

# PHRAME – eine EU-Forschungskooperation: Wie gefährlich ist der Kiefernspiltholznematode für Europa?

Ute HOYER-TOMICZEK und Christian TOMICZEK

## Abstract

### PHRAME – an EU Research cooperation

Detection of pinewood nematode in Portugal has increased the threat to the EU from this extremely dangerous pest. The key objective for this project is to develop an improved Pest Risk Analysis methodology that can be used at both local and regional scales to assess the significance of a plant health threat and, by use of a core model, to assess the consequences of outbreaks. Seven research institutes of six nations cooperate within this project, which is funded by the European Union. Within this project the Austrian team is in charge of vector survey and vector biology and the development of early detection methods.

Vector survey in Austria was carried out by using pheromone-, wood-log traps and traps with burned wood material. No *Monochamus* beetles were caught by the different traps. The studies of the *Monochamus* biology showed, that the beetles make a maturation feeding during their whole life with a peak during the first two weeks. Under laboratory conditions *Monochamus galloprovincialis pistor* beetles stayed alive for 53-94 days. Female beetles died 1 – 2 weeks earlier than male beetles.

Three different methods (bioacoustics, electrical conductivity and measurement of resin flow) were tested for early detection of effected trees. So far, best results were achieved by measurement of resin flow.

Die ständig steigenden Mengen an gehandelten Waren in der ganzen Welt erhöhen das Risiko, dass Krankheiten und Schädlinge zwischen den Ländern (Kontinenten) und Ökosystemen verschleppt werden. Viele solcher Krankheiten und Schädlinge werden mit Pflanzen und/oder Pflanzenprodukten verbracht. Die Pflanzenschutzdienste der Länder sollen die Einschleppung, Ansiedlung und Ausbreitung gefährlicher Schadorganismen verhindern. Eine Voraussetzung dafür ist eine rasche und eindeutige Identifizierung solcher Schadorganismen und von deren Überträgern (Vektoren), wobei zunehmend molekularbiologische Diagnosemethoden eingesetzt werden. Weiters ist entscheidend, dass man das Gefährdungspotenzial, die Auswirkungen auf das Ökosystem bei Etablierung eines Schadorganismus und Möglichkeiten deren Verhinderung kennt. Dies wird als „Pest Risk Analysis“ (PRA) bezeichnet. Dabei greift man auf die Erfahrungen aus schon stattgefundenen Einschleppungen von Schadorganismen und deren Auswirkungen auf ihre Umwelt in ihren ursprünglichen Verbreitungsgebieten zurück. Dazu sind umfangreiche Kenntnisse über die Biologie der Schadorganismen und deren Wechselspiel mit der Umwelt notwendig.

Der Kiefernspiltholznematode *Bursaphelenchus xylophilus* ist einer der weltweit am meisten gefürchteten Schädlinge und hat für die Europäische Union Quarantänestatus. Die Einschleppung von *B. xylophilus* nach und

**PHRAME** ist eine EU-Forschungskooperation und steht für „**Development of Improved Pest Risk Analysis techniques for quarantine pests, using Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Portugal as a Model System**“. Es kooperieren sechs EU-Staaten: Großbritannien (Projekt-Koordinator), Deutschland, Portugal, Spanien, Österreich und Frankreich. Beteiligt sind sieben Forschungsinstitutionen: Forestry Commission Research Agency (UK), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (D), Universidade de Évora (P), Departamento de Agroecologia (E), Bundesforschungs- und Ausbildungszentrum für Wald, Naturgefahren und Landschaft (A), INRA Interactions Plantes Microorganismes et Santé Végétale (F), INIA Instituto Nacional de Investigação Agrária (P).

Das Projekt gliedert sich in neun Arbeitsgebiete, in denen übergreifend die verschiedenen Institutionen tätig sind:

1. Vektor-Surveys und Untersuchung der Vektor-Biologie in den beteiligten Ländern, insbesondere von *Monochamus*-Arten, Diagnose verschiedener *Monochamus*-Arten;
2. *Bursaphelenchus sp.*-Surveys, Suche nach Welkeerscheinungen bei Kiefern, Quantifizierung der Nematoden-Vektor-Beziehung in Portugal, Spanien und Frankreich;
3. Sammlung von öko-klimatischen Daten, Entwicklung von Submodellen und Vorhersage von Kiefernwelke-Risiko-Gebieten;
4. Entwicklung von Methoden zur Früherkennung der Kiefernwelke an lebenden Bäumen;
5. Etablierung von Nematoden-Kulturen, deren Massenvermehrung und Cryokonservierung;
6. Evaluierung der Pathogenität der portugiesischen *B. xylophilus*-Population in europäischen Kiefern und Modell-Konstruktion;
7. Definition des Einschleppungsweges von *B. xylophilus* nach Portugal anhand verschiedener *B. xylophilus*-Isolate und Entwicklung von Einschleppungs-Modellen;
8. Neuer Literatur-Überblick und Verwendung phänologischer Daten zur Entwicklung von Sub-Modellen;
9. Entwicklung von „response surface models“ und CLIMEX-Analysen und deren Einbeziehung in ein neues PRA-Prozess-Modell, welches anhand von *B. xylophilus* und *Monochamus ssp.* als Testorganismen getestet und verifiziert werden soll. Entwicklung von Schädlings-Management-Szenarien für Portugal und für das restliche Europa.

seine Entdeckung 1999 in Portugal machte die rasche Entwicklung von Management- und Bekämpfungsstrategien notwendig. Die Befallsfläche von *B. xylophilus* in Portugal nahe der Hafenstadt Setúbal vergrößerte sich von 309.000 ha im Jahr 2000 auf 617.000 ha im Jahr 2004. Die jährliche Anzahl der Bäume mit Kiefernwelkesymptomen stieg von 53.487 im Jahr 2000 auf 85.086 im Jahr 2004, welche alle vernichtet werden mussten. Untersuchungen des aktuellen *B. xylophilus*-Befalls in Portugal, der Auswirkungen auf das Ökosystem und Entwicklung von Methoden zur Bekämpfung sollen zu einer verbesserten PRA und damit zu besseren Management- und Bekämpfungsstrategien für die EU führen.

Dies waren auch die Startvorgaben für die EU-Forschungskooperation PHRAME (siehe Kasten). Die Hauptaufgaben des Instituts für Waldschutz des BFW in Wien sind

- die morphologische und molekularbiologische Diagnose verschiedener *Monochamus*-Arten, die als Hauptvektoren von *B. xylophilus* gelten,
- Untersuchungen im Freiland und im Labor zur Biologie von in Österreich heimischen *Monochamus*-Arten (zwecks Vergleich mit portugiesischen, spanischen und französischen Arten),
- die Entwicklung möglicher Methoden zur Früherkennung von Nematoden- bzw. *Monochamus*-Befall stehender Bäume und
- die Zusammenstellung Österreich spezifischer öko-klimatischer Daten als Grundlage für PRA-Modelle.

### **Monochamus-Surveys**

Um einen Überblick über die Verbreitung der verschiedenen *Monochamus*-Arten zu erhalten, wurden in den beteiligten Ländern Portugal, Spanien, Frankreich und Österreich Erhebungen (Surveys) durchgeführt.

In den Sommern 2003, 2004 und 2005 wurde versucht, *Monochamus sp.* in verschiedenen Kiefernbeständen (*Pinus sylvestris* und *Pinus nigra*) in Niederösterreich, wo Kiefernsterben festgestellt wurde, zu sammeln mit:

- Pheromonfallen,
- „Knüppelfallen“, die mit frischen Kiefernast- und Stammstücken bestückt waren,
- „Brandknüppelfallen“ (Abbildung 1), die als Lockstoff angebrannte Kiefernast- und Stammstücke enthielten, weil *Monochamus sp.* gerne Kiefernbrandflächen aufsuchen,
- Fangbäume verschiedener Nadelbaumarten und
- freier Fang.

In den Fallen wurden keine *Monochamus*-Käfer gefangen, sondern nur vereinzelt Borkenkäfer (*Pityogenes spp.*), Bockkäfer der Gattung Callidiini, Waldbock (*Spondylus buprestoides*), Rosenkäfer (*Liocola lugubris*) und Hirschkäfer (*Lucanus cervus*). Die Lockwirkung der Brandknüppel-

falle war nicht besser als die der normalen Knüppelfalle oder der Pheromonfalle, obwohl an einem Standort nachweislich *Monochamus* sp. vorkamen. Die Beifänge waren vergleichbar.

Mit den Fangbäumen und durch freien Fang wurden in Niederösterreich in einer Forstverwaltung (600–1200 m Seehöhe) im Jahr 2003 ein *M. galloprovincialis pistor* (Abbildung 2), vier *M. sartor* (Abbildung 3) und sieben *M. sutor* (Abbildung 4), 2004 drei *M. sartor* und neun *M. sutor*, 2005 elf *M. sartor* und sieben *M. sutor* gefangen.

### Monochamus-Biologie

Für die Untersuchung des Schlupfzeitraumes wurde im März 2004 der Stamm einer in Kärnten gefällten 80-100 Jahre alten Weißkiefer (*Pinus sylvestris*) mit *Monochamus*-Befall in sieben Stücke von ca. 50 cm Länge geschnitten. Die Stammstücke wurde bis Juni in einem Freiland-Insektarium, danach im Labor zur besseren Kontrolle verwahrt. Aus zwei der sieben Stücke schlüpften innerhalb von zwei Juliwochen 14 *M. galloprovincialis pistor*-Käfer.

Zur Beobachtung der Lebensdauer, des Reifungsfraßes sowie des Paarungs- und Eiablageverhaltens wurden im Sommer 2004 sieben Paare von *M. galloprovincialis pistor*, ein Paar und sieben einzelne Weibchen von *M. sutor* sowie ein Paar und ein einzelnes Männchen von *M. sartor* in Käfigen zusammen mit Futterpflanzen und -zweigen sowie Brutmaterial kultiviert (Abbildung 5). Sämlinge und Zweige älterer Weißkiefern (*Pinus sylvestris*) wurden *M. galloprovincialis pistor*, Weißkiefern sämlinge und Fichtenzweige (*Picea abies*) wurden *M. sutor* und *M. sartor* als Futtermaterial angeboten. Das Brutmaterial für *M. galloprovincialis pistor* bestand aus *Pinus sylvestris*-Ast- und Stammstücken mit vier verschiedenen Durchmessern, für



Abbildung 1:  
Brandknüppelfalle mit angebrannten *Pinus sylvestris* Ast- und Stammstücken

Figure 1:  
Burned wood-log trap with burned branches and stem pieces of *Pinus sylvestris*

Abbildung 2:  
*Monochamus galloprovincialis pistor* Männchen

Figure 2:  
*Monochamus galloprovincialis pistor* male

Abbildung 3:  
*Monochamus sartor* Männchen

Figure 3:  
*Monochamus sartor* male

Abbildung 4:  
*Monochamus sutor* Männchen

Figure 4:  
*Monochamus sutor* male

*M. sartor* und *M. sutor* aus *Picea abies*-Stammstücken. Die gesamte Lebenszeit konnte für *M. galloprovincialis pistor* beobachtet werden, für *M. sartor* und *M. sutor* nur die Zeit nach dem Fang. *M. galloprovincialis pistor*-Käfer lebten 53-96 Tage (7-13,5 Wochen), *M. sutor* 13-35 Tage (2-5 Wochen) und *M. sartor* 12-41 Tage (2-6 Wochen) in Gefangenschaft. In Bezug auf die einzelnen Paare starben die Weibchen durchschnittlich ein bis zwei Wochen früher als die Männchen, vermutlich durch das Kraft raubende Eierlegen.

Der Reifungsfraß von *Monochamus* sp. ist hinsichtlich seiner Vektorrolle für *B. xylophilus* von Bedeutung. Während der Käfer durch Nagen an der Rinde oder an den Nadeln dem Baum Wunden zufügt, lockt der Harzduft potenziell unter den Flügeldecken und in den Tracheen sitzende Nematoden an, so dass diese sich vom Käfer in die entstandenen Wunden fallen lassen, sich von Zelle zu Zelle fortbewegen und somit den Baum befallen. Für die Verbreitung von *B. xylophilus* mit Hilfe von *Monochamus* sp. bzw. diesbezügliche Bekämpfungsmaßnahmen sind die Dauer, die Intensität und der Ort des Reifungsfraßes wichtig. Der Reifungsfraß von *M. galloprovincialis pistor* und auch von *M. sutor* und *M. sartor* ist in den ersten beiden Lebenswochen sehr intensiv. *M. galloprovincialis pistor* fressen intensiv an der Basis der Nadeln und verursachen deren vollständigen Fall (Abbildung 6). Der Reifungsfraß findet auch sehr stark an den Nadeln selbst und an der Rinde statt. Der Reifungsfraß von *M. sutor* und *M. sartor* erfolgt intensiv an der Rinde und an der Basis der Nadeln, wobei die *Picea abies*-Zweige den *Pinus sylvestris*-Sämlingen bevorzugt werden. Nach den ersten zwei Wochen nimmt die Intensität des Reifungsfraßes deutlich ab, aber die Käfer fressen ihre gesamte Lebenszeit über an der Nadelbasis und Rinde, so dass am Ende die Zweige vollständig entrindet sind (Abbildung 7).

Das Brutmaterial der *Monochamus*-Paare von 2004 wurde bis zum Herbst im Labor, über den Winter bis Mitte Mai 2005 im Freiland-Insektarium gelagert. Die F1-Generation der sieben *M. galloprovincialis pistor*-Paare schlüpfte im Zeitraum Ende Mai bis Anfang September mit Schwerpunkten in der zweiten und vierten Juniwoche und dritten und vierten Juliwoche. Insgesamt schlüpften 73 *M. galloprovincialis pistor* im Verhältnis 1:2 Männchen:Weibchen (28:45). Die Brutholzdimension, aus der die meisten Käfer (37 = 50,7 %) schlüpften, war die zweitstärkste von den angebotenen mit 6-8 cm Durchmesser. Aus dem Brutholz mit dem stärksten Durchmesser (9-12 cm) schlüpften 21 Käfer (28,8 %). Das Brutholz mit 4-6 cm Durchmesser verzeichnete 6 geschlüpfte Käfer (8,2 %). Die restlichen 9 Käfer (12,3 %) schlüpften aus künstlichem Nährmedium, in welches die Larven im November 2004 transferiert und seitdem wiederholt in frisches Nährmedium umgesetzt worden waren.



Abbildung 5:  
Zuchtkäfig mit *Pinus sylvestris* Brut- und Futtermaterial für *Monochamus galloprovincialis pistor*

Figure 5:  
Cultivation cage with breeding and feeding material of *Pinus sylvestris* for *Monochamus galloprovincialis pistor*

## Diagnose verschiedener *Monochamus*-Arten

*Monochamus*-Arten nur nach morphologischen Kriterien zu bestimmen, stößt insbesondere bei frühen Entwicklungsstadien wie Ei, Larve und Puppe an ihre Grenzen. Mehr Erfolg versprach sich das Institut für Waldschutz von einer molekularbiologischen Diagnosemethode. Die Vorarbeiten dazu wurden mit dem Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz, Department für Wald- und Bodenwissenschaften (Universität für Bodenkultur) erarbeitet. Finanziert wurde dieses Projekt durch das Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft. Die aus Eiern, Larven, Puppen und Käfern isolierte DNA (Erbgut) wird in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) mit für mitochondriale Genomabschnitte geeigneten Primern amplifiziert (vervielfältigt). Die erhaltenen PCR-Fragmente werden anschließend mit so genannten Restriktionsenzymen in kleinere Stücke geschnitten. Das resultierende Muster der Schnittfrag-



Abb. 6

Abbildung 6:  
Reifungsfraß von *Monochamus galloprovincialis pistor* an *Pinus sylvestris*-Sämlingen: links: kein Reifungsfraß, Mitte: 1 Woche Reifungsfraß, rechts: 2 Wochen Reifungsfraß

Figure 6:  
Maturation feeding of *Monochamus galloprovincialis pistor* on *Pinus sylvestris* seedlings: left: no maturation feeding, middle: 1 week maturation feeding, right: 2 weeks maturation feeding



Abb. 7

Abbildung 7:  
Reifungsfraß von *Monochamus sartor*: am Ende der Lebenszeit waren die *Picea abies*-Zweige vollständig entrindet.

Figure 7:  
Maturation feeding of *Monochamus sartor*: At the end of life the twigs of *Picea abies* were completely without bark.

mente ist artspezifisch. Mittels dieser Methode können derzeit vier europäische, vier nordamerikanische und drei asiatische *Monochamus*-Arten voneinander unterschieden und in jedem Entwicklungsstadium bestimmt werden.

### Entwicklung von Methoden zur Früherkennung der Kiefernwelke an lebenden Bäumen

Von einem Verfahren, das einen Nematodenbefall erkennen ließe, bevor typische Schadenssymptome sichtbar werden, verspricht man sich einen wesentlichen Fortschritt bei der Bekämpfung des Schädling. Die Ausgangsüberlegung ist: Wo könnte die Forschung ansetzen? Der Befall mit Splintholznematoden führt einerseits zu Verstopfungen der Wasserleitungsbahnen (Embolie), andererseits auch zu vermehrtem Harzdruck im Anfangsstadium. Der Baum versucht, den Befall im Harz zu ersticken. Später nimmt die Harzproduktion drastisch ab. Diese bekannten Reaktionen im Baum wurden nun herangezogen, um Früherkennungsmethoden zu testen und zu entwickeln.

Verstopfte Wasserleitungsbahnen wirken sich auf den Wassertransport aus und verändern die elektrische Leitfähigkeit des Splintholzes. Die getesteten Geräte (Shigometer, Conditometer und Mervit) zeigten einen deutlichen

Anstieg des elektrischen Widerstandes im Splintholz leider erst dann, als auch bereits erste Befallssymptome erkennbar waren. Somit ist dieser Ansatz nicht Erfolg versprechend.

Wie schon vorher beschrieben, überträgt der Bockkäfer (*Monochamus* spp.) den Kiefern Splintholznematoden auf gesunde Bäume. Der Bockkäferbefall findet meist in der Baumkrone statt, was seine Entdeckung wesentlich erschwert. Deshalb sollten die Fraßgeräusche der Bockkäferlarven hörbar gemacht werden. Die Testung bioakustischer Methoden hat gezeigt, dass Bockkäferbefall erkennbar, aber derzeit noch keine praxistaugliche Anwendung möglich ist.

Die besten Ergebnisse zur Früherkennung eines Splintholznematodenbefalls wurden mit Methoden erzielt, die den Rückgang der Harzproduktion aufzeigen. Allerdings ist auch diese Methode zeitaufwendig und daher bei einer großen Anzahl zu überprüfender Bäume kaum anwendbar.

### Ausblick

Eine Einschleppung oder Einwanderung von *Bursaphelenchus xylophilus* würde nach bisherigen Erkenntnissen für die Waldbestände Zentraleuropas, auch Österreichs, wegen der vorkommenden *Monochamus*-Arten verheerende Folgen haben.