

Jörg Schumacher¹, Rolf Kehr², Sindy Leonhard³, Alfred Wulf¹

Neue Erkenntnisse zur Pathogenese des Triebsterbens an Esche (*Fraxinus excelsior*)

New details on the pathogenesis of ash dieback

Zusammenfassung

Das Eschentriebsterben nimmt in Deutschland unter den bedeutsamen Baumkrankheiten gegenwärtig eine zentrale Rolle ein. In den Baumschulen sind die wirtschaftlichen Schäden besonders groß, wenngleich auch Wälder in zunehmendem Maße betroffen sind. Die hier vorgestellten mykologischen und histologischen Untersuchungen wurden an dreijährigen Baumschulpflanzen durchgeführt. Dabei ist die durch *Chalara fraxinea* (Teleomorph: *Hymenoscyphus albidus*) verursachte Infektionsrate in der Rinde, im äußeren und inneren Holzteil sowie im Mark für die Organe Spross und Wurzel ermittelt worden. Die Invasions- und Ausbreitungsstrategie des Pilzes wurde im verholzten Spross untersucht. Zudem wurde überprüft, ob bodenbürtige Oomyceten (*Phytophthora*- bzw. *Pythium*-Arten) als primäre oder maßgebliche Schädigungsursache in Frage kommen.

Die Ergebnisse bestätigen die dominante Rolle von *C. fraxinea* als Verursacher des Eschentriebsterbens und schließen zugleich die Bedeutung von Oomyceten im Krankheitsprozess aus. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass der Pilz den verholzten Spross sehr effektiv aus zentralen Bereichen heraus dreidimensional zu erschließen vermag und dabei nicht vorrangig endophytisch lebt. Die zunächst den oberirdischen Teil der Pflanze schädigende Infektion kann sich nachfolgend auf alle Bereiche im Wirt ausdehnen.

Stichwörter: *Chalara fraxinea* (Hauptfruchtform: *Hymenoscyphus albidus*), *Fraxinus excelsior*, Baumschulpflanzen, Oomyceten, mykologische und histologische Studien

Abstract

Ash dieback is currently one of the most important tree diseases in Europe. It is already widespread in Northern and Central Europe as well as in some parts of Western and Southern Europe. Trees of the species *Fraxinus excelsior* and *F. angustifolia* of all ages on various site types are affected in forests, in the landscape as well as in nurseries and urban plantings. Symptoms include wilting of leaves and young shoots, shoot dieback, premature leaf fall and variously colored bark necroses of different sizes, always lacking exudates. In young trees the disease leads to mortality within a few years, whereas a chronic process can often be observed in older trees. In Germany the impact of the disease varies greatly in different regions, but a countrywide distribution is assumed. Significant damage was especially established in nurseries and forests of Northern Germany.

The paper presents a recent investigation of a large number of naturally infested nursery saplings from Northern Germany. The real infection rates, invasion and spreading strategies of the fungus inside of plant tissues and the role of soil-borne *Oomycetes* as possible primary or accompanying causal organisms of the disease were examined. The results confirm the dominant role of *Chalara fraxinea* (teleomorph: *Hymenoscyphus albidus*) as the causal agent of ash dieback and rule out the role of pathogenic *Oomycetes* in the disease process. The authors conclude that the fungus is able to spread very effectively in woody tissue as a parasite and does not originate from the root system.

Institut

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Braunschweig¹

Hochschule für Angewandte Wissenschaft und Kunst, Fakultät Ressourcenmanagement, Göttingen²

Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft, Sachgebiet Waldschutz, Freising³

Kontaktanschrift

Prof. Dr. Alfred Wulf, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, E-Mail: alfred.wulf@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

September 2009

Key words: *Chalara fraxinea* (teleomorph: *Hymenoscyphus albidus*), *Fraxinus excelsior*, nursery saplings, Oomycetes, mycological and histological studies

Einleitung

Das Eschentriebsterben ist in Nord- und Mitteleuropa sowie in Teilen West- und Südeuropas bereits weit verbreitet. Erste Meldungen reichen bis in die 1990er Jahre zurück und betrafen zunächst die Baltischen Staaten, Polen und den Südwesten Skandinaviens sowie später auch Deutschland, Österreich, die Tschechische Republik, die Schweiz, Frankreich, Ungarn und zuletzt Slowenien (JUODVALKIS und VASILIAUSKAS, 2002; PRZYBYL, 2002a; BARKLUND, 2005; HEYDECK et al., 2005; CECH, 2005; THOMSEN und SKOVSGAARD, 2006; KOWALSKI und HOLDENRIEDER, 2008; SZABO, 2008; OGRIS et al., 2009; JANKOWSKY und HOLDENRIEDER, 2009). Betroffen sind Bäume jeden Alters in unterschiedlichen Standorten sowohl in Wäldern und beim Landschaftsgehölz als auch in Alleen und urbanen Grünanlagen. Die Symptomatik der Erkrankung ist vielschichtig und kann durch eine Blatt- und Triebwelke, vorzeitigen Blattfall und partielles Absterben in der Krone sowie durch sehr variabel gefärbte, exsudatlose Rindennekrosen unterschiedlicher Ausdehnung gekennzeichnet sein. Während bei jungen Bäumen der Krankheitsprozess meist innerhalb weniger Jahre letal verläuft, zeigt sich bei älteren Bäumen oft ein chronisches Krankheitsbild. Als Hauptverursacher wird mehrheitlich der Discomycet *Hymenoscyphus albidus* angesehen, der bis vor kurzem ausschließlich mit seiner erst im Jahr 2006 (KOWALSKI, 2006) beschriebenen Nebenfruchtform *Chalara fraxinea* im Zusammenhang der Krankheit stand (KOWALSKI und HOLDENRIEDER, 2009a,b). Für eine ursächliche Beteiligung des Pilzes sprechen sowohl die zunehmenden Nachweise (KOWALSKI, 2006; SCHUMACHER et al., 2007a; HALMSCHLAGER und KIRISITS, 2008; BAKYS et al., 2008; SZABO, 2008) als auch die durchgeführten Pathogenitätstests in Gewächshäusern und im Freiland (BAKYS et al., 2008 und 2009; KOWALSKI und HOLDENRIEDER, 2009a). Unklarheiten bestehen jedoch z. B. über das plötzliche, aggressive Auftreten dieses bisher unauffälligen Saprobionten sowie über die Infektions- und Ausbreitungsmechanismen des Krankheitserregers. Darüber hinaus lassen sich an den erkrankten Eschen auch eine Reihe weiterer Pilze mit z. T. pathologischem Potential nachweisen sowie gleichzeitig auftretende, abiotische Einflussfaktoren konstatieren. (CECH, 2005 und 2006a,b,c; CECH und HOYER-TOMICZEK, 2007; KOWALSKI und HOLDENRIEDER, 2008a und 2009a; BAKYS et al., 2009; KIRISITS et al., 2008; SCHUMACHER et al., 2007a,b und 2008). In Deutschland stellt sich das gegenwärtige Krankheitsausmaß sehr heterogen dar, wenngleich bereits von einem flächendeckenden Auftreten ausgegangen wird. Die größten ökonomischen und ökologischen Schäden werden in der Baumschul- und Forstwirtschaft Norddeutschlands festgestellt (SCHUMACHER et al., 2007a, 2007b). In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 300 dreijährige Baumschulpflanzen

mit dem Ziel untersucht, einerseits den Infektionsgrad und das Ausmaß der Schädigung in den unterschiedlichen Organen und Geweben zu quantifizieren und andererseits Erkenntnisse über die möglichen Infektions- und Ausbreitungswege des Erregers in der Pflanze zu gewinnen.

Material und Methoden

Für die Untersuchung wurden im Herbst 2008 insgesamt 300 dreijährige Pflanzen (*F. excelsior*) aus infizierten norddeutschen Baumschulen bezogen. Alle Pflanzen waren bis zum jahreszeitlich bedingten Laubabwurf in einem lebenden Zustand, wenn auch z. T. bereits sehr deutlich geschädigt. Die Pflanzen sind mit der gesamten Wurzelmasse komplett aus den Pflanzbeeten entnommen worden und wiesen zu Beginn der Untersuchung keinerlei mechanische Beschädigungen auf. Die Untersuchung umfasste insgesamt drei methodische Ansätze (Nachweis bodenbürtiger Oomyceten, Nachweis von *C. fraxinea* in Rinde, Holz und Wurzel sowie Studien zur Histologie und Symptomausprägung), für die jeweils 100 Pflanzen benötigt wurden.

Die für den Nachweis bodenbürtiger Oomyceten verwendeten 100 Pflanzen wurden auf fünf große Plastikwannen (je 20 Stück) verteilt und mit gleichen Abständen zueinander aufrecht positioniert. Die Wannen sind anschließend mit jeweils 40 l *Aqua dest.* aufgefüllt worden. Die Wurzeln und die unteren 10 cm des Sprosses befanden sich somit unter Wasser. Nach der Flutung wurde an der Wasseroberfläche zuerst mit einem Kescher das grobe und dann mit KIMTECH-Papiertüchern das feine Treibgut beseitigt. Für den indirekten Nachweis der Mikroorganismen sind auf der Wasseroberfläche organische Köder schwimmend ausgebracht worden. Dazu dienten einerseits unreife Äpfel der Sorte „Granny Smith“ (2 je Wanne) und andererseits 2 bis 3 Tage alte Blättchen (10 je Wanne) von im Gewächshaus angezogenen Eichensämlingen (cf. MITCHEL und KANNWISCHER-MITCHEL, 1992; ERWIN und RIBEIRO, 1996; JUNG, 1998; LEONHARD, 2004). Das Wasser in den Wannern wurde nach jeweils 24 h zu 1/3 erneuert. Verfärbten sich die Blattköder nach ca. 24 bis 36 h teilweise oder komplett bräunlich, wurden diese auf Filterpapier getrocknet, mit einem Skalpell in ca. 2-3 x 4-5 mm² große Stücke geschnitten und zu gleichen Anteilen in Petrischalen (25 pro Schale) mit selektivem Nährmedium (PARPN-Agar) ausgelegt (cf. JUNG, 1998). Aufgearbeitete (nekrotisierte) Blättchen sind jeweils durch frische Blattköder ersetzt worden. Diese sich wiederholende Prozedur wurde nach insgesamt 4 Tagen beendet. Die Äpfel sind nach 7 Tagen Versuchsdauer aufgearbeitet worden. Dabei wurde die Fruchtrinde zusammen mit dem darunter liegenden Fruchtgewebe bis in 1 cm Tiefe in ca. 1 cm³ große Probestücke aufgeschnitten und wie die Blattköder getrocknet und ausgelegt.

Aus den Proben herauswachsende Kolonien wurden abgeimpft und auf einen sterilen Karotten-Agar übertragen. Die Präsenz von Oosporen bei homothallischen Ar-

ten ist zur Gattungs- bzw. Artbestimmung herangezogen worden. Die ebenfalls für die Bestimmung benötigte Sporangienformation wurde durch die Flutung von 1 cm² großen Agar-Würfeln aus dem Randbereich 3 Tage alter Kulturen mit Teichwassersuspension einerseits und Bodenwasserfiltrat andererseits stimuliert. Das Teichwasser wurde im Verhältnis 1/5 mit *Aqua dest.* gemischt. Die Bodensuspension wurde mit Erdmaterial der jeweiligen Baumschule hergestellt, indem 50 g Boden mit 1000 ml *Aqua dest.* gespült und die dabei entstandene Suspension anschließend über einen FILTRAK-Faltenfilter gefiltert wurde (JUNG, 1998; LEONHARD, 2004).

Für den serologischen Nachweis (DAS-ELISA) der Mikroorganismen anhand von Zoosporen im Flutungswasser wurden zeitgleich zur Aufarbeitung der infizierten Blattköder auch Wasserproben aus den Wannen entnommen. Dazu wurde ein 40 ml Glasröhrchen an jeweils 9 systematisch verteilten Probepunkten mit einer Tiegelfange nacheinander solange senkrecht in das Flutungswasser eingetaucht, bis sich dieses mit Oberflächenwasser gefüllt hatte. Die jeweils derselben Flutungswanne zugehörigen Proben wurden in einem Messbecher gesammelt und mit einem Magnetrührer vermischt. Die Mischwasserproben (360 ml je Wanne) sind anschließend mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch eine 0,45 µm Zellulose-Nitrat-Membran gefiltert worden. Die Membranfilter wurden in flüssigem Stickstoff (-196°C) gefroren und danach mit einem Mörser zerrieben. Das Pulver ist in 2 ml Eppendorf-Kapseln mit je 1 ml Extraktionspuffer versetzt, dann vermischt und bei -20°C konserviert worden. Für die Positiv-Kontrolle wurden parallel zum Flutungsversuch in den Wannen Zoosporensuspensionen von 10 verschiedenen *Phytophthora*-Arten (*P. alni* BRASIER und S. A. KIRK, *P. cambivora* (PETRI) BUISMAN, *P. cactorum* (LEBERT und COHN) J. SCHRÖT., *P. citricola* SAWADA, *P. cinnamomi* RANDS, *P. europaea* E. M. HANSEN und T. JUNG, *P. gonapodyides* (H. E. PETERSEN) BUISMAN, *P. megasperma* DRECHSLER, *P. quercina* T. JUNG und *P. syringae* (KLEB.) KLEB.) aus der Instituts-Mykothek in Braunschweig hergestellt. Dazu wurden wie oben beschrieben Agar-Würfel aus der Randzone junger Kulturen herausgeschnitten und jeweils in Petrischalen (d = 5 cm) mit *Aqua dest.*, Bodenwasserfiltrat sowie Teichwassersuspension geflutet (pH-Wert: 6,5 bis 7). Wasserwechsel, Probenentnahme und Probenaufbereitung erfolgten wie oben erklärt.

Die Probenanalyse ist in Anlehnung an die bei ALI-SHTAYEH et al. (1991), WAKEHAM et al. (1997), PETTITT et al. (2002) sowie KYUCHUKOVA et al. (2006) angewandten Methoden vorgenommen worden. Für den DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wurden die Produkte (Coating- und Konjugat-Antikörper; Coating-, Konjugat-, Extraktions- und Wasch-Puffer; Positiv- und Negativ-Kontrollen; Substrat und Stop-Lösung) der Firma Neogen Europe Ltd, UK verwendet. Das Absorptionsmaß der Proben ist auf Microtiterplatten (96 wells) mit einem Photometer (Multiscan Ascent) nacheinander bei 405 und 630 nm ermittelt worden. Die für den Nachweis von *C. fraxinea* verwendeten 100 Pflanzen wurden äußerlich mit *Aqua dest.* gerei-

nigt und mit Filterpapier anschließend wieder getrocknet. Eine erste Unterteilung erfolgte entsprechend dem jährlichen Sprosszuwachs (Internodien), wozu die Pflanzen jeweils quer an den Triebbasenarben (Nodien) durchtrennt wurden. In einer sterilen Box sind die Pflanzen dann differenziert nach den Organen Wurzel und Spross sowie nach den Geweben Rinde, äußerer und innerer Splint sowie Mark aufgearbeitet worden. Die Präparation der Proben im Detail erfolgte entsprechend der von KOWALSKI (2006) beschriebenen Methodik. Danach wurden im Anschluss an die Oberflächendesinfektion (96% Ethanol) sowohl aus symptomatischen als auch asymptomatischen Bereichen der Pflanzen Probestücke in einer Größe von 5 x 5 x 1 mm³ herausgeschnitten und auf Malzextrakt-Agar (2%) ausgelegt. Die Petrischalen wurden in absoluter Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert und täglichen Kontrollen unterzogen. Da die Kolonien von *C. fraxinea* ein relativ langsames Wachstum aufweisen und mitunter empfindlich auf Veränderungen reagieren, fand eine Übertragung auf frische Nährböden frühestens nach 2 Wochen statt. Bis dahin wurden auftretende Kontaminationen und konkurrierende Mikroorganismen fortlaufend aus den Petrischalen entfernt. Zwei der frisch gewonnenen sowie 8 weitere Isolate (nördliches bzw. zentrales West- und Ostdeutschland, südliches Westdeutschland sowie Schweden und Polen) wurden aus dem Fundus der Instituts-Mykothek in Braunschweig (JKI) ausgewählt, um zu überprüfen, ob *C. fraxinea* extrazelluläre Phenoloxidasen produziert. Die Stämme wurden auf spezielle Nährmedien (2% Malzextrakt-Agar, zuzüglich 0,005% Guajakol bzw. 0,1% Tannin) zur Induktion oxidativer Farbreaktionen geimpft (cf. BAVENDAMM, 1928; RYPACEK, 1966).

Für die Erhebungen zur Symptomausprägung wurden die 100 verwendeten Pflanzen zunächst mit *Aqua dest.* gesäubert. Daraufhin sind sowohl die Gesamtlänge als auch das Längenverhältnis zwischen Spross und Wurzel ermittelt worden. Äußere Hinweise auf Infektionen (Rindennekrosen, Ausfall der Terminalknospe, Zwieselbildung) wurden dabei erfasst. Vermessen wurden ebenfalls die Längenausdehnung der Nekrosen in der Rinde und der damit assoziierten Verbräunungen im Holz. Aus den Zentren sowie oberen und unteren Übergangsbereichen der Holzverbräunung bzw. Rindennekrosen sind Probesegmente für histologische Schnitte herausgetrennt worden. Bis zur Anfertigung der Mikrotomschnitte wurden die Sprossabschnitte in einer Konservierungslösung (1/6 Glycerin, 1/3 *Aqua dest.*, 1/2 Ethanol), in welcher auch die Entlüftung (Vakuumpumpe) stattfand, gelagert. Die mit einem Schlittenmikrotom (Leitz 1208) in der Radial-, Tangential- und Querebene gefertigten Holz-schnitte sind zur Verdeutlichung der Pilzhyphen und des Cytoplasmas unter kurzzeitiger Erhitzung (90°C) mit Anilinblau (1% in Milchsäure) für 24 h angefärbt worden (GERLACH, 1969). Eine Unterscheidung pflanzlicher Reservestoffe von pilzlichen Zellinhalten wurde mit Lugol'scher Lösung (1% Iod, 2% Kaliumiodid in *Aqua dest.*) vorgenommen. Die anschließende Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

Ergebnisse

Sowohl die angewandten Ködermethoden (Apfelfalle, Eichenblättchen-Test) als auch der serologische Test (DAS-ELISA) erbrachte keine Hinweise auf Infektionen durch *Phytophthora*-Arten. Hingegen konnten aus allen 5 Flutungswannen mithilfe der baitings mehrere Vertreter der Gattung *Pythium* nachgewiesen werden. Die zunächst 63 gewonnenen Isolate (zwischen 5 und 16 pro Flutungswanne) ließen sich anhand der makroskopischen und mikroskopischen Kulturmerkmale insgesamt 4 verschiedenen, sowohl homo- als auch heterothallischen bzw. sterilen Spezies mit entweder globoser oder filamentöser Sporangienbildung zuordnen, die jedoch aufgrund der geringen Virulenz nicht abschließend determiniert wurden. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Daten der Wurzelerhebung. Die 100 vermessenen Pflanzen wiesen ohne Ausnahme gut ausgebildete Wurzelsysteme auf und wurden optisch als vital eingeschätzt. Das mittlere Verhältnis zwischen Spross und Wurzel betrug exakt 2:1.

Bei insgesamt 95% der untersuchten Pflanzen konnte *C. fraxinea* erfolgreich aus symptomatischem Gewebe isoliert werden. Nachweise wurden überwiegend im verholzten Gewebe des Sprosses (äußerer und zentraler Holzteil), deutlich seltener in der Wurzel und nur ausnahmsweise in der Sprossrinde erbracht (Abb. 1). Für die nekrotisierte Rinde muss jedoch zeitgleich festgestellt werden, dass dort ein höherer Anteil (99%) konkurrierender und z. T. antagonistischer Pilzarten präsent ist als im verbräunten Holzteil (75%). Zu den häufigsten sekundär isolierten Spezies zählen *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. (Teleomorphe: *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker) und *Phomopsis* sp. Der Nachweis von *C. fraxinea* in eindeutig asymptomatischem Probematerial gelang dagegen nicht. Ein Vergleich der positiven Befunde in den jeweils 3 Jahresabschnitten (Internodien) stellt zwischen dem dreijährigen (ältesten) und dem zweijährigen Sprossab-

schnitt lediglich geringe Unterschiede heraus. Ein signifikanter Unterschied (abnehmende Tendenz) besteht allerdings zwischen den älteren Sprossabschnitten und dem jüngsten (einjährigen) Trieb (TUKEY-Test: $P < 0,001$). Als signifikant erweist sich auch das Ungleichgewicht zwischen den Nachweisen von *C. fraxinea* in der Wurzel und im Spross (KRUSKAL-WALLIS-Test: $P < 0,001$). Die detaillierte Betrachtung erlaubt Rückschlüsse auf den möglichen Infektionsweg. So beträgt der errechnete Übereinstimmungsgrad (negative und positive Befunde) zwischen der Wurzel und dem Spross zwar insgesamt nur 52%, aber zwischen der Wurzel und dem direkt benachbarten, dreijährigen Sprossabschnitt immerhin 65%. Während fast die Hälfte aller positiven Befunde (48%) ausschließlich dem Spross zugeordnet werden konnten, gelang der Nachweis von *C. fraxinea* allein in der Wurzel in keinem einzigen Fall.

Der BAVENDAMM-Test mit 10 Isolaten des Pilzes aus geographisch unterschiedlichen Regionen zeigte positive Reaktionen für alle Isolate im Guajakol-Agar, jedoch nur für 3 Isolate im Tannin-Agar. Zudem wurde im Tannin-Agar lediglich bei 2 Isolaten ein normales Myzelwachstum festgestellt. Die Isolate im Guajakol-Agar wuchsen regulär, wiesen jedoch ein sehr variables Reaktionsverhalten auf. So zeigten 4 Isolate eine Farbreaktion ausschließlich am Impfstück, während die übrigen 6 Isolate den Agar auch in jüngeren Bereichen der Kultur verfärbten.

Weiterhin zeigten die Vermessungen an den Pflanzen, dass zwischen den Nekrosen in der Rinde und den verbräunten Holzbereichen signifikante Zusammenhänge bestehen. Zum einen nimmt die Ausdehnung einer Rindennekrose auch mit größer werdender Holzverbräunung zu (Abb. 2, $r^2 = 0,82$), zum anderen ist die Verbräunung im Holz grundsätzlich größer als die assoziierte Nekrotisierung in der Rinde (WILCOXON-Test: $P < 0,001$, Abb. 3). Dieser Zusammenhang wird auch durch die Präsenz des Erregers gestützt, der mit der größten Stetigkeit

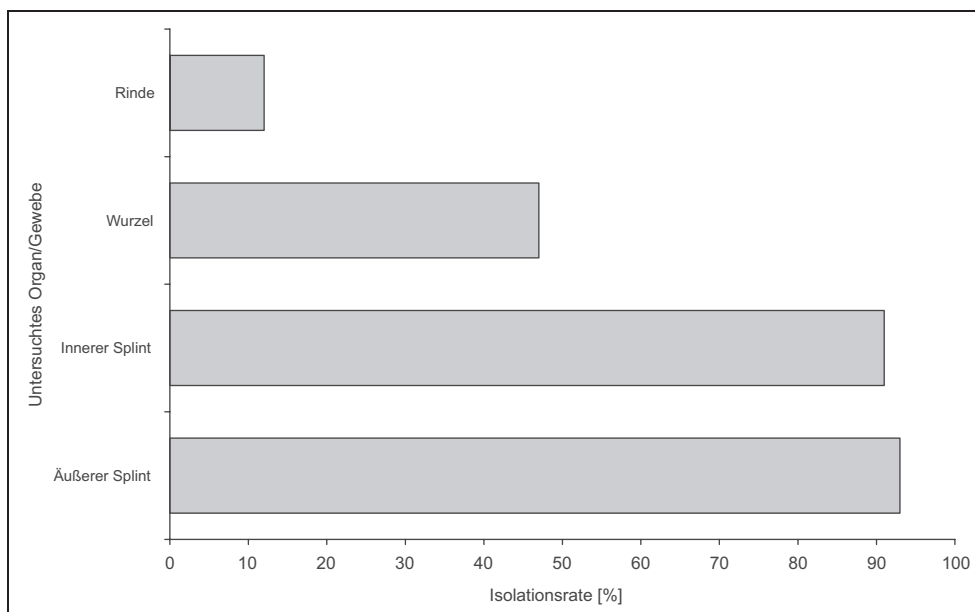


Abb. 1. Nachweis von *Chalara fraxinea* in den untersuchten Organen bzw. Geweben.

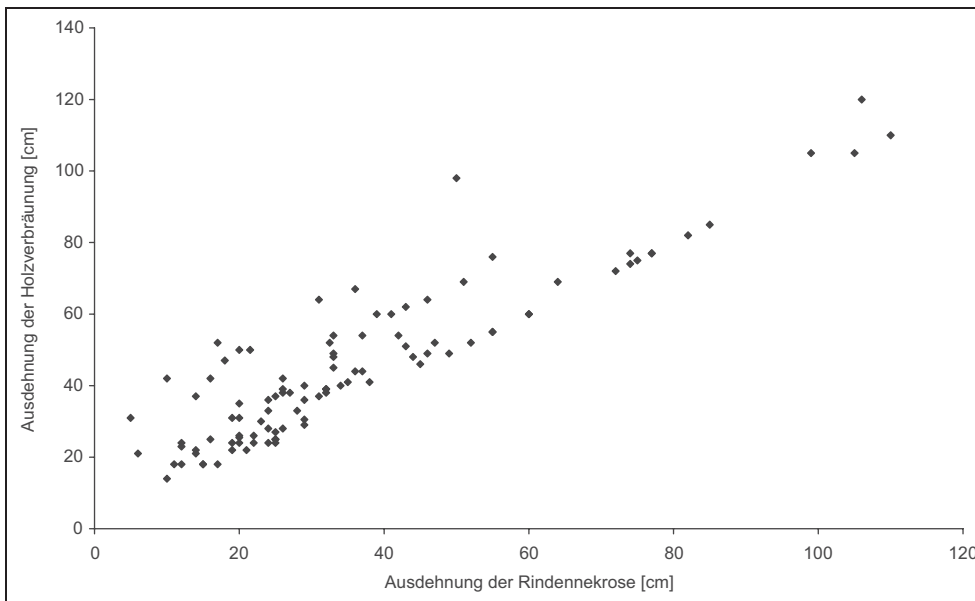


Abb. 2. Zusammenhang zwischen den Längen der Rindennekrosen und den damit assoziierten Holzverbräunungen.

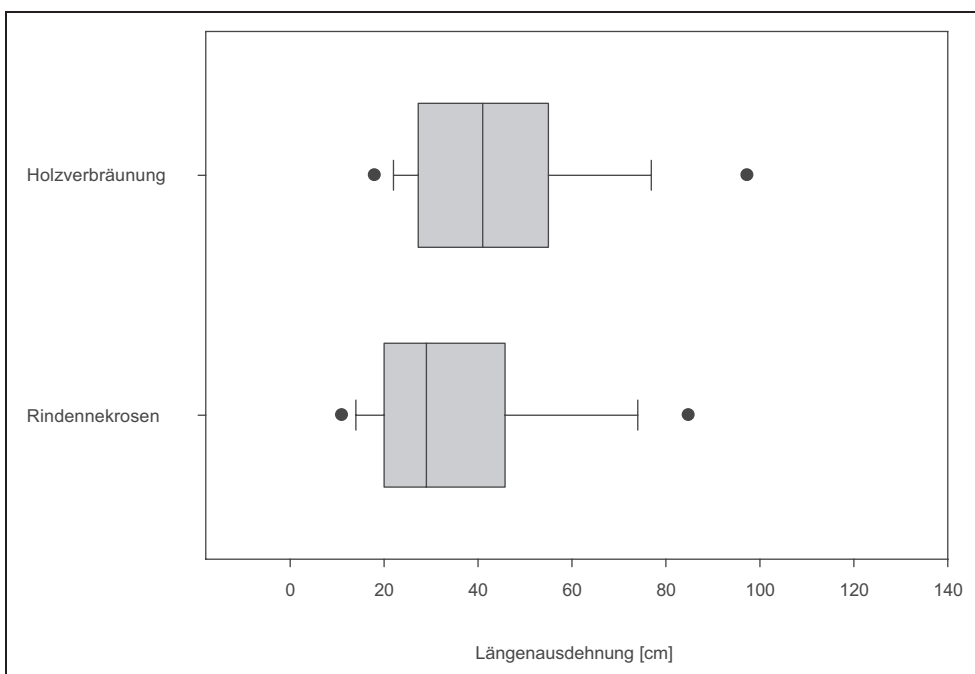


Abb. 3. Vergleich der Längenausdehnung bei den Rindennekrosen und den damit assoziierten Holzverbräunungen.

aus der Peripherie des erkrankten Gewebes isoliert werden konnte. Die Erhebungen ergaben außerdem, dass der überwiegende Anteil der Pflanzen (79%) jeweils nur eine und deutlich seltener zwei (18%), drei oder sogar vier (3%) Rindennekrosen mit den korrespondierenden Holzverbräunungen aufwiesen. An 30% der Pflanzen wurden darüber hinaus Zwieselbildungen als Folge abgestorbener Terminalknospen registriert.

Nach Auswertung der lichtmikroskopisch untersuchten Präparate (Microtomschnitte) ergibt sich für *C. fraxinea* ein plausibles Muster der Besiedlung und Ausbreitung im verholzten Spross. Danach besiedelt der Pilz zunächst und stets vorzugsweise die mit Primärmetaboliten (v. a. Stärke, Fette, Nährsalze) angereicherten Gewebe. Die radiale Ebene erschließen sich die Hyphen zumeist über die Parenchymzellen der Holzstrahlen (Abb. 4,

links), wodurch der Pilz sehr rasch z. B. vom zentralen Mark bis in das Phloem gelangt. Das Mark und die Gefäße ermöglichen dagegen vorrangig die Ausbreitung in longitudinaler Richtung. Sowohl in den Gefäßen als auch im paratrachealen (vasizentrischen) und Holzstrahlparenchym ist die größte Besiedlungsdichte zu beobachten (Abb. 4, rechts). Dort können auch die kräftigsten Hyphen gemessen werden (bis 7 µm).

In einem späteren Stadium lässt sich *C. fraxinea* zunehmend auch in den Faserzellen sowie im Kambium und Phloem nachweisen (Abb. 5, links), wenngleich die Hyphen dort im Allgemeinen geringere Durchmesser als in den Gefäß- und Parenchymzellen erreichen. Die Ausbreitung von Zelle zu Zelle bzw. in ein benachbartes Gewebe auf Zellebene erfolgt durch Penetration der Tüpfel mithilfe mechanischen Druckes, wobei die Hyphen in den

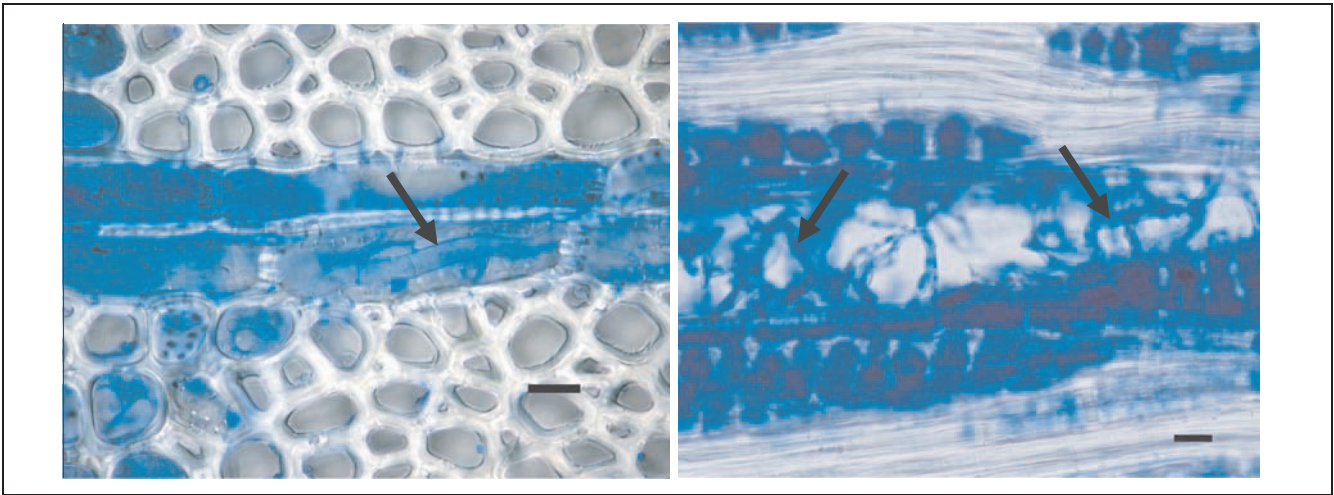


Abb. 4. Wachstum von Hyphen im Holzstrahlparenchym (links, Querebene) und in den Gefäßen (rechts, Tangentialebene), Referenzbalken = 10µm.

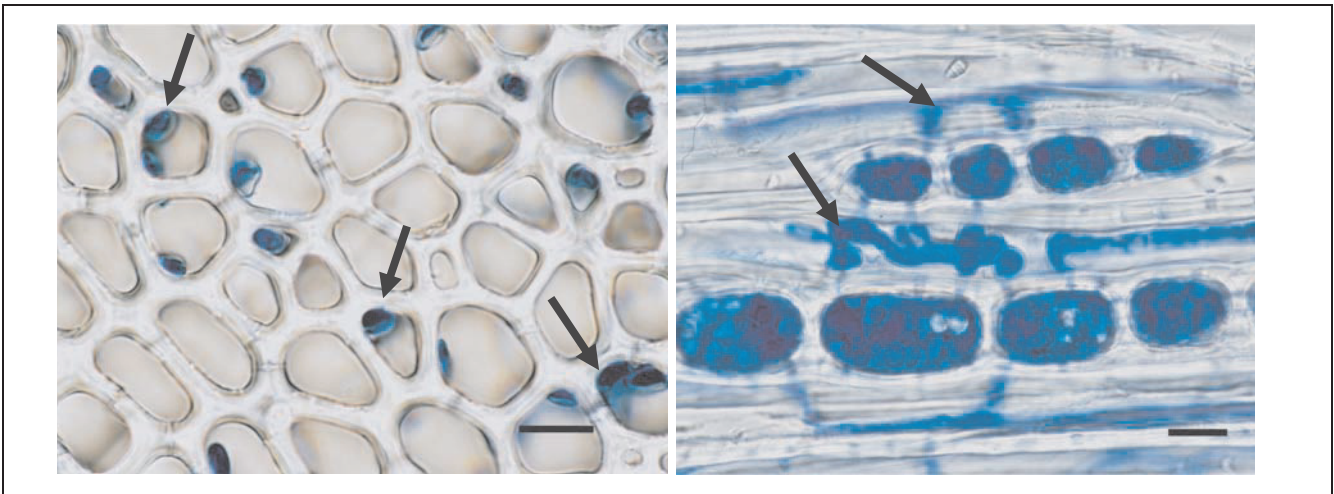


Abb. 5. Quergeschnittene Hyphen in Fasern und Gefäßen (links, Querebene) und Übergänge von Hyphen zwischen Fasern bzw. Gefäßen und Zellen des Holzstrahlparenchyms (rechts, Tangentialebene), Referenzbalken = 10µm.

Zelllumina verdickt und in den Kanälen als dünne Perforationshyphen erscheinen (Abb. 5, rechts).

Diskussion

Im Unterschied zu vorangegangenen Untersuchungen (PRZYBYL, 2002a; HALMSCHLAGER und KIRISITS, 2008; BAKYS et al., 2008 und 2009; KOWALSKI und HOLDENRIEDER 2008 und 2009a) konnte in der vorliegenden Studie eine große Anzahl gleichaltriger (dreijähriger) Baumschulpflanzen untersucht werden, die einerseits unter bekannten und vergleichbaren Freilandbedingungen erzogen sowie andererseits natürlichen Infektionen ausgesetzt waren. Während Erhebungen zu äußeren Krankheitsmerkmalen in weitgehend allen bisherigen Untersuchungen stattfanden (cf. PRZYBYL, 2002a,b,c; BARKLUND, 2005; KOWALSKI und LUKOMSKA, 2005; CECH, 2006a,b,c; THOMSEN et al., 2007; SCHUMACHER et al., 2007a, b; KIRISITS und HALMSCHLAGER, 2008; SKOVGAARD et al., 2009; BAKYS et al.,

2008 und 2009) wurden histologische Ergebnisse bislang jedoch nicht publiziert. Eine wichtige Ergänzung stellen auch die Tests zum Vorkommen pathogener Oomyceten in der Rhizosphäre erkrankter Eschen dar, da bei den Untersuchungen von BAKYS et al. (2008) ausschließlich oberirdische Organteile (Blätter, Blattstiele und Rinde) anhand extrahierter DNA berücksichtigt wurden. Somit blieb die Frage noch unbeantwortet, ob bodenbürtige Oomyceten für eine maßgebliche Prädisposition bzw. primäre Schädigung der Pflanzen verantwortlich sein könnten. Die dafür ausgewählten Flutungs- und Ködermethoden sowie serologischen Tests sind anerkannte Nachweisverfahren, die sich an der Biologie der Erreger orientieren. Aufgrund der nun vorliegenden Ergebnisse, die sich sowohl auf die negativen Testbefunde als auch Messdaten der Wurzelerhebung stützen, wird eine ursächliche oder relevante Beteiligung von Oomyceten im Krankheitsprozess ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu wird die auch anderenorts festgestellte Bedeutung von *Chalara fraxinea* (Teleomorphe: *Hymenoscyphus albidus*) als

Haupterreger des Eschentriebsterbens bestätigt, welcher sich als dominanter Pilz im erkrankten Gewebe noch lebender Pflanzen erweist. Die Ergebnisse lassen ebenfalls den Schluss zu, dass *C. fraxinea* kein überwiegend endophytischer oder wurzelbürtiger Pilz ist und die Pathogenese somit in den oberirdischen Pflanzenteilen induziert wird. Der Erreger lässt sich zwar auch in der Wurzel in gewissem Umfang nachweisen, jedoch nur, sofern die Infektion aus dem darüber gelegenen Spross übergreift. Die Ausbreitung im Wirtsgewebe ist von den Zentren der Invasion grundsätzlich in alle Richtungen möglich, wengleich das Wachstum im Holz und dort insbesondere im Mark, den Holzstrahlen sowie Gefäßen forciert erscheint. Als Nahrungsquelle dienen dem Pilz dabei v. a. Parenchymzellen, deren Reservestoffe auf dem Weg der Besiedlung strategisch erschlossen werden. Das bevorzugte Wachstum in zentralen Bereichen des verholzten Sprosses kann für *C. fraxinea* ein Vorteil darstellen, da dort die Abwehrmechanismen des Wirtes nur eingeschränkt wirken.

Die Vermutung der Autoren, dass die Nekrotisierungen in der Rinde vielmehr die Folge einer bereits vorangegangenen Schädigung im Holzteil sind als der Ausgangspunkt der Erkrankung, lässt sich anhand der signifikanten Unterschiede bei den Isolationsraten in den verschiedenen Geweben sowie bei den Abmaßen der Verbräunung in der Rinde und im Holz verdeutlichen.

Darüber hinaus zeigen die positiven Reaktionen beim BAVENDAMM-Test, insbesondere im Guajakol-Agar, dass *C. fraxinea* über ein gewisses Potential zum Abbau von Holzkomponenten verfügt. Diese Eigenschaften, in Verbindung mit dem geringen Abwehrverhalten des Wirtes, lassen durchaus Ähnlichkeiten zu typischen Welke-Erregern aus der Ordnung der *Ophiostomatales* (cf. WINGFIELD et al., 1993) erkennen. Xylophage Fähigkeiten sind ebenfalls unter den bei der natürlichen Astreinigung beteiligten Ascomyceten verbreitet (BUTIN und KOWALSKI, 1992). Die Bildung generativer Fruchtkörper (Teleomorphe) an den Blattstielen des Falllaubes könnte ein Anzeichen für die ursprüngliche Zugehörigkeit des Pilzes zu dieser ökologischen Gruppe sein.

Für die Baumschulwirtschaft zeichnet sich für die Eschenproduktion eine zunehmend Besorgnis erregende Situation ab. Die vorgestellte Studie kann dazu beitragen, die Kenntnisse über das Eschentriebsterben zu erweitern und damit auch mögliche Lösungsansätze für zukünftige präventive und kurative Maßnahmen zielgenauer auszurichten.

Danksagung

Wir danken Herrn K. LANGE (Ellerhoop) für die Bereitstellung der Baumschulpflanzen sowie den Herren Prof. T. KOWALSKI (Kraków) und Dr. R. VASAITIS (Uppsala) für die polnischen und schwedischen Isolate von *C. fraxinea*. Für die technische Assistenz sei außerdem Frau D. TRAUTMANN, U. SCHEIDEMANN, B. BODEWALD und Herrn H. THIELE gedankt.

Literatur

- ALI-SHTAYEH, M.S., J.D. MACDONALD, J. KABASHIMA, 1991: A method for using commercial ELISA Tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water. *Plant Disease* **75**, 305-311.
- BAKYS, R., R. VASAITIS, P. BARKLUND, K. IHRMARK, J. STENLID, 2008: Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* **58**, 284-292.
- BAKYS, R., R. VASAITIS, P. BARKLUND, I.M. THOMSEN, J. STENLID, 2009: Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *Eur. J. Forest. Res.* **128**, 51-60.
- BARKLUND, P., 2005: Ash dieback takes over south and mid-Sweden. *SkogsEko* **3**, 11-13 (in Swedish).
- BAVENDAMM, W., 1928: Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzerstörenden Pilzen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* **38**, 257-276.
- BUTIN, H., T. KOWALSKI, 1992: Die natürliche Astreinigung und ihre biologischen Voraussetzungen. Versuche zum Holzabbau durch Astreinigerpilze. *Eur. J. For. Path.* **22**, 174-182.
- CECH, T.L., 2005: Blattkrankheiten und vorzeitiger Laubfall – eine Folge des kühlfeuchten Sommers 2005. *Forstschutz Aktuell* **34**, 11-12.
- CECH, T.L., 2006a: Auffallende Schadfaktoren an Waldbäumen im Jahr 2005. *Forstschutz Aktuell* **35**, 6-7.
- CECH, T.L., 2006b: Eschenschäden in Österreich. *Forstschutz Aktuell* **37**, 18-20.
- CECH, T.L., 2006c: Neuartige Eschenschäden. *Forstzeitung* **11**, 41.
- CECH, T., U. HOYER-TOMICZEK, 2007: Aktuelle Situation des Zurücksterbens der Esche in Österreich. *Forstschutz Aktuell* **40**, 8-10.
- ERWIN, D.C., O.K. RIBEIRO, 1996: *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society (Hrsg.), St. Paul, Minnesota.
- GERLACH, D., 1969: *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- HALMSCHLAGER, E., T. KIRISITS, 2008: First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathology* **57**, 1177.
- HEYDECK, P., M. BEMMANN, H.-G. KONTZOG, 2005: Triebsterben an Gemeiner Esche (*Fraxinus excelsior*) im nordostdeutschen Tiefland. *Forst und Holz* **60**, 505-506.
- JANKOVSKY, L., O. HOLDENRIEDER, 2009: *Chalara fraxinea* – ash dieback in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.* **45**, 74-78.
- JUODVALKIS, A., A. VASILIAUSKAS, 2002: The extent and possible causes of dieback of ash stands in Lithuania. *LZUU Mokslo Darbai. Biomedicinos Mokslo* **56**, 17-22 (in Lithuanian).
- JUNG, T., 1998: Die Phytophthora-Erkrankung der europäischen Eichenarten – wurzelzerstörende Pilze als Ursache des Eichensterbens. *Diss. Univ. München. LINCOM*.
- KIRISITS, T., E. HALMSCHLAGER, 2008: Eschenpilz nachgewiesen. *Forstzeitung* **2**, 32-33.
- KIRISITS, T., M. MATLAKOVA, S. MOTTINGER-KROUPA, E. HALMSCHLAGER, 2008: Verursacht *Chalara fraxinea* das Zurücksterben der Esche in Österreich? *Forstschutz Aktuell* **43**, 29-34.
- KOWALSKI, T., 2006: *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *For. Path.* **36**, 264-270. doi:10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x
- KOWALSKI, T., O. HOLDENRIEDER, 2008: Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa. *Schweiz. Z. Forstwes.* **3**, 45-50.
- KOWALSKI, T., O. HOLDENRIEDER, 2009a: Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. *For. Path.* **39**, 1-7.
- KOWALSKI, T., O. HOLDENRIEDER, 2009b: The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *For. Path.* doi:10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x
- KOWALSKI, T., A. LUKOMSKA, 2005: Studies of *Fraxinus excelsior* L. dieback in stands of Wloszczowa Forest Unit. *Acta Agrobot.* **59**, 429-440 (in Polish).
- KYUCHUKOVA, M.A., C. BÜTTNER, J. GABLER, B. BAR-YOSEF, R. GROSCH, H.-P. KLÄRING, 2006: Evaluation of a method for quantification of *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots at different temperatures and inoculum densities. *Journal of Plant Diseases and Protection* **113**, 113-119.
- LEONHARD, S., 2004: Vorkommen und Bedeutung pilzähnlicher Mikroorganismen (Abt. Oomycota) in ausgewählten Eichenbeständen des Freistaates Sachsen. *Diplomarbeit*, TU Dresden.
- MITCHEL, D.J., M.E. KANNWISCHER-MITCHEL, 1992: *Phytophthora*. In: Singleton, L.L.; J.D. Mihail, C.M. Rush 1992: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. The American Phytopathological Society (Hrsg.), St. Paul, Minnesota. 265 S.
- OGRIS, N., T. HAUPTMANN, D. JURC, 2009: *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. *New Dis. Rep.*, Vol. **19**.

- PETTITT, T.R., A.J. WAKEHAM, M.F. WAINWRIGHT, J.G. WHITE, 2002: Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Path.* **51**, 720-727.
- PRZYBYL, K., 2002a: Causes of decline of ash trees and stands. Project Report. Central Board of State Forests, Warsaw (in Polish).
- PRZYBYL, K., 2002b: Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *For. Path.* **32**, 387-394. doi:10.1046/j.1439-0329.2002.00301.x
- PRZYBYL, K., 2002c: Mycobiota of thin roots showing decay of *Fraxinus excelsior* young trees. *Dendrobiology* **48**, 65-69.
- RYPÁČEK, V., 1966: Biologie holzerstörender Pilze. Jena, Gustav Fischer Verlag.
- SCHUMACHER, J., A. WULF, S. LEONHARD, 2007a: Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eschen. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **59**, 121-123.
- SCHUMACHER, J., P. HEYDECK, S. LEONHARD, A. WULF, 2007b: Neuartige Schäden an Eschen. *AFZ/Der Wald* **20**, 1094-1096.
- SCHUMACHER, J., S. LEONHARD, A. WULF, P. HEYDECK, 2008: Neuartiges Eschentriebsterben in Mittel- und Nordeuropa – welche Bedeutung kommt dem Gefäßpilz *Chalara fraxinea* zu? *Jahrbuch der Baumpflege* 2008, 147-154.
- SKOVSGAARD, J.P., I.M. THOMSEN, I.M. SKOVGAARD, T. MARTINUSSEN, 2009: Associations between symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *For. Path.* (in press).
- SZABO, I., 2008: First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. *New Dis. Rep.*, Vol. **18**.
- THOMSEN, I.M., J.P. SKOVSGAARD, 2006: Ash dieback: climatic damage or fungal attack? *Skoven* **38**, 408-411 (in Danish).
- THOMSEN, I.M., J.P. SKOVSGAARD, P. BARKLUND, R. VASAITIS, 2007: Fungal disease is the cause of ash dieback. *Skoven* **39**, 234-236 (in Danish).
- WAKEHAM, A.J., T.R. PETTITT, J.G. WHITE, 1997: A novel method for detection of viable zoospores of *Pythium* in irrigation water. *Ann. Appl. Biol.* **131**, 427-435.
- WINGFIELD, M.J., K.A. SEIFERT, J.F. WEBBER (editors), 1993: *Ceratocystis* and *Ophiostoma* – taxonomy, ecology, and pathogenicity. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.