana* bei dieser Temperatur optimal entwickelt. SEVIM ET AL. (2010) konnten ähnliche Werte (8 Tage) für *M. anisopliae* und *I. fumosorosea* bei Verwendung vergleichbarer Sporenkonzentrationen (10^7) an der Borkenkäferart *Dendroctonus micans* ermitteln. Auch INGLIS ET AL. (2001) geben die Temperaturen zwischen 20°C und 25°C als Optimaltemperaturen für die Entwicklung von *B. bassiana* und auch für die Entwicklung der beiden anderen Pilzarten an. Gründe warum es zu einer hohen Variationsbreite innerhalb der vier Wiederholungsversuche kam, können in der individuellen Fitness und Widerstandskraft der Käfer der jeweiligen Versuchsauswahl liegen (vgl. WEGENSTEINER, 1996).

Die zweite wesentliche Komponente, um die Effizienz einer potentiellen antagonistischen Wirkung der geprüften Pilzarten abschätzen zu können, ist der Infektionserfolg ermittelt über die Infektionsrate (% inf.). Der Infektionserfolg war bei direkter Inokulation (3sec.) und der 20°C-Temperaturstufe sehr hoch und deutlich erfolgreicher als bei den indirekten Versuchen, wenn gleich sich aber die Gewichtung zwischen den Pilzarten deutlich verschob. KREUTZ ET

AL. (2004 a) zitieren MÜLLER-KÖGLER (1965), der einen minimalen Temperaturbereich von 0-10°C und einen maximalen Temperaturbereich von 30-35°C an. Erst unter bzw. über diesen Temperaturen geht die Infektionsrate signifikant zurück. Eine erfolgreiche Pilzinfektion in Kombination mit einer kurzen MLD sind die entscheidenden Komponenten um den Erfolg, der in dieser Untersuchung ausgewählten Pilzarten aus Sicht des effizienten Schädlingsmanagements abzuschätzen. Nur wenn hohe Infektionsraten in Kombination mit kurzen MLD erreicht werden, lohnt es sich den Einsatz dieser drei entomopathogenen Pilzarten auch in der Praxis zu prüfen. Bei 20°C konnten Infektionswerte von min. 58,60% bis max. 98,10% ermittelt werden. Die ermittelten Werte sind alle hochsignifikant unterschiedlich zum Referenzwert der Kontrolle (vgl. Tab.7). Die hohen Werte von *B. bassiana* (90,00%/98,10%/85,70%/87,10%) sind vergleichbar mit den von WEGENSTEINER (1996) ermittelten Werten von 86,9 0% u. 94,5 0% und zeigen dass mit *B. bassiana* am erfolgreichsten infiziert werden konnte. War bei der Länge der ermittelten MLD *I. fumosorosea* mit den niedrigsten gemessenen MLD der Spitzenreiter unter den getesteten Pilzarten, so trat bei den Infektionsraten *B. bassiana* an die Stelle der Bestplatzierung. Viermal konnte mit *B. bassiana* eine signifikant höhere Infektionsrate im Vergleich zu den beiden anderen Pilzarten ermittelt werden (vgl. Tab. 11). Ob eine Infektion tatsächlich erfolgt und damit bestimmend für den Infektionserfolg, ist in hohem Maße von der individuellen Resistenz (präinfektionelle Abwehrmechanismen) abhängig, der Immunität und der genetischen Herkunft des Pilzstamms (vgl. INGLIS ET AL., 2001). Entscheidend sind zudem eine Reihe an exogenen Faktoren, einzeln und in Kombination. Besonders die Solarstrahlung, die Temperatur, die relative Luftfeuchte sowie der Niederschlag und der Wind sind als infektionshemmende Umweltfaktoren im Freiland zu nennen (JARONSKI, 2010). In diesem Laborversuch ist der Faktor Temperatur konstant. Die anderen Faktoren Solarstrahlung, Niederschlag, Wind etc. sind unter Laborbedingungen nicht vorhanden. Einzig die relative Luftfeuchte muss Beachtung finden (KREUTZ ET AL., 2004a), diese wurde während der Versuche nicht gemessen aber zumindest optisch und sensorisch anhand des an den Petrischalen vorkommenden Kondenswassers eingeschätzt. Der Zellstoff in den Versuchsschalen wurde fortlaufend mit autoklaviertem Wasser nachbenetzt. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die relative Luftfeuchte ohne diese fortlaufend gemessen zu haben innerhalb der Petrischalen auf einem für die Infektion optimal hohen Niveau lag. Es gilt die Vermutung, dass es scheinbar innerhalb der Zucht mehr oder weniger für Pilzinfektionen anfällige Individuen gab. Diese Disposition könnte für alle Pilzarten gesehen, unter anderem eine altersabhängige Komponente gehabt haben. So ist es denkbar, dass junge Käfer nach dem

Schlupf mit ihrem weicheren Chitinpanzer unter Umständen schneller infiziert wurden, als ältere Käfer die schon lange Zeit vollständig ausgehärtet waren und die unter Umständen auch schon mit anderen Pathogenen oder saprophytischen Pilzen in Berührung kamen z.B. durch anhaftende Erde auf den Versuchsstämmen. Die Stämme in denen sich *I. typographus* entwickelte waren nicht steril sondern kamen wie auch die Fraßrinde aus dem Freiland. Es wurden keine Altersanalysen oder Geschlechtsdifferenzierungen der Käfer in dieser Untersuchung gemacht, deshalb sollte diesem Umstand in nachfolgenden Arbeiten Rechnung getragen werden. WEGENSTEINER & FÜHRER (1988) diskutieren für die Art *Hylobius abietis* hierzu die Möglichkeit einer altersbedingten Resistenzsteigerung und stellten fest, dass es aufgrund der besonders starken Cuticula von *H. abietis* zu längeren Inkubationszeiten trotz *B. bassiana*- Infektion kommen könnte.

Bisher wurden keine Versuche unternommen *I. typographus* mit den Pilzarten *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* zu infizieren. Obgleich bekannt ist, dass beide Pilzarten einen breiten Wirkkreis besitzen und in Europa in Waldökosystemen häufig anzutreffen sind (ZIMMERMANN, 2007b, 2008) fehlen Infektionsversuche. Für beide Pilzarten ist der Nachweis erbracht, dass sie in Gebieten in denen *I. typographus* Schäden verursacht regelmäßig vorkommen. Für die Pilzart *M. anisopliae* ist ein Freilandnachweis an einer *I. typographus* Population in der Schweiz auf Sturmwurfflächen belegt (KELLER ET AL., 2004). Allerdings wurde die Durchseuchungsrate als gering eingeschätzt. Für die Pilzart *I. fumosorosea* erbrachte LANDA ET AL. (2001) den Nachweis für den Böhmer Wald. Die Pilzarten *M. anisopliae* und *B. bassiana* wurden schon erfolgreich an der Borkenkäferart *Scolytus scolytus* von DOBERSKI (1981a) getestet. Auf Grund der fehlenden Vergleichsliteratur, soll deshalb in bestimmten Punkten vor allem auf die letzt genannte Arbeit verwiesen werden. So konnte DOBERSKI (1981b) an *Scolytus scolytus* mit den beiden Pilzarten mit vergleichbarer Sporenkonzentration von 1×10^7 und einer vergleichbaren Testtemperatur von 20°C jeweils 80 und 100% der inokulierten Käfer infizieren.

4.2 Veränderungen in der Wirksamkeit der Pilzarten durch indirekte Inokulation auf die Mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./n-inf.) bei 20°C Inkubationstemperatur

Bei den indirekten Versuchen reduzierte sich die Infektionsleistung deutlich. Weitgehend unabhängig davon blieben die ermittelten MLD. Entgegen den Infektionsraten waren die ermittelten MLD größtenteils vergleichbar mit denen der direkten Inokulationen (vgl. Abschnitt 3). In einigen Fällen starben die infizierten Käfer deutlich schneller ab. So wurde

mit nur 2,13 Tagen die kürzeste MLD für die Pilzart *M. anisopliae* und auch die kürzeste MLD für alle Versuche bei der „3min-Variante + 1 Woche“ ermittelt. Entgegen den Erwartungen, dass der kürzeste Wert wahrscheinlich bei der höchsten Temperaturstufe erreicht werden würde, wurde die kürzeste MLD bei 20°C- Versuchstemperatur beobachtet. Bis auf eine ermittelte MLD sind alle MLD signifikant unterschiedlich zur MLD der Kontrolle. Allerdings konnte in diesem Versuch nur ein Käfer mit *M. anisopliae* infiziert werden, deshalb ist der Unterschied nicht signifikant (vgl. Tab. 13). Die kürzesten MLD- Werte konnten bei drei von vier indirekten Versuchen mit der Pilzart *M. anisopliae* erzielt werden, einmal wurde mit *B. bassiana* die kürzeste MLD ermittelt. Die MLD- Werte von *I. fumosorosea* lagen meistens zwischen den Zeiten von *M. anisopliae* und *B. bassiana*. Insgesamt kann *M. anisopliae* bei der 20°C- Temperaturstufe vor den beiden anderen Pilzarten als die Pilzart mit den kürzesten MLD bei indirekter Inokulation ermittelt werden (vgl. Tab.20). Die MLD reichten insgesamt von min. 2,13 Tagen bis max. 11,50 Tagen. Die längste MLD wurde mit der Pilzart *I. fumosorosea* bei 20°C und einer Verweildauer von 1:30min nach 1 Woche ermittelt (vgl. Tab. 13). Besonders nach dem Aufsetzen der Käfer nach 1 Woche wurden längere MLD erwartet, da von suboptimalen Bedingungen auf der trockenen Borkenoberfläche ausgegangen werden muss. Es kann abschließend nicht geklärt werden, warum der Wert so niedrig war. Es lag aber weder eine Vorinfektion vor, noch wurde in diesem Fall ein anderer Pilzstamm der Pilzart verwendet, der möglicherweise virulenter gewesen wäre.

Die Infektionsraten waren im Vergleich zu den direkten Inokulationen bei der 20°C-Temperaturstufe deutlich reduziert. Es war teilweise nur in geringem Umfang möglich mit der indirekten Inokulation Infektionen mit den drei Pilzarten hervorzurufen. Die meisten Käfer konnten im Vergleich zu den beiden anderen Pilzarten mit *B. bassiana* infiziert werden (vgl. Tab. 21). In keinem Fall wurden 50% der aufgesetzten Käfer infiziert (vgl. Abschnitt 3). Mit den vier 20°C-Varianten wurden nur noch min. 2% bis max. 42% der Testindividuen erfolgreich infiziert. Besonders gering war die Infektionsleistung mit der Pilzart *M. anisopliae* mit nur 2% bei der Variante „Indirekte Inokulation 1:30min + 1 Woche“ (vgl. Tab. 13). Gründe dafür können z.B. in der Oberflächenstruktur der Borke gesehen werden. Trotz gründlichem Auftragen der Sporensuspension auf die Borke gab es vermutlich immer Bereiche, die nicht vollkommen mit Sporensuspension benetzt werden konnten. Teilweise lief die flüssige Suspension auch vom Stamm. Es konnte nicht verifiziert werden, wie viele Sporen tatsächlich auf den Kontaminationsstellen vorhanden waren. Zudem könnten Pflanzensekundärstoffe und die Oberflächenchemie der Fichtenborke auch Einfluss auf die

geringeren Infektionserfolge gehabt haben. CORY & ERICSSON (2009) postulieren, dass die Keimfähigkeit von Sporen entomopathogener Pilze durch hemmende Extraktstoffe und die Chemie der Pflanzenoberfläche beeinflusst werden kann. Zusätzlich diskutieren KREUTZ ET AL (2004a) eine antagonistische Wirkung durch saprophytische Pilzarten und Bläuepilze auf und unter der Fichtenrinde auf *B. bassiana*. Bei den Wiederholungsversuchen nach 1 Woche waren die kontaminierten Infektionsbereiche auch vollkommen ausgetrocknet, obwohl der geteilte Fichtenstamm auf feuchtem Zellstoff lagerte und das Aufbewahrungsbehältnis, in dem sich das jeweilige Stammstück befand, verschlossen war. Der zurückgegangene Infektionserfolg könnte neben den zuvor erwähnten Komponenten vor allem auch an der geringeren Keimfähigkeit der ausgetrockneten Sporen gelegen haben. Im Gegensatz zu frisch aufgetragenen Konidien die über einen hohen Feuchtigkeitsgehalt verfügen sind die Bedingungen für die Keimung nach einer Woche Trockenheit auf der Borke suboptimal. Wahrscheinlich war deshalb die Infektionsleistung nach 1 Woche besonders gering. So geben INGLIS ET AL. (2001) an, dass das Feuchtigkeitsmilieu, in dem sich die Sporen befinden einen signifikanten Einfluss auf die Keimfähigkeit und damit auf die Wirkung der Sporen hat. Es muss also vermutet werden, dass es einen Unterschied gibt, wenn die Suspension frisch auf dem Stamm aufgetragen wurde im Vergleich zu den Varianten nach einer Woche. Zumindest für *B. bassiana* und *M. anisopliae* wurden für die „1:30min sofort-Variante“ im Vergleich zur „1:30min + 1 Woche-Variante“ signifikant höhere Infektionsraten mit $p = 0,004$ für *B. bassiana* und mit $p = 0,014$ für *M. anisopliae* nachgewiesen (vgl. Tab. 19). Mit 34% zu 10% 16% zu 2% besteht ein deutlicher Unterschied. Verlängerte sich die Aufenthaltszeit der Käfer auf den inokulierten Stammabschnitten um das Doppelte der Zeit von 1,5min auf 3min, so konnte nochmals ein steigender Infektionserfolg beobachtet werden. Die „3min-sofort-Variante“ war auch die erfolgreichste bei den indirekten Varianten (vgl. Tab. 14). Bei Vergleich der „indirekt-sofort-Varianten“ ließ sich bei relativ hohem Infektionsniveau zumindest für die *I. fumosorosea* mit $p = 0,062$ ein Wert knapp an der Signifikanzgrenze in Bezug auf den Infektionserfolg ermitteln. Die Verdopplung des Aufenthalts führt in diesem Fall zu einem relativ deutlich höheren Infektionserfolg. Noch höher waren die Infektionsraten bei permanentem Kontakt der Käfer mit Sporen inokulierter Borke (vgl. WEGENSTEINER, 1996). Diese Beobachtung deckte sich mit den bei *B. bassiana* ermittelten Daten und erhärtet den Verdacht, dass sowohl die verringerten Feuchtebedingungen als auch die in und auf der Borke befindlichen sekundären Pflanzenstoffe den Infektionserfolg verringern. Eine Untersuchung

von VEGA ET AL. (1996) postuliert, dass die Anwesenheit von Allelochemikalien⁹ wie z.B. Catechin, Gallussäure, Salizylsäure, Saponin und Tanin die Überlebensfähigkeit von *I. fumosorosea* einschränkt. Besonders gering war die Infektionsrate beim 20°C Versuch nach 1 Woche. Insgesamt waren die Versuche, bei denen die Käfer nach 1 Woche wieder für die jeweilige Testzeit auf den behandelten Stammabschnitten laufen gelassen wurden die erfolglosesten.

4.3 Folgen der Temperaturerhöhung auf 25°C Inkubationstemperatur auf die Mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./ n-inf.)

Als höchste Inkubationstemperatur wurde 25°C getestet. Es konnte ein direkter und ein indirekter Versuch durchgeführt werden. Die höhere Inkubationstemperatur verkürzte die MLD deutlich. Für die getesteten Pilzarten wurden zum Teil die kürzesten Werte ermittelt. Der direkte Vergleich zwischen allen Testtemperaturen (15°C/20°C/25°C) für ausgewählte Versuche aus der Versuchsreihe der direkten Versuche zeigt hochsignifikante Unterschiede zwischen den Temperaturstufen. Es wird somit belegt, dass mit 25°C die kürzesten MLD-Werte ermittelt werden konnten (vgl. Abschnitt 3). Vor allem für die Pilzarten *M. anisopliae* bei direkter Inokulation und für *I. fumosorosea* bei indirekter Inokulation wurden mit 3,11 und 3,71 Tagen die zweit niedrigsten Werte für alle Versuche und Testtemperaturen gemessen. Bei der höchsten getesteten Temperaturstufe liegt *M. anisopliae* hochsignifikant für den Unterschied der Länge der MLD vor den beiden anderen Pilzarten (vgl. Tab. 10). Die kürzeste MLD bei *I. fumosorosea* (3,71 Tage) konnte bei 25°C und einer Verweildauer von 5min beobachtet werden. In diesem Fall führte die Faktorenkombination längere Verweildauer des Käfers, das sofortige Aufsetzen nach Inokulation der Borke und die höhere Inkubationstemperatur zu einem besonders positiven Ergebnis. Auch mit *B. bassiana* und *I. fumosorosea* konnten bei direkter Inokulation sehr kurze MLD - Werte mit 4,60 bzw. 5,12 Tagen ermittelt werden. Bei der indirekten Inokulation unterscheiden sich die MLD der beiden anderen Pilzarten hingegen nicht signifikant zur Kontrolle und die Werte unterscheiden sich auch nicht erheblich von den 20°C-Versuchen (vgl. Tab. 6).

⁹ Sind in der Regel Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels und werden aus einigen wenigen Ausgangssubstanzen (Aromatische Aminosäuren, einige andere) synthetisiert. Ihre Verbreitung erfolgt in gasförmiger (Verdunstung), flüssiger (Wurzelexsudate, Auslaugen durch Regen, Nebel, Tau) oder fester Form (verrottende Pflanzen bzw. Pflanzenteile).

WEGENSTEINER (1996) stellt bei seinen Untersuchungen für *B. bassiana* fest, dass die besten Effekte bei der 25°C-Temperaturstufe zu beobachten sind. Es bleibt abzuwarten, ob diese Beobachtung auch im Freiland gemacht werden kann. Denn besonders in den Sommermonaten in denen diese hohen Temperaturen im Bestand erreicht werden können, ist auch die Strahlung höher. Die Strahlung wiederum und besonders die darin enthaltenen UV-A und UV-B Anteile gelten als der Hauptmortalitätsfaktor der Pilzsporen (JARONSKI, 2010). Somit wird bei höheren Temperaturen und entsprechender Sonnendisposition der Sporen die Virulenz eher ab als zu nehmen. Als Hauptursache der Virulenzabnahme ist dann ein permanentes Absinken der wirksamen Sporenanzahl durch weitgehendes Absterben aller keimfähigen Konidien zu nennen (PLATTEDE, 1985).

Der Infektionserfolg ist abhängig von der individuellen Resistenz (präinfektionelle Abwehrmechanismen), der Immunität und der genetischen Herkunft des Pilzstamms (vgl. INGLIS ET AL., 2001). Insbesondere aber auch von exogenen Faktoren. Die Solarstrahlung, die Temperatur, die relative Luftfeuchte sowie der Niederschlag und der Wind sind als die infektionshemmende Umweltfaktoren im Freiland zu nennen (JARONSKI, 2010).

Unter Laborbedingungen kann der Faktor Temperatur konstant gehalten werden, dies wird in der Natur nicht der Fall sein. So können unter Umständen in den Sommermonaten zeitweise auch weit höhere Temperaturen als 25°C die potentielle Infektiosität der Sporen herabsetzen. Wenig bekannt ist auch der Einfluss von starken Temperaturschwankungen. INGLIS ET AL. (2001) weisen der Temperatur eine Schlüsselfunktion zu, damit entomopathogene Pilze effizient wirken können. So geben Sie einen optimalen Temperaturbereich zwischen 20°C - 25°C an. Pilzwachstum ist zwar auch unter bzw. über diesen Temperaturen möglich. Dennoch geht die Infektionsrate mit zunehmendem Abstand vom Optimaltemperaturbereich signifikant zurück. Bei 25°C Inkubationstemperatur stieg das Infektionsprozent besonders bei *I. fumosorosea* (82%) an und war bei *M. anisopliae* (92%) das höchste gemessene über alle Versuche. Wie erwartet, war unter Voraussetzung einer hohen Luftfeuchte, bei höherer Temperatur eine bessere Infektionsleistung zu erzielen als bei 15°C und damit einem schon deutlichen Abstand zu den postulierten Optimaltemperaturen. Die Pilzart *I. fumosorosea* kommt besonders häufig in subtropischen und tropischen Klimaten an Insekten vor (ZIMMERMANN, 2008). Scheinbar sind die Sporen deshalb auch bei höheren Temperaturen virulent, was auch die sehr erfolgreichen Infektionsraten bei 25°C zeigten. Ob diese Beobachtung allerdings auch auf Freilandbedingungen übertragbar ist, bleibt zu prüfen. JARONSKI (2010) beschreibt die Konidien von *I. fumosorosea* (noch vor *B. bassiana* und *M. anisopliae*) als besonders empfindlich gegenüber Strahlungseinflüssen, wenn sie im

Freiland angewendet werden. Allerdings muss hier auch von einer gewissen Isolatsensibilität ausgegangen werden. So können verwendete Isolate durchaus über längere Zeiträume auch im Freiland persistent sein. STEPHAN (2012) gibt für einen Laborversuch mit der Pilzart *I. fumosorosea* gegen *Cydia pomonella*, *C. funebrana*, *C. molesta* und *Eupoecilia ambiguella* an, dass sich das hier verwendete Isolat im Vergleich zu anderen insektenpathogenen Pilzarten deutlich länger wirksam zeigte. In 2010 und 2011 durchgeführte Versuche zeigten, dass über den zwei monatigen Untersuchungszeitraum die Wirksamkeit des Pilzes trotz direkter Sonnenexposition und teilweise kräftigen Regengüssen nicht nachließ. Wurden *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* hinsichtlich ihrer Persistenz verglichen, so zeigte *I. fumosorosea* sogar eine deutlich längere Wirksamkeit als *M. anisopliae*. Die längere Verweilzeit von 5 Minuten auf den kontaminierten Stellen in Kombination mit der höheren Temperatur führte bei den Käfern der indirekten Versuche zu einer vergleichsweise höheren Infektionsrate als bei anderen indirekten Versuchen. Mit 42% lag das Infektionsprozent besonders bei *B. bassiana* deutlich über dem Infektionsprozent der indirekten 20°C-Versuche mit 1:30 min Verweildauer. Nur bei dem 3min - sofort Versuch konnte exakt der gleiche Wert ermittelt werden. Auch mit *M. anisopliae* konnte mit 38% ein größerer Anteil der Testkäfer infiziert werden als bei den anderen indirekten Versuchen. Die Unterschiede zur Kontrolle waren hochsignifikant. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die höhere Temperatur positiv i. S. einer kürzeren MLD wirkt und die niedrigere Temperatur die MLD negativ also verlängernd beeinflusst. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den positiven Temperatureinflüssen bei den direkten Versuchen.

An dieser Stelle muss jedoch auch erwähnt werden, dass möglicherweise eine konstante Testtemperatur von 25 °C für die Käfer selbst ungünstig war. So zeigen sich die Lebenserwartungen in der Kontrolle mit 14,24 Tagen und 10,14 Tagen der beiden 25°C-Versuche relativ kürzer zu den anderen Testtemperaturen.

4.4 Wirkungen der Pilzarten auf die Mittlere Lebensdauer (MLD) und die Infektionsrate (% inf./n-inf.) bei auf 15°C reduzierter Inkubationstemperatur

Obwohl das Temperaturoptimum der meisten entomopathogenen Pilzarten zwischen 20°C und 25°C liegt (INGLIS ET AL., 2001) wurde besonders in Annäherung an die Freilandtemperaturen die Wirkung der drei Pilzarten auch bei 15°C geprüft. Bei 15°C Inkubationstemperatur konnten ein direkter und ein indirekter Inokulationsversuch analog zu dem 25°C Versuch durchgeführt werden. Es konnten bei direkter Inokulation bei 15°C

hochsignifikant längere MLD als bei den beiden anderen Temperaturstufen (20°C/25°C) ermittelt werden. Diese Beobachtungen decken sich mit denen von INGLIS ET AL. (2001) zitierten Werten von VESTERGAARD ET AL. (1995) der für die Pilzart *M. anisopliae* eine Verlängerung der MLD um jeweils einen Tag bei 3-5°C Temperaturreduzierung bei Inkubation angibt. Besonders der Vergleich der beiden Temperaturstufen 15°C und 25°C zeigt hochsignifikante Unterschiede für alle Pilzarten und die Kontrolle (vgl. Abschnitt 3). Die ermittelten Unterschiede zeigen deutlich die Tendenz, dass die MLD bei niedrigeren Temperaturen länger werden. Diese Beobachtung deckt sich auch mit von DOBERSKI (1981b) erhobenen Werten für die beiden Pilzarten *B. bassiana* und *I. fumosorosea*. Bei 15°C konnten für infizierte Käfer der Art *Scolytus scolytus* erheblich längere MLD mit einer Länge von 11,40 bzw. 14,00 Tagen im Gegensatz zu den hier ermittelten Werten beobachtet werden. Eine Verringerung der Temperatur hatte aber auch Auswirkungen auf die Infektionsraten besonders in Hinblick auf die indirekte Inokulation. Bei direkter Inokulation konnte in keinem Fall eine Infektionsrate mit einem Spitzenwert von 90% wie bei den anderen getesteten Temperaturstufen erreicht werden. Es konnten bei 15°C keine signifikanten Unterschiede bei den Infektionsraten zwischen den Pilzarten ermittelt werden (vgl. Tab.11).

Bei der Pilzart *B. bassiana* konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Infektionsrate bei direkter Gegenüberstellung ausgewählter Beispiele aus der Versuchsreihe beobachtet werden. Bei den anderen beiden Pilzarten war dies aber zu beobachten (vgl. Abschnitt 3). Obwohl die Käfer bei der indirekten Inokulationsvariante bei 15°C erheblich länger (5min) auf den inokulierten Rindenstellen verblieben, waren die MLD-Werte der Pilzarten deutlich länger als bei der 20°C-Variante mit 3min Verweildauer. Bei der 25°C-Variante waren die MLD der Pilzarten auch deutlich kürzer. Die MLD bei der Pilzart *B. bassiana* war bei indirekter Inokulation sogar um 0,82 Tage länger als der Kontrollwert und damit nicht signifikant. Da keine Infektionen in der Kontrolle vorlagen gibt es keine schlüssige Erklärung für das vorzeitige Absterben der Kontrollkäfer beim indirekten Versuch. Wie erwartet wurde bei der Testtemperatur von 15°C die längste MLD mit 11,80 Tagen für *B. bassiana* bei den indirekten Inokulationen ermittelt. Diese Beobachtung war vergleichbar mit der bei *I. fumosorosea*, denn mit 10,22 Tagen wurde auch hier als die längste MLD bei den direkten Versuchen ermittelt. Dies lässt den Schluss zu, dass sich die MLD bei beiden Pilzarten bei niedriger Temperaturstufe deutlich verlängert.

Besonders drastisch veränderten sich die Werte für die Infektionsrate bei der indirekten Inokulation. Der Infektionserfolg verringerte sich bei allen drei Pilzarten trotz längerer Verweildauer auf nur noch 8% bzw. 20%. Die Beobachtung der geringen Infektionsleistung

bei Temperaturreduktion deckt sich mit den Untersuchungen von DOBERSKI (1981b), der hierzu vor allem für *M. anisopliae* feststellt, dass Gründe hierfür in der Thermophilie der Pilzart liegen.

5 Resümee

Die vorliegende Arbeit und die beschriebenen Ergebnisse liefern eine Einschätzung der behandelten Pilzarten *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* als mögliche Antagonisten gegen *I. typographus*. Darüber hinaus werden die Ergebnisse aus anderen Untersuchungen zur Pilzart *B. bassiana* bestätigt und es wird ein weiterer Beweis für deren Anwendbarkeit als biologische Bekämpfungsmaßnahme erbracht. Bei den direkten Inokulationsversuchen handelt es sich um reine Laboruntersuchungen mit konstanten Bedingungen bzw. Infektionsparametern. Die infektionsbeeinflussenden Parameter, Temperatur, eingesetzte Sporenmenge und Luftfeuchte waren konstant. Untersucht wurde jede der drei Pilzarten in Verbindung mit der Inokulationsart bei den drei im Vorfeld bestimmten Testtemperaturen. Der verwendete Temperaturbereich lag dabei in einem von der Literatur beschriebenen Optimumbereich von 20°C, die 15°C-Testtemperatur stellt das untere Ende dieses Optimumbereichs und die 25°C-Variante das obere Ende dieses Optimumbereichs. Vor allem die 25°C werden in mitteleuropäischen Waldökosystemen konstant nur sehr selten -über wenige Stunden selten über mehrere Tage- und nur während der Sommermonate erreicht. Bei Nachfolgeuntersuchungen sollte vor allem in Hinblick auf die Freilandanwendung in heimischen Waldgebieten deshalb eher mit geringeren Temperaturen und gegebenenfalls auch mit wechselnden Temperaturstufen innerhalb eines Versuchstages getestet werden. Die Luftfeuchte war in den Untersuchungsschalen konstant hoch. Auch dies wird im Freiland selten der Fall sein. Daher sollte auch hier mit wechselnden Feuchtegehalten in Anschlussarbeiten getestet werden.

Bei den indirekten Infektionsversuchen wurde eine praxisnahe Inokulationsmethode - Kontamination der Stammoberfläche- getestet. Die Sporensuspension wurde auf den verwendeten halbierten kurzen Stammabschnitten mittels eines Anstreichverfahrens sehr gründlich aufgetragen. Dieses gründliche Streichverfahren wird im Freiland z.B. auf Windwurfflächen kaum zu bewältigen sein. Sollten die Versuche in größerem Maßstab und außerhalb des Labors wiederholt werden, so muss aus Effizienzgründen auf das praktikablere Spritzverfahren umgestellt werden.

Die Infektionsbedingungen wurden mit Annäherung an eine praktische Applikation zunehmend variabler. Abschließend konnte nicht genau bestimmt werden wie viele Sporen sich wirklich auf den behandelten Stammabschnitten befanden auf denen die Käfer liefen. Es konnte beobachtet werden, dass die Testkäfer gewisse Stellen mieden und sich an anderen akkumulierten. Ob dies primär mit der auf dem Stamm aufgetragenen Sporensuspension

zusammenhang oder ob die Käfer vor dem Laborlicht einfach in dunklere Nischen während der Versuchsausführung auszuweichen versuchten, kann nicht verifiziert werden. Eventuell waren diese dunkleren Stellen z.B. unter einer Borkenschuppe, jene an denen im Vergleich zu anderen Stellen weniger Sporensuspension anhaftete. Es kann möglich sein, dass die Käfer den Sporenbelag wahrnehmen. Welchen Einfluss die heterogene Oberflächenstruktur des Fichtenstammes und welchen Einfluss die Pflanzensekundärstoffe hatten, konnte nicht ermittelt werden. Insgesamt dürften aber all diese Faktoren und deren Kombination zu einer Reduzierung der Effizienz in der Infektionsleistung der getesteten Pilzarten beigesteuert haben. Zumindest die nachlassende Effizienz in Hinblick auf die Infektionsraten geht besonders aus den Untersuchungen zu den indirekten Versuchen deutlich hervor.

Die getroffenen Aussagen gelten nur für die aus den Bodenproben in Hohenlehen stammenden Pilzisolat und deren Vermehrungsgut. Es ist nicht auszuschließen, dass andere Isolate andere evtl. bessere Virulenzeigenschaften hätten zeigen können.

Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen, dass es mit den ausgewählten Methoden möglich ist Pilzinfektionen mit den drei untersuchten Pilzarten *B. bassiana*, *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* bei *I. typographus* erfolgreich hervorzurufen. Sowohl mit den direkten als auch mit den indirekten Versuchsvarianten waren bei jedem Versuch und j jeder Temperaturstufe Infektionen zu erzielen. Wenn gleich auch die Infektionsraten bei den indirekten Versuchen deutlich niedriger waren. Insgesamt zeigen die Versuche sowohl bei jeder einzelnen Pilzart als auch bei den unterschiedlichen Testtemperaturen im Vergleich gesehen hohe Variationsbreiten, sowohl in der Länge der Mittleren Lebensdauer (MLD) als auch in der Höhe der Infektionsraten (% inf.). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die direkten Inokulationsversuche erfolgreicher verliefen, vor allem in Bezug auf die Infektionsraten. Die direkte Inokulation bewirkte regelmäßig höhere Infektionsraten als die indirekte Inokulation, bei allen drei Pilzarten. Dies könnte obwohl nicht quantifiziert u. a. auch an einer höheren Sporendosis bei der direkten Inokulation gelegen haben. Außerdem begünstigte die räumliche Nähe und die Haltung von deutlich mehr Käfern pro Flächeneinheit in den Petrischalen bei den direkten Inokulationen sicher die Übertragung von Sporen untereinander und führte wahrscheinlich zu höheren Infektionsraten. Besonders das gemeinsame Ausschütten der Käfer nach dem Schwenken in Sporensuspension ergab hohe gegenseitige Übertragungsszenarien.

Die Temperatur hatte signifikante Auswirkungen auf die beiden geprüften Kriterien MLD und % inf., sowohl bei den direkten als auch bei den indirekten Versuchen. So konnte mit steigender Temperatur eine sinkende MLD bei den ausgewählten drei Versuchen bei direkter Inokulation beobachtet werden (Abb. 19/ Tab. 12). Analog dazu stiegen mit einer

Temperaturerhöhung die Infektionsraten zumindest bei den Pilzarten *I. fumosorosea* und *M. anisopliae* bei den ausgewählten direkten Inokulationen an (Abb. 20/ Tab.13). Die Ergebnisse der direkten Versuche weisen eine hohe Variation bei den verschiedenen Testtemperaturen auf. Insgesamt waren die Versuche bei der hohen Testtemperatur von 25°C erfolgreicher als bei der um 5°C (20°C) bzw. 10°C niedrigeren Testtemperatur von 15°C.

Wurden bei den indirekten Inokulationsversuchen die Käfer sofort nach der Sporenapplikation aufgesetzt, konnten im Gegensatz zu den Nachfolgeversuchen nach 1 Woche mehr Infektionen erzielt werden. Je länger die Verweilzeit der Testindividuen bei den sofortigen indirekten Versuchen auf dem Stamm war, umso höher war der Infektionserfolg. Auch hier wurde eine Temperaturabhängigkeit sichtbar, bei niedriger Temperatur konnte auch eine längere Verweilzeit der Käfer auf dem Stamm keine höheren Infektionsraten hervorbringen (vgl. Tab. 16). Bei indirekter Inokulation gab es keine signifikanten Unterschiede in der MLD zwischen sofort angesetzten Käfern und nach einer Woche angesetzten Käfern nach 1:30min Aufenthaltsdauer. Bei der Variante 1:30min sofort und 3min + 1 Woche trat nur bei *M. anisopliae* eine signifikant kürzere Lebensdauer auf.

Weitere hier nicht getestete Funktionsparameter müssen in nachfolgenden Untersuchungen geprüft werden und mit den hier erzielten Ergebnissen kombiniert analysiert werden. Um Funktionsparameter wie das Raum-/Zeitverhalten, wechselnde Temperaturniveaus und jahreszeitliche Einflüsse zu testen sind nachfolgend besonders Freilandversuche unter vollem und wechselndem UV-Licht-Einfluss und schwankenden Temperatur- und Niederschlagseinflüssen nötig. Einhergehend dazu müssen besonders Suspensionsformulierungen und Ausbringungstechniken getestet werden. Haftsuspensionen mit UV-Schutzzusätzen für Stämme müssen dabei, aufgrund der UV-Empfindlichkeit der Konidien der verwendeten Pilzarten, besonders erprobt werden. Bei den Ausbringungstechniken werden Sprüh-/Spritzverfahren dem Anstreichen vorgezogen werden müssen um das Sporenmaterial möglichst effizient auf größeren Waldflächen und besonders auf Windwurfflächen ausbringen zu können. Das Streichverfahren bzw. die hier vorgenommene Einarbeitung der Sporensuspension auf die Teststämme kann vorrangig nur in Laborversuchen in kleinen Maßstäben oder an Einzelbäumen geleistet werden. Als günstig einzuschätzen ist sicher die Kombination mit Pheromonfallen, in denen sich die Käfer inokulieren können um dann wieder in Freiheit zu gelangen. Es besteht kein Zweifel darüber, dass es dadurch zu günstigen Weiterverbreitungsszenarien kommt.

Eventuell weiter zu untersuchen sind die Auswirkungen der Nahrungsqualität im Jahresverlauf (Frühjahr, Sommer, Herbst) und die individuelle Fitness bzw. die daraus

resultierende Sensitivität der Käfer im Bezug auf die Empfänglichkeit für Mykosen. Während der Untersuchungen wurde das Alter der Käfer bzw. Grad der Aushärtung des Chitinpanzers nicht weiter untersucht. Allerdings ist anzunehmen, dass bei jüngeren Käfern mit weicherem Exoskelett noch höhere Infektionsraten erzielbar wären.

Prinzipiell scheint der Einsatz der drei hier getesteten entomopathogenen Pilzarten als „biologische Kontrollmaßnahme“ geeignet, um als Ergänzung in der biologischen Schädlingskontrolle zu den gängigen Praktiken der sanitären Fällung und Entrindung befallener Stämme, der Verwendung von Pheromonfallen und der chemischen Behandlung von Stämmen, Anwendung zu finden. Die Untersuchungen zeigen aber, dass ein schneller „Knock-Down-Effekt“ bzw. eine kurzfristig hohe Abtötungswirkung vergleichbar mit der Wirkung eines klassischen chemischen Insektizids nicht realisierbar ist und dass besonders bei indirekter Anwendung die Infektionsleistung deutlich zurückgeht. Wie bereits unter 1.2 erwähnt, kann aus den Untersuchungen gefolgert werden, dass die Vorteile der Anwendung dieser drei entomopathogenen Pilzarten im präventiven Schädlingsmanagement und bei niedrigen Schädlingsabundanz liegen. Ein permanentes Schädlingsmonitoring ist deshalb untrennbar mit der Anwendung von entomopathogenen Pilzarten verknüpft.

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Illustrativer Überblick des Wachstums eines entomopathogenen Pilzes durch das Integument eines Insekts (www.nature.com). Darstellung zeigt: 1. Perkutaner Infektionsweg durch Anlagerung der Spore an das Integument des Insekts, 2. Keimung der Spore und Ausbildung des Appresoriums 3. Penetrationsprozess 4. Ausbildung der Blastosporen in der Hämolymphe und Bildung verschiedener pilzbürtiger Toxine	11
Abb.2:	Auswachsen der Pilzart <i>B. bassiana</i> aus einem mittels Sporensuspension ($1-2 \times 10^7$) infizierten <i>I. typographus</i>	12
Abb.3:	Makroskopische Aufnahme des auswachsenden Myzels und der Konidiosporen der Pilzart <i>B. bassiana</i>	13
Abb.4:	Mikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart <i>B. bassiana</i>	13
Abb.5:	Elektronenmikroskopische Detailaufnahme von Sporen der Pilzart <i>B. bassiana</i> am Exoskelett eines infizierten <i>I. typographus</i>	14
Abb.6:	Makroskopische Aufnahme des auswachsenden Myzels und der Konidiosporen der Pilzart <i>M. anisopliae</i>	15
Abb.7:	Mikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart <i>M. anisopliae</i>	16
Abb.8:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart <i>M. anisopliae</i> auf dem Caput und dem Halsschild eines infizierten <i>I. typographus</i>	17
Abb.9:	Makroskopische Aufnahme des auswachsenden Myzels und der Konidiosporen der Pilzart <i>I. fumosorosea</i>	18
Abb.10:	Mikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart <i>I. fumosorosea</i>	19
Abb.11:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Sporen der Pilzart <i>I. fumosorosea</i>	19
Abb.12:	Gesamtüberblick zu den direkten und indirekten Versuchen	29
Abb.13:	Kumulative Mortalität (in %) von <i>I. typographus</i> verursacht durch die drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (1. Versuch)	32

Abb.14: Kumulative Mortalität (in %) von <i>I. typographus</i> verursacht durch die drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (2. Versuch).....	34
Abb.15: Kumulative Mortalität (in %) von <i>I. typographus</i> verursacht durch die drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (3. Versuch).....	34
Abb.16: Kumulative Mortalität (in %) von <i>I. typographus</i> verursacht durch die drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (4. Versuch).....	36
Abb.17: Kumulative Mortalität (in %) von <i>I. typographus</i> verursacht durch die drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (5. Versuch).....	42
Abb.18: Kumulative Mortalität (in %) von <i>I. typographus</i> verursacht durch die drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (6. Versuch).....	44
Abb.19: Übersicht zu den MLD der drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach den direkten Inokulationen (3sec.) und MLD der unbehandelten Kontrollen bei den drei verschiedenen Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C (V5,V1, u. V6 = Versuch 5,1 und 6)	49
Abb.20: Übersicht zu den Infektionsraten (% inf.) der drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) bei <i>I. typographus</i> nach den direkten Inokulationen (3sec.) bei den drei verschiedenen Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C (V5,V1, u. V6 = Versuch 5,1 und 6)	51
Abb.21: Kumulative Mortalität (in %) von <i>I. typographus</i> verursacht durch die drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach indirekter Inokulation (1:30min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7a)	54

- Abb.22: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (1:30min) und Aufsetzen nach 1 Woche und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7b) 56
- Abb.23: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (3:00min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8a)....
.....58
- Abb.24: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (3:00min) und Aufsetzen nach 1 Woche und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8b) 60
- Abb.25: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (5:00min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (9. Versuch) 62
- Abb.26: Kumulative Mortalität (in %) von *I. typographus* verursacht durch die drei Pilzarten (*Bb* = *B. bassiana*, *If* = *I. fumosorosea*, *Ma* = *M. anisopliae*) nach indirekter Inokulation (5:00min) und sofortigem Ansetzen der Käfer und Referenzmortalität der unbehandelten Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (10. Versuch) 64

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht möglicher Anwendungsstrategien (aus MÜLLER-KÖGLER, 1965; HAJEK, 2004; SCHMUTTERER UND HUBER, 2005;)	6
Tab. 2:	Gesamtübersicht zu den Pilzarten <i>B. bassiana</i> , <i>I. fumosorosea</i> und <i>M. anisopliae</i> (aus BUTT, ET AL. (2001); TANADA & KAYA (1993); ZIMMERMANN, (2007a,b); ZIMMERMANN (2008))	21
Tab. 3:	Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% i nf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (1. Versuch)	33
Tab. 4:	Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% i nf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (2. Versuch)	35
Tab. 5:	Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% i nf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (3. Versuch)	37
Tab. 6:	Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% i nf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (4. Versuch)	39

Tab. 7:	Gesamtergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (1. - 4. Versuch).....	41
Tab. 8:	Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (5. Versuch).....	43
Tab. 9:	Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (6. Versuch).....	45
Tab. 10:	Ergebnisse für die Signifikanzen Mittlere Lebensdauer (MLD) der einzelnen Pilzarten untereinander (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C	50
Tab. 11:	Ergebnisse für die Signifikanzen der Infektionsraten (% inf.) der einzelnen Pilzarten untereinander (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) nach direkter Inokulation (3sec.) für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C	48
Tab. 12:	Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD) und Signifikanzen (Sign./MLD) der drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3sec.) und Referenzwerte für die unbehandelten Kontrollen bei den drei Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C (V5, V1 und V6= Versuch 5,1 und 6).....	50
Tab. 13:	Ergebnisse für die Infektionsraten (% inf.) und Signifikanzen (Sign./%inf.) bei <i>I. typographus</i> nach direkter Inokulation (3 sec.) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) bei den drei Testtemperaturen 15°C/20°C/25°C	51

Tab. 14: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach indirekter Inokulation (1:30min sofort) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7a)	55
Tab. 15: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach indirekter Inokulation (1:30min) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Aufsetzen nach 1 Woche und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 7b)	57
Tab. 16: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach indirekter Inokulation (3:00min) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8a)	59
Tab. 17: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach indirekter Inokulation (3:00min +1 Woche) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 20°C (Versuch 8b)	61
Tab. 18: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach indirekter Inokulation (5:00min) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 15°C (9. Versuch)	63
Tab. 19: Ergebnisse für die mittlere Lebensdauer (MLD), Infektionserfolg (% inf.) und Signifikanzen (Sign./MLD/% inf.) bei <i>I. typographus</i> nach indirekter Inokulation (5:00min) mit den drei Pilzarten (<i>Bb</i> = <i>B. bassiana</i> , <i>If</i> = <i>I. fumosorosea</i> , <i>Ma</i> = <i>M. anisopliae</i>) und Referenzwerte für die unbehandelte Kontrolle bei einer Testtemperatur von 25°C (10. Versuch)	65

Tab. 20: Ergebnisse für die Signifikanzen der Mittleren Lebensdauer (MLD) der einzelnen Pilzarten (Bb = <i>B. bassiana</i> , If = <i>I. fumosorosea</i> , Ma = <i>M. anisopliae</i>) untereinander nach indirekter Inokulation für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C	67
Tab. 21: Ergebnisse für die Signifikanzen der Infektionsrate (% inf.) der einzelnen Pilzarten (Bb = <i>B. bassiana</i> , If = <i>I. fumosorosea</i> , Ma = <i>M. anisopliae</i>) untereinander nach indirekter Inokulation für die Versuche 1-4 bei 20°C Testtemperatur und für die beiden Testtemperaturen 15°C und 25°C	68
Tab. 22: Vergleich zwischen direkter Inokulation (3sec.) und indirekter Inokulation (1:30min sofort) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten	69
Tab. 23: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (1:30min sofort) und indirekter Inokulation (1:30min + 1 Woche) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten.....	70
Tab. 24: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (1:30min sofort) und indirekter Inokulation (3:00min) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten	71
Tab. 25: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (1:30min sofort) und indirekter Inokulation (3:00min + 1Woche) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten.....	72
Tab. 26: Vergleich zwischen indirekter Inokulation (3min sofort) und indirekter Inokulation (3:00min + 1Woche) bei gleicher Testtemperatur von 20°C und Signifikanzen (MLD/ % inf.) zwischen den Pilzarten	72

Literaturverzeichnis

- ALTENKIRCH, W.; MAJUNKE, C.; OHNESORGE, B.; (2002): Waldschutz auf ökologischer Grundlage. Eugen Ulmer GmbH & Co. Stuttgart; S. 59-104
- BUTT, T. M.; JACKSON C.; MAGAN, N. (2001): Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CAB International 198 Madison Avenue New York NY 10016-4341 USA, S. 1-69
- CORY, J. S.; ERICSSON, J. D.; (2009): Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *BioControl* 2010 55:75–88
- DOBERSKI, J. W.; (1981a): Comparative Laboratory Studies on three Fungal Pathogens of the Elm Bark Beetle *Scolytus Scolytus*: Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus* to Larvae and adults of *S. Scolytus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37; S. 188-194
- DOBERSKI, J. W.; (1981b): Comparative Laboratory Studies on three Fungal Pathogens of the Elm Bark Beetle *Scolytus Scolytus*: Effect of Temperature and Humidity on Infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37; S. 195-200
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C.; (2001): Suggestions for unifying the terminology of biological control. *BioControl* 46: 387-400
- FAHRMEIR, L.; KÜNSTLER, R.; PIGEOT, I.; TUTZ, G.; (2003): Statistik: Der Weg zur Datenanalyse. 4. Auflage: Springer-Lehrbuch Berlin, Heidelberg, New York; S.467, 519
- FARGUES, J., GOETTEL, M.S., SMITS, N., OUEDRAOGO, A., VIDAL, C., LACEY, L.A., LOMER, C.J. AND ROUGIER, M. (1996): Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* 135, 171-181
- FRANZ, J. M.; KRIEG, A.; (1972): Biologische Schädlingsbekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin Hamburg
- HAJEK, A. E.; (2004): Natural Enemies: An Introduction to Biological Control, 289-337 University Press Cambridge S. 4-61

- INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. (2001): Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pests. In BUTT, T. M.; JACKSON C.; MAGAN, N. (2001): Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CAB International 198 Madison Avenue New York NY 10016-4341 USA
- JARONSKI, S.; (2010): Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. S. 159- 185 in ROY, H.; VEGA, F.; CHANDLER, D.; GOETTEL, M.; PELL, J.; WAJNBERG, E. (2010): The Ecology of Fungal Entomopathogens. Springer Dordrecht Heidelberg London NewYork
- KELLER, S., ZIMMERMANN, G. (1989): Mycopathogens of soil insects. In WILDING, N.; COLLINS, N.M.; HAMMOND, P.M.; WEBBER, J.F.(ed.). Insect – fungus interactions. London: Academic Press, 1989, S.240-269
- KELLER, S., EPPER, C., WERMELINGER, B.; (2004): *Metarhizium anisopliae* as a new pathogen of the spruce bark beetle *Ips typographus*. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft 77, S. 121-123
- KREHAN, H.; STEYRER, G. (2006): Borkenkäfersituation und Borkenkäfer-Monitoring 2005. In Forstschutzsituation 2005 in Österreich Erhebungen und Diagnosen des BFW und Dokumentation der Waldschädigungsfaktoren 2005. Forstschutz Aktuell Nr. 35; S.10-14
- KREUTZ, J., VAUPEL, O.; ZIMMERMANN, G. (2004a): Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. Journal of Applied Entomology 128 (6), 384-389
- KREUTZ, J., VAUPEL, O.; ZIMMERMANN, G. (2004b): Horizontal Transmission of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* among the Spruce Bark Beetle, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) in the Laboratory and under Field conditions. Biocontrol Science and Technology Vol.14, No. 8, S. 837-848
- LANDA Z., HORNAK P., OSBORNE L.S., NOVAKOVA A.; BURSOVA E. (2001): Entomogenous fungi associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in the Bohemian Forest. Silva Gabreta Vol. 6, S. 259-272

- MCLEOD D.M. ,1954: Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium*. Limber. Canadian Journal of Botany 32: 818-890
- MÜLLER-KÖGLER, E. (1965): Pilzkrankheiten bei Insekten. Paul Parey in Berlin und Hamburg
- PLATTEDER, W. (1985): Untersuchungen zur Mikrobiologie und Pathogenität des insektentötenden Pilzes *Beauveria bassiana* (Vuill.) Bals. (Fungi imperfecti). Diplom-Arbeit am Lehrstuhl für angewandte Zoologie der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.
- ROY, H.; VEGA, F.; CHANDLER, D.; GOETTEL, M.; PELL, J.; WAJNBERG, E.; (2010): The Ecology of Fungal Entomopathogens. 2010 Springer Dordrecht Heidelberg London NewYork S. 75
- SCHAERFFENBERG, B. (1957): Infektions- und Entwicklungsverlauf des insektentötenden Pilzes *Beauveria bassiana* (Vuill.) Link. Zeitschrift für angewandte Entomologie 41; S. 395-402
- SCHMUTTERER, H.; HUBER, J.; (2005): Natürliche Schädlingsbekämpfungsmittel. Eugen Ulmer GmbH &Co S.87-109
- SCHWENKE, W.; (1996): Grundzüge des Massenwechsels und der Bekämpfung des Großen Fichtenborkenkäfers *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae). Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz 69, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin; S. 11-15
- SCHWERDTFEGER, F.; (1981): Die Waldkrankheiten. Ein Lehrbuch der Forstpathologie und des Forstschutzes. Verlag Paul Parey Hamburg und Berlin; S. 191-192; 294-300
- SEVIM; A.; DEMIR, I.; TANYELI, E.; DEMIRBAG, Z. (2010): Screening of entomopathogenic fungi against the European spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidea). Biocontrol Science and Technology, Vol. 20, No. 1, 3-11
- SMITH, P.; (1993): Control of *Bemisia tabaci* and the Potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a Biopesticide. Biocontrol News and Information 14

- STEINWENDER, B. M.; (2007): Wirkung des insektenpathogenen Pilzes *B. bassiana* (Bals.) Vuill. auf den Borkenkäfer *Ips sexdentatus* (Boern.) und den Borkenkäfer räuber *Tanasimus formicarius* (L.) Diplomarbeit Universität Wien
- STEPHAN, D.; (2012): Biologischer Pflanzenschutz II Sektion 43. 58. Deutsche Pflanzenschutztagung. „Pflanzenschutz – alternativlos“, 10.-14. September 2012, Braunschweig 282 Julius-Kuhn-Archiv,438
- STEYRER, G., KREHAN, H.; (2009): Borkenkäfer-Kalamität 2008: Ist ein weiterer Rückgang wahrscheinlich? Forstschutz Aktuell Nr. 46; S.9-15
- TANADA, Y.; KAYA, H.; (1993): Insect Pathology. Academic Press 1250 Sixth Avenue, San Diego California S.319 -361
- VEEN, KH.; FERRON, P. (1966): A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarrhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 8:268-269
- VEGA, F.; DOWD P.; MCGUIRE M.; JACKSON M; NELSEN T.; (1996): In vitro effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal of Invertebra Pathology 1997; 70: S. 209–213.
- VESTERGAARD, S., BUTT, T. M., GILLESPIE, A. T., SCHREITER, G., EILENBERG, J.(1995): Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. Biocontrol Science and Technology 5. S.185-192.
- WEBER, H.; (1993): Allgemeine Mykologie. Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart S. 422-435
- WEGENSTEINER, R.; FÜHRER, E. (1988): Zur Wirksamkeit von *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. gegen *Hylobius abietis* L. [Col.: Curculionidae]. Entomophaga 33 (3), S.339-348
- WEGENSTEINER, R.; (1996): Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). IOBC/wprs Bulletin 19 (9), S. 186-189

- WERMELINGER, B.; (2004): Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*- a review of recent research. *Forest ecology and Management* 202 (2004); S. 67-82
- WIZE, M.C.; (1904): Die durch Pilze hervorgerufenen Krankheiten des Rübenrüsselkäfers (*Cleonus punctiventris* Germ.) mit besonderer Berücksichtigung neuer Arten, *Bulletin International de L'Academie des Sciences de Cracovie, Classe des Sciences Mathematique et Naturelles*, S.713-727
- ZIMMERMANN, G.; (2007a): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. in *Biocontrol Science and Technology*, 17 (5/6); S. 553-596
- ZIMMERMANN, G.; (2007b): Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17:9; S. 879-920
- ZIMMERMANN, G.; (2008): The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formely *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formely *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology* Vol. 18, No. 9; S. 865-901