

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig und Berlin, Dienststelle für wirtschaftliche Fragen und Rechtsangelegenheiten im Pflanzenschutz, Außenstelle Kleinmachnow

Intra- und interspezifische Kreuzungsexperimente mit einem deutschen und einem sibirischen Isolat von *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) und verwandten *Bursaphelenchus*-Arten

Intra- and interspecific crossing experiments with a German and a Siberian isolate of *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) and related *Bursaphelenchus* species

Von Helen Braasch

Zusammenfassung

Im Ergebnis von Kreuzungsexperimenten eines deutschen und eines sibirischen Isolates von *Bursaphelenchus mucronatus* untereinander, mit anderen Herkünften von *B. mucronatus* (Frankreich, Norwegen, Japan) und mit verwandten *Bursaphelenchus*-Arten (*B. xylophilus* aus Japan, mukronate Form von *B. xylophilus* aus Nordamerika, *B. fraudulentus* aus Deutschland) wurden Schlußfolgerungen zu den Verwandtschaftsbeziehungen der geprüften Isolate gezogen. Der Vermehrungserfolg weist große Unterschiede zwischen den intraspezifischen Kreuzungen verschiedener Herkünfte von *B. mucronatus* einerseits und den interspezifischen Kreuzungen auf, so daß die Zuordnung der geprüften Isolate zu den genannten 3 Arten bestätigt werden kann. Die Kreuzung zwischen dem sibirischen Isolat von *B. mucronatus* und der m-Form von *B. xylophilus* aus Nordamerika verlief teilweise so erfolgreich, daß das Ergebnis den Resultaten bei intraspezifischen Kombinationen nahe kommt. Bei der Kombination der verschiedenen Herkünfte von *B. mucronatus* ergaben sich keine Anhaltspunkte, die für eine Unterteilung dieser Art in weitere Arten sprechen würden. Bemerkenswert ist die Steigerung der Vermehrungsrate bei den intraspezifischen Kreuzungen bis auf das Vierfache gegenüber den Kontrollvermehrungen der reinen Isolate. Von Bedeutung für die Einschätzung der Gefahr einer Einschleppung des Quarantäneschädling *B. xylophilus* ist die Erkenntnis, daß aus der Kreuzung dieser Art mit dem deutschen Isolat von *B. mucronatus* eine F1-Generation entstehen kann, die zur erfolgreichen Weitervermehrung befähigt ist.

Abstract

The crossings of a German and a Siberian isolate of *Bursaphelenchus mucronatus* with one another, with other provenances of *B. mucronatus* (France, Norway, Japan) and with related *Bursaphelenchus* species (*B. xylophilus* from Japan, *B. xylophilus* mucronate form from North America, *B. fraudulentus* from Germany) gave information on the relationship of the isolates under investigation. Multiplication varies significantly between the intraspecific crossings of various provenances of *B. mucronatus* on the one hand and the interspecific crossings on the other hand. Thus, the assignment of the mentioned isolates to the above-mentioned three species can be confirmed. The crossing of the Siberian isolate of *B. mucronatus* and of the m-form of *B. xylophilus* from North America was partly so successful that it approximated the results of intraspecific combinations. The combina-

tion of various provenances of *B. mucronatus* did not point out a grouping of this species into further species. The increase in the multiplication rate of intraspecific crossings up to 4-fold the control with the pure isolate is remarkable. The fact that the crossing of *B. xylophilus* with the German isolate of *B. mucronatus* can produce a F1 generation which is able to successfully multiply is important to assess the risk of introducing this quarantine organism.

Einleitung

Nachdem erkannt war, daß *Bursaphelenchus xylophilus* (STEINER und BUHRER, 1934) NICKLE, 1970 (Kiefernholznematode) der Verursacher der vorwiegend in Japan enorme Schäden verursachenden Kiefernwelke ist, wandte sich das Interesse auch nahe verwandten Arten dieses Quarantäneschädling zu. Die leichte Verschleppbarkeit dieser holzbewohnenden und durch holzbrütende Insekten übertragbaren Arten erfordert eine hohe Aufmerksamkeit hinsichtlich der möglichen Einschleppung gefährlicher Arten beim internationalen Handel mit Holz und deren klare taxonomische Definition. Während beim Holzimport aus Nordamerika die Gefahr der Einschleppung des dort beheimateten, gefährlichen *B. xylophilus* nach Europa besteht, wird vom Gebiet der ehemaligen Sowjetunion in beträchtlichem Umfang mit Holz die als nicht oder geringfügig pathogen geltende Art *B. mucronatus* MAMIYA und ENDA, 1979 verbracht (BRAASCH, 1991). Dieser dem *B. xylophilus* morphologisch und biologisch sehr ähnliche Nematode ist jedoch in den Koniferenwäldern der Nordhemisphäre weit verbreitet und wurde in Europa in Finnland, Schweden, Norwegen, Frankreich und Deutschland nachgewiesen. In Ostasien ist er auch überall dort vorhanden, wo sich *B. xylophilus* in der Folge von Einschleppungen einbürgerte. Beide Arten leben in Nadelgehölzen und können durch die gleichen Vektoren (vorwiegend *Monochamus*-Arten) von Baum zu Baum übertragen werden. Morphologische und biologische Ähnlichkeiten bestehen nach bisherigen Kenntnissen außer zwischen den genannten beiden Arten auch mit *B. fraudulentus* RÜHM, 1965 und *B. kolyomensis* KORENTSCHENKO, 1980. Während ersterer bisher nur in Laubgehölzen in Europa nachgewiesen wurde, ist *B. kolyomensis* lediglich aus dem Nordosten Rußlands an Nadelgehölzen beschrieben worden.

Zur morphologischen Determination dieser sich durch ihre Maße nicht unterscheidenden Arten werden hauptsächlich die weiblichen Tiere herangezogen, deren Schwanzenden archa-

rakteristische Merkmale tragen. Die Weibchen von *B. xylophilus* besitzen ein abgerundetes, gelegentlich punktuertes oder mit einem winzigen Mukro versehenes Schwanzende. Die Weibchen von *B. mucronatus* tragen dagegen einen deutlichen Mukro am Schwanzende. Aus morphologischer Sicht kompliziert sich die Situation dadurch, daß es in Nordamerika neben *B. xylophilus* mit gerundetem Schwanzende (r-Form) einen *Bursaphelenchus* mit mukronatem Schwanzende gibt, der aufgrund von Kreuzungsexperimenten als m-Form dem *B. xylophilus* zugerechnet wird (WINGFIELD et al., 1983). Für Verwirrung sorgte die irrtümliche Feststellung von *B. xylophilus* in Frankreich (BAUJARD et al., 1979). Durch morphologische Untersuchungen und Kreuzungsversuche wurde später belegt, daß es sich bei dem französischen Isolat um *B. mucronatus* handelte, obwohl diese Herkunft in gewissem Maße mit *B. xylophilus* kreuzbar ist (DE GUIRAN und BRUGUIER, 1989). Kreuzungsexperimente liefern eine wertvolle Ergänzung morphologischer Kriterien für die Beurteilung der Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener *Bursaphelenchus*-Isolate.

Die Theorien über den Verwandtschaftsgrad der erwähnten *Bursaphelenchus*-Arten reichen von der in Nordamerika sprachlich praktizierten Vereinheitlichung von *B. xylophilus* und *B. mucronatus* zu „pine wood nematodes“ bzw. der Verwendung der Bezeichnung „species complex“ (WEBSTER et al., 1990), der Errichtung einer Supraspecies mit unvollständiger reproduktiver Isolation der Arten (DE GUIRAN und BRUGUIER, 1989), der Existenz mehrerer Gruppierungen sowohl bei *B. xylophilus* als auch bei *B. mucronatus* (WEBSTER et al., 1990) bis zur Vermutung, daß sich unter der Bezeichnung *B. mucronatus* mehrere Arten verbergen. BECKENBACH et al. (1992) gewinnen im Ergebnis genomischer DNA-Untersuchungen Anhaltspunkte, daß die europäische Gruppe von *B. mucronatus* eine eigene Art darstellen könnte. In Übereinstimmung mit dieser Annahme stellen RIGA et al. (1992) fest, daß sich französische und japanische Populationen von *B. mucronatus* nicht ohne weiteres kreuzen lassen, während DE GUIRAN und BOULBRIA (1986) über die Kreuzbarkeit europäischer und japanischer Populationen berichten. Nach BOLLA und TAMURA (1989) kann der Paarungserfolg unterschiedlicher Herkünfte einer *Bursaphelenchus*-Art sehr unterschiedlich sein. Auch bei *B. xylophilus* gibt es beträchtliche genomische Differenzen zwischen unterschiedlichen Populationen, größere Differenzen bestehen jedoch zwischen *B. xylophilus* und *B. mucronatus* (BOLLA et al., 1988). WEBSTER et al. (1990) bestätigen durch die Ergebnisse ihrer DNA-Untersuchungen die Resultate elektrophoretischer Studien von DE GUIRAN et al. (1985), die eine klare taxonomische Differenzierung zwischen *B. xylophilus* und *B. mucronatus* zeigen.

SCHAUER-BLUME (1992) führte Kreuzungsversuche mit dem norwegischen und dem französischen Isolat von *B. mucronatus* einerseits und einem japanischen Isolat von *B. mucronatus*, *B. xylophilus* (Japan) und *B. fraudulentus* andererseits durch. Während beide Isolate eine fertile F1-Generation mit dem japanischen Isolat von *B. mucronatus* bildeten, war nur das französische Isolat mit *B. xylophilus* kreuzbar. Die F1-Generation aus der Kreuzung zwischen dem norwegischen Isolat von *B. mucronatus* und *B. xylophilus* war steril. Bei Kreuzungen zwischen *B. fraudulentus* einerseits und *B. xylophilus* und *B. mucronatus* andererseits erzielte SCHAUER-BLUME (1992) in weniger als 1% von insgesamt 1026 Kreuzungsversuchen Nachkommen, die jedoch zur Weitervermehrung befähigt waren.

Deutsche und sibirische Isolate von *B. mucronatus* sind bisher noch nicht in Kreuzungsexperimente einbezogen worden. In Hinsicht auf die Gefahr einer Einschleppung von *B.*

xylophilus ist es von besonderem Interesse, die Eigenschaften der europäischen Isolate von *B. mucronatus* hinsichtlich ihrer Kreuzbarkeit mit dem gefährlichen Quarantäneschädling zu kennen. In Anbetracht des Holzhandels mit Rußland muß auch eine bessere Charakterisierung der sibirischen Herkünfte von *B. mucronatus* angestrebt werden.

Material und Methodik

Das zu den Untersuchungen verwendete deutsche Isolat von *B. mucronatus* (*B. m.*, D) stammt aus einem Kiefernwald (*Pinus sylvestris*) im Südosten Mecklenburg-Vorpommerns, das sibirische Isolat (Igarka-Isolat, *B. m.* (Ig)) von importiertem Kiefernholz (*P. sylvestris*, sibirische Standortsform) aus der uralo-sibirischen Taiga. Beide Isolate wurden seit 1989 auf *Botrytis cinerea* auf Malzagar in Petrischalen vermehrt.

Die zur Kreuzung mit diesen beiden Isolaten verwendeten Arten bzw. Herkünfte sind:

B. xylophilus von *Pinus densiflora* (Mito, Ibaraki Prefecture, Japan) – *B. x.* (JP)

B. xylophilus m-Form von *Abies balsamea* (Cloquet, Minnesota, USA) – *B. x.* (m)

B. mucronatus von *Pinus pinaster* (Casteljaloux, Frankreich) – *B. m.* (FR)

B. mucronatus von *Pinus sylvestris* (Hanestad, Norwegen) – *B. m.* (NO)

B. mucronatus von *Pinus densiflora* (Yachiyo, Chiba Prefecture, Japan) – *B. m.* (JP)

B. fraudulentus von *Quercus spec.* (Berlin, Deutschland) – *B. f.*

Alle zur Kreuzung benutzten Tiere stammten unmittelbar aus *Botrytis*-Malzagar-Vermehrungen und wurden einen Tag vor den Experimenten nach der Sieb-Trichter-Methode zur Extraktion angesetzt. Zur Kreuzung wurde jeweils 1 Larve (L3) des einen Partners mit 3 Männchen des anderen Partners auf eine Petrischale (Durchmesser 35 mm) mit Malzagar und dichtem *Botrytis*-Bewuchs in einen in der Mitte des Agars angebrachten Schnitt gesetzt. Im reziproken Versuch wurden Larven und Männchen jeweils vom anderen Partner genommen. Jede Kreuzungsvariante und jeder dazugehörige reziproke Versuch wurden 10mal wiederholt. Als Kontrolle diente die Vermehrung der Partner mit sich selbst im Ansatz mit einer Larve und 3 Männchen. Eine größere Anzahl männlicher Tiere wurde benutzt, um das Auffinden der anteilig aus den Larven entstandenen Weibchen zu erleichtern, den möglichen Altersunterschied zwischen den Geschlechtern auszugleichen und eine mehrfache Begattung wie unter natürlichen Bedingungen zu ermöglichen.

Nach einer Versuchszeit von 4 Wochen im Dunkeln und bei Temperaturen zwischen 20 und 25°C wurden die aus den Petrischalen entnommenen Agarplatten, auf denen bei guter Vermehrung der Pilzrasen vollkommen abgeweidet wurde, zwecks Extraktion der Nematoden 24 Stunden nach der Sieb-Trichter-Methode angesetzt. Anschließend erfolgte das Auszählen der im Extrakt vorhandenen Nematoden. Als Platten mit Vermehrung wurden die Petrischalen gewertet, aus denen mehr als 4 Nematoden extrahiert werden konnten. Bei erfolgreichen Kreuzungen wurde versucht, eine Dauerzucht aufzubauen.

Erfolgreiche Kreuzungsexperimente zwischen *B. mucronatus* und *B. xylophilus* (JP) wurden durch begleitende Versuche ergänzt, bei denen wenige Tage nach Beginn der Kreuzung die Larven der ersten Generation extrahiert und durch Umsetzen auf frische Agar-*Botrytis*-Platten auf ihre Fertilität geprüft wurden.

Tab. 1. Vermehrung von *Bursaphelenchus* auf *Botrytis* nach 4 Wochen (Ansatz jeweils 10 Platten mit je 1 L3 und 3 ♂)

Art/Herkunft	Anzahl Platten mit Vermehrung	Durchschnittl. Anzahl Nematoden pro	
		Vermehrungsplatte	angesetzte Platte
<i>B. x.</i> (JP)	5	4 446	2 223
<i>B. x.</i> (m)	9	13 331	11 998
<i>B. m.</i> (JP)	7	1 505	1 054
<i>B. m.</i> (D)	8	8 307	4 248
<i>B. m.</i> (Ig)	6	11 429	6 857
<i>B. m.</i> (FR)	8	4 578	3 662
<i>B. m.</i> (NO)	4	6 405	2 562
<i>B. f.</i> (D)	6	9 183	5 510

Ergebnisse der Kreuzungsexperimente und Kontrollvermehrungen

Die Ergebnisse der Kontrollvermehrungen sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Aus den Ansätzen auf insgesamt 80 Petrischalen ergab sich eine durchschnittliche Vermehrung in 6,6 Schalen pro 10 Ansätze. Daraus läßt sich ein leichter Überschuß weiblicher Tiere unter den L3-Larven ableiten. Das annähernd gleiche Resultat erzielt man, wenn L3-Larven einzeln

an kleinen Agar/*Botrytis*-Blöcken zu erwachsenen Tieren gezogen werden. Bei den innerartlichen Kreuzungen (Tab. 2 und 3) wurde von insgesamt 140 angesetzten Petrischalen eine Vermehrung in 6,1 Schalen pro 10 Ansätze errechnet. Bei den interspezifischen Kreuzungen (Tab. 2 und 3) betrug dieser Wert 2,8 (bezogen auf 120 Schalen), d. h. diese Kreuzungsversuche verliefen viel weniger erfolgreich als die Kontrollvermehrungen.

Die Anzahl der Nematoden, die nach 4 Wochen von den Petrischalen isoliert wurde, war bei den Arten und Herkünften sowie den Kreuzungen sehr unterschiedlich und wurde sowohl als Durchschnitt der 10 angesetzten Platten als auch der Platten mit Vermehrung errechnet. Die Anzahl der in den Kontrollvermehrungen aus 1 Weibchen und 3 Männchen hervorgegangenen Nachkommen verringerte sich in folgender Reihenfolge: *B. x.* (m), *B. m.* (Ig), *B. f.* (D), *B. m.* (D), *B. m.* (NO), *B. m.* (FR), *B. x.* (JP), *B. m.* (JP). Die Vermehrungsrate der mukronaten Form von *B. xylophilus* war am höchsten, gefolgt von der Rate des *B. mucronatus* aus Sibirien; die geringste Vermehrung zeigte das japanische Isolat von *B. mucronatus*.

Die Vermehrungsergebnisse aus den Kreuzungen sind aus den Tabellen 2 (mit dem deutschen *B. mucronatus*) und 3 (mit dem sibirischen *B. mucronatus*) ersichtlich, wobei die für die Wertung maßgebliche Zahl jeweils hervorgehoben ist. Da die Anzahl der stattgefundenen Vermehrungen pro 10 Ansätze

Tab. 2. Intra- und interspezifische Kreuzungsversuche mit *Bursaphelenchus mucronatus* aus Deutschland auf *Botrytis*-Platten

Kreuzung	Anzahl Platten mit Vermehrung	Durchschnittl. Anzahl Nematoden nach 4 Wochen pro	
		Vermehrungsplatte	angesetzte Platte (n = 10)
<i>B. m.</i> (D) × <i>B. m.</i> (Ig)			
1 L3 × 3 ♂	8	40 404	32 323
reziprok	9	20 366	18 329
gesamt	17	29 796	25 326
<i>B. m.</i> (D) × <i>B. m.</i> (JP)			
1 L3 × 3 ♂	5	13 220	6 610
reziprok	6	10 397	6 238
gesamt	11	11 680	6 424
<i>B. m.</i> (D) × <i>B. m.</i> (FR)			
1 L3 × 3 ♂	6	41 360	24 816
reziprok	4	4 962	1 984
gesamt	10	26 801	13 400
<i>B. m.</i> (D) × <i>B. m.</i> (NO)			
1 L3 × 3 ♂	6	8 080	4 848
reziprok	2	6 150	1 230
gesamt	8	7 597	3 039
<i>B. m.</i> (D) × <i>B. x.</i> (JP)			
1 L3 × 3 ♂	7	1 222	856
reziprok	4	201	20
gesamt	11	796	438
<i>B. m.</i> (D) × <i>B. x.</i> (m)			
1 L3 × 3 ♂	3	16	5
reziprok	3	1 243	373
gesamt	6	630	32
<i>B. m.</i> (D) × <i>B. f.</i> (D)			
1 L3 × 3 ♂	1	56	6
reziprok	1	19	2
gesamt	2	38	4

Tab. 3. Intra- und interspezifische Kreuzungsversuche mit *Bursaphelenchus mucronatus* aus Sibirien (Igarka-Isolat) auf *Botrytis*-Platten

Kreuzung	Anzahl Platten mit Vermehrung	Durchschnittl. Anzahl Nematoden nach 4 Wochen pro	
		Vermehrungsplatte	angesetzte Platte (n = 10)
<i>B. m.</i> (Ig) × <i>B. m.</i> (D)			
1 L3 × 3 ♂	9	20 366	18 329
reziprok	8	40 404	32 323
gesamt	17	29 796	25 326
<i>B. m.</i> (Ig) × <i>B. m.</i> (JP)			
1 L3 × 3 ♂	7	9 905	6 934
reziprok	8	3 827	3 062
gesamt	15	4 877	4 998
<i>B. m.</i> (Ig) × <i>B. m.</i> (FR)			
1 L3 × 3 ♂	5	20 512	10 226
reziprok	8	25 011	20 008
gesamt	13	23 285	15 117
<i>B. m.</i> (Ig) × <i>B. m.</i> (NO)			
1 L3 × 3 ♂	9	20 460	18 416
reziprok	3	6 057	1 817
gesamt	12	16 861	10 112
<i>B. m.</i> (Ig) × <i>B. x.</i> (JP)			
1 L3 × 3 ♂	1	44	4
reziprok	2	55	11
gesamt	3	51	8
<i>B. m.</i> (Ig) × <i>B. x.</i> (m)			
1 L3 × 3 ♂	0	0	0
reziprok	5	8 119	4 059
gesamt	5	8 119	2 029
<i>B. m.</i> (Ig) × <i>B. f.</i> (D)			
1 L3 × 3 ♂	0	0	0
reziprok	0	0	0
gesamt	0	0	0

bei den intraspezifischen Kreuzungen fast identisch mit dieser Anzahl bei den Kontrollvermehrungen war, also Hemmschwellen für das Zustandekommen der Kreuzungen nicht erkennbar waren, wurde als Maßstab für den Erfolg dieser Kreuzungen die durchschnittliche Anzahl Tiere pro Schale mit Vermehrung gewertet. Für die Wertung der interspezifischen Kreuzungen muß in Anbetracht des verringerten Kreuzungserfolges der Wert für die Anzahl Nematoden pro angesetzte Platte mit berücksichtigt werden.

Bei den innerartlichen Kreuzungen zwischen den verschiedenen Herkünften von *B. mucronatus* fand in allen durchgeführten Varianten eine gute Vermehrung statt. Die Vermehrungsrate war in den meisten Fällen sogar wesentlich höher als bei den Kontrollvermehrungen. Der beste Vermehrungserfolg wurde in der Kombination des deutschen und sibirischen Isolates von *B. mucronatus* erzielt, gefolgt von der Kombination des deutschen mit dem französischen und des sibirischen mit dem französischen Isolat. Dabei war auffällig, daß bei der Vermehrung des deutschen mit dem französischen Isolat ein wesentlich größerer Vermehrungserfolg zu verzeichnen war, wenn die Männchen vom deutschen Isolat stammten. Im Verhältnis dazu fielen die Ergebnisse der Kombination des deutschen bzw. sibirischen Isolates mit dem japanischen Isolat geringer aus, wobei jedoch auch berücksichtigt werden muß, daß das japanische Isolat in den Kontrollvermehrungen die geringste Vermehrungsrate aufwies. Bei den Kombinationen mit dem norwegischen Isolat, deren Ergebnisse insgesamt ebenfalls geringer ausfielen als bei den Kombinationen zwischen dem deutschen und sibirischen und den jeweiligen Verbindungen mit dem französischen Isolat, zeigte sich dann eine deutlich geringere Vermehrung, wenn die Männchen vom sibirischen bzw. deutschen Isolat stammten.

Eine weitaus geringere Nachkommenschaft als bei den innerartlichen Kombinationen entstand in der Regel bei den interspezifischen Kreuzungen. Bei der Kreuzung von *B. mucronatus* (D) mit *B. xylophilus* (JP), stand die Häufigkeit der stattgefundenen Kreuzungen (d. h. des Zustandekommens der F1-Generation) nicht hinter der der Kontrollen zurück; der Vermehrungserfolg war jedoch im weiteren Verlaufe gegenüber innerartlichen Kombinationen wesentlich geringer (durchschnittlich 438 Tiere pro Platte bzw. 796 Tiere pro Vermehrungsplatte). Bei der Kreuzung von *B. mucronatus* (Ig) mit *B. xylophilus* (JP) war der Vermehrungserfolg noch geringer (8 bzw. 51 Tiere), und es gab auch erhebliche Beeinträchtigungen beim Zustandekommen der Kreuzung überhaupt (nur auf 3 von 20 Platten Nachkommenschaft). Im Falle der Nachkommenschaft aus der Kreuzung von *B. xylophilus* (JP) mit *B. mucronatus* (Ig) war keine Weitervermehrung über mehrere Generationen möglich, während sich aus den Kreuzungen zwischen *B. xylophilus* (JP) und *B. mucronatus* (D) in beiden Kreuzungsvarianten von den Platten mit der höchsten Nachkommenschaft Zuchten mit n Vermehrungen aufbauen ließen.

Um zu prüfen, ob die Weitervermehrung der F1-Generation aus dieser zwischenartlichen Kreuzung (*B. x. JP* × *B. m. D*) nur unter dem Einfluß der anwesenden Elterntiere stattfindet, wurden in einem weiteren Versuch die Erstlarven der Kreuzung nach wenigen Tagen entnommen und gesondert zur Weitervermehrung auf *Botrytis*-Agar-Platten gesetzt. Die in Tabelle 4 dokumentierten Ergebnisse belegen, daß auch ohne Anwesenheit der zur Kreuzung verwendeten Elterntiere eine gute Weitervermehrung stattfindet.

Die Kreuzungen zwischen *B. xylophilus* (JP) und *B. mucronatus* (D) wurden mehrfach wiederholt. Auf den meisten Platten mit Vermehrung entwickelten sich relativ wenige

Tab. 4. Weitervermehrung der F1-Larven aus der Kreuzung *B. xylophilus* (JP) × *B. mucronatus* (D) an *Botrytis*

Ansatz (10 Platten)	F1 nach 6 Tagen	nach 4 Wochen	nach 8 Wochen
1 Larve <i>B. m.</i> × 3 ♂ <i>B. x.</i>	9	5 200	
		Ansatz:	
		25	2 866
		25	15 400
		25	14 446
dto.	12	24 600	Fn

Tiere. Auf Platten mit sehr geringer Vermehrung wurden mitunter mißgestaltete Tiere beobachtet. Immer wieder sind aber einzelne Schalen dabei, auf denen die Vermehrung besser ist und fortschreitet. Nach einer Reihe von Generationen steht die Vermehrungsrate schließlich nicht hinter der innerartlicher Vermehrungen zurück, ja sie kann diese sogar übertreffen (Tab. 4).

Während sich die Kreuzung zwischen dem deutschen *B. mucronatus* und der mukronaten Form von *B. xylophilus* entsprechend verhielt wie die Kreuzung zwischen *B. mucronatus* (D) und *B. xylophilus* (JP), war die Kreuzung zwischen dem sibirischen *B. mucronatus* und *B. xylophilus* (m) teilweise unerwartet erfolgreich. Eine Weitervermehrung der Nachkommen aus den Kreuzungen mit der mukronaten Form von *B. xylophilus* war bei der Variante *B. m.* (D) 3♂ × *B. x.* (m) 1 L und bei der Kreuzung mit *B. mucronatus* (Jg) möglich.

Die geringste Nachkommenschaft wurde aus den Kreuzungen mit dem in Laubgehölzen vorkommenden *B. fraudulentus* erzielt. Bei der Kreuzung des deutschen *B. mucronatus* mit *B. fraudulentus* entwickelten sich nur auf 2 von 20 Platten wenige Nematoden. Dennoch war eine Weitervermehrung der nach 4 Wochen von der Kreuzungsplatte entnommenen und auf eine neue Platte übertragenen 56 Tiere aus der Variante mit den männlichen Tieren von *B. fraudulentus* möglich. Bei dem Versuch, das sibirische Isolat von *B. mucronatus* mit *B. fraudulentus* zu kreuzen, gab es keine Nachkommenschaft.

Diskussion

Die Ergebnisse der Kreuzungsexperimente zeigen, daß einschneidende Differenzen in der durchschnittlichen Anzahl der Nachkommen zwischen den innerartlichen Kombinationen verschiedener Herkünfte von *B. mucronatus* einerseits und den Kreuzungen zwischen verschiedenen *Bursaphelenchus*-Arten andererseits bestehen.

Während die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen eines Weibchens nach 4 Wochen pro Vermehrungsplatte (bei 20 Platten Ansatz) bei den innerartlichen Kombinationen von 4877 bis 29769 variierte, betrug sie bei den interspezifischen Kreuzungen (ausgenommen die Kreuzung zwischen *B. m. Ig* und *B. x. m*) 0 bis 796. Diese Differenzen sind so erheblich, daß der Artstatus von *B. xylophilus*, *B. mucronatus* und *B. fraudulentus* konsolidiert erscheint. Die Vermehrung der Nachkommen aus Kreuzungen zwischen allen Herkünften von *B. mucronatus* war ausreichend gut, so daß an der Zugehörigkeit der geprüften Isolate zur Art *B. mucronatus* nicht gezweifelt werden kann.

Ob die Differenzen in der Vermehrungsrate der verschiedenen Kombinationen der unterschiedlichen Herkünfte von *B. mucronatus* einen Verwandtschaftsgrad der genetisch sicher nicht ganz homogenen Isolate repräsentieren, kann nicht mit

Sicherheit gesagt werden. Wahrscheinlich gehen in diese Werte auch die Unterschiede in den Vermehrungsraten der reinen Isolate und deren möglicherweise unterschiedliche Temperaturansprüche ein. Eine durchgängig besonders gute Vermehrung zeigte die Kombination des deutschen mit dem sibirischen Isolat. In einigen Fällen fiel die eine Variante einer Kreuzung deutlich geringer aus als ihr reziproker Teil, so bei den Kombinationen des deutschen bzw. sibirischen Isolates mit dem norwegischen Isolat. Hierbei war der Vermehrungserfolg dann geringer, wenn die weiblichen Tiere aus Norwegen stammten. Ob hier gewisse, wenn auch geringe Vermehrungsschranken wirksam werden, muß offenbleiben. Bei interspezifischen Kreuzungen wird dieses Phänomen öfter beobachtet. Die Vermehrungsrate der beiden Prüflisolate mit dem japanischen Isolat von *B. mucronatus* war geringer als bei den meisten anderen innerartlichen Kombinationen, aber sie gibt keinen Anlaß, das japanische Isolat als gesonderte Art zu betrachten.

Bemerkenswert ist die Steigerung der Vermehrungsrate bei den innerartlichen Kreuzungen gegenüber den reinen Isolaten, die bis zum Vierfachen betragen kann. Es muß geprüft werden, ob bei solchen Kombinationen, die durch Verschleppungen in der Natur durchaus auftreten können, auch eine Steigerung der Pathogenität zu beobachten ist.

Die größten Fortpflanzungsbarrieren wurden bei den Kreuzungen zwischen *B. mucronatus* und *B. fraudulentus* beobachtet. Bei der Verwendung des sibirischen Isolates entstanden dabei keinerlei Nachkommen. Mit dem deutschen Isolat konnten sich wenige Nachkommen entwickeln, wobei aus der Variante mit den *B. fraudulentus*-Männchen eine bereits über mehrere Monate laufende Zucht aufgebaut werden konnte. An diesem Beispiel wie auch bei einigen anderen Kreuzungen zeigt sich, daß die Reaktionsweisen des deutschen und sibirischen Isolates von *B. mucronatus* Differenzen aufweisen. Dies kommt besonders auch in der Bereitschaft zur Kreuzung mit dem japanischen Isolat von *B. xylophilus* zum Ausdruck, wobei das sibirische Isolat nur eine äußerst geringe, nicht zur Weitervermehrung befähigte F1-Generation hervorbrachte, während sich bei der Kreuzung mit dem deutschen *B. mucronatus* aus der etwas zahlreicheren Nachkommenschaft in beiden Varianten gutgehende Zuchten aufbauen ließen. Mögliche Vermutungen, daß die in Ostdeutschland nachgewiesenen Populationen von *B. mucronatus* auf eine Einschleppung aus Sibirien nach langjährigem intensiven Holzimport zurückführbar seien, werden durch diese Befunde nicht gestützt.

Die von dem französischen Isolat von *B. mucronatus* bereits bekannte erfolgreiche Kreuzbarkeit mit dem Quarantäneschädling *B. xylophilus* ist nunmehr auch für das deutsche Isolat nachgewiesen. Diese Eigenschaft erfordert Beachtung für den Fall einer Einschleppung von *B. xylophilus*, da dieser durch Einkreuzung Pathogenitätsgene in europäische Populationen von *B. mucronatus* einbringen könnte. Diese Problematik kompliziert sich dadurch, daß morphologisch eine solche Einkreuzung verdeckt bliebe, da die Nachkommen aus den Kreuzungen *B. m.* × *B. x.* (rundschwänzige Form) in der Regel wie *B. mucronatus* aussehen.

Das Ergebnis bei der Kreuzung des sibirischen Isolates von *B. mucronatus* mit dem amerikanischen Minnesota-Isolat der m-Form von *B. xylophilus* fiel teilweise überraschend gut aus, woran möglicherweise auch die hohe Vermehrungsrate der beiden reinen Isolate (Kontrollvermehrungen) Anteil hat. Das Resultat der Kreuzung des Minnesota-Stammes mit dem deutschen Isolat reiht sich dagegen in die Ergebnisse der interspezifischen Kreuzungen ein, war aber ausreichend, um aus den Nachkommen sich gut vermehrende Zuchten aufbauen zu

können. WINGFIELD et al. (1983), der die m-Form von *B. xylophilus* erstmalig aus *Abies balsamea* in Minnesota und Wisconsin (USA) beschrieb, stellte bei Kreuzungsversuchen mit *B. mucronatus* aus Japan nur eine geringe Vermehrung fest. DE GUIRAN und BRUGIER (1989) dagegen fanden eine sehr gute Vermehrung bei der Kreuzung zwischen dem französischen *B. mucronatus* und der m-Form von *B. xylophilus* aus Minnesota, wenn man die F1-Larven bei den Elterntieren beließ. ABAD et al. (1991) konstatierten bei DNA-Untersuchungen Differenzen zwischen dem Minnesota-Stamm von *B. xylophilus* und 2 anderen virulenten Stämmen dieser Art aus Nordamerika. Dennoch stand nach den erzielten Mustern der Minnesota-Stamm *B. xylophilus* näher als *B. mucronatus*.

Bei der Interpretation der erheblichen Differenzen in den Ergebnissen von Kreuzungsexperimenten mit der nordamerikanischen m-Form von *B. xylophilus* und *B. mucronatus* sollte nicht außer acht gelassen werden, daß es sich bei der nordamerikanischen mukronaten Form möglicherweise um ein heterogenes natürliches Kreuzungsprodukt zwischen *B. xylophilus* und *B. mucronatus* in einem durch Ausbreitung nach der Art differenzierung entstandenen gemeinsamen Vorkommensgebiet oder an den Grenzen ihrer Areale handeln könnte. Die Möglichkeit solcher Kreuzungen ist experimentell nachgewiesen. Durch die gemeinsamen Vektoren und Wirte ist ein Zusammentreffen beider Formen vorprogrammiert. Bei dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten hatten die Kreuzungsprodukte zwischen *B. xylophilus* und *B. mucronatus* stets ein mukronates Aussehen. Auf diese Weise könnte man auch die größere Pathogenität der nordamerikanischen mukronaten Form gegenüber dem euroasiatischen *B. mucronatus* und ihre höhere Kreuzungsbereitschaft mit *B. xylophilus* erklären.

Weitere Untersuchungen zur systematischen Stellung der mukronaten, *B. xylophilus* zugeordneten Form aus Nordamerika sind erforderlich. Insbesondere sollten Isolate aus den südlichsten und nördlichsten Vorkommensgebieten dieser Form unter Einbeziehung molekularbiologischer Methoden miteinander verglichen werden. Möglicherweise wird dabei neben der bekannten nordamerikanischen, *B. xylophilus* zugerechneten m-Form noch die Art *B. mucronatus* festgestellt.

Literatur

- ABAD, P., S. TARES, N. BRUGIER und G. DE GUIRAN, 1991: Characterization of the relationship in the pinewood nematode species complex (PWNSC) (*Bursaphelenchus* spp.) using a heterologous *unc-22* DNA probe from *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* **102**, 303–308.
- BAUJARD, P., A. BOULBRIA, R. HAM, C. LAUMOND und C. SCOTTO LA MASSESE, 1979: Premières données sur la nematofaune associée aux dépérissements du pin maritime dans l'ouest de la France. *Ann. Sci. For.* **36**, 331–339.
- BECKENBACH, K., M. J. SMITH und J. M. WEBSTER, 1992: Taxonomic affinities and intra- and interspecific variation in *Bursaphelenchus* spp. as determined by polymerase chain reaction. *J. Nematology* **24**, 140–147.
- BOLLA, R. I. und H. TAMURA, 1989: Mating potential and chromosome number of some Japanese and U. S. populations of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Jap. J. Nematology* **19**, 7–11.
- BOLLA, R. I., C. WEAVER und R. E. K. WINTER, 1988: Genomic differences among pathotypes of *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. Nematology* **20**, 309–316.
- BRAASCH, H., 1991: Erster Nachweis von *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya und Enda, 1979 in Deutschland und sein Vorkommen in Holzimporten aus der UdSSR nebst Ergänzungen zur Beschreibung dieser Art. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, Berlin* **27**, 209–218.
- DE GUIRAN, G. und A. BOULBRIA, 1986: Le nématode des pins. Caractéristiques de la souche française et risque d'extension de *Bursaphelenchus xylophilus* en Europe. *EPPO Bulletin* **16**, 445–452.

- DE GUIRAN, G. und N. BRUGUIER, 1989: Hybridization and phylogeny of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus* spp.). *Nematologica* **35**, 321–330.
- DE GUIRAN, G., M. J. LEE, A. DALMASSO und M. BONGIOVANNI, 1985: Preliminary attempt to differentiate pinewood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) by enzyme electrophoresis. *Revue Nematol.* **8**, 92–95.
- RIGA, E., K. BECKENBACH und M. WEBSTER, 1992: Taxonomic relationships of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* based on interspecific and intraspecific cross-hybridisation and DNA analysis. *Fundam. appl. Nematol.* **15**, 391–395.
- SCHAUER-BLUME, M., 1992: Crossing experiments with *Bursaphelenchus* isolates from Europe and Japan. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **99**, 304–309.
- WINGFIELD, M. J., A. BLANCHETTE und E. KONDO, 1983: Comparison of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* from pine and balsam fir. *Europ. J. Forest Pathology* **13**, 360–372.
- WEBSTER, J. M., R. V. ANDERSON, D. L. BAILLIE, K. BECKENBACH, J. CURRAN und T. A. RUTHERFORD, 1990: DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. *Revue Nematol.* **13**, 255–263.