

Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz, Department für
Wald- und Bodenwissenschaften



Untersuchungen zum gegenwärtigen Zurücksterben der Eschen

Masterarbeit

von

Michaela Matlakova

Betreuer:

Ao. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Erhard Halmschlager
Univ. Ass. Dipl. Ing. Dr. Thomas Kirisits

Wien, 2009

DANKSAGUNG

Mein Dank geht an:

meinen Masterarbeitsbetreuer ao. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Erhard Halmschlager für seine wertvolle fachliche Hilfe und seine zahlreichen Ratschläge und Korrekturen während des Schreibprozesses.

Univ. Ass. Dipl. Ing. Dr. Thomas Kirisits, der es mir ermöglicht hat, diese interessante Masterarbeit im Rahmen eines von ihm beantragten Projekts durchzuführen, sowie für seine stete Unterstützung bei den Versuchen.

meine ganze Familie für ihre große Geduld, die Ermutigung und die Unterstützung während der Zeit meines Studiums.

meine Freunde und Kollegen am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz, wie Mag. Susanne Mottinger – Kroupa, Andrea Stradner, MTA Susanne Krumböck, Ing. Gabriele Motlik, Dipl. Ing. Peter Kritsch und Roman Wanjek, für ihre technische Assistenz und Hilfsbereitschaft und besonders für das angenehme Arbeitsklima am Institut.

meine Kollegin und Freundin Dipl. Ing. Nina Dobart, die eine hilfreiche Stütze während dem Verfassen dieser Arbeit war.

das Projekt FORTHREATS (The European network on emerging diseases and invasive species threats to European forest ecosystems) – Projekt Kontrakt Nr. 044436, innerhalb des 6. Rahmenprogramms der Europäischen Union für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

das Lebensministerium (Forschungsprojekt Nr. 100343, BMLFUWLE. 3.2.3/0001-IV/2/2008), sowie die Landesregierungen von Niederösterreich, Salzburg, Kärnten, Oberösterreich, der Steiermark und des Burgenlandes sowie die Österreichischen Bundesforste (ÖBf AG) für die Finanzierung des Forschungsprojektes über das Eschentriebsterben in Österreich und damit zugleich dieser Masterarbeit.

die Landesforstdienststellen der Bundesländer, zahlreichen Bezirksforstinspektionen und Forstbetrieben sowie den Forstschutzreferenten der Bundesländer für die praktische Unterstützung der Arbeit.

Herrn Ing. Ofö. Minich, Revierleiter in Neuwaldegg und Herrn Thomas Hofer, Revierleiter in Nasswald, für ihre Hilfe bei der Probensammlung.

und Herrn Prof. Dipl. Ing. Dr. Ferenc Lakatos, Univ. of West-Hungary, für die Hilfe bei der Besorgung der Eschenpflanzen für den Inokulationsversuch.

Abstract (engl.)

A massive dieback of shoots, twigs and branches of common ash (*Fraxinus excelsior*) is presently observed in many areas across Europe. In Austria this phenomenon was first observed in 2005. Isolations from naturally infected ash trees (*F. excelsior*) from two sites in Lower Austria and one site in Vienna carried out in the course of this master thesis clearly demonstrated that *Chalara fraxinea*, which is considered to play a key role in this process, was always associated with the early symptoms of dieback. The total rate of isolations from symptomatic ash trees was 81 %. Furthermore, the pathogenicity of *C. fraxinea* was confirmed on 1-2 year-old, potted ash trees (*F. excelsior*, *F. angustifolia* and *F. ornus*) in inoculation experiments. In the third task we compared the influence and correlation between length of necrosis of inoculated ash trees and the growth rate of the respective isolates on agar media.

Key words: *Chalara fraxinea*, inoculation experiments, pathogenicity tests, growth tests

Abstract (dt.)

Die Esche (*Fraxinus excelsior*) ist gegenwärtig in vielen Teilen Europas von einem schwerwiegenden Zurücksterben der Triebe, Zweige und Äste betroffen. In Österreich wird dieses Phänomen seit 2005 beobachtet. Die im Rahmen der Masterarbeit durchgeführten Pilz-Isolierungen von zwei verschiedenen Standorten in Niederösterreich und einem Standort in Wien haben gezeigt, dass *Chalara fraxinea* (der vermutete Erreger des Zurücksterbens der Esche) regelmäßig mit den Frühsymptomen des Zurücksterbens der Esche assoziiert ist. Die Isolierungsrate betrug dabei 81 %. Darüber hinaus wurde die Pathogenität dieses Pilzes gegenüber *F. excelsior*, *F. angustifolia* and *F. ornus* in Inokulationsversuchen an 1–2-jährigen, getopften Eschenpflanzen bestätigt. Anhand von Wachstumstests wurde zudem untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate des jeweiligen Isolats auf Agarmedium und der in den Inokulationsversuchen beobachteten Nekrosenlänge existiert.

Schlagwörter: *Chalara fraxinea*, Inokulationsversuche, Pathogenitätstests, Wachstumstests

1. Einleitung

Ein massives Zurücksterbenden an Eschen ist gegenwärtig das auffälligste und am häufigsten auftretende Schadbild innerhalb der europäischen Laubgehölze. Die Erkrankung tritt in ganz Europa auf. In Polen, wo das Eschensterben schon seit mehreren Jahren ein weit verbreitetes Problem ist, wurde der Mikropilz *Chalara fraxinea* als Auslöser der Erkrankung nachgewiesen (KOWALSKI 2006). Im Juni 2007 wurde am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz (IFFF), Boku-Wien von jungen Eschen mit Symptomen des Eschen-Triebsterbens erstmals in Österreich der Erreger des Eschentriebsterbens isoliert. In weitere Folge wurden am IFFF verschiedenste Untersuchungen zu diesem Forstschutzproblem durchgeführt. Diese Arbeit stellt einen Teil dieser Untersuchungen dar.

Zielsetzung der Masterarbeit:

In der vorliegenden Masterarbeit wurden der Krankheitsverlauf und die Symptomatik des Eschentriebsterbens näher untersucht. Zudem sollte die Pathogenität und Virulenz des Erregers an Hand von Inokulationsversuchen näher charakterisiert werden. Unter Pathogenität versteht man die qualitative Eigenschaft eines Organismus, eine Krankheit hervorzurufen (d.h. ein Organismus ist entweder pathogen oder nicht pathogen), wogegen die Virulenz auch eine quantitative Aussage zulässt (z.B. wie viele der inokulierten Versuchspflanzen entwickelten innerhalb einer bestimmten Zeitspanne die für die Erkrankung typischen Symptome). Zum Nachweis der Pathogenität müssen die Koch'schen Postulate für den vermuteten Erreger (im vorliegenden Fall für *C. fraxinea*) erfüllt werden:

1. Das vermutete Pathogen muss regelmäßig mit der Krankheit assoziiert sein.
2. Das vermutete Pathogen muss isoliert werden und in Reinkultur vorliegen.
3. Nach künstlicher Inokulation von gesunden Pflanzen mit einer Reinkultur des isolierten Erregers muss die Krankheit experimentell wieder erzeugt werden können.
4. Aus den, nach künstlicher Inokulation erkrankten Pflanzen, muss der Erreger re-isoliert werden können und der re-isolierte Erreger muss mit dem inokuliertem identisch sein.

1.1 Literaturüberblick zum neuartigen Eschensterben und Auftreten von *C. fraxinea* in Europa

1.1.1 Chronologie des Eschensterbens in Europa

Das Eschentriebsterben wurde erstmals 1991/92 in Polen (PRZYBYŁ 2002, PUKACKI & PRZYBYŁ 2005, KOWALSKI 2006, KOWALSKI & HOLDENRIEDER 2008) beobachtet. Später wurde das Auftreten dieser Krankheit in vielen Teilen Kontinentaleuropas wie Litauen (LYGIS et al. 2005) und Lettland (T. Gaitnieks, pers. Mitt., in: KIRISITS et al. 2009b), später auch in Schweden (THOMSEN et al. 2007), Dänemark (THOMSEN et al. 2009; SKOVSGAARD et al. 2009), Deutschland (SCHUMACHER et al. 2007), Österreich (CECH 2006, CECH et al. 2007, CECH 2008, HALMSCHLAGER & KIRISITS 2008, KIRISITS & HALMSCHLAGER 2008), der Schweiz (ENGESSER et al. 2009), Frankreich (CHANDELIER et al. 2009; IOOS et al. 2009), Ungarn (SZABÓ 2008), Tschechien (JANKOVSKÝ et al. 2008) Slowenien (OGRIS et al. 2009) und Rumänien (D. Chira pers. Mitt., in: KIRISITS et al. 2009b) beobachtet.

Tab. 1: Verlauf des Eschentriebsterbens in Europa

Jahr des ersten Auftretens	Betroffene Länder
1991/92	Polen (PRZYBYŁ 2002, PUKACKI & PRZYBYŁ 2005, KOWALSKI 2006, KOWALSKI & HOLDENRIEDER 2008)
1996	Litauen (LYGIS et al. 2005), Lettland (T. Gaitnieks, pers. Mitt., in: KIRISITS et al. 2009b)
2000-2003	Deutschland (SCHUMACHER et al. 2007), Schweden (THOMSEN et al. 2007), Dänemark (THOMSEN et al. 2007; SKOVSGAARD et al. 2009)
2004-2006	Österreich (CECH 2006, CECH et al. 2007, CECH 2008, HALMSCHLAGER & KIRISITS 2008, KIRISITS & HALMSCHLAGER 2008), Tschechien (JANKOVSKÝ et al. 2008), Slowenien (OGRIS et al. 2009), Slowakei
2007-2009	Finnland, Norwegen (TALGØ et al. 2009), Schweiz (ENGESSER et al. 2009), Ungarn (SZABÓ 2008), Frankreich (CHANDELIER et al. 2009; IOOS et al. 2009) Rumänien (D. Chira pers. Mitt., in: KIRISITS et al. 2009b)

Seit 2006 hat sich das Eschentriebsterben auch in Österreich weit verbreitet – im Jahr 2008 wurden in allen österreichischen Bundesländern Symptome beobachtet (KIRISITS et al. 2008a, KIRISITS & CECH 2009a).

1.1.2 Erstnachweis und weiteres Auftreten von *C. fraxinea* in Europa

Bis 2006 wurde vermutet, dass das Zurücksterben der Esche primär durch abiotische Schadfaktoren ausgelöst wird, in deren Folge Mikropilze, die unter normalen Umständen harmlos sind, das weitere Absterben von Trieben, Zweigen und Ästen verursachen (PRZYBYŁ K 2002, PUKACKI & PRZYBYŁ 2005, CECH 2006, CECH et al. 2007). Diese Einschätzung änderte sich mit der Entdeckung des anamorphen Ascomyceten *C. fraxinea*, der in Polen regelmäßig von absterbenden Eschentrieben isoliert werden konnte (KOWALSKI 2006), und sich in ersten Infektionstests gegenüber Eschen als pathogen erwies (KOWALSKI et al. 2009a). Die Biologie von *C. fraxinea* war zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend unbekannt.

Nach seiner Entdeckung in Polen wurde *C. fraxinea* auch in Deutschland (SCHUMACHER et al. 2007), Schweden (BAKYS et al. 2008, 2009), Litauen (R. Vasaitis, pers. Mitt., in: KIRISITS et al. 2009b), Österreich (HALMSCHLAGER & KIRISITS 2008, KIRISITS & HALMSCHLAGER 2008, KIRISITS et al. 2008a, 2008b, 2009a), Norwegen (TALGØ et al. 2008), der Schweiz (ENGESSER et al. 2009), Frankreich (CHANDELIER et al. 2009, IOOS et al. 2009), Ungarn (SZABÓ 2008), Tschechien (JANKOVSKÝ et al. 2008) und Slowenien (OGRIS et al. 2009) nachgewiesen.

Vor kurzem wurde in Polen mit dem Weißen Stengelbecherchen (*Hymenoscyphus albidus*) zudem das sexuelle Stadium (Teleomorph) von *C. fraxinea* entdeckt (KOWALSKI et al. 2009b). Im Gegensatz zu den Konidien von *C. fraxinea* sind die Ascosporen von *H. albidus* windverbreitet. Dies könnte die schnelle Verbreitung des Erregers klären (KOWALSKI et al. 2009b).

1.2 Symptome des Eschentriebsterbens

Wie am Namen erkennbar, ist das Zurücksterben der Esche durch ein von außen nach innen und von oben nach unten voranschreitendes Absterben der Triebe, Zweige und Äste gekennzeichnet. Die erkrankten Pflanzenteile treiben im darauffolgenden Frühjahr nicht mehr aus. An Trieben und Zweigen können mitunter welkende und schwarz verfärbte Blätter beobachtet werden (KIRISITS & HALMSCHLAGER 2008, KOWALSKI & HOLDENRIEDER 2008, ENGESSER et al. 2009, KIRISITS et al. 2008a, 2008b, KIRISITS et al. 2009a, KIRISITS & CECH 2009a, 2009b, OGRIS et al. 2009). Das Zurücksterben ist durch einen scharfen Übergang

zwischen lebenden und abgestorbenen Kronenteilen gekennzeichnet (CECH et al. 2007, SCHUMACHER et al. 2007, KIRISITS et al. 2008a, KIRISITS et al. 2009a), wobei die lebenden Zweige und Äste normal beblättert sind. Darüber hinaus zeigen viele Eschen jedoch eine spärliche Belaubung in der gesamten Krone (Abb. 1) sowie einen büschelartigen Blattaustrieb.



Abb. 1: Natürliche Verjüngungsfläche im Nasswald mit spärlicher Belaubung



Abb. 2: Scharf vom Bast abgegrenzte Rindennekrose im Ansatzbereich von einem Seitentrieb

Im Frühstadium der Erkrankung sieht man bisweilen auch braun bis schwarz gefärbte Nekrosen an Blattstielen und Blättern. Ein weiteres wichtiges Merkmal sind Rindennekrosen, die zumeist scharf vom Bast abgegrenzt, und häufig im Ansatzbereich von Seitenzweigen zu finden sind (Abb. 2).

Diese Nekrosen breiten sich in Längs- und Querrichtung aus und gehen häufig ineinander über. Dadurch kann es zur Ringelung und zum vollständigen Absterben des Bastes kommen. Im Holz findet man braune bis graue Verfärbungen, die sich in Längsrichtung weit über den Bereich der Rindennekrosen hinaus erstrecken. Starkes Zurücksterben der Pflanzen ist meistens mit der Bildung von stammbürtigen Wasserreisern (Angsttrieben) verbunden, die häufig bei jungen erkrankten Pflanzen gut sichtbar sind (KIRISITS & HALMSCHLAGER 2008). Nach CECH (2006) und CECH et al. (2007) wurde an einigen Standorten mit starkem Befall an erkrankten Eschen zudem eindeutig eine Wurzelfäule diagnostiziert.

1.3 Beschreibung des Erregers (*Hymenoscyphus albidus*, Anamorph: *Chalara fraxinea*)

Die morphologischen Merkmale von *Chalara fraxinea* T. KOWALSKI sp. nov. sind bei KOWALSKI (2006) ausführlich beschrieben: Die Art wächst bei etwa 20°C am schnellsten und bildet auf künstlichem Nährboden Kolonien mit sehr variabler Kulturmorphologie. Auf Malzextraktagar sind die Kolonien anfangs weiß, später entwickeln sie bräunliche Flecken und/oder die Kolonien verfärben sich gleichmäßig hellbraun. Häufig treten Sektoren mit unterschiedlicher Myzelstruktur und -farbe auf (Abb. 3). Nach etwa drei bis vier Wochen bilden sich oft unterschiedlich große, fleckige oder ringförmige, dunkle, sklerotische Strukturen auf der Oberfläche des Mediums.

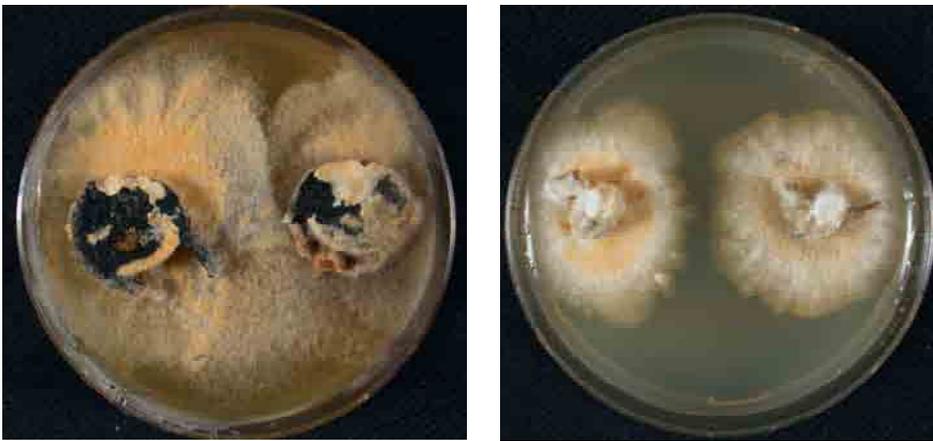


Abb. 3: Kolonien von *C. fraxinea* auf Malzextraktagar mit weißlich-braunem Myzel und dunklen sklerotischen Bereichen

Der Pilz sporuliert im Labor nicht immer. Niedrige Temperaturen (10 bis 15°C) und nährstoffarme Medien fördern die Sporenbildung. Die Konidien entstehen in 16 bis 24 µm langen und 4 bis 5 µm breiten, flaschenförmigen, pigmentierten Zellen (Phialiden) (Abb. 4). An der Spitze der Phialide sammeln sich die farblosen einzelligen Sporen in einem schleimigen Tröpfchen, seltener in Ketten.

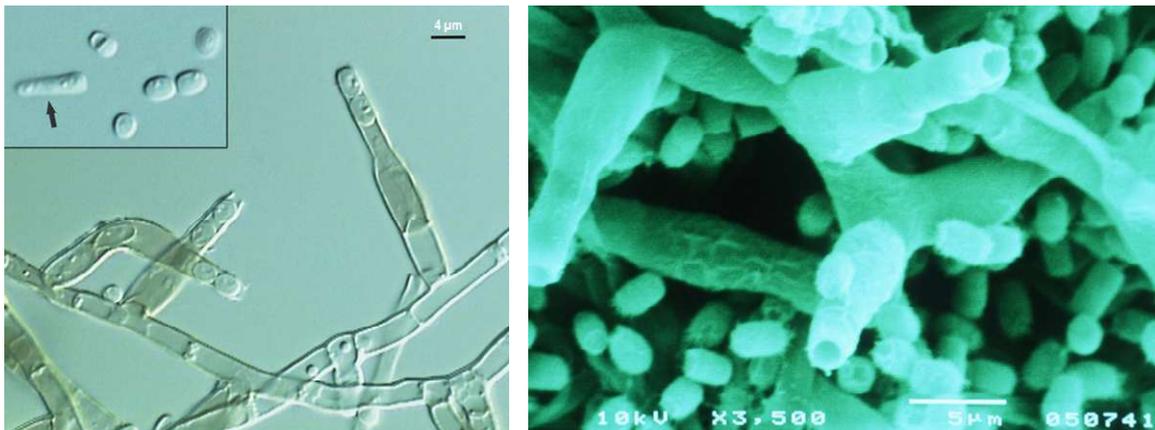


Abb. 4: Flaschenförmige Phialiden und Konidien von *C. fraxinea*: 100-fache Vergrößerung im Durchlichtmikroskop (re), Pfeil: erste Konidie sowie REM Aufnahme (li). Fotos: Halmschlager, Mottinger-Kroupa

Die zuerst gebildete Spore ist etwas größer ($6-7 \times 2.2-2.5 \mu\text{m}$) als die später gebildeten ($3.2-4.0 \times 2.0-2.5 \mu\text{m}$) (KOWALSKI 2006, KOWALSKI & HOLDENRIEDER 2008, KIRISITS et al. 2008a).

Als Teleomorph (sexuelles Stadium) von *C. fraxinea* wurde vor kurzem das weiße Stengelbecherchen *Hymenoscyphus albidus* (Roberge ex Desm.) W. PHILLIPS identifiziert (KOWALSKI & HOLDENRIEDER 2009). Die kleinen, schüsselförmigen Fruchtkörper dieses Pilzes (Apothezien) wurden in Polen von August bis September 2008 vorwiegend an im Vorjahr abgefallenen Blattspindeln (= jene Teile der Eschenblätter, an denen die Blättchen sitzen) in der Bodenstreu gefunden und konnten bereits ab Mitte Mai (in unreifem Zustand) bzw. im Juni 2009 auch in betroffenen Beständen in Österreich nachgewiesen werden (KIRISITS et al. 2009b).



Abb. 5: Apothezien des Weißen Stengelbecherchens (*Hymenoscyphus albidus*), an im Vorjahr abgefallenen Blattspindeln. Foto: Kirisits

Im frühen Stadium sind die Apothezien weißlich bis cremefarben, die älteren und trockenen Fruchtkörper haben eine zimtbraune Färbung (KOWALSKI & HOLDENRIEDER 2009). Der Basalbereich ist oft schwarz gefärbt und kann an der Basis erweitert oder verengt sein. Die Apothezien haben einen Durchmesser von 1,5 – 3 mm, der Stiel ist 0,4 – 2,0 mm lang und 0,2 – 0,5 mm dick. Dieser Pilz ist seit 150 Jahren in Europa bekannt und gilt als selten oder wurde zumindest selten beobachtet.

In der Arbeit von ENGESSER (2009) und KIRISITS et al. (2009b) wurde der hypothetische Lebenszyklus von *C. fraxinea* genauer beschrieben. Man nimmt an, dass im Sommer die Blattspindeln der Esche infiziert werden. Es entstehen dann kleine braune Flecken und gelegentlich Einschnürungen an den Blattspindeln und in weiterer Folge auch Welkesymptome an den Blättern. Wenn der Erreger von den Blattspindeln in den Trieb einwächst kommt es dort später zur Bildung von nekrotischen Stellen. Nach dem Blattfall im Herbst überwintert der Pilz am Boden in der Streu auf den abgefallenen Blättern. Im nächsten Frühsommer bilden sich dann auf den Überresten der Blattspindeln neue Fruchtkörper, welche mit ihren Askosporen wiederum neue Blattspindeln in der Krone infizieren. Der Lebenszyklus des Pilzes ist damit geschlossen.

2. Material und Methoden

2.1 Nachweis von *C. fraxinea* an symptomatischen Eschen

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde an drei Standorten (zwei in Niederrösterreich und einer in Wien) das Zurücksterben der Eschen untersucht und Proben von symptomatischen Eschen für die Isolierung des Erregers aus befallenen Pflanzengeweben genommen.

2.1.1 Untersuchungsstandorte und Symptomatik der beprobten Eschen

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Untersuchungsstandorte und die Art der für die Isolierung entnommenen Pflanzenproben.

Tab. 2: Untersuchungsstandorte mit Koordinaten und der Beschreibung der Proben

Standort	Koordinaten	Proben
Forstgarten (NÖ)	15°20'12.2" Ost, 48°36'14.7" Nord	Baumschulpflanzen (1/2 Pflanzen)
	15°20'03.1" Ost, 48°36'04.6" Nord	Baumschulpflanzen (2/0 Pflanzen)
Nasswald (NÖ)	47°46'10.22" Ost, 15°42'00.62" Nord	Äste von Bäumen mit unterschiedlichem Alter
Neuwaldegg (Wien)	4°14'41.70" Ost, 16°16'07.1" Nord	Äste von Bäumen mit unterschiedlichem Alter

2.1.1.1 Forstgarten

Der Anteil der gemeinen Esche (*F. excelsior*) an der Gesamtfläche ist im Forstgarten nur gering. Es gab nur zwei Flächen mit Eschen, wobei auf beiden Flächen befallene Pflanzen gefunden wurden. Auf einer Fläche waren 3-jährige, verschulte Pflanzen (1/2 Pflanzen, d.h. im 2. Jahr verschulte Sämlinge), auf der anderen 2-jährigen Sämlinge (2/0 Pflanzen) von der Erkrankung betroffen. Vor allem auf der zweiten Fläche, also jener mit den 3-jährigen, verschulten Pflanzen konnten verschiedenste Symptome des Eschentriebsterbens (inkl. deutlicher Nekrosebildung) gefunden werden. Die 2-jährigen Eschen zeigten hingegen überwiegend Frühsymptome.



Abb. 6: Welkender zweijähriger Sämling im Forstgarten



Abb. 7: Charakteristische Welke der Blätter an dreijährigen Pflanzen im Forstgarten

Das auffälligste Symptom war das charakteristische Welken der Blätter. Die Blätter waren schwarz gefärbt mit braunen Nekrosen an den Blattspindeln. An den Stämmchen der erkrankten Bäumchen waren abgestorbene Triebe und Verfärbungen mit braun-gelblich bis zu violett gefärbten Nekrosen zu sehen.

2.1.1.2 Nasswald - Forstverwaltung der Stadt Wien

Die Forstverwaltung Nasswald umfasst die nordwestliche Hälfte der Rax und des Schneeberges. In Nasswald tritt die gemeine Esche in natürlicher Verjüngung auf. Das Zurücksterben der Esche konnte in diesen Beständen häufig beobachtet werden, wobei vor allem Bäume mit Spätsymptomen gefunden wurden. Bäume aller Altersklassen waren von der Erkrankung betroffen. Symptome wie Nekrosen, ein Welken der Blätter (frische Welkesymptome aber auch Blätter, die zum Teil bereits ganz vertrocknet waren), abgestorbene Wipfeltriebe und Äste sowie schon abgestorbene Bäume konnten beobachtet werden.

2.1.1.3 Neuwaldegg

Im Juli 2008 wurden auch in Neuwaldegg einige Gebiete bezüglich des Auftretens des Eschentriebsterbens untersucht. Es wurden sowohl Bäume mit Frühsymptomen als auch solche mit Spätsymptomen gefunden. An den Eschen konnten abgegrenzte, braun gefärbte Nekrosen, aber auch ganz frische, hellgrün bis gelb verfärbte Rindennekrosen beobachtet werden. Häufig befanden sich Reste eines toten Seitenzweiges im Zentrum der Nekrose (KIRISITS 2008).

2.1.2 Probennahme

Die Proben wurden, in Abhängigkeit von der Entnahmehöhe, mit Hilfe einer Garten- oder Stangenschere gesammelt.

Tab. 3: Anzahl der beprobten Bäume je Standort

Standort	Anzahl der beprobten Bäume
Forstgarten	40
Nasswald	70
Neuwaldegg	70

Die gesammelten Proben aus Nasswald und Neuwaldegg wurden folgenden Kategorien zugeordnet:

- Diffusen Rindennekrosen (Abb. 8)
- Abgegrenzten Rindennekrosen („Stammkrebse“) (Abb. 9)



Abb. 8: Diffuse Rindennekrose



Abb. 9: Abgegrenzte Rindennekrose

An allen gesammelten Proben aus Nasswald und Neuwaldegg wurde zudem der Durchmesser gemessen und die Proben in weiterer Folge einzelnen Durchmesserklassen zugeordnet.

Tab. 4: Durchmesserklassen der Probenstücke

Durchmesserklasse	mm
1	5 – 7,9
2	8 – 10,9
3	11 – 13,9
4	14 - 29

Die Proben wurden als einzelne Pflanzen ohne Wurzel oder als 10 - 15 cm lange Stamm- oder Triebstücke vom Sammelstandort abtransportiert. Bis zum Zeitpunkt der Isolierung wurden die Proben im Kühlraum mit 5° C gelagert.

2.1.3 Pilzisolierung und –identifizierung

Zur Isolierung des Erregers wurden die Stammstücke in der Impfbank oberflächensterilisiert. Dazu wurden diese nach RACK & BUTIN (1984) zuerst 1 Minute in Ethanol (96%), dann 3 Minuten in Natriumhypochlorit mit ca. 4% aktivem Chlor und schließlich nochmals

30 Sekunden in Ethanol (96%) getaucht (Abb. 10). Die äußere Rinde wurde anschließend mittels eines abgeflammtten Skalpellts abgeschält und die Proben schließlich mit einer Astschere in kleine, ca. 5 bis 10 mm lange und 5 mm dicke Stücke geschnitten. Die Probenstücke wurden dann auf Petrischalen (Ø 90 mm) mit künstlichen Nährmedien (Malzextraktagar mit 2% Malzextrakt, 1,6 % Agar und 100 mg/l Streptomycinsulfat) aufgelegt (vgl. auch Beschreibung der Zubereitung von Malzextraktagar im Anhang auf S. 73)

Die Probenstücke wurden - sofern möglich - immer von der Übergangzone zwischen gesundem und krankem Gewebes entnommen. Die Schalen wurden mit Parafilm® verschlossen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Proben wurden bei 7 °C in einem Klimaschrank inkubiert und regelmäßig in Hinblick auf das Auswachsen von *C. fraxinea* kontrolliert. Dazu wurden auswachsende Pilzmyzelien unter dem Stereomikroskop (Auflichtmikroskop) untersucht. Falls *C. fraxinea* nicht eindeutig verifiziert werden konnte, wurde anschließend noch ein mikroskopisches Präparat angefertigt und dieses im Durchlichtmikroskop untersucht.

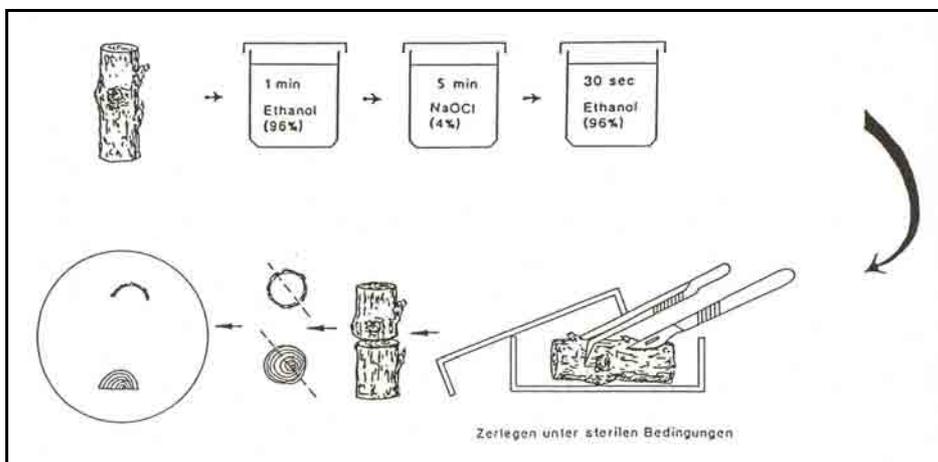


Abb. 10: Arbeitsablauf zur Oberflächensterilisation (aus: NEUMÜLLER 1994 nach RACK & BUTIN 1984, verändert)

2.1.4 Datenauswertung

Die Daten wurden mit dem Statistik - Programm SPSS bearbeitet. Es wurde pro Untersuchungsstandort die Anzahl an gesammelten Proben, getrennt nach Nekrosentyp und Durchmesser der Proben, sowie die positive Isolierung von *C. fraxinea* analysiert. Weiters wurden mit SPSS geeignete Balkendiagramme (Bargraphiken) zu den ausgewerteten Daten

erstellt. Die Isolierungsergebnisse wurden nach Standort und Durchmesserklasse ausgewertet, wobei die Testung auf signifikante Unterschiede bei den Häufigkeiten mittels Chi – Square Test erfolgte.

2.2 Inokulationsversuche

Anfang März 2008 wurde mit der Anpflanzung von Versuchspflanzen für die Inokulationsversuche begonnen. Mit diesem Experiment sollte die Pathogenität von *C. fraxinea* gegenüber den drei in Österreich vorkommenden Eschenarten (*Fraxinus excelsior* – Gemeine Esche, *F. angustifolia* subsp. *danubialis* – Schmalblättrige Esche, und *F. ornus* – Manna-Esche, Blumen-Esche) (ADLER et al. 1994) nachgewiesen werden. Für jene beiden Eschenarten (*Fraxinus excelsior* und *F. angustifolia* subsp. *danubialis*), an denen in der Natur bereits Symptome des Eschentriebsterbens beobachtet wurden, sollten zudem die Koch'schen Postulate überprüft werden.

2.2.1 Versuchspflanzen

Für den Inokulationsversuch wurden Sämlinge der gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*), der schmalblättrigen Esche (*Fraxinus angustifolia*) sowie der Blumenesche (*Fraxinus ornus*) verwendet. Es handelte sich durchwegs um wurzelnackte, ein- bzw. zweijährige Sämlinge (vgl. Tab. 5) aus drei verschiedenen Baumschulen aus Ungarn (Szombathely, Kapuvár, Szarvaskut), die für die Inokulationsversuche noch getopft werden mussten. Die Pflanzen von *F. excelsior* und *F. angustifolia* wurden 05.03.2008 aus Ungarn abgeholt und am 06.03.2008 eingetopft. Das Topfen von *F. ornus* erfolgte durch die spätere Lieferung der Pflanzen erst am 10.04.2008. Die Versuchspflanzen wurden einzeln in schwarze Töpfe (Volumen: 3 l) der Größe 14,5 cm x 14,5 cm x 21 cm (b x b x h) gesetzt, im Garten des IFFF aufgestellt und regelmäßig gegossen. Als Substrat diente Torferde (Pflanzensubstrat T6) der Firma Kranzinger (<http://www.kranzinger-erde.at/>).

Anfang Mai wurden die Höhen der Eschen gemessen. Die Eschenpflanzen begannen zwischen dem 13. und dem 15. April auszutreiben.



Abb. 11: *F. excelsior* Versuchspflanzen



Abb. 12: *F. angustifolia* Versuchspflanzen

Tab. 5: Überblickstabelle über die mit *Chalara fraxinea* inokulierten Versuchspflanzen (N = Anzahl der Pflanzen)

Baumart	N	Alter	Höhe vor dem Austrieb	Höhe nach dem Austrieb	Höhe der Inokulationsstelle	Durchmesser der Stammes	Länge der Inokulationswunde
1. Inokulationstermin							
<i>F. excelsior</i>	100	1 jährig	37,4 ± 7,6	51,2 ± 11,1	15,8 ± 4,9	0,7 ± 0,2	2,1 ± 0,5
<i>F. angustifolia</i>	20	2 jährig	39,2 ± 6,0	46,5 ± 10,8	14,9 ± 3,5	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,4
<i>F. ornus</i>	20	1 jährig	39,1 ± 8,7	42,6 ± 7,2	17,0 ± 4,6	0,4 ± 0,1	2,0 ± 0,6
2. Inokulationstermin							
<i>F. excelsior</i>	55	1 jährig	41,2 ± 10,5	56,1 ± 16,8	17,7 ± 6,4	0,7 ± 0,1	2,5 ± 0,8
<i>F. angustifolia</i>	23	2 jährig	37,6 ± 6,2	57,7 ± 12,2	13,4 ± 2,8	0,5 ± 0,1	2,7 ± 0,4
<i>F. ornus</i>	10	1 jährig	40,6 ± 5,1	45,9 ± 4,3	14,1 ± 2,4	0,5 ± 0,1	2,6 ± 0,3

2.2.2 Inokulation der Versuchspflanzen

Die Pflanzen des ersten Inokulationstermins wurden 62 bzw. 63 Tage nach der Anpflanzung (am 07. bzw. 08.05.2008) inokuliert. Die zweite Inokulation von Versuchspflanzen erfolgte 105 Tage (am 18. bzw. am 19.06.2008) nachdem die Pflanzen getopft wurden (Tab. 6).

Tab. 6: Versuchsdesign – Inokulationsversuche

1. Inokulationstermin: 07. - 08.05.2008		
Baumart	Isolate	Anzahl der Pflanzen
<i>F. excelsior</i>	5 Isolate + Kontrolle (a 20 Pflanzen)	120 Pflanzen
<i>F. angustifolia</i>	1 Isolat + Kontrolle (a 20 Pflanzen)	40 Pflanzen
<i>F. ornus</i>	1 Isolat + Kontrolle (a 20 Pflanzen)	40 Pflanzen
Letzte Aufarbeitung: 21.10.2008		200 Pflanzen
2. Inokulationstermin: 18. - 19.06.2008		
Baumart	Isolate	Anzahl der Pflanzen
<i>F. excelsior</i>	5 Isolate + Kontrolle (a 20 Pflanzen)	120 Pflanzen
<i>F. angustifolia</i>	2 Isolate + Kontrolle (a 20 Pflanzen)	60 Pflanzen
<i>F. ornus</i>	1 Isolat + Kontrolle (a 20 Pflanzen)	40 Pflanzen
Letzte Aufarbeitung: 13.08.2008		118 ¹ Pflanzen

¹ die restlichen 102 Pflanzen wurden zur weiteren Beobachtung belassen

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Anzahl der inokulierten Pflanzen und verwendeten Isolate sowie die Anzahl der aufgearbeiteten Pflanzen je Inokulationstermin. Beim 1. Inokulationstermin wurden alle 200 inokulierten Pflanzen aufgearbeitet. Beim 2. Inokulationstermin wurden von den insgesamt 220 inokulierten Pflanzen nur 118 für die Untersuchung aufgearbeitet. Die restlichen 102 Pflanzen wurden zur weiteren Beobachtung der Krankheitsentwicklung belassen.

Für die Inokulation der Versuchspflanzen wurden verschiedene *Chalara fraxinea* Isolate verwendet. Diese Isolate wurden aus Bäumen/Jungpflanzen mit Symptomen des Eschentriebsterbens von verschiedenen Standorten in Österreich isoliert (Tab. 7).

Tab. 7: Bezeichnung, CBS Nummern und Herkunft der bei der Inokulation verwendeten Isolate von *C. fraxinea*

Orig. Isolat Nummer	CBS ¹ -Nr.	Sammeldaten	Substrat
N1/3 Holz	CBS 122191	20. 06. 2007, Edt bei Lambach, OÖ, leg.: Halmschlager	<i>Fraxinus excelsior</i>
N5/4/A	CBS 122192	20. 06. 2007, Altaussee, Steiermark, leg.: Halmschlager	<i>F. excelsior</i>
T8/1/H3	CBS 123135	25. 07. 2007, Laussa, OÖ, leg.: Kirisits	<i>F. excelsior</i>
NWE/1/2/H1	CBS 123137	29. 01. 2008, Wien-Neuwaldegg, Wien, leg.: Kirisits	<i>F. excelsior</i>
HO/II/6/1	CBS 123140	07. 02. 2008, Hohenau an der March, NÖ, leg.: Kirisits	<i>F. angustifolia</i> subsp. <i>danubialis</i>
HO/II/4/2	CBS 123139	07. 02. 2008, Hohenau an der March, NÖ, leg.: Kirisits	<i>F. angustifolia</i> subsp. <i>danubialis</i>
MIB/2/1	CBS 123141	26. 02. 2008, Michelberg, NÖ, leg.: Kirisits	<i>F. excelsior</i>
T16/1/H2	CBS 122193	25. 07. 2007, Laussa, OÖ, leg.: Kirisits	<i>F. excelsior</i>
MDF/1/5/1	CBS 123364	26. 02. 2008, Mannersdorf am Leithagebirge, NÖ, leg.: Mottinger-Kroupa	<i>F. excelsior</i>
SFB/II/7/2	CBS 123365	22. 04. 2008, Wien-Schafberg, Wien, leg.: Kirisits	<i>F. excelsior</i>

¹ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Niederlande (<http://www.cbs.knaw.nl>)

2.2.2.1 Vorbereitung des Inokulums

Aus einem Eschenaststück mit einem Durchmesser von 8 bis 10 cm wurden Rindenstücke (Baststücke) ausgestanzt, die mit einem Messer auf 10 x 15 mm große Stückchen geschnitten wurden. Die Baststücke wurden bei einer Temperatur von 121 °C zwei Mal autoklaviert und anschließend unter sterilen Bedingungen auf die Myzelkulturen der verwendeten *C. fraxinea* Isolate aufgelegt. Nach 14 Tagen Inkubation im Klimaschrank bei 7 °C war das Inokulum durch den Pilz so weit besiedelt, dass es für die Inokulation herangezogen werden konnte. Die Baststücke für die Inokulation der Kontrollpflanzen wurden hingegen nur auf Malzextraktagar aufgelegt.

2.2.2.2 Verlauf der Inokulation

Nach Randomisierung wurden den Pflanzen entsprechende Isolate zugeordnet und anschließend jede Pflanze - entsprechend dem zugeordneten Pilzisolat - mit einem farbigen Band markiert (vgl. Tab. 8 und Abb. 13).



Abb. 13: Randomisierte Pflanzen mit den zugeordneten Pilzisolaten

Bei den beiden Inokulationsterminen wurden jeweils unterschiedliche Isolate verwendet. Es gab jedoch zwei Pilzisolate (HO/II/6/1, HO/II/4/2) die an allen drei Eschenarten inokuliert wurden. Das Isolat MIB 2/1 wurde an *F. excelsior* und *F. angustifolia* inokuliert.

Tab. 8: Überblick über die in Abhängigkeit vom jeweiligen Pilzisolat verwendeten Farben zur Markierung der verwendeten Eschenpflanzen beim ersten und zweiten Inokulationstermin

Isolat	Eschenart	Farbe
1. Inokulationstermin		
N 1/3 Holz	<i>Fraxinus excelsior</i>	blau
N 5/4/A	<i>F. excelsior</i>	gelb
T 8/1/H3	<i>F. excelsior</i>	rosa
NWE 1/2/H1	<i>F. excelsior</i>	orange
HO II/6/1	<i>F. excelsior</i> , <i>F. angustifolia</i> , <i>F. ornus</i>	rot
2. Inokulationstermin		
HO II/4/2	<i>F. excelsior</i> , <i>F. angustifolia</i> , <i>F. ornus</i>	rot
MIB 2/1	<i>F. excelsior</i> , <i>F. angustifolia</i>	rosa
T16/1/H2	<i>F. excelsior</i>	orange
MDF 1/5/1	<i>F. excelsior</i>	blau
SFB II/7/2	<i>F. excelsior</i>	gelb

An den so sortierten Pflanzen wurden mit einem sterilen Okuliermesser 2 bis 3 cm lange Schnitte in die Rinde geschnitten und mit einer abgeflamnten Pinzette ein mit *C. fraxinea* bewachsenes Baststück in die Wunden eingesetzt. Anschließend wurden die Wunden mit Parafilm umwickelt (Abb. 14).



Abb. 14: Verlauf der Inokulation: Anfertigung des Schnitts am Stämmchen, Einsetzen des Inokulums, Umwicklung der Wunde mit Parafilm

Die Kontrollpflanzen wurden gleich behandelt, nur wurden anstelle der Pilz-bewachsenen Baststücke sterile Baststücke verwendet. Die Höhe der Inokulationsstelle war von der Pflanzenhöhe abhängig und wurde von der Bodenoberfläche im Topf gemessen und schriftlich festgehalten. Vor jeder Inokulation wurden das gebrauchte Okulirmesser und die Pinzette in 70 %igen Alkohol getaucht und abgeflammt. Die fertig inokulierten Pflanzen wurden in gemischten Gruppen aus allen Isolattypen im Institutsgarten aufgestellt.

2.2.3 Kontrolle und Aufarbeitung der Versuchspflanzen

Die Pflanzen wurden täglich kontrolliert und regelmäßig gegossen. Der Versuch endete nach drei Monaten. Ungefähr 25-30 Tage nach der Inokulation traten die ersten Welke-Symptome an den Pflanzen auf (Abb. 15).



Abb. 15: Welke – Symptome an den Versuchspflanzen

Das Datum der Welke wurde notiert und die welkenden Pflanzen wurden – sofern möglich – noch am selben Tag aufgearbeitet:

Dazu wurde die Pflanze soweit aufgeschnitten, bis man die gesamte Länge der Nekrose sehen und messen konnte. Bei der Aufarbeitung wurden drei Messwerte notiert (Abb. 16): Der erste Messwert war die Länge der äußeren Nekrose an der Rinde (A). Um den zweiten Messwert, die Länge der Nekrose im Bastbereich (B), messen zu können, musste die Rinde mit Hilfe eines Skalpell abgeschält werden. Der dritte Messwert war die Länge der Holzverfärbung (C). Um diesen Parameter erheben zu können wurde das Stämmchen der Versuchspflanze mit

Hilfe einer Gartenschere vorsichtig aufgespalten. Bei den Kontrollpflanzen entstanden keine Nekrosen (Abb. 17, A-C). Weiters wurde auch die Höhe der Inokulationsstelle, die Länge der Inokulationswunde und der Höhenzuwachs aufgenommen. Die aufgespaltenen Stämmchenstücke, die etwas mehr als die Nekrosenlänge umfassten, wurden nach der Aufarbeitung der Versuchspflanzen in Papiersäcke eingepackt, beschriftet und ins Labor zur Oberflächensterilisation transportiert.



Abb. 16: Durch Inokulation mit *C. fraxinea* entstandene Rindennekrose: äußerlich sichtbare Nekrose an der Rinde (A), Nekrose im Bast (B) und Holzverfärbung (C)

Abb. 17: Rinde (A), Bast (B) und Holz (C) einer Kontrollpflanze (Anm.: die Nekrose beschränkt sich im wesentlichen auf die Inokulationsstelle)

2.2.4 Reisolierung des Erregers

Stämmchenstücke, die nicht sogleich nach der Aufarbeitung oberflächensterilisiert werden konnten, wurden in einem Klimaschrank bei einer Temperatur von 7 °C, längstens bis zu drei Tagen aufbewahrt.

Die Oberflächensterilisation erfolgte wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben (vgl. auch Abb. 10). Im Unterschied zur Isolierung aus Freilandproben wurden bei der Reisolierung des Erregers aus den inokulierten Versuchspflanzen jedoch Stämmchenhälften der aufgearbeiteten Pflanzen verwendet. Für die Reisolierung wurden aus der stärkeren Stämmchenhälfte je zwei Gewebestücke aus dem Bereich der Inokulationsstelle entnommen. Zwei weitere Gewebestücke wurden aus dem unteren und oberen Nekrosenbereich entnommen - sofern möglich - immer von der Übergangzone zwischen gesundem und krankem Gewebe. Pro

Pflanze wurden somit zwei Petrischalen verwendet: Eine mit Proben aus dem oberen und unteren Nekrosenbereich („oberes Ende“, „unteres Ende“), die andere mit den zwei Proben aus der Mitte der Inokulationsstelle („Mitte“). Der Bereich um die Inokulationsstelle war durch die Wund- und Abwehrreaktionen der Pflanze und die mechanische Verletzung des Gewebes im Zuge der Inokulation im Gegensatz zu den anderen beiden Entnahmestellen immer stark nekrotisch.

Auswachsene Pilzmyzelien wurden unter dem Stereomikroskop (Auflichtmikroskop) untersucht. Falls *C. fraxinea* nicht eindeutig verifiziert werden konnte, wurde anschließend noch ein mikroskopisches Präparat angefertigt und dieses im Durchlichtmikroskop untersucht.

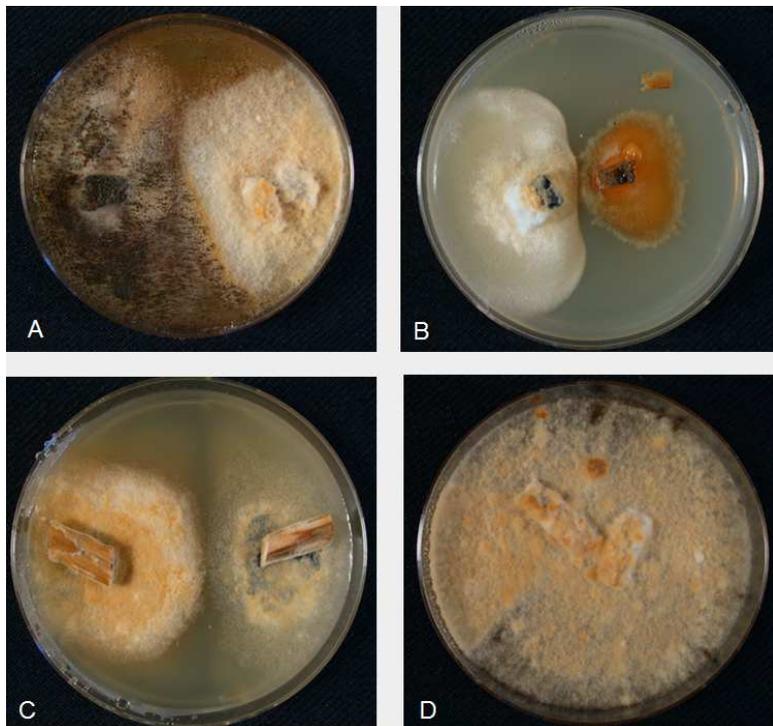


Abb. 17: Reisolierungen aus den Versuchspflanzen: A: *Fraxinus excelsior* - *Chalara fraxinea* (re) und andere Pilzkultur (li). B: *F. excelsior* - *C. fraxinea* (li) und andere Pilzkultur (re). C: *F. angustifolia* - Reinkulturen von *C. fraxinea*, (re & li). D: *F. ornus* - Reinkultur von *C. fraxinea*

2.2.5 Datenauswertung

Die Daten wurden mit dem Statistik - Programm SPSS bearbeitet. Die positive Reisolierung von *C. fraxinea* wurde, getrennt nach Inokulationstermin und Baumart mittels Kruskal – Wallis Test, analysiert. Weiters wurde die Reisolierung in Abhängigkeit von aufgetretenen Welkesymptomen und nach den verwendeten Pilzisolaten ausgewertet. Zusätzlich wurde die Reisolierung von *C. fraxinea* auch getrennt für die einzelnen Abimpfungsstelle aus der

Nekrose ausgewertet. Zu den mittels Kruskal – Wallis Test ausgewerteten Reisolierungs-Daten wurden mittels SPSS zudem auch Säulendiagramme (Bargraphiken) erstellt.

Die gemessenen Nekrosenlängen wurden getrennt nach Baumart, Pilzisolat und nach den Parametern äußere Rindennekrose, Nekrose im Bast bzw. Holzverfärbung ausgewertet. Für die Daten der Nekrosenlängen wurden mit dem SPSS Programm Boxplots Graphiken erstellt. Die Auswertung erfolgte wiederum mittels Kruskal – Wallis Test.

2.3 Wachstumstests

Der Wachstumstest wurde im Jänner 2009 angelegt und sollte Hinweise liefern, ob die Virulenz der Isolate mit einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit auf künstlichen Kulturmedien korreliert. Die Virulenz ist charakterisiert als quantitatives Ausmaß einer Erkrankung, das durch ein Pathogen oder ganz spezifisches Isolat eines Pathogens hervorgerufen wird. Das Spektrum reicht von schwach virulent bis höchst virulent. Der Wachstumstest wurde mit allen zum Inokulationsversuch benutzten Isolaten (Abb. 18) durchgeführt, wobei zwei Agartypen (Malzextraktagar und Eschensaftagar) Verwendung fanden.

Die Zubereitung von Malzextraktagar erfolgte wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Im Unterschied zur Zubereitung von Malzextraktagar für die Isolierung von Freilandsproben wurde bei der Zubereitung von Malzextraktagar und Eschensaftagar (500 ml Eschensaft, 10 g Malzextrakt, 16 g Agar-Agar, 500 ml Leitungswasser – vgl. auch Beschreibung der Zubereitung von Eschensaftagar im Anhang auf S. 73) für den Wachstumstest auf Grund der vergleichsweise geringen Kontaminationsgefahr durch Bakterien und auch um das Pilzwachstum nicht zu beeinflussen, kein Streptomycinsulfat zugegeben.

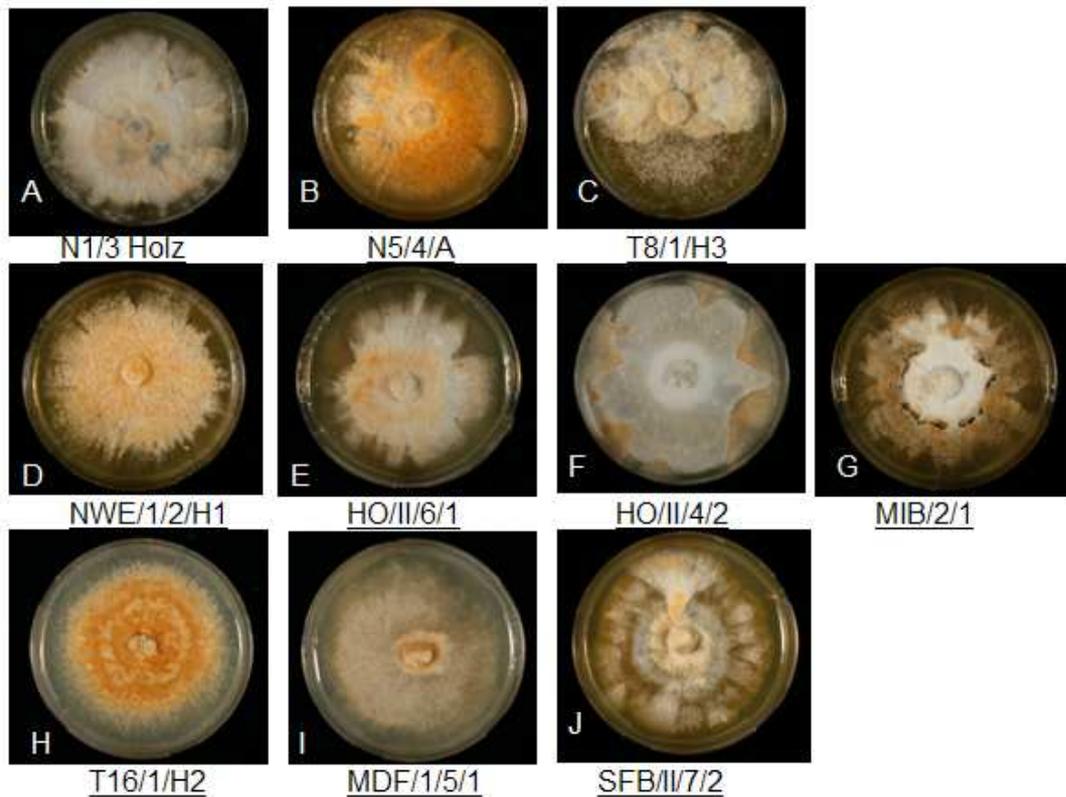


Abb. 18: Überblick über die Pilzisolatplatten, die für die Inokulation und den Wachstumstest verwendet wurden

2.3.1 Durchführung des Tests

Beim Wachstumstest wurden zehn unterschiedliche Isolate (vgl. Tabelle 7, S. 17) auf zwei Medien (MEA und Eschensaft-Agar) getestet. Dazu wurden je fünf Platten (5 cm-Durchmesser) pro Isolat und Agar -Typ angefertigt: Als Inokulum diente mit Pilzmyzel bewachsener MEA, der aus dem Rand einer Stammkultur mit einem 4 mm-Korkbohrer herausgestanzt wurde. Zum Beimpfen wurde das Inokulum mit der Myzelseite nach unten in der Mitte der Platte auf dem jeweiligen Agar-Medium platziert. Die Inkubation der Platten erfolgte in einem Klimaschrank bei 25 °C. Das Myzelwachstum wurde periodisch kontrolliert. Sobald eine Agarplatte zu ca. 2/3 mit Myzel bewachsen war, wurde die Wachstumsfront auf der Schalenunterseite mit einem Stift angezeichnet. Zur Ermittlung der Wachstumsrate wurden auf dem Boden der Agarplatten zwei zueinander normal stehende Linien so gelegt, dass ihr Schnittpunkt im Zentrum der Inokulationsstelle lag und die beiden Linien möglichst den minimalen und maximalen Durchmesser der Myzelkultur abbildeten. Aus den zwei Durchmesser-Messungen wurde der Mittelwert berechnet, davon 4 mm (die Größe des Inokulums) abgezogen und mit nachstehender Formel die radiale Wachstumsrate (mm/Tag) für jedes Isolat bestimmt:

radiale Wachstumsrate pro Tag:

$$i_{x \text{ radial}} = \frac{\frac{D - 4 \text{ mm}}{2}}{x \text{ Tage}}$$

DMittlerer Durchmesser [in mm] nach *x* Tagen

4 mm ...Größe des Inokulums

2.3.2 Datenauswertung

Die Daten wurden mit dem Statistik - Programm SPSS ausgewertet. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Isolate wurde getrennt nach Agartyp berechnet und mittels Boxplot-Diagrammen dargestellt. Die statistische Auswertung der radialen Wachstumsraten erfolgte mittels Kruskal – Wallis Test.

Der Zusammenhang zwischen mittlerer Nekrosenlänge im Bast bei *F. excelsior* und der radialen Wachstumsrate auf Malzextraktagar wurde für alle verwendeten Pilzisolat durch eine Korrelationsanalyse berechnet und mittels einer Scatterplot Graphik, dargestellt.

2.4 Statistik und Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit SPSS 12.0.1 für Windows (©SPSS Inc., 1989 – 2003) und MS Excel (Microsoft ® Office, 2003) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov One Sample Test, die Varianzhomogenität mit dem Levene Test getestet. Da die Daten durchwegs nicht normal verteilt waren und auch keine Varianzhomogenität vorlag, wurde anstelle einer One-way ANOVA der Kruskal-Wallis H-Test für die Auswertung herangezogen. Für den Vergleich von Häufigkeiten wurde der Pearson Chi – Square Test eingesetzt. Der Likelihood Ratio Test wurde dann angewendet, wenn der Erwartungswert bei den mittels Pearson Chi – Square Test ausgewerteten Daten bei mindestens eine Zelle kleiner als fünf war. Nähere Details zur Datenauswertung sind in den einzelnen Subkapiteln beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierungsergebnisse (Nachweis von *C. fraxinea* auf weiteren Standorten in Österreich)

3.1.1 Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit vom Standort

Die durchschnittliche Isolierungsrate von *C. fraxinea* aus Proben der drei untersuchten Standorte (Neuwaldegg, Nasswald und Forstgarten) war mit 80,6% sehr hoch. Die höchste Isolierungsrate wurde mit 88,6% in Nasswald erzielt (Abb. 19). In Neuwaldegg konnte von 74,3% der untersuchten Pflanzen *C. fraxinea* isoliert werden. Im Forstgarten betrug die Isolierungsrate 77,5% (Abb. 19). Der durchgeführte Pearson Chi – Square Test ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,088$) zwischen den Untersuchungsstandorten.

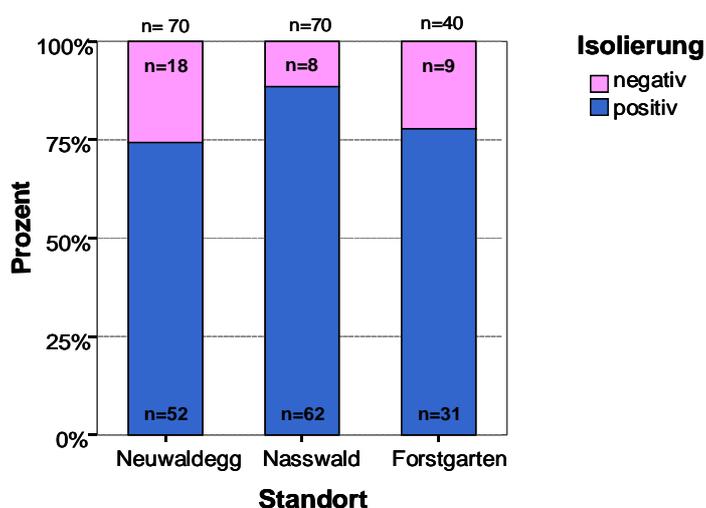


Abb. 19: Isolierungsraten (% , n) von *C. fraxinea* aus den Freilandproben, getrennt nach Untersuchungsstandorten

3.1.2 Isolierungsergebnisse getrennt nach Nekrosotypen

Die von den Versuchsflächen Neuwaldegg und Nasswald gesammelten Proben wurden noch genauer untersucht und nach Nekrosotypen aufgegliedert ausgewertet.

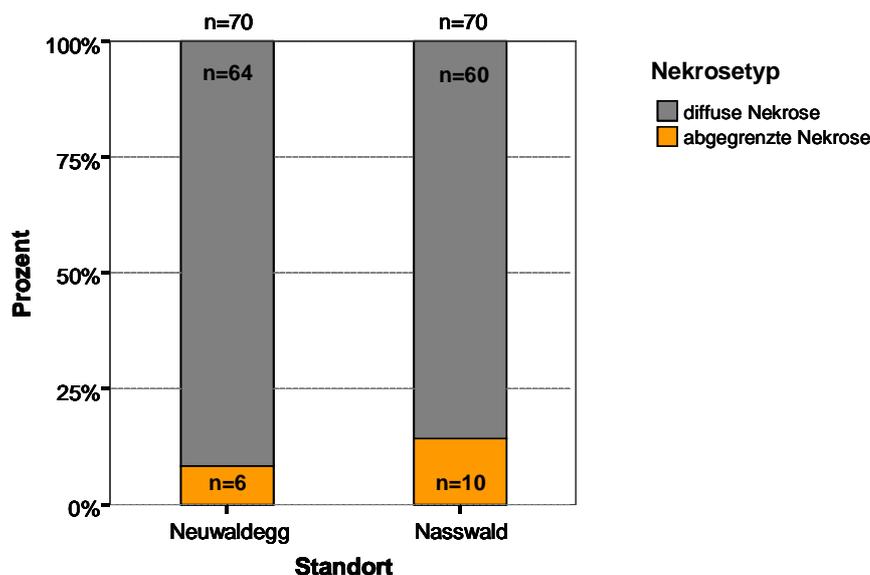


Abb. 20: Anzahl der Freilandproben (n, %) aus den Standorten Neuwaldegg und Nasswald getrennt nach Nekrosetypen

Wie Abbildung 20 zeigt, waren an beiden Standorten Proben mit diffusen Rindennekrosen deutlich häufiger vertreten: Am Standort Neuwaldegg wiesen 91,4% der Proben diffuse Nekrosen auf, auch am Standort Nasswald war der Anteil mit 85,7% relativ hoch. Proben mit abgegrenzten Rindennekrosen waren mit 14,3% (Nasswald) und 8,6% (Neuwaldegg) hingegen deutlich weniger häufig vertreten. Die statistische Auswertung mittels Pearson Chi – Square Test ergab hinsichtlich der Anzahl der Nekrosetypen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,288$) zwischen den Untersuchungsstandorten.

Der Anteil der positiven Isolierung von *C. fraxinea* aus Freilandproben des Standorts Nasswald und Neuwaldegg ist getrennt nach Nekrosetypen in Abbildung 21 dargestellt. Aus Proben von Neuwaldegg wurde *C. fraxinea* von 75% der Proben mit diffusen Nekrosen und von 66,7% der Proben mit abgegrenzten Rindennekrosen isoliert. Die mittlere Isolierungsrate betrug 74,3%. Die Isolierungsrate wies keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,663$) zwischen den Nekrosetypen (Likelihood Ratio Test) auf.

Aus den Proben von Nasswald konnte *C. fraxinea* von 91,7% der, Proben mit diffusen Rindennekrosen und von 70% der Proben mit abgegrenzten Rindennekrosen isoliert werden. Die mittlere Isolierungsrate betrug 88,6%. Die Isolierungsrate in Abhängigkeit vom

Nekrosetyp unterschied sich auch am Standort Nasswald nicht signifikant ($p = 0,078$, Likelihood Ratio Test).

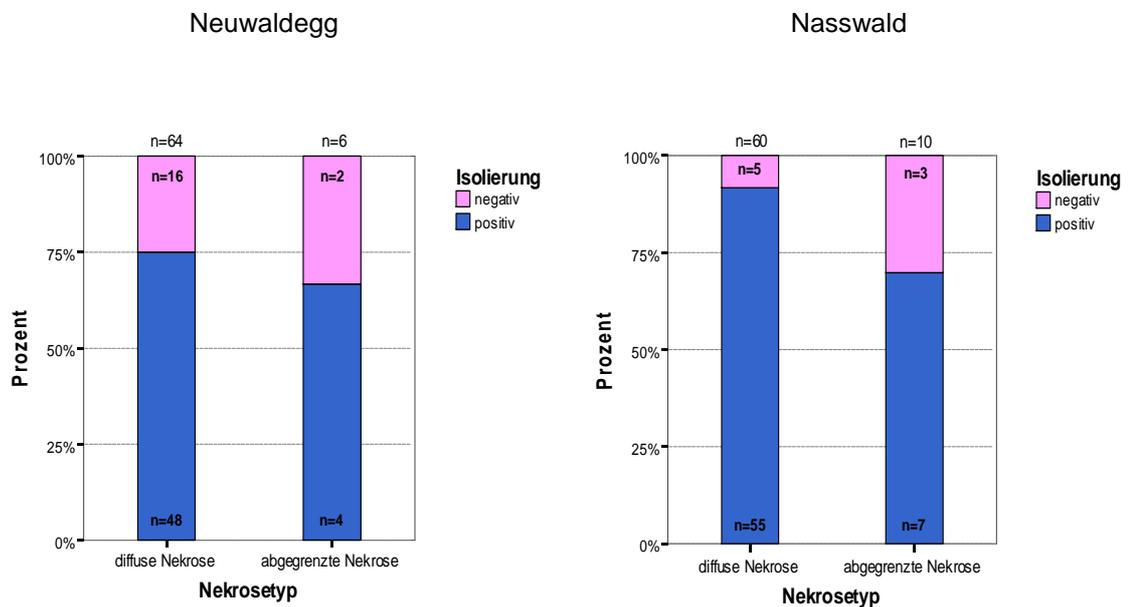


Abb. 21: Isolierungsraten (% , n) von *C. fraxinea* an den Untersuchungsstandorten Neuwaldegg und Nasswald, getrennt nach Nekrosetypen

Wie Abbildung 21 jedoch zeigt, war die Isolierungsrate von *C. fraxinea* aus Proben mit diffusen Nekrosen (83%) auf beiden Standorten jeweils höher wie aus Proben mit abgegrenzten Rindennekrosen (69%).

3.1.3 Auftreten von Nekrosentypen und Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit von der Durchmesserklasse der Probe

3.1.3.1 Auftreten der Nekrosentypen

An den Standorten Neuwaldegg und Nasswald wurde auch das Auftreten der Nekrosentypen in Abhängigkeit vom Durchmesser der Freilandproben untersucht. In Tabelle 9 sind die mittleren Durchmesser und die Standardabweichung, sowie die minimalen und maximalen Durchmesser der Proben aus Neuwaldegg und Nasswald aufgelistet, wobei sich hinsichtlich der Mittelwerte keine wesentlichen Unterschiede zeigten.

Tab. 9: Durchmesser der gesammelten Proben aus Neuwaldegg und Nasswald

Standort	Durchmesser (mm)/Standardabweichung	Min (mm)	Max (mm)
Neuwaldegg	10,7 ± 3,3	5,3	20
Nasswald	11,4 ± 4,3	5	29

Wie Abbildung 22 und 23 jedoch zeigen, wurden sowohl in Nasswald als auch in Neuwaldegg diffuse Nekrosen eher an dünneren Zweigproben gefunden, wogegen abgegrenzte Rindennekrosen („Rindenkrebse“) überwiegend an dickeren Zweigen/Stämmchen auftraten.

Abbildung 22 zeigt, dass abgegrenzte Rindennekrosen in Neuwaldegg vorwiegend an Proben der Durchmesserklasse 4 gefunden wurden (35,7%). In der Durchmesserklasse 3 betrug der Anteil nur mehr 6,3%, wogegen in den Durchmesserklassen 1 und 2 ausschließlich diffuse Nekrosen auftraten. Das Vorkommen der beiden Nekrosentypen in den einzelnen Durchmesserklassen unterschied sich signifikant (Likelihood Ratio Test, $p = 0,002$).

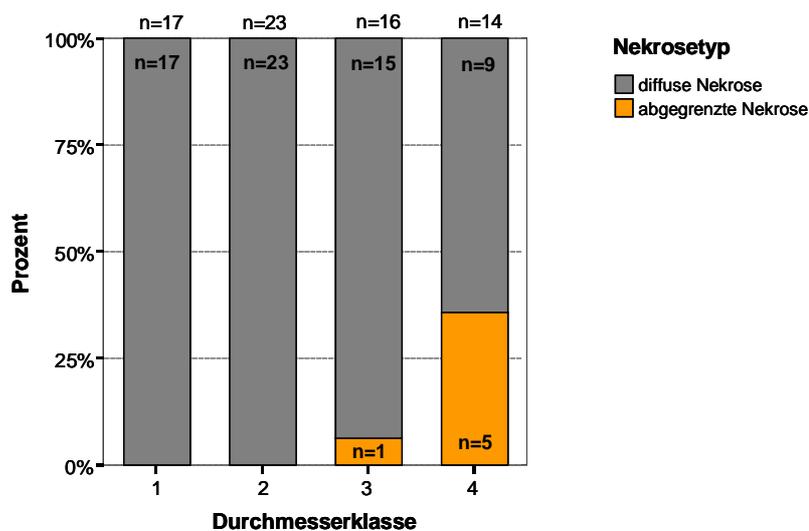


Abb. 22: Anzahl der Proben vom Standort Neuwaldegg getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm) und Ausprägung der Rindennekrose.

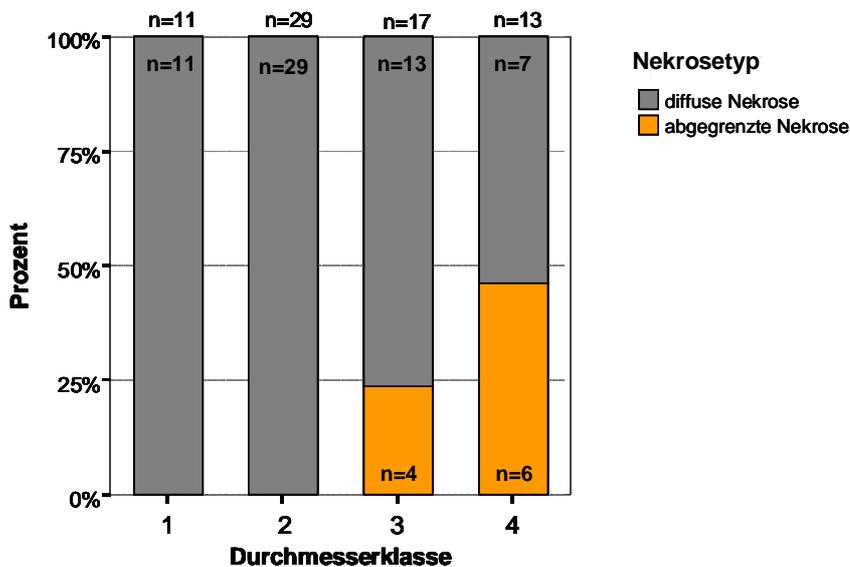


Abb. 23: Anzahl der Proben vom Standort Nasswald getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm) und Ausprägung der Rindennekrose

Auch in Nasswald (Abb. 23) wurden - ähnlich wie im Neuwaldegg - die abgegrenzten Rindennekrosen überwiegend an Proben der Durchmesserklasse 4 gefunden (46,2%). In der Durchmesserklasse 3 betrug der Anteil immerhin noch 23,5%, und war somit deutlich höher als in Neuwaldegg. An Proben der Durchmesserklasse 1 und 2 traten wiederum ausschließlich

diffuse Nekrosen auf. Mittels Likelihood Ratio Tests konnte ein statistisch hochsignifikanter Unterschied im Auftreten der Nekrosentypen in den einzelnen Durchmesserklassen nachgewiesen werden ($p = 0,000$).

3.1.3.2 Isolierungsergebnisse

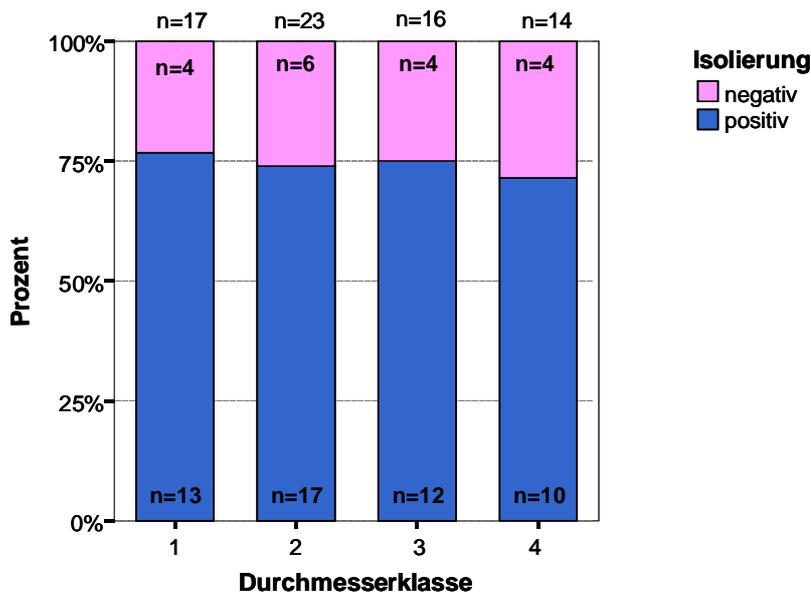


Abb. 24: Isolierungsraten (% , n) von *C. fraxinea* aus Proben des Standorts Neuwaldegg getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm)

Wie Abbildung 24 zeigt, wurde *C. fraxinea* in Neuwaldegg aus rund 75% aller Proben jeder Durchmesserklasse isoliert - es gab also keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Durchmesserklassen ($p = 0,991$, Likelihood Ratio Test). Das höchste Isolierungsergebnis von 76,5% wurde bei den Proben aus der Durchmesserklasse 1 erzielt, die niedrigste Isolierungsrate ergab sich aus Proben der Durchmesserklasse 4 (71,4%). Insgesamt konnte *C. fraxinea* aus 74,3% aller Proben isoliert werden.

In Nasswald (Abb. 25) traten im Gegensatz zum Standort Neuwaldegg Unterschiede in den Isolierungsraten von *C. fraxinea* in Abhängigkeit von der Durchmesserklasse auf, diese waren aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,732$, Likelihood Ratio Test). Die höchste Isolierungsrate wurde mit 93,1% aus Proben der Durchmesserklasse 2 erzielt. Die niedrigste Isolierungsrate von 81,8% ergab sich bei Proben der Durchmesserklasse 1. Die

Isolierungsraten von Proben der Durchmesserklassen 3 und 4 lagen mit 88,2% und 84,6% dazwischen.

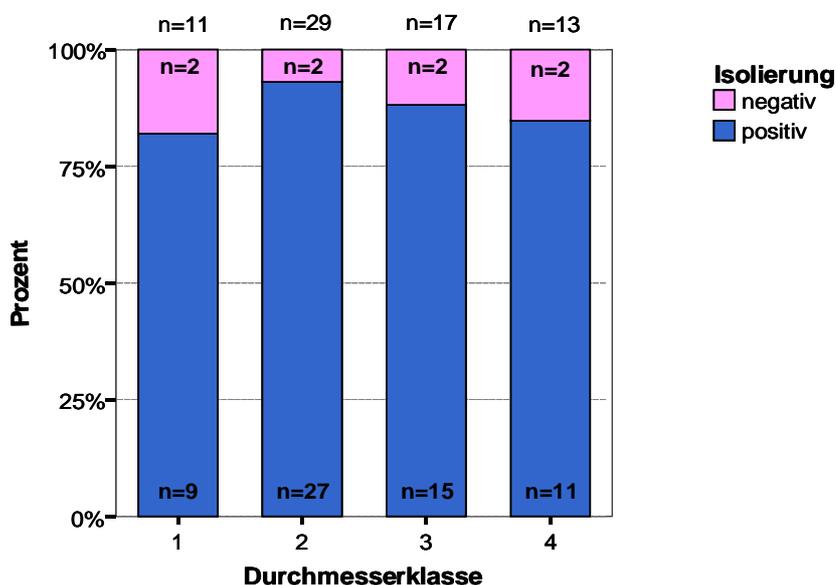


Abb. 25: Isolierungsraten (%), n) von *C. fraxinea* aus Proben des Standorts Nasswald getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm)

3.2 Ergebnisse des Inokulationsversuches mit *C. fraxinea* an *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus*

Circa einen Monat nach der Inokulation traten bei einigen Pflanzen erste Symptome des Eschensterbens auf. Das auffälligste Symptom war ein Welken der Blätter und die Bildung von braunen Rindennekrosen im Bereich der Inokulationsstelle. Nachfolgend werden der zeitlicher Verlauf des Auftretens von Welkeerscheinungen, die Entwicklung von Rindennekrosen und die Ergebnisse der Reisolierungen für jede der drei inokulierten Eschenarten getrennt dargestellt.

3.2.1 *Fraxinus excelsior*

Tabelle 10 gibt einen Gesamtüberblick über die Ergebnisse des Inokulationsversuchs an *F. excelsior* (Anzahl der Pflanzen mit Welkeerscheinungen, mittlere Nekrosenlängen sowie Reisolierungsraten), getrennt nach den Inokulationsterminen und den verwendeten Pilzisolaten.

Wie die Übersicht zeigt, verursachten alle getesteten Isolate Welkesymptome an den Versuchspflanzen, wobei der Anteil welkender Pflanzen je nach Isolat zwischen 18 und 64%

lag. Die Ausbildung einer Nekrose konnte hingegen an allen mit *C. fraxinea* inokulierten Versuchspflanzen (100%) beobachtet werden. An den Kontrollpflanzen wurden hingegen keinerlei Nekrosen ausgebildet.

Die Länge der Nekrosen betrug nach 3 Monaten bei den äußerlich sichtbaren Nekrosen im Mittel über alle Isolate 4,7 cm, im Bast 5,7 cm und die Holzverfärbung hatte eine Ausdehnung von 6 cm, wobei die mittleren Nekroselängen in Abhängigkeit vom verwendeten Isolat zwischen 3,0 bis 7,0 cm (äußere Nekrose), 3,2 bis 8,1 cm (Nekrose im Bast) und 3,5 bis 8,4 cm (Länge der Holzverfärbung) variierten (Tab. 10).

Während der 3-monatigen Versuchsdauer wurden bei einzelnen Pflanzen zwar massive Welkeerscheinungen beobachtet, es kam aber in keinem Fall zum vollständigen Absterben der Pflanze. Die Reisolierungsrate von *C. fraxinea* betrug in Abhängigkeit von den verwendeten Isolaten zwischen 25 und 73% (Tab. 10).

Tab. 10: Ergebnisse des Inokulationsversuches: Anzahl der Pflanzen mit Welkesymptomen, Nekrosenlängen und Reisolierungsraten getrennt nach Inokulationsterminen (Mai bzw. Juni) und Pilz-Isolaten

Inokulationstermin / Isolat	N	% (n) Pflanzen	Länge in cm (Mittelwert ± Standardabweichung)			% (n) Pflanzen
		mit Welke	Oberflächliche Nekrose	Nekrose im Bast/Kambium	Verfärbung im Holz	Reisolierungsrate
1. Inokulationstermin (Mai 2008)						
N1/3 Holz (Edt bei Lambach, OÖ)	20	25 (5)	5,7 ± 3,5	6,7 ± 4,0	7,1 ± 4,0	70 (14)
N5/4/A (Altaussee, ST)	20	35 (7)	6,0 ± 4,9	7,6 ± 5,6	7,6 ± 5,0	60 (12)
T8/1/H3 (Laussa, OÖ)	20	25 (5)	3,2 ± 1,5	3,8 ± 1,8	4,1 ± 1,7	40 (8)
HO/II/6/1 (Hohenau/March, NÖ)	20	20 (4)	3,5 ± 1,4	4,5 ± 1,9	4,8 ± 1,9	45 (9)
NWE/1/2/H1 (Neuwaldegg, Wien)	20	30 (6)	5,1 ± 3,6	7,1 ± 4,0	6,7 ± 3,5	25 (5)
2. Inokulationstermin (Juni 2008)						
T/16/1/H2 (Laussa, OÖ)	10	20 (2)	3,6 ± 1,2	3,6 ± 1,2	3,5 ± 1,1	30 (3)
HO/II/4/2 (Hohenau/March, NÖ)	11	27 (3)	3,6 ± 2,5	4,0 ± 3,0	4,5 ± 3,0	73 (8)
MIB/2/1 (Michelberg, NÖ)	11	18 (2)	3,0 ± 1,1	3,2 ± 1,3	4,1 ± 2,3	46 (5)
MDF/1/5/1 (Mannersdorf/Leithagebirge, NÖ)	12	50 (6)	6,2 ± 4,3	7,1 ± 4,5	8,4 ± 5,4	50 (6)
SFB/II/7/2 (Schafberg, Wien)	11	64 (7)	7,0 ± 5,2	8,1 ± 5,9	7,3 ± 4,1	73 (8)
Gesamt	10	30 (47)	4,7 ± 3,4	5,7 ± 4	6 ± 3,7	50 (78)

3.2.1.1 Welkesymptome

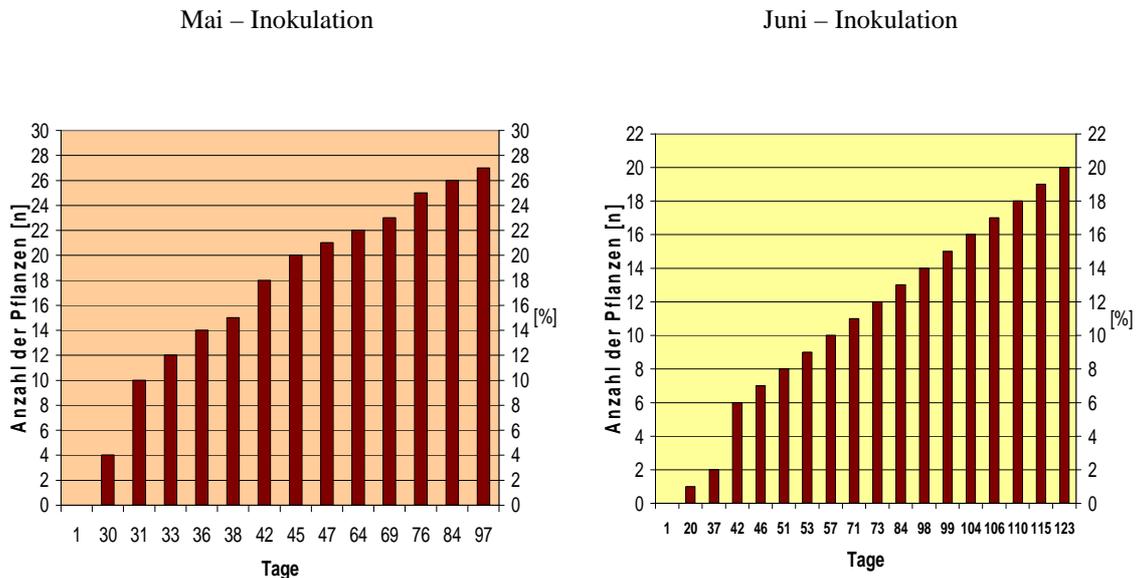


Abb. 26: *Fraxinus excelsior*: Kumulative Darstellung der welkenden Pflanzen (n, %) in Abhängigkeit von der Anzahl von Tagen nach der Inokulation

Abbildung 26 zeigt, dass nach Inokulation der Pflanzen im Mai im Zeitraum von 97 Tagen an 27 Pflanzen von insgesamt 100 inokulierten Pflanzen Welkesymptome auftraten. Bei den Kontrollpflanzen konnte hingegen kein Welken der Blätter beobachtet werden. Bei Inokulation der Pflanzen im Juni traten trotz des längeren Beobachtungszeitraums von 123 Tagen im Vergleich zur Mai – Inokulation an deutlich weniger Pflanzen (n = 20) Welkeerscheinungen auf. Wie schon beim Mai – Inokulationstermin zeigten auch hier die Kontrollpflanzen keine Welkesymptome.

3.2.1.2 Nekrosenlängen

Wie Abbildung 27 zeigt, wurden bei der Mai-Inokulation an *F. excelsior* in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Isolat unterschiedlich lange Nekrosen ausgebildet. Die längsten Nekrosen (bis zu 24,2 cm an der Rinde, 28,7 cm im Bast und 26,5 cm im Holz) traten an Pflanzen auf, die mit dem Isolat N 5/4/A inokuliert wurden. Die vergleichsweise geringsten maximalen Nekrosenlängen wurden bei Verwendung des Isolates T 8/1/H3 (7,4 cm - Rinde, 8,6 cm - Bast, 8,5 cm - Holz) und HO II/6/1 (7,8 cm - Rinde, 7,8 cm - Bast, 8,8 cm - Holz) gemessen. Betrachtet man die Mittelwerte, so wurden bei der Mai-Inokulation die längsten Nekrosen bei Isolat N 5/4/A (7,6 cm Bast, 7,6 cm Holz) gemessen.

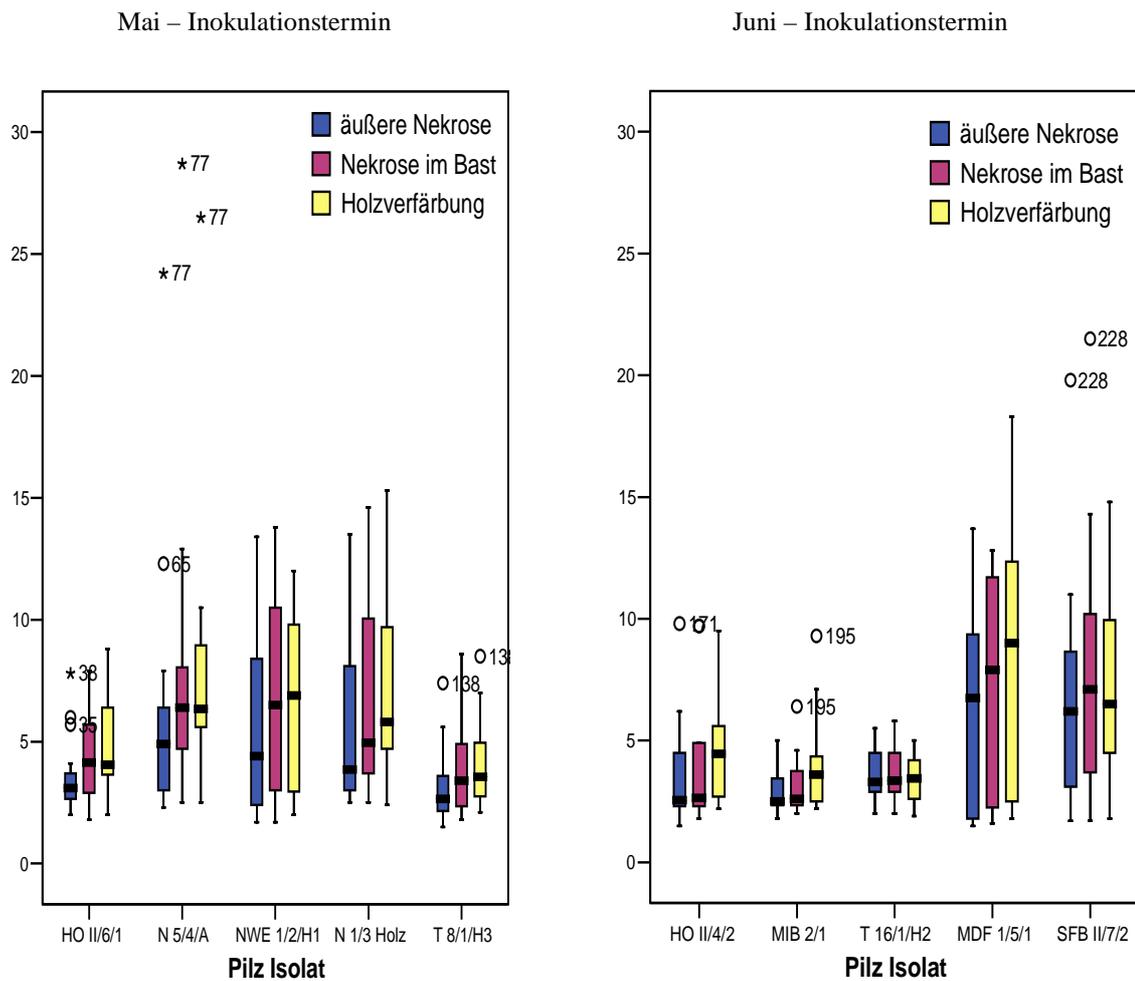


Abb. 27: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von *Fraxinus excelsior* in Abhängigkeit von den verwendeten Isolaten (HO II/6/1, N 5/4/A, NWE 1/2/H1, N 1/3 Holz und T 8/1/H3; Mai – Inokulationstermin) und (HO II/4/2, MIB 2/1, T 16/1/H2, MDF 1/5/1 und SFB II/7/2; Juni – Inokulationstermin)

Die kürzeste mittlere Nekrosenlänge trat bei Verwendung des Isolates T 8/1/H3 (3,2 cm) auf (vgl. Tab. 10). Die Durchführung des Kruskal - Wallis Tests ergab bei *F. excelsior* für die äußere Nekrosenlänge ($p = 0,008$), die Länge der Nekrose im Bast ($p = 0,003$) und die Ausdehnung der Holzverfärbung ($p = 0,004$) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Pilzisolaten. (Anm.: eine ANOVA konnte nicht gerechnet werden, da es keine Homogenität und Normalverteilung in den Gruppen gab).

Auch bei der Juni-Inokulation kam es in Abhängigkeit von den verwendeten Isolaten zur Ausbildung unterschiedlich langer Nekrosen an Pflanzen von *F. excelsior*. Die längsten Nekrosen konnten mit 19,8 cm an der Rinde und 21,5 cm im Bast bei Verwendung des Isolats SFB II/7/2 erzielt werden. Die längste Holzverfärbung trat mit 18,3 cm bei einer Pflanze auf, die mit dem Isolat MDF 1/5/1 inokuliert wurden.

Vergleicht man die Mittelwerte für die einzelnen Isolate (Tab. 10), so zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede: Die längsten Nekrosen wurden bei Verwendung des Isolats SFBII /7/2 (Rinde: 7 cm, Bast: 8,1 cm) gemessen. Die längste mittlere Holzverfärbung (8,4 cm) wurde bei Verwendung des Isolats MDF 1/5/1 erreicht. Hinsichtlich der mittleren Länge der äußeren Nekrose ($p = 0,201$), jener im Bast ($p = 0,125$) sowie der Ausdehnung der Holzverfärbung ($p = 0,096$) konnten zwischen den verwendeten Pilzisolaten im Gegensatz zur Mai-Inokulation keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Kruskal – Wallis Test).

3.2.1.3 Reisolierungen

Alle verwendeten Pilzisolat von *C. fraxinea* erwiesen sich gegenüber *F. excelsior* als pathogen und konnten aus den inokulierten Pflanzen erfolgreich reisolieren werden. Die Reisolierungsrate war in Abhängigkeit vom verwendeten Pilzisolat jedoch unterschiedlich hoch und reichte von 25 bis 72,7% (Abb. 28, Tab. 10).

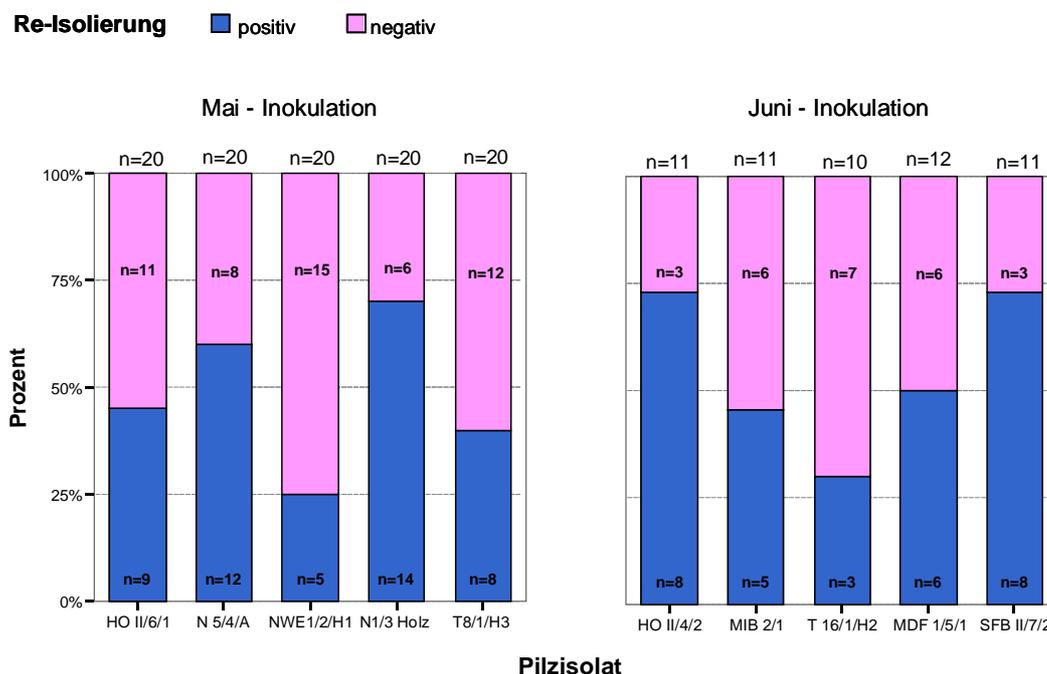


Abb. 28: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von *C. fraxinea* (n, %) aus den inokulierten *Fraxinus excelsior* Pflanzen, getrennt nach Pilzisolaten und Inokulationstermin

Die höchsten Reisolierungsraten (jeweils 72,7%) konnten bei Pflanzen erzielt werden, die im Juni mit den Pilzisolaten SFB II/7/2 und HO II/4/2 inokuliert wurden. Für den Inokulationstermin im Mai betragen die höchsten Reisolierungsraten 70% (N 1/3 Holz) bzw.

60% (N 5/4/A). Die niedrigste Reisolierungsrate ergab sich mit 25% für das Pilzisolat NWE 1/2/H1 (Mai - Inokulation). Weitere Reisolierungen gelangen wie folgt: 45%ige Reisolierung des Isolats HO II/6/1 und 40% beim Isolat T 8/1/H3 (Mai – Inokulation). Beim Pilzisolat MDF 1/5/1 gelang bei 50%, bei MIB 2/1 bei 45,5% und bei T 16/1/H2 bei 30% der inokulierten Pflanzen eine Reisolierung von *C. fraxinea*.

Im Mittel über alle Isolate betrug die Reisolierungsrate bei der Inokulation im Mai 48% und im Juni 54,5%. Mittels Pearson Chi – Square Test wurden für den Mai – Inokulationstermin in Hinblick auf die erfolgreiche Reisolierung statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Pilzisolaten gefunden ($p = 0,043$), für den Juni – Inokulationstermin konnten die Unterschiede hingegen nicht statistisch abgesichert werden ($p = 0,199$) (Likelihood Ratio Test).

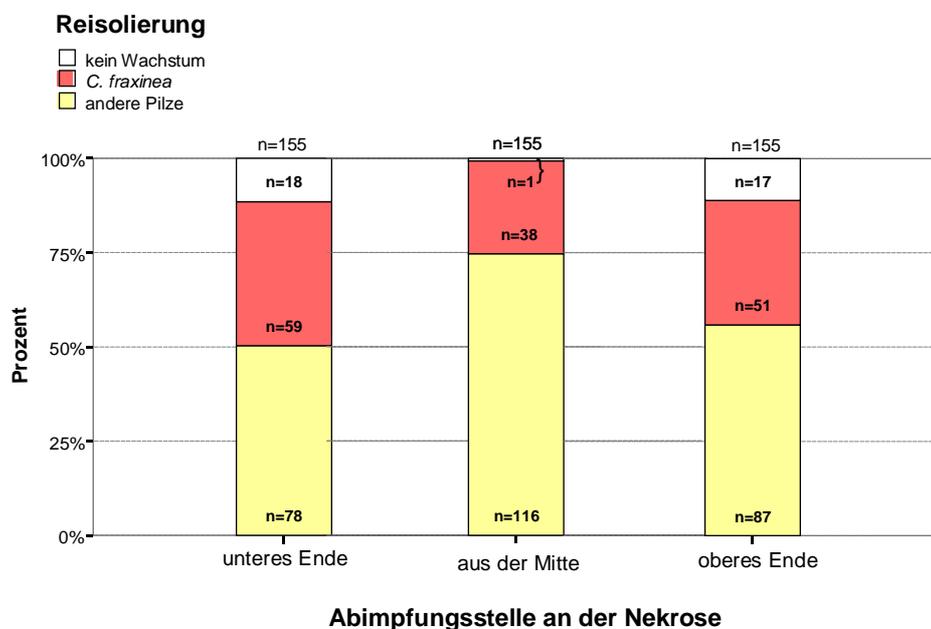


Abb. 29: Auftreten von *C. fraxinea* und anderen Pilzen (% , n) im Zuge der Reisolierung von *Fraxinus excelsior* in Abhängigkeit von der gewählten Abimpfungsstelle (unteres Ende, aus der Mitte bzw. oberes Ende der Nekrose; gepoolte Daten des Mai- und Juni – Inokulationstermins)

Auch die Entnahmestelle der für die Reisolierung des Erregers herangezogenen Gewebeproben hatte einen Einfluss auf die mittleren Reisolierungsraten (Abb. 29). Die höchste Reisolierungsrate von 38,1% wurde aus Proben erzielt, die von unterem Ende der Nekrose entnommen wurden. Die Reisolierungsrate aus dem oberen Teil der Nekrose betrug im Mittel 32,9%. Die niedrigste Reisolierung gelang mit 24,5% aus der Mitte der Nekrose.

3.2.2 *Fraxinus angustifolia*

3.2.2.1 Welkesymptome

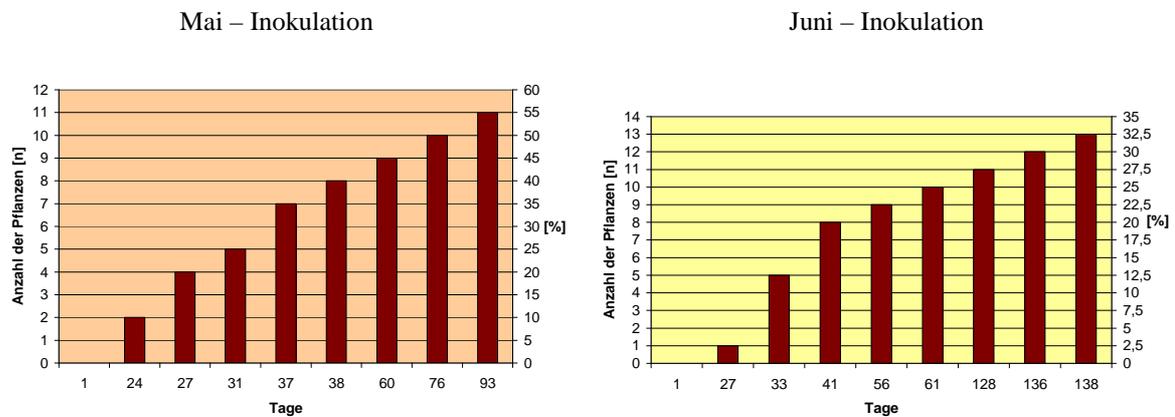


Abb. 30: *Fraxinus angustifolia*: Kumulative Darstellung der welkenden Pflanzen (n, %) in Abhängigkeit von der Anzahl von Tagen nach der Inokulation

Abbildung 30 zeigt, dass bei *Fraxinus angustifolia* im Zeitraum von 93 Tagen an 11 von insgesamt 20 inokulierten Pflanzen (55%) Welkesymptome auftraten. Bei den Kontrollpflanzen konnte keine Welke beobachtet werden. Bei der Juni-Inokulation traten im Zeitraum von 138 Tagen an 13 von insgesamt 40 inokulierten Pflanzen (32,5%) Welkesymptome auf. Trotz längerem Beobachtungszeitraum war die Anzahl an gewelkten Pflanzen im Vergleich zum Mai – Inokulationstermin hier somit deutlich niedriger. Ähnlich wie schon beim Mai – Inokulationstermin zeigten auch hier die Kontrollpflanzen keinerlei Welkesymptome.

3.2.2.2 Nekrosenlängen

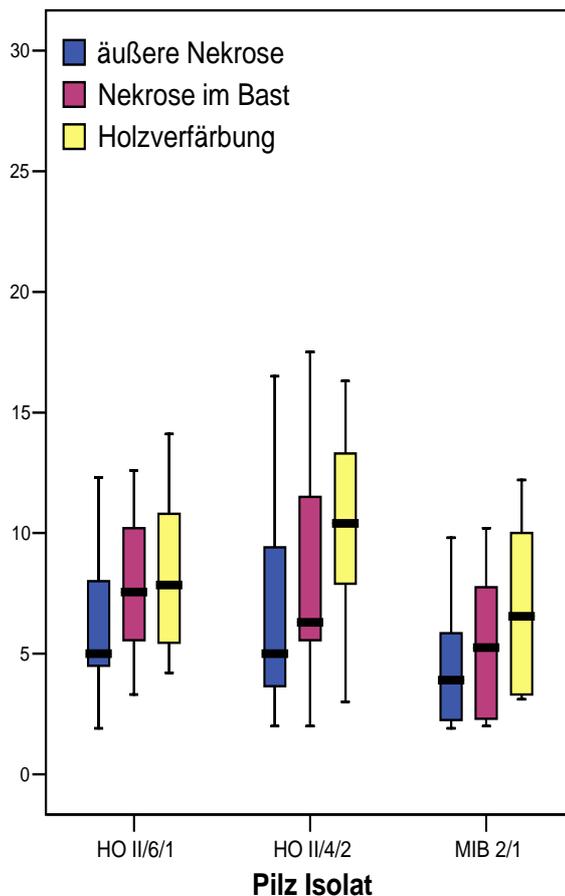


Abb. 31: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von *Fraxinus angustifolia* in Abhängigkeit von den verwendeten Isolaten HO II/6/1 (Mai – Inokulation) und HO II/4/2 und MIB 2/1 (Juni – Inokulationstermin)

Die mit dem Isolat HO II/4/2 an Pflanzen von *F. angustifolia* induzierten Nekrosen waren deutlich länger als jene, die durch die Isolate MIB 2/1 und HO II/6/1 hervorgerufen wurden (Abb. 31). Dies zeigt sich besonders an den maximal gemessenen Nekrosenlängen: An Pflanzen, die mit dem Isolat HO II/4/2 inokuliert wurden, waren die Nekrosen an der Rinde bis zu 16,5 cm lang, im Bast bis zu 17,5 cm und im Holz wurden Verfärbungen bis 39 cm Länge gemessen. Die maximalen Nekrosenlängen bei Verwendung des Isolates MIB 2/1 erreichten hingegen nur 9,8 cm an der Rinde, 10,2 cm im Bast und 12,2 cm im Holz. Im Mittel über die drei verwendeten Isolate betragen die Nekrosenlängen an *F. angustifolia* an der Rinde 5,8 cm, im Bast 7,2 cm und im Holz 8,8 cm. Hinsichtlich der mittleren Länge der äußeren Nekrose ($p = 0,319$), jener im Bast ($p = 0,195$) sowie der Ausdehnung der Holzverfärbung ($p = 0,212$) konnten zwischen den verwendeten Pilzisolaten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Kruskal - Wallis Test).

3.2.2.3 Reisolierungen

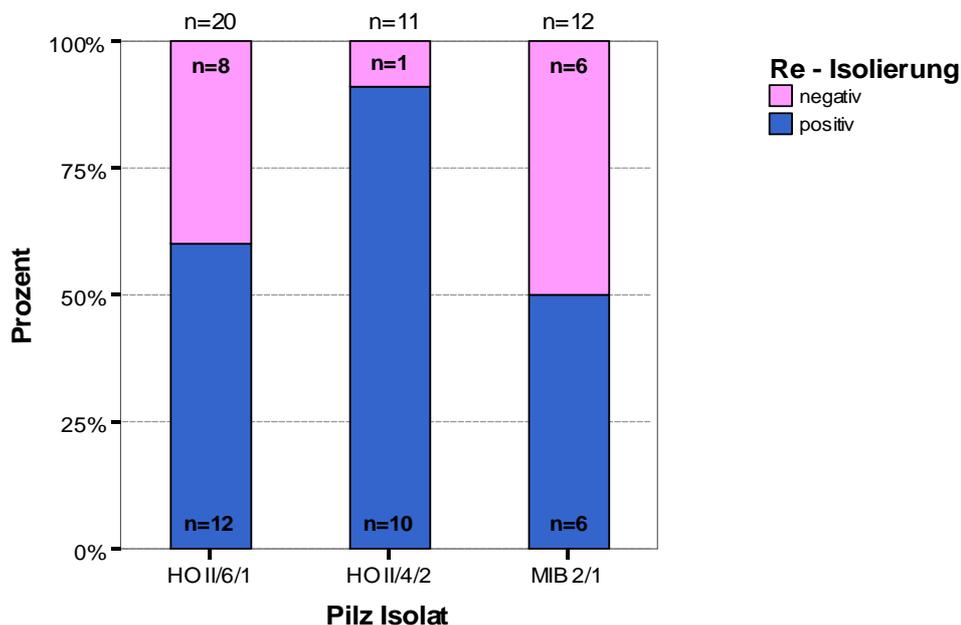


Abb. 32: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von *C. fraxinea* (n, %) aus den inokulierten *Fraxinus angustifolia* Pflanzen, getrennt nach den Pilzisolaten HO II/6/1 (Mai – Inokulationstermin) und HO II/4/2 und MIB 2/1 (Juni – Inokulationstermin)

Die Reisolierungsraten aus den inokulierten *F. angustifolia* Pflanzen waren in Abhängigkeit vom verwendeten Pilzisolat unterschiedlich hoch (Abb. 32). Bei Pflanzen, die mit dem Pilzisolat HO II/4/2 inokuliert wurden, konnte der Erreger in 90,9% aller Fälle reisoliert werden. Bei Verwendung des Pilzisolats HO II/6/1 gelang bei 60% und beim Isolat MIB 2/1 bei der Hälfte (50%) der inokulierten Pflanzen eine positive Reisolierung. Im Mittel betrug die gesamte Reisolierungsrate 65,1%. Hinsichtlich der Häufigkeit der positiven Reisolierungen wurden mittels Likelihood Ratio Tests keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Pilzisolaten ($p = 0,069$) festgestellt.

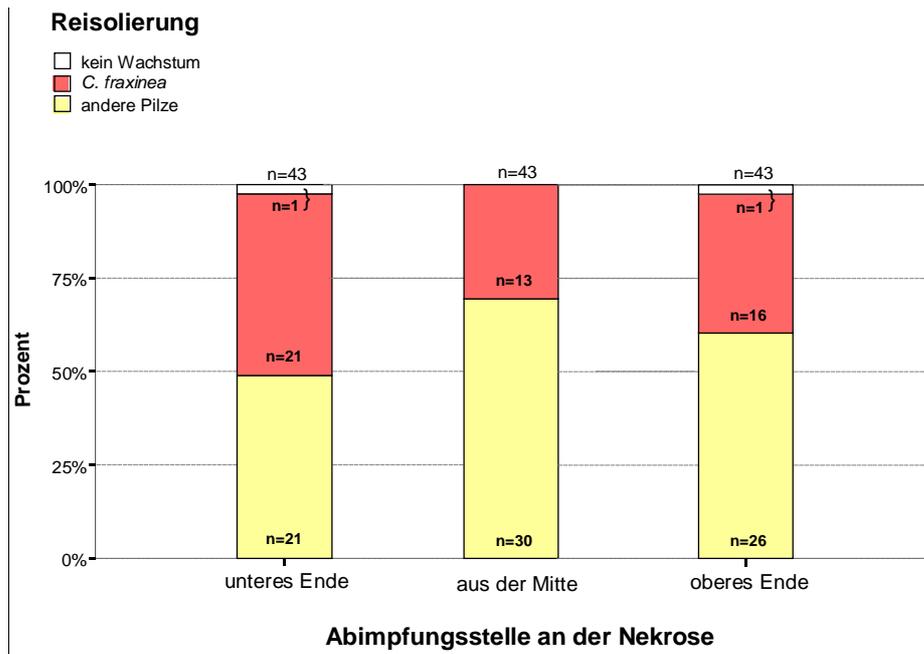


Abb. 33: Auftreten von *C. fraxinea* und anderen Pilzen (% , n) im Zuge der Reisolierung von *Fraxinus angustifolia* in Abhängigkeit von der gewählten Abimpfungsstelle (unteres Ende, aus der Mitte bzw. oberes Ende der Nekrose; gepoolte Daten des Mai- und Juni – Inokulationstermins)

Wie schon bei *Fraxinus excelsior*, ergaben sich auch bei *F. angustifolia* unterschiedliche Reisolierungsraten in Abhängigkeit von der Entnahmestelle der Gewebeprobe (Abb. 33). Die höchste Reisolierungsrate wurde mit 48,8% von Proben erzielt, die vom unteren Ende der Nekrose entnommen wurden. Die Reisolierungsrate aus dem oberen Teil der Nekrose betrug im Mittel 37,2%. Die niedrigste Reisolierung gelang mit 30,2% aus der Mitte der Nekrose.

3.2.3 *Fraxinus ornus*

3.2.3.1 Welkesymptome

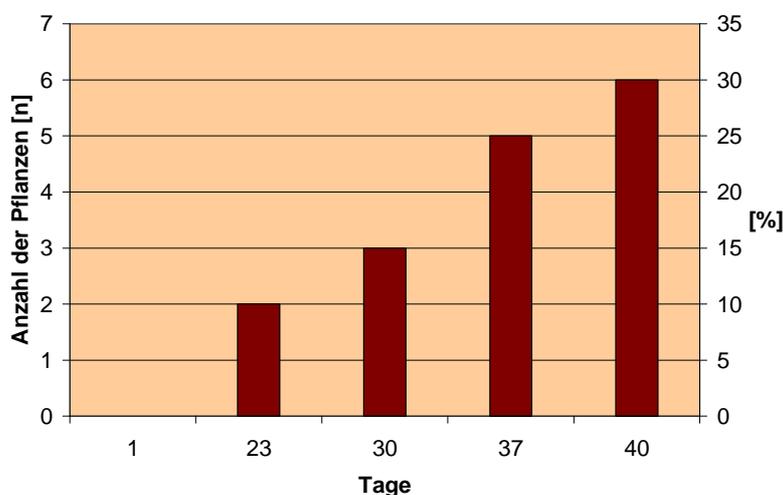


Abb. 34: *Fraxinus ornus* (Mai – Inokulation): Kumulative Darstellung der welkenden Pflanzen (n, %) in Abhängigkeit von der Anzahl von Tagen nach der Inokulation (Anm.: bei der Inokulation im Juni kam es zu keinen Welkeerscheinungen an den inokulierten Versuchspflanzen!)

Nach Inokulation der *F. ornus* Pflanzen im Mai konnten im Zeitraum von 40 Tagen nur an 6 (30%) von insgesamt 20 inokulierten Pflanzen Welkesymptome beobachtet werden (Abb. 34). Ähnlich wie bei *F. excelsior* und *F. angustifolia*, konnte bei den Kontrollpflanzen kein Welken der Blätter beobachtet werden. Bei Inokulation der Pflanzen im Juni konnten weder bei den inokulierten, noch bei den Kontrollpflanzen Welkesymptome beobachtet werden.

3.2.3.2 Nekrosenlängen

Wie Abbildung 35 zeigt, verursachten die beiden an *F. ornus* inokulierten Pilzisolat unterschiedlich lange Nekrosen: Isolat HO II/6/1, mit dem die Pflanzen im Mai inokuliert wurden, wies mit Nekrosen von bis zu 13,6 cm Länge an der Rinde, 15,2 cm im Bast und 14,8 cm im Holz im Vergleich zum Isolat HO II/4/2 (Juni – Inokulation) wesentlich längere Nekrosen auf. An den mit dem Pilzisolat HO II/4/2 inokulierten Pflanzen wurden folgenden maximalen Nekrosenlängen gemessen: 3,2 cm an der Rinde, 2,8 cm im Bast und 3,5 cm im Holz. Auch bei den Medianen waren diese Unterschiede zwischen den verwendeten Pilzisolaten/Inokulationsterminen deutlich ausgeprägt und konnten mittels Kruskal - Wallis Test auch statistisch hoch signifikant abgesichert wurden ($p = 0,000$).

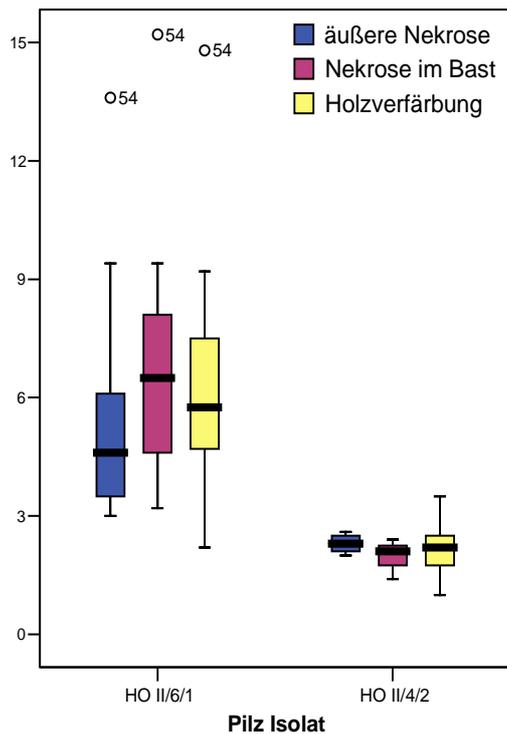


Abb. 35: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von *Fraxinus ornus* bei Verwendung der Isolate HO II/6/1 (Mai – Inokulationstermin) und HO II/4/2 (Juni – Inokulationstermin)

3.2.3.3 Reisolierungen

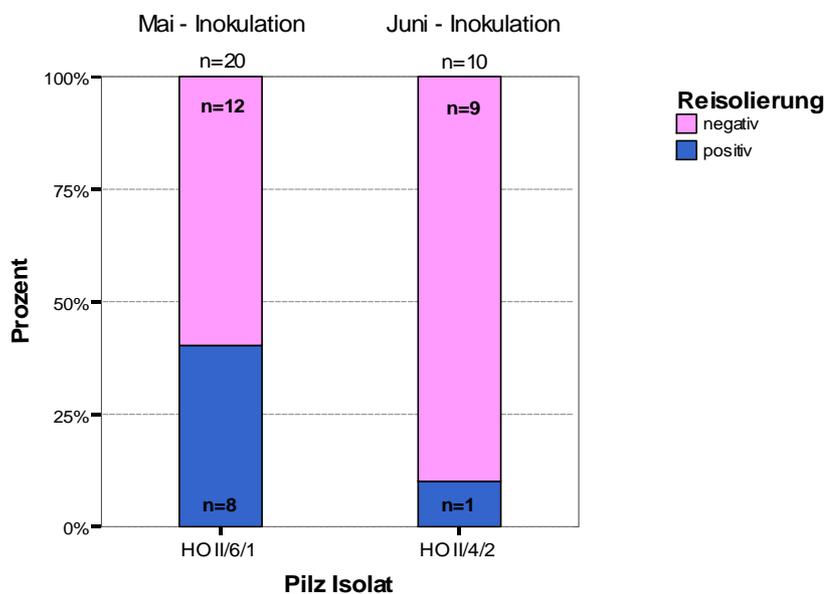


Abb. 36: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von *C. fraxinea* (n, %) aus den inokulierten *Fraxinus ornus* Pflanzen, getrennt nach Pilzisolaten und Inokulationsterminen

In Abhängigkeit vom verwendeten Pilzisolat bzw. Inokulationstermin traten bei *F. ornus* Pflanzen unterschiedliche Reisolierungsraten auf (Abb. 36). Von jenen Pflanzen, die mit dem Pilzisolat HO II/6/1 im Mai inokuliert wurden, konnte *C. fraxinea* in 40% aller Fälle reisoliert werden, wogegen die Reisolierungsrate im Juni bei den mit dem Pilzisolat HO II/4/2 inokulierten Pflanzen nur 10% erreichte. Dieser doch deutliche Unterschied in der Reisolierungsrate zwischen den Pilzisolaten bzw. Inokulationsterminen konnte mittels Likelihood Ratio Tests statistisch jedoch nicht abgesichert werden ($p = 0,072$). Im Mittel über beide Inokulationstermine betrug die Reisolierungsrate bei *F. ornus* 30%.

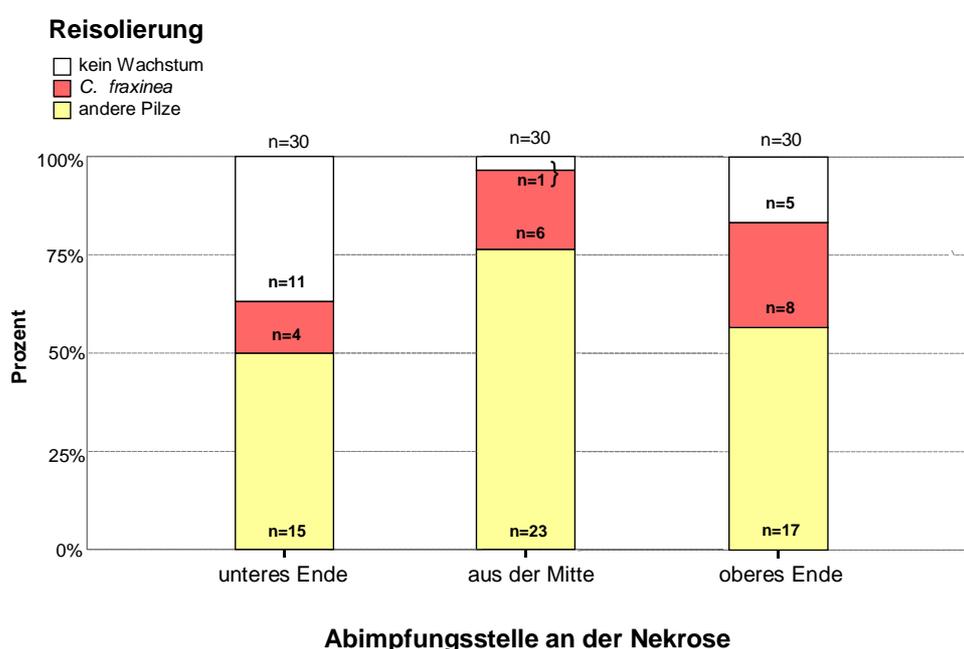


Abb. 37: Auftreten von *C. fraxinea* und anderen Pilzen (% , n) im Zuge der Reisolierung von *Fraxinus ornus* in Abhängigkeit von der gewählten Abimpfungsstelle (unteres Ende, aus der Mitte bzw. oberes Ende der Nekrose; gepoolte Daten des Mai- und Juni – Inokulationstermins)

Abbildung 37 zeigt die unterschiedlichen Reisolierungsraten von *C. fraxinea* in Abhängigkeit von den gewählten Abimpfungsstellen (unteres Ende, aus der Mitte bzw. vom oberen Ende der Nekrose). Die höchste Reisolierungsrate (26,7%) zeigte sich aus Proben, die von oberem Ende der Nekrose entnommen wurden. Aus der Mitte der Nekrose betrug die Reisolierungsrate im Mittel 20%. Die niedrigste Reisolierung gelang bei *F. ornus* mit 13,3% aus jenen Proben, die von dem unteren Ende der Nekrose entnommen wurden.

3.2.4 Vergleich jener Isolate, die an mehreren Eschenarten getestet wurden

Da zwei Isolate an allen drei Eschenarten und ein Isolat sowohl an *Fraxinus excelsior*, als auch an *F. angustifolia* getestet wurden (vgl. Tab. 8), kann zumindest für diese Isolate auch ein Vergleich zwischen den einzelnen Baumarten erfolgen.

3.2.4.1 Auftreten von Welkesymptomen

Das Auftreten von Welkesymptomen an Versuchspflanzen von *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus* nach Inokulation mit dem Isolat HO II/6/1 (Mai – Inokulation) bzw. HO II/4/2 (Juni – Inokulation) ist in Abbildung 38 dargestellt. Dabei zeigten sich für beide Inokulationstermine deutliche Unterschiede zwischen den drei Eschenarten, wobei sich *F. angustifolia* mit jeweils 55% (Mai – Inokulation) bzw. 63,6% (Juni – Inokulation) an welkenden Versuchspflanzen am anfälligsten erwies. Bei der Mai – Inokulation mittels Isolat HO II/6/1 kam es bei *F. ornus* an nur 30% und bei *F. excelsior* an nur 20% aller Versuchspflanzen zur Ausprägung von Welkesymptomen. Die mittels Pearson Chi – Square Tests erhobenen Unterschiede zwischen den einzelnen Eschenarten liegen hier mit $p = 0,057$ nur knapp über dem 5% Signifikanzniveau.

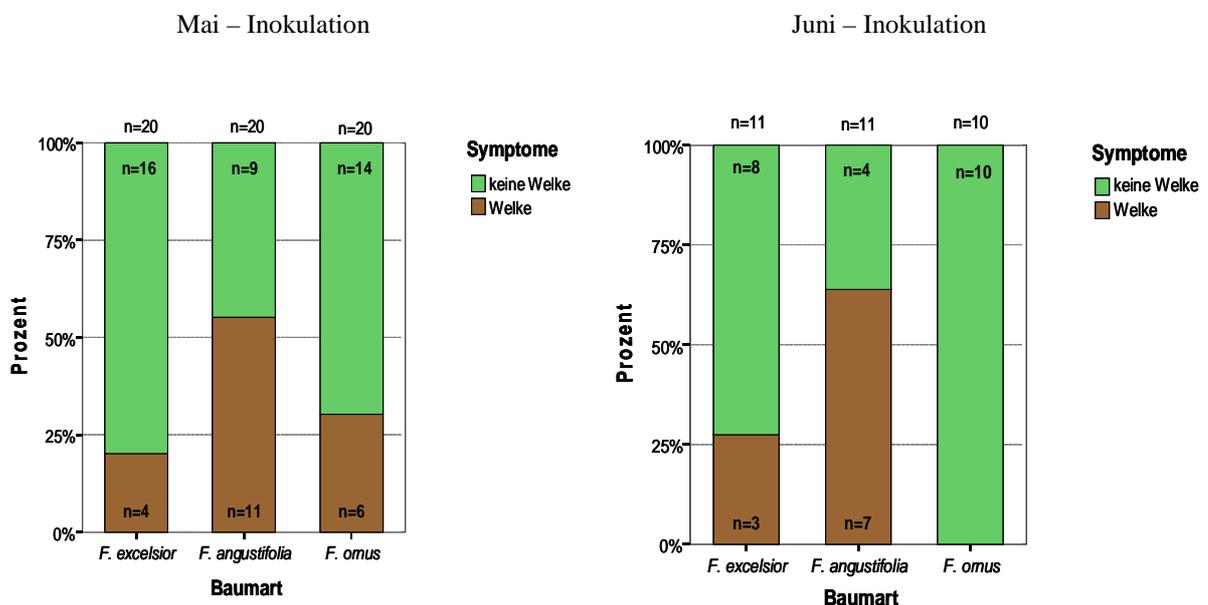


Abb. 38: Auftreten von Welkesymptomen (% , n) an Versuchspflanzen von *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus* nach Inokulation mit dem Isolat HO II/6/1 (Mai – Inokulation) und dem Isolat HO II/4/2 (Juni – Inokulation)

Bei der Inokulation im Juni mittels Isolat HO II/4/2 war der Anteil welkender *F. excelsior* Pflanzen mit 27,3% etwas höher als im Mai, Pflanzen der Art *F. ornus* wiesen überhaupt keine Welke auf. Es wurde ein statistisch hoch signifikante Unterschied zwischen den Baumarten gefunden (Likelihood Ratio Test, $p = 0,002$).

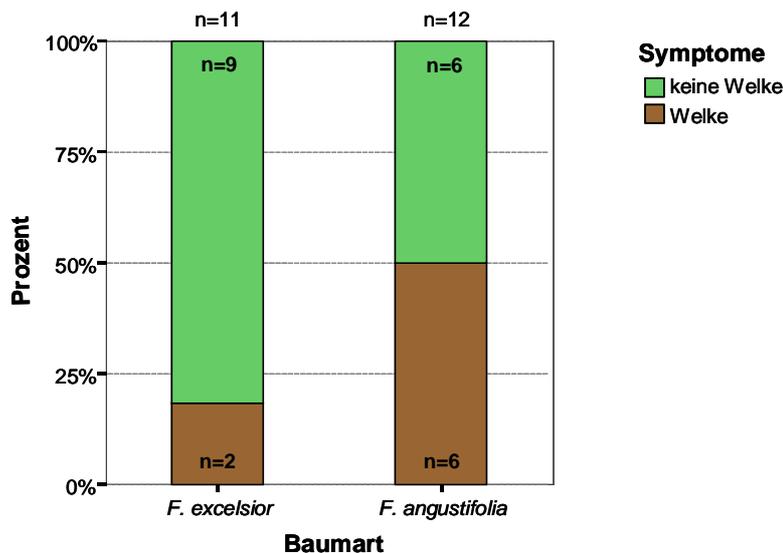


Abb. 39: Auftreten von Welkesymptomen (% , n) an Versuchspflanzen von *Fraxinus excelsior* und *F. angustifolia* nach Inokulation mit dem Isolat MIB 2/1 (Juni – Inokulation)

In Abbildung 39 ist die Wirkung des Isolats MIB 2/1 auf *F. excelsior* und *F. angustifolia* dargestellt. Auch hier war die Anzahl der Eschenpflanzen, die eine Welke aufwiesen, bei *F. angustifolia* mit 50% aller inokulierten Pflanzen fast 3-fach so hoch wie bei *F. excelsior* (18,2%). Trotz der deutlichen Unterschiede konnten diese – wahrscheinlich auf Grund des kleinen Stichprobenumfangs – mittels Likelihood Ratio Tests statistisch jedoch nicht abgesichert werden ($p = 0,103$).

3.2.4.2 Nekrosenlängen bei den einzelnen Eschenarten

Nach der Inokulation bildeten sich Nekrosen an den Pflanzen, die sich ausgehend von der Inokulationsstelle längst des Stammes ausbreiteten. Bei der Aufarbeitung der Pflanzen wurden diese Nekrosenlängen gemessen, um Unterschiede zwischen den Isolaten und den Eschenarten vergleichen zu können. An den Kontrollpflanzen entstanden keine Nekrosen.

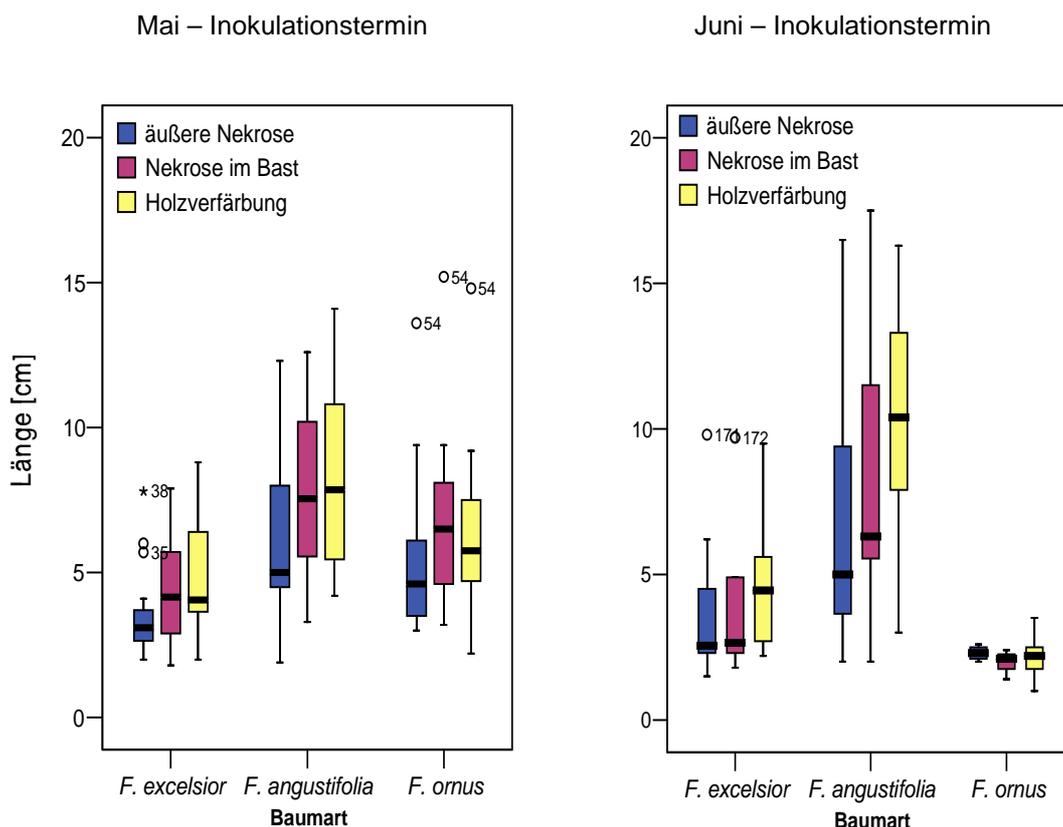


Abb. 40: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus* bei Verwendung des Isolates HO II/6/1 (Mai – Inokulationstermin) und Isolates HO II/4/2 (Juni – Inokulationstermin)

Wie Abbildung 40 zeigt, traten an Pflanzen von *F. excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus* bei Verwendung des gleichen Isolats unterschiedlich lange Nekrosen auf. Bei Verwendung des Isolats HO II/6/1 (Mai- Inokulation) wurden die längsten Nekrosen (bis zu 13,6 cm an der Rinde, 15,2 cm im Bast und 14,8 cm im Holz) zwar an einer Pflanze der Art *F. ornus* gemessen (Nr. 54 in Abb. 40), im Mittel wurden die längsten Nekrosen jedoch bei *F. angustifolia* ausgebildet. Die vergleichsweise kürzesten Nekrosen wies *F. excelsior* auf. Dies traf nicht nur für die Mittelwerte, sondern auch für die maximalen (bis zu 7,8 cm an der Rinde, 7,9 cm im Bast und 8,8 cm im Holz) Nekrosenlängen zu. Sowohl für die Länge der

äußeren Nekrose ($p = 0,001$), der Nekrose im Bast ($p = 0,001$) als auch für die Ausdehnung der Holzverfärbung ($p = 0,001$) konnten die gefundenen Unterschiede zwischen den Baumarten statistisch hoch signifikant abgesichert werden (Kruskal - Wallis Test).

Das Ergebnis der Juni - Inokulation mittels Isolat HO II/4/2 ist in Abbildung 22 gezeigt. Im Gegensatz zur Inokulation mit dem Isolat HO II/6/1 (Mai – Inokulation) wiesen die *F. ornus* Pflanzen hier nur sehr kurzen Nekrosen auf (bis zu 3,2 cm an der Rinde und 2,8 cm im Bast und Holz). Die längsten Nekrosen (bis zu 16,5 cm an der Rinde, 17,5 cm im Bast und 39 cm im Holz) traten an *F. angustifolia* auf. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Baumarten waren sowohl in Hinblick auf die Länge der äußeren Nekrose ($p = 0,010$), der Nekrose im Bast ($p = 0,001$) und Ausdehnung der Holzverfärbung ($p = 0,000$) statistisch signifikant (Kruskal - Wallis Test).

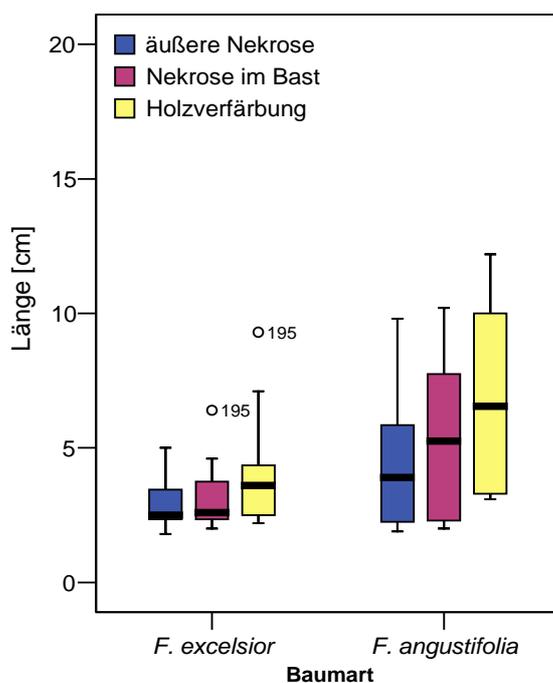


Abb. 41: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von *Fraxinus angustifolia* und *F. excelsior* bei Verwendung des Isolates MIB 2/1 (Juni – Inokulationstermin)

Auch die Testung des Isolates MIB 2/1 an Pflanzen von *F. excelsior* und *F. angustifolia* ergab hinsichtlich der Nekrosenlängen ein ähnliches Bild (Abb. 41). An *F. angustifolia* wurden wesentlich längere Nekrosen (bis zu 9,8 cm an der Rinde, 10,2 cm im Bast und 12,2 cm im Holz) gebildet als dies bei *F. excelsior* der Fall war (an letztere erreichten die Nekrosen nur eine Länge von bis zu 5 cm an der Rinde, 6,4 cm im Bast und 9,3 cm im Holz). Während die

Unterschiede zwischen den beiden Baumarten für die Länge der äußeren Nekrose ($p = 0,218$) und Nekrose im Bast ($p = 0,166$) statistisch nicht abgesichert werden konnten, wurden in der Länge der Holzverfärbung statistisch signifikante Unterschiede festgestellt ($p = 0,036$, Kruskal - Wallis Test).

3.2.5 Reisolierungsraten in Abhängigkeit von den untersuchten Eschenarten

Die über alle getesteten Baumarten kalkulierte Gesamt-Reisolierungsrate betrug bei der Mai – Inokulation 48,6% und bei der Juni – Inokulation 53,4%. Die Reisolierungsraten beider Termine unterscheiden sich statistisch allerdings nicht signifikant. Die höchste Reisolierungsrate wurde von den *F. angustifolia* Pflanzen erzielt (65,1%), wobei hier deutlich höhere Reisolierungsrate aus jenen Pflanzen erreicht wurden, die längeren Nekrosen aufgewiesen haben. Die niedrigsten Reisolierungsraten traten bei den *F. ornus* Pflanzen (30%). Dies weist auf eine höhere Resistenz von *F. ornus* gegenüber *C. fraxinea* hin.

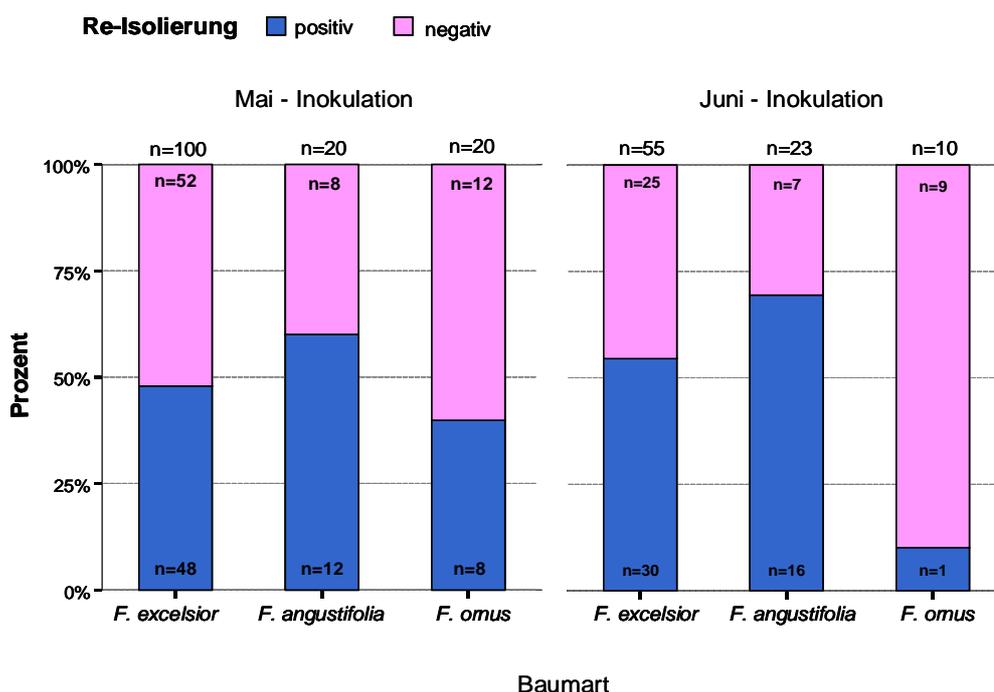


Abb. 42: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von *C. fraxinea* (n, %) aus inokulierten Pflanzen, getrennt nach Baumart und Inokulationstermin

Wie Abbildung 42 zeigt, wurden – unabhängig vom Zeitpunkt der Inokulation - die höchsten Reisolierungsraten mit 60% (Mai – Inokulation) bzw. 69,6% (Juni – Inokulation) aus Pflanzen der Art *F. angustifolia* erzielt. Aus Pflanzen von *F. excelsior* konnte der Erreger in 48% (Mai – Inokulation) bzw. 54,5% (Juni - Inokulation) aller Fälle reisoliert werden. Die

niedrigste Resolierungsrate wies *F. ornus* auf, wo *C. fraxinea* aus 40% (Mai – Inokulation) bzw. aus nur 10% aller inokulierten Pflanzen (Juni – Inokulation) erfolgreich reisoliert werden konnte.

Während sich beim Mai – Inokulationstermin hinsichtlich der Reisolierungsraten keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,439$; Pearson Chi – Square Test) zwischen den Baumarten ergaben, konnten für den Juni – Inokulationstermin statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,004$) zwischen den Baumarten nachgewiesen werden (Likelihood Ratio Test).

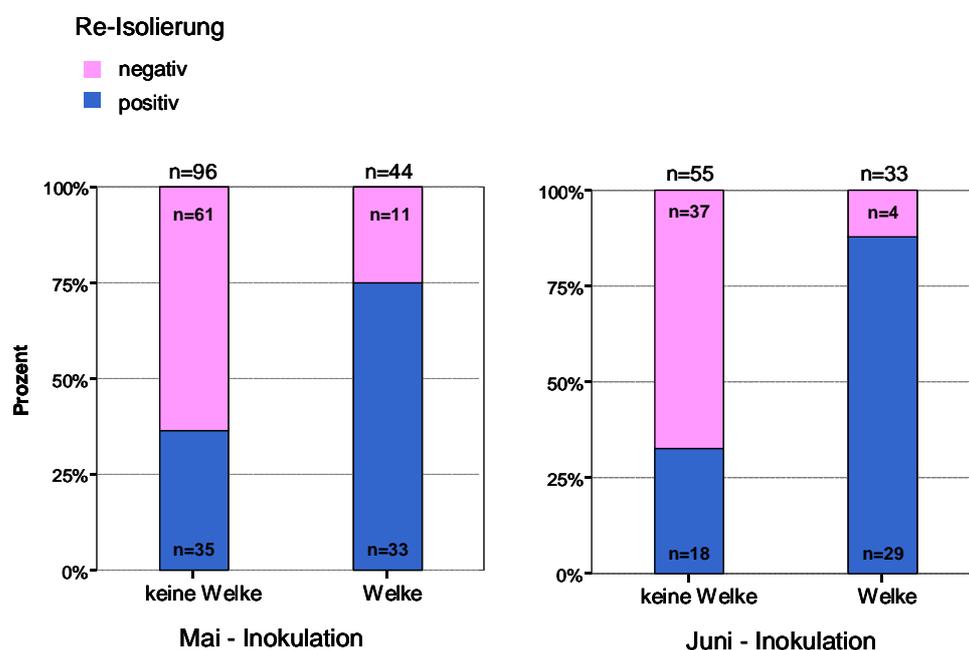


Abb. 43: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von *C. fraxinea* (n, %) in Abhängigkeit vom Entstehen von Welkesymptomen getrennt nach Inokulationsterminen

Die Ausprägung von Welkesymptomen hatte einen positiven Einfluss auf den Reisolierungserfolg (Abb. 43): Während *C. fraxinea* bei der Mai Inokulation aus 75% der gewelkten Pflanzen reisoliert werden konnte, betrug die Reisolierungsrate bei Pflanzen, die keine Welke aufwiesen, nur 36,5%. Bei der Juni – Inokulation gelang die Reisolierung des Erregers sogar von 87,9% der gewelkten Pflanzen, von Pflanzen ohne Welkesymptomen betrug die Reisolierungsrate hingegen nur 32,7%. Die deutlichen Unterschiede in der erfolgreichen Reisolierung des Erregers zwischen den welkenden und nichtwelkenden Pflanzen waren für beide Inokulationstermine auch statistisch höchst signifikant ($p = 0,000$; Pearson Chi – Square Test).

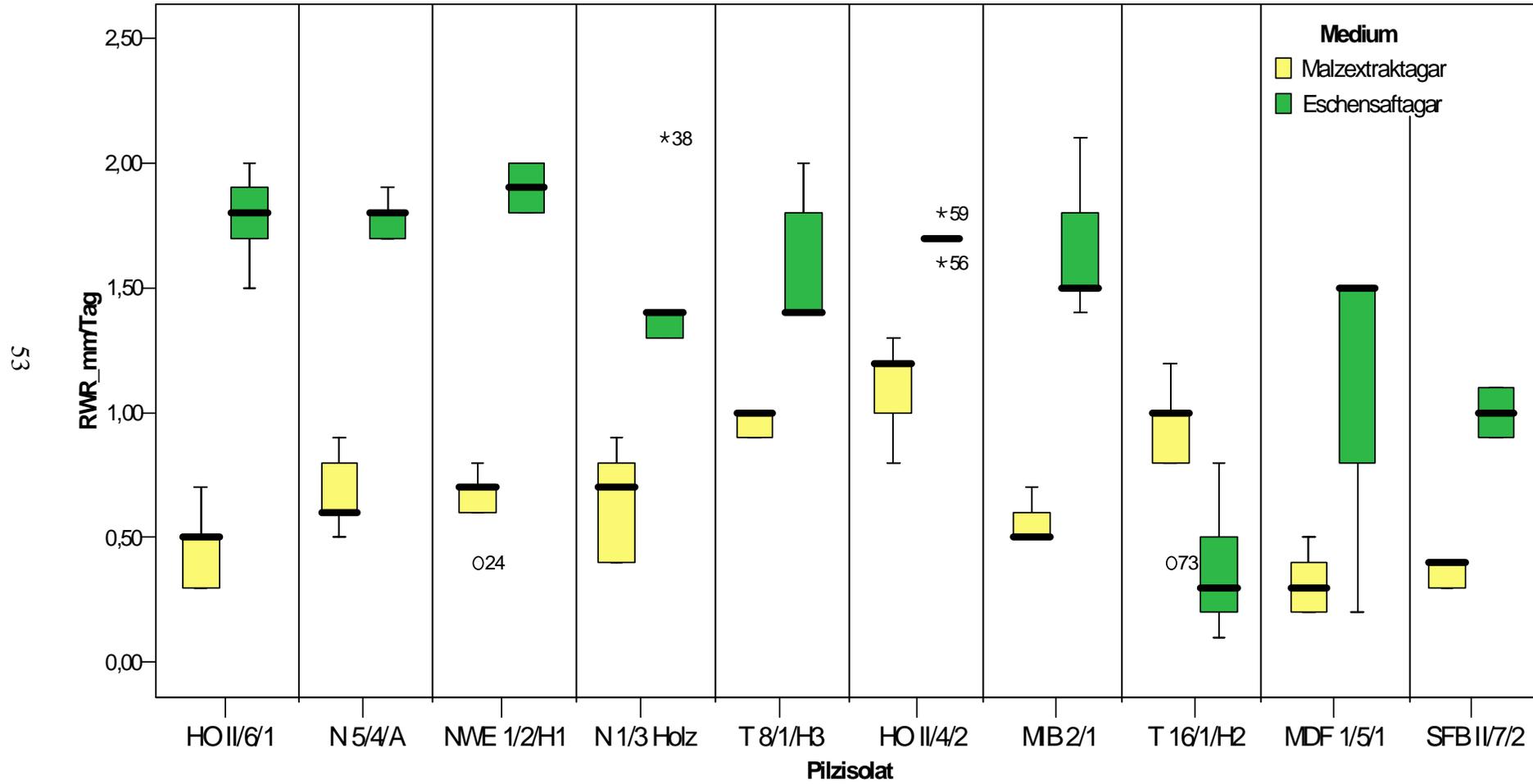
3.3 Ergebnisse des Wachstumstests

Die Ergebnisse des Wachstumstests von *C. fraxinea* auf Malzextraktagar und Eschensaftagar sind getrennt für die zehn untersuchten Isolate in Abbildung 44 dargestellt. Zur Charakterisierung der Wachstumsgeschwindigkeit der verwendeten Pilzisolat, wurden die radialen Wachstumsraten [RWR] ausgewertet.

Die gemessenen Werte auf Malzextraktagar reichten von 0,2 mm/Tag (MDF 1/5/1) bis 1,3 mm/Tag (HO II/4/2). Der Mittelwert über alle getesteten Isolate betrug 0,66 mm/Tag. Im Vergleich zum Malzextraktagar war die radiale Wachstumsrate der Isolate auf Eschensaftagar deutlich höher. Die gemessenen Werte reichten hier von 0,1 mm/Tag (T 16/1/H2) bis 2,1 mm/Tag (MIB 2/1 und N 1/3 Holz), die mittlere RWR über alle getesteten Isolate war auf Eschensaftagar mit 1,44 mm/Tag annähernd zweimal so hoch.

Mit Ausnahme des Isolats MDF 1/5/1 ($p = 0,069$) unterschieden sich die radialen Wachstumsraten auf Malzextrakt- und Eschensaftagar bei allen anderen Isolatn signifikant voneinander: T 8/1/H3 ($p = 0,007$), N 5/4/A, NWE 1/2/H1, N 1/3 Holz, HO II/4/2, SFB II/7/2 und MIB 2/1 ($p = 0,008$), HO II/6/1 ($p = 0,009$), T 16 /1/H2 ($p = 0,036$) (Kruskal – Wallis Test).

Abb. 44: Radiale Wachstumsraten (RWR) (mm/Tag) der Pilzisolat auf Eschensaft- und Malzextraktagar



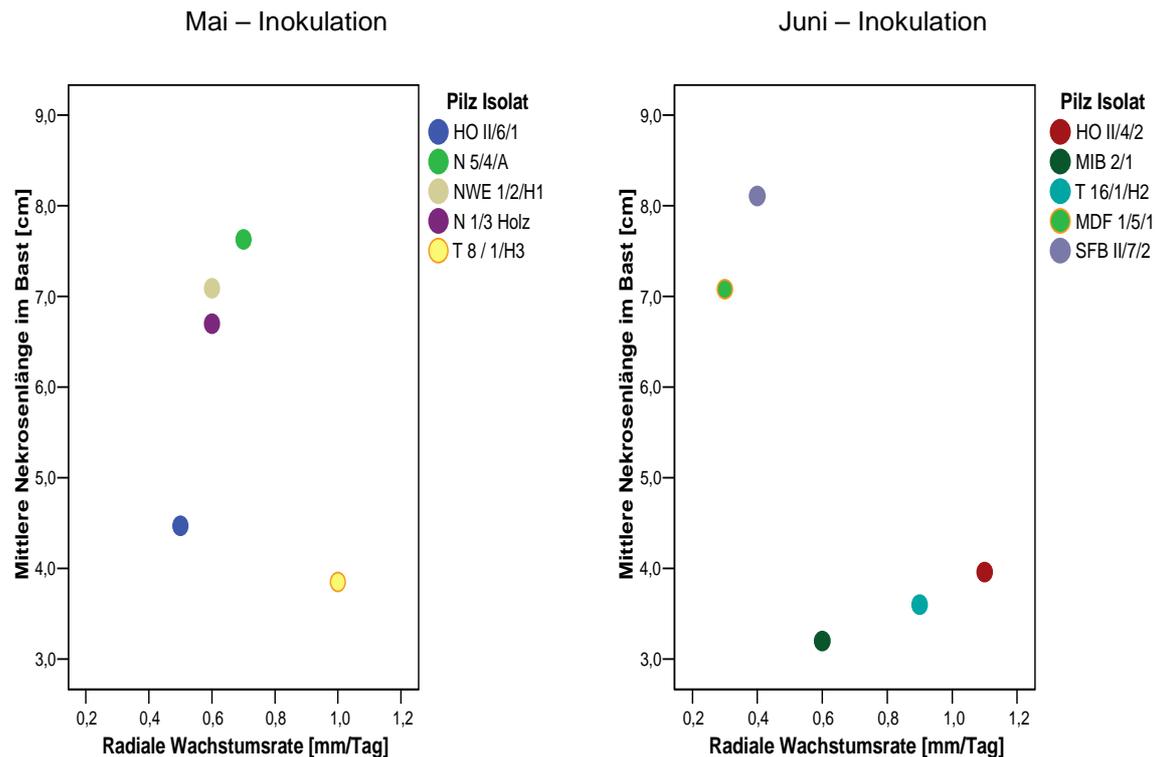


Abb. 45: Zusammenhang zwischen mittlerer Nekrosenlänge im Bast (cm) und der radialen Wachstumsrate (mm/Tag) auf Malzextraktagar für die an *Fraxinus excelsior* inokulierten Pilzisolat

Abbildung 45 zeigt den Zusammenhang zwischen der mittleren Nekrosenlänge im Bast und der radialen Wachstumsrate auf Malzextraktagar. Wie bei der Mai – Inokulation zu sehen ist, haben die Isolate, bei denen die radiale Wachstumsrate höher war, längere Nekrosen im Bast bei *F. excelsior* gebildet. Bei dem Pilzisolat T 8/1/H3, einem Ausreißer, wurde kein positiver Zusammenhang gefunden. Bei der Juni – Inokulation konnte ein positiver Zusammenhang bei den Isolaten MIB 2/1, T 16/1/H2 und HO II/4/2 gefunden werden.

Mittels Korrelationsanalyse konnten für die Isolate der Mai – Inokulation kein Zusammenhang zwischen der mittleren Nekrosenlänge im Bast und der radialen Wachstumsrate auf Malzextraktagar gefunden werden ($r = -0,051$). Bei der Juni – Inokulation konnte ein nur schwacher, negativer Zusammenhang festgestellt werden ($r = -0,500$).

4. Diskussion

4.1 Isolierungsergebnisse (Nachweis von *C. fraxinea* auf weiteren Standorten in Österreich)

4.1.1 Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit vom Standort und Nekrosetyp

Die Isolierungsrate aus Proben der untersuchten Standorte Nasswald, Neuwaldegg und Forstgarten betrug in der vorliegenden Untersuchung im Mittel 80,6 % und war somit etwas höher als jene Isolierungsrate (bis zu 70%), die KOWALSKI (2006) in Polen aus Trieben mit initialen Nekrosen erzielte. In Schweden wurde *C. fraxinea* aus 93% aller Proben mit Rindennekrosen bzw. Stammkrebsen isoliert (BAKYS et al. 2008), d.h. die Isolierungsrate war etwas höher als in der vorliegenden Untersuchung. LYGIS et al. konnten bereits 2005 vermutlich das Teleomorph des Pilzes (als *Hymenoscyphus* sp. 970) aus 3,8% aller Proben von absterbenden Eschen isolieren (damals war aber *C. fraxinea* noch nicht beschrieben und die Anamorph- Teleomorph Verbindung zwischen *C. fraxinea* und *Hymenoscyphus albidus* noch nicht bekannt!).

Die Isolierungsunterschiede zwischen den beprobten Standorten waren in der vorliegenden Untersuchung statistisch nicht signifikant. Auch in Schweden traten zwischen den beiden Untersuchungsstandorten Unterschiede auf (Örebro: 35-100% bzw. Gnesta 25-87%), die jedoch ebenfalls nicht sehr deutlich ausgeprägt waren (BAKYS et al. 2008).

Einen gewissen Einfluss auf die Isolierung des Erregers hatte jedoch die Ausprägung des Nekrosetyps, wobei sich gezeigt hat, dass auf beiden Untersuchungsstandorten aus diffusen (initialen) Nekrosen eine höhere Isolierungsrate erzielt wurde, als aus abgegrenzten Rindennekrosen. Dort versucht die Pflanze durch Überwallungsprozesse bereits, die Ausbreitung des Erregers im Gewebe zu begrenzen, was eine Erklärung für die jeweils niedrigere Isolierungsrate aus abgegrenzten Nekrosen sein könnte. Zudem wird *C. fraxinea* an älteren Nekrosen offenbar durch Folgepilze verdrängt. Im Mittel betrug die Isolierungsrate aus Proben mit abgegrenzten Nekrosen in der vorliegenden Untersuchung 69%. BAKYS et al. (2008) erzielten aus Stammkrebsen hingegen eine deutlich höhere Isolierungsrate von 93%. Eine Begründung für die vergleichsweise niedrigere Isolierungsrate könnte sein, dass in der vorliegenden Untersuchung größere Probenstücke verwendet wurden, und es dabei offenbar zu einer höheren Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Konkurrenzpilzen, die das Auswachsen von *C. fraxinea* behindern, kommt.

Chalara fraxinea konnte aus Proben aller Durchmesserklassen isoliert werden, wobei eine erfolgreiche Isolierung häufiger aus Proben mit dünnerem Durchmesser gelang (vgl. Abb. 22-23). Aus dickeren Zweigproben bzw. Stämmchen konnte der Erreger wesentlich weniger häufig isoliert werden. Ursache für diese Unterschiede dürften wiederum die unterschiedlich ausgeprägten Nekrosetypen sein, denn an dünnen, jungen Trieben kommt es überwiegend zur Bildung diffuser Nekrosen, da die Pflanze zu schwach ist, eine Überwallungszone zu bilden und der Pilz schneller das Gewebe besiedeln kann. An dickeren Trieben kommt es hingegen rascher zu einer Überwallungsreaktion und der Ausbildung von „abgegrenzten Rindennekrosen“.

4.2 Ergebnisse des Inokulationsversuches mit *C. fraxinea* an *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Inokulationsversuche bestätigten eindeutig die Pathogenität des Pilzes *C. fraxinea*. Es konnten an allen inokulierten Eschenarten (*F. excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus*) Symptome des Eschsterbens hervorgerufen werden. Bei den Kontrollpflanzen wurden hingegen an keiner der getesteten Eschenarten Nekrosen ausgebildet, auch die Inokulationswunden waren bei allen Kontrollpflanzen zum Versuchsende verheilt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von BAKYS et al. (2008), TALGØ et al. (2009) und KOWALSKI et al. (2009a) überein (Anm.: in all diesen Arbeiten wurde jedoch nur *F. excelsior* getestet).

4.2.1 Welkesymptome und Ausbildung von Rindennekrosen

Die ersten Welksymptome traten an den Pflanzen innerhalb von einem Monat auf. Die durch künstliche Inokulation hervorgerufenen Symptome waren für *F. excelsior* und *F. angustifolia* identisch mit jenen Symptomen wie sie in der Natur beobachtet werden können (vgl. SCHUHMACHER et al. 2007, THOMSEN et al. 2007, KOWALSKI & HOLDENRIEDER 2008, KIRISITS et al. 2008a, KIRISITS & CECH 2009a, 2009b, KIRISITS et al. 2009a). Das Auftreten von Welkesymptomen und die Ausbildung von Rindennekrosen an *F. excelsior* wurde auch in Inokulationsversuchen durch BAKYS et al. (2008, 2009), SZABO (2008), KOWALSKI et al. (2009a), OGRIS et al. (2009) und TALGØ et al. (2009) beschrieben. Beim Vergleich mit der Arbeit von BAKYS (2008) ist jedoch zu beachten, dass die Pflanzen beim schwedischen Inokulationsversuch vor dem Austrieb inokuliert und dann im Glasshaus weiter beobachtet wurden, wobei nach der Inokulation nur 20% der Pflanzen austrieben. Beim vorliegenden

Versuch waren die Pflanzen zum Zeitpunkt der Inokulation schon ausgetrieben und nach ca. drei Monaten traten an 30% der mit *C. fraxinea* inokulierten *F. excelsior* Pflanzen Welkesymptome auf.

Die Anzahl jener Versuchspflanzen, die Welkesymptome entwickelten, war bei allen drei getesteten Eschenarten beim Mai – Inokulationstermin jeweils höher als beim Juni – Inokulationstermin. Dies könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass die später inokulierten Pflanzen länger Zeit hatten, sich in den Töpfen zu etablieren und die Pflanzen dadurch zu einer verstärkten Abwehr fähig waren (Anm.: der Verpflanzungsschock war bei diesen Pflanzen sicher schon etwas mehr überwunden wie bei den im Mai inokulierten Pflanzen).

Jene Isolate, die an allen drei Eschenarten (HO II/6/1, HO II/4/2) bzw. an *F. excelsior* und *F. angustifolia* (MIB 2/1) getestet wurden, erzeugten an *F. angustifolia* deutlich stärkere Symptome als an der (den) jeweils anderen Eschenart(en). So wies *F. angustifolia* im Vergleich zu den anderen Baumarten mit 56% (n = 24) die höchste Anzahl an gewelkten Pflanzen auf. Dies könnte auf eine erhöhte Anfälligkeit von *F. angustifolia* gegenüber dem Erreger hindeuten (KIRISITS et al. 2009c).

Bei *F. ornus* wurde als einziger Baumart beim Juni – Inokulationstermin überhaupt kein Welken der Blätter beobachtet. Dies könnte auf eine geringere Anfälligkeit dieser Eschenart hinweisen (ENGESSER et al. 2009, KIRISITS et al. 2009b) und würde sich mit der Beobachtung decken, dass an der Blumenesche in der Natur bisher keine Symptome des Eschensterbens festgestellt wurden (KIRISITS et al. 2009a, 2009b). Um dies zu klären, sind aber noch weitere Inokulationsversuche und Symptom-Inventuren im Freiland notwendig.

4.2.2 Nekrosenlängen

Die an *F. excelsior* gemessenen minimalen und maximalen Nekrosenlängen variierten bei der Mai – Inokulation zwischen 1,5 und 28,7 cm, bei der Juni – Inokulation zwischen 1,5 und 21,5 cm und lagen somit in jenem Bereich (1,1 - 28,7 cm) der auch von BAKYS et al. (2008) beschrieben wird. Im Unterschied zum vorliegenden Versuch wurden die Nekrosenlängen bei BAKYS et al. (2008) jedoch schon sechs Wochen nach der Inokulation ermittelt und nur acht Isolate an 96 Versuchspflanzen getestet. Wie schon bei BAKYS et al. (2008) beschrieben, waren auch im vorliegenden Versuch zumindest bei einzelnen Versuchspflanzen die Nekrosen bei einigen Pilzisolaten zwei- bis dreimal so lang wie bei anderen. Dies kann als ein

Hinweis für die Existenz von individuellen Unterschieden hinsichtlich der Resistenz einzelner Bäume bzw. Versuchspflanzen gesehen werden und würde sich auch mit Beobachtungen aus Freilandinventuren und in Samenplantagen decken (OLRIK et al. 2007, KJÆR et al. 2009, KIRISITS et al. 2009b). Neben einer unterschiedlichen Resistenz der Wirtspflanzen können die unterschiedlichen Nekroselängen aber auch auf einer unterschiedlichen Virulenz der eingesetzten Pilzisolat beruhen. Zur eindeutigen Klärung dieser Frage müssten jedoch Inokulationsversuche an Klonen durchgeführt werden.

Die mittlere Nekrosenlänge (Bast) über alle Isolate war mit 5,7 cm etwas geringer wie der in BAKYS et al. (2008) angegebene Wert (7,2 cm). In Abhängigkeit vom verwendeten Isolat variierte die Nekrosenlänge im vorliegenden Versuch zwischen 3,2 und 8,1 cm. Bei BAKYS et al. (2008) lag die Variation zwischen 4,2 und 8,9 cm und umfasste somit einen ähnlichen Bereich. Auch hier wäre jedoch wiederum die unterschiedliche Versuchsdauer etc. (vgl. vorhergehender Absatz) zu berücksichtigen. Wie die Ergebnisse zudem zeigen, war – von einigen wenigen Ausnahmen abgesehen – die Länge der Holzverfärbung jeweils länger als die Nekrosenlänge im Bast, und diese wiederum immer größer als die äußere Nekrose. Das legt nahe, dass sich *C. fraxinea* im Holz offenbar rascher ausbreitet als im Bast.

Ein weiterer Vergleich der Nekrosenlängen bietet sich mit der Arbeit von OGRIS et al. (2009) an. Legt man die im vorliegenden Versuch ermittelte Nekrosenlänge auf 27 Tage um, liegt die mittlere Nekrosenlänge im Bast mit 1,7 cm in einem ähnlichen Bereich, wie sie in der Arbeit von OGRIS et al. (2009) beschrieben wird (Nekrose im Bastbereich nach 27 Tagen: 1,9 cm, Holzverfärbung: 2,5 cm). Trotz Umrechnung auf die unterschiedliche Versuchsdauer hinkt auch dieser Vergleich etwas, da in der Arbeit von OGRIS et al. (2009) keine Angaben zur Anzahl der inokulierten Pflanzen bzw. diesjährigen Triebe gemacht werden und nur ein Isolat für die Inokulation verwendet wurde. Der von OGRIS et al. (2009) angegebene Wert für die Holzverfärbung deckt sich mit der für das Isolat MDF/1/5/1 ermittelten Ausdehnung der Holzverfärbung (bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Versuchsdauer).

An *F. angustifolia* wurden nach gleicher Versuchsdauer an den inokulierten Versuchspflanzen Nekrosen bis zu einer Länge von 39 cm gebildet, was im Vergleich zu *F. excelsior* deutlich länger war. Auch die Nekrosenlänge im Mittel über alle Isolate war mit 7,2 cm um 1,5 cm länger als an *F. excelsior*. Vergleichswerte aus der Literatur liegen für *F. angustifolia* bisher nicht vor.

Die beiden an *F. ornus* verwendeten Pilzisolat bildeten an den Pflanzen signifikant unterschiedlich lange Nekrosen aus. In den meisten Fällen waren die Nekrosenlängen deutlich kleiner als bei *F. excelsior* und *F. angustifolia*. Ähnliche Beobachtungen liegen auch von ENGESSER (2009) nach ersten Infektionstests vor. *F. ornus* ist gegenüber *C. fraxinea* somit offenbar weniger anfällig als *F. excelsior* und *F. angustifolia*.

Die bereits anhand der Ergebnisse für die einzelnen Baumarten postulierte unterschiedliche Anfälligkeit der getesteten Eschenarten wird durch die Ergebnisse der Testung jener Pilzisolat bestätigt, die an *F. excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus* inokuliert wurden. Bei Verwendung dieser Pilzisolat an allen drei Baumarten traten bei *F. angustifolia* (Abb. 40) im Durchschnitt die längste Nekrosen auf. Auch zeigte sich *F. angustifolia* für *C. fraxinea* im Vergleich zu den anderen zwei Baumarten am anfälligsten.

4.2.3 Reisolierung

4.2.3.1 Interpretation der Reisolierungsergebnisse aus den einzelnen Eschenarten

Auch die Reisolierungsrate war bei *F. excelsior* in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Isolat unterschiedlich und reichte von 25 bis zu 73% wobei die Gesamt-Reisolierungsrate 50% betrug. Bei KOWALSKI et al. (2009a) konnte *C. fraxinea* bei Verwendung der gleichen Anzahl von Pilzisolaten aus 81% aller Versuchspflanzen reisoliert werden.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Reisolierungsraten könnten die unterschiedlich lange Versuchsdauer (im vorliegenden Fall nur bis zum Auftreten von ersten Welkesymptomen bzw. max. 3-4 Monate, bei Kowalski erfolgte die Aufarbeitung hingegen periodisch nach 2, 3 bzw. 12 Monaten) sowie Unterschiede hinsichtlich der Versuchspflanzen, der Länge der Inokulationswunde sowie der Inkubationsbedingungen der entnommen Probestücke sein. Im Gegensatz zur Arbeit von KOWALSKI et al. (2009a), der die auf Agarmedium gelegten Probenstücke bei Zimmertemperatur inkubierte, erfolgte die Inkubation der Probenstücke im Rahmen dieser Arbeit in einem Klimaschrank bei 7° C. Dabei könnte die langsam wachsende *C. fraxinea*, die in einigen Fällen nur ein sehr kleines Myzel bildete, bei längerer Inkubationsdauer durch andere Pilze überwachsen worden sein. Zudem wurden bei KOWALSKI et al. (2009a) die Inokulationen an Eschen aus Naturverjüngung bzw. an Pflanzen einer sechsjährigen Eschenkultur durchgeführt, wogegen die *F. excelsior* Pflanzen im vorliegenden Versuch einjährig und frisch getopft waren. Die Länge der

Inokulationswunde war im vorliegenden Versuch mit 2 – 2,2 cm zudem ca. viermal so lang wie bei KOWALSKI et al. (2009a).

In den Versuchen von BAKYS et al. (2008) schwankte die Reisolierungsrate zwischen 40 und 82% und war somit ebenfalls etwas höher als im vorliegenden Versuch. Das etwas niedrigere Reisolierungsergebnis könnte in vorliegender Arbeit möglicherweise auf die Verwendung von größeren Probenstücken für die Reisolierung zurückzuführen sein. Bei größeren Probenstücken, wie sie neben der vorliegenden Untersuchung u.a. auch von BAKYS et al. (2009) verwendet wurden, kommt es leichter zur Entwicklung von anderen, schneller wachsenden Pilzen, die das Auswachsen von *C. fraxinea* erschweren.

Vergleicht man die Ergebnisse der Reisolierung für die drei Abimpfungsstellen (oberes Ende der Nekrose, aus der Mitte bzw. unteres Ende der Nekrose), so zeigt sich, dass *C. fraxinea* sowohl bei *F. excelsior* als auch bei *F. angustifolia* am häufigsten aus dem unteren Ende der Nekrose reisoliert werden konnte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeit von ZASPEL & PHAM (2009) bei der die Verteilung von sekundären Metaboliten von *C. fraxinea* an inokulierten Eschenpflanzen untersucht wurde. Die höchste Konzentration an sekundären Metaboliten wurde dabei in der Nähe der Stammbasis, am Wurzelhals und in den primären Wurzeln gefunden. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich der Erreger von der Infektionsstelle besonders nach unten ausbreitet. Eine nähere Charakterisierung der sekundären Metabolite von *C. fraxinea* erfolgte in der Arbeit von ANDERSSON et al. (2009). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das von *C. fraxinea* isolierte Phytotoxin Viridiol zur Pathogenität dieses Pilzes beiträgt.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Eschenarten wurden bei *F. ornus* die höchsten Reisolierungsraten aus dem oberen Ende der Nekrose erzielt. Dies könnte auf die hohe Anzahl n = 11 (36%) an Proben aus dem unteren Ende der Nekrose zurückzuführen sein, die weder ein Wachstum von *C. fraxinea* noch von anderen Pilzen aufgewiesen. Die vergleichsweise höhere Reisolierung (40%) gelang bei *F. ornus* aus jenen Pflanzen, die mit dem Isolat HO II/6/1 inokuliert wurden, das auch die längeren Nekrosen gebildet hat.

4.2.3.2 Reisolierung in Abhängigkeit vom Welkenzustand der Pflanzen

Im Zuge der Reisolierungen hat sich gezeigt, dass der Welkezustand der Pflanzen einen signifikanten Einfluss auf den Reisolierungserfolg hat. *C. fraxinea* konnte wesentlich häufiger

(81%) von Pflanzen reisoliert werden, die bereits Welkesymptome zeigten, als von nicht gewelkten Pflanzen (35%). Das Welken der Pflanzen signalisiert, dass sich *C. fraxinea* im Gewebe bereits stark ausgebreitet hat wobei in vielen Fällen die Pflanzen im Bast bereits „geringelt“ waren. Diese fortgeschrittene Ausbreitung im Gewebe hat sicherlich zum höheren Isolierungserfolg aus gewelkten Pflanzen beigetragen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Koch'schen Postulate für *F. excelsior* und *F. angustifolia* mit insgesamt 53,5% positiver Reisolierung erfüllt wurden. Die höchsten Reisolierungsraten (65%) wurden bei *F. angustifolia* erzielt. Die Reisolierungsraten bei *F. excelsior* waren um 15% niedriger. *F. ornus* erwies sich hingegen gegenüber *C. fraxinea* als weniger anfällig.

4.3 Wachstumstest

Die getesteten *C. fraxinea*-Isolate zeigten bis auf eine Ausnahme (s.u.) auf Eschensaftagar eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit als auf Malzextraktagar. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Inhaltstoffe des Eschensaftagars das Wachstum des Pilzes positiv beeinflussen. *C. fraxinea* ist ein sehr langsam wachsender Pilz, was die Durchführung des Wachstumstests erschwerte. Jenes Isolat (T 16/1/H2), das als einziges eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit auf Eschensaftagar zeigte, hatte bei *F. excelsior* auch die kürzesten Nekrosen gebildet (d.h. es war durch eine besonders niedrige Virulenz gekennzeichnet) und mit 30% auch die zweitniedrigste Reisolierungsrate gezeigt.

Für einige Isolate wurde eine positive Korrelation zwischen der mittleren Nekrosenlänge und der radialen Wachstumsrate beobachtet. Andererseits gab es auch einige Isolate, die auf den Agarplatten ein relativ schnelles Wachstum aufwiesen, an den *F. excelsior* Pflanzen aber nur sehr kleine Nekrosen hervorriefen. Aber auch der umgekehrte Fall war vertreten. Diese unterschiedlichen Reaktionen können dadurch erklärt werden, dass die Nekrosenlänge nicht nur von der Virulenz der einzelnen Isolate sondern natürlich auch von der Resistenz und den spezifischen Abwehrreaktionen der jeweiligen Wirtspflanze abhängt.

5. Zusammenfassung

Das gegenwärtige Zurücksterben der Esche ist eine Krankheit, die durch windverbreitete Ascosporen des weißen Stengelbecherchens (*Hymenoscyphus albidus* – dem Teleomorph-Stadium von *Chalara fraxinea*) oder eines Pilzes, der von diesem morphologisch nicht unterscheidbar ist, hervorgerufen wird.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob die Koch'schen Postulate für den Erreger *Chalara fraxinea* für die zwei Eschenarten *F. excelsior* und *F. angustifolia* erfüllt werden. Die Pathogenität des Erregers wurde zusätzlich an *F. ornus* getestet. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Inokulationsversuchen an allen drei Eschenarten mittels verschiedenen *C. fraxinea* Isolaten angelegt.

Um den Erreger aus befallenem Gewebe zu isolieren, wurden drei unterschiedliche Standorte besucht und Proben von symptomatischen Eschen genommen und davon *C. fraxinea* isoliert. Diese gewonnenen Isolate wurden für die Inokulationsversuche verwendet. Zuletzt wurde ein Wachstumstest auf Malzextraktagar und Eschensaftagar durchgeführt, um zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen der Virulenz der Isolate und deren Wachstumsgeschwindigkeit auf den künstlichen Kulturmedien besteht.

Im Zuge der Arbeit konnten folgenden Fakten festgestellt werden:

1. *C. fraxinea* konnte aus erkrankten Bäumen aus dem Freiland leicht isoliert werden, vor allem aus der Übergangzone von gesundem und nekrotischem Gewebe.
2. Die Pathogenität des Pilzes wurde gegenüber allen getesteten Eschenarten (*F. excelsior*, *F. angustifolia* und *F. ornus*) bestätigt.
3. *C. fraxinea* konnte regelmäßig aus allen inokulierten Eschenarten reisoliert werden.
4. Die Koch'schen Postulate für *F. excelsior* und *F. angustifolia* wurden damit erfüllt. (Reisolierungsrate bei *F. excelsior*: 25-70 %, je nach Isolat).
5. Zwischen der Nekrosenlänge im Bast und der Wachstumsrate eines Isolats auf Malzextraktagar konnte kein klarer Zusammenhang gefunden werden.

Die Symptome des Eschensterbens konnten sowohl an jungen Pflanzen als auch an älteren Bäumen beobachtet werden. Bei den Inokulationsversuchen mit *C. fraxinea* sind an den Versuchspflanzen idente Symptome wie an den Eschen im Freiland aufgetreten. Die Versuche haben gezeigt, dass von den drei getesteten Eschenarten *F. angustifolia* am anfälligsten, und *F. ornus* offenbar am wenigsten anfällig ist.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche ermöglichten es, das Verhalten und die Virulenz des Pathogens *C. fraxinea* an den getesteten Eschenarten detailliert zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- ADLER W, OSWALD K, FISCHER R, 1994. Exkursionsflora von Österreich [Excursion flora of Austria]. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, Wien, 1180 pp.
- ANDERSSON PF, JOHANSSON SBK, STENLID J, BROBERG A, 2009. Isolation, identification and necrotic activity of viridiol from *Chalara fraxinea*, the fungus responsible for dieback of ash. *Forest Pathology*, in press. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2009.00605.x.
- BAKYS R, VASAITIS R, BARKLUND P, THOMSEN IM, STENLID J, 2009. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *European Journal of Forest Research* **128**, 51-60.
- BAKYS R, VASAITIS R, BARKLUND P, IHRMARK K, STENLID J, 2008. Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* **58**, 284-292.
- CECH TL, 2006. Eschenschäden in Österreich [Ash dieback and premature leaf shedding in Austria]. *Forstschutz Aktuell* **37**, 18-20. http://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_37_8.pdf
- CECH TL, 2008. Eschenkrankheit in Niederösterreich – neue Untersuchungsergebnisse [Dieback of ash in Lower Austria – new results]. *Forstschutz Aktuell* **43**, 24-28. http://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_43_9.pdf
- CECH TL, HOYER-TOMICZEK U, 2007. Aktuelle Situation des Zurücksterbens der Esche in Österreich [Actual situation of dieback of ash in Austria]. *Forstschutz Aktuell* **40**, 8-10. http://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_40_3.pdf
- CHANDELIER A, ANDRE F, LAURENT F, 2009. Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real time PCR. *Forest Pathology*, in press. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2009.00610.x.
- ENGESSER R, QUELOZ V, MEIER F, KOWALSKI T, HOLDENRIEDER O, 2009. Das Triebsterben der Esche in der Schweiz [Ash dieback in Switzerland]. *Wald und Holz* **6/2009**, 24-27.

- HALMSCHLAGER E, KIRISITS T, 2008. First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathology* **57**, 1177 & *New Disease Reports*.
- <http://www.bspp.org.uk/ndr/july2008/2008-25.asp>, **Volume 17**
- IOOS R, KOWALSKI T, HUSSON C, HOLDENRIEDER O, 2009. Rapid *in planta* detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. *European Journal of Plant Pathology*, in press. DOI: 10.1007/s10658-009-9471-x.
- JANKOVSKÝ L, PALOVČÍKOVÁ, DVOŘÁK M, 2008. Alien diseases of woody plants in the Czech Republic. In: Steyrer G, Tomiczek C, Lackner C (Eds.), Proceedings of the Second Meeting of Forest Protection and Forest Phytosanitary Specialists, 27-28 November 2007, Vienna, Austria. *Forstschutz Aktuell* **44**, 32-34. http://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_44_14.pdf
- KIRISITS T, 2008. Eschenpathogen *Chalara fraxinea* nun auch in Kärnten nachgewiesen [First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* from Carinthia]. *Forstschutz Aktuell* **45**, 28-30. http://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_45_12.pdf
- KIRISITS T, HALMSCHLAGER E, 2008. Eschenpilz nachgewiesen [Ash fungus detected]. *Forstzeitung* **119 (02-2008)**, 32-33. https://www.dafne.at/prod/dafne_plus_common/attachment_download/efd9e0d1ee75f887d883b3c6e597ba03/Kirisits%20&%20Halmschlager%20Chalara%20fraxinea_FZ_119_02-2008.pdf
- KIRISITS T, CECH TL, 2009a. Eschentriebsterben: Ursache, Symptome, Empfehlungen [Ash dieback: cause, symptoms, recommendations]. *Kärntner Forstverein Information* **59/Juni 2009**, 17-19. http://www.verwaltung.ktn.gv.at/161547_DE-
- KIRISITS T, CECH TL, 2009b. Eschentriebsterben erkennen. *Forstzeitung* **120 (05-2009)**, 30-31; ISSN 1012-4667.
- KIRISITS T, MATLAKOVA M, MOTTINGER-KROUPA S, HALMSCHLAGER E, 2008a. Verursacht *Chalara fraxinea* das Zurücksterben der Esche in Österreich? [Is *Chalara fraxinea* the causal agent of ash dieback in Austria?]. *Forstschutz Aktuell* **43**, 29-34. http://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_43_10.pdf
- KIRISITS T, MATLAKOVA M, MOTTINGER-KROUPA S, HALMSCHLAGER E, 2008b. Involvement of *Chalara fraxinea* in ash dieback in Austria. In: Steyrer G, Tomiczek C, Lackner C (Eds.), Proceedings of the Second Meeting of Forest Protection and Forest

- Phytopathological Specialists, 27-28 November 2007, Vienna, Austria. *Forstschutz Aktuell* **44**, 16-18. http://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_44_7.pdf
- KIRISITS T, MATLAKOVA M, MOTTINGER-KROUPA S, HALMSCHLAGER E, 2009a. Pilz verursacht Eschentriebsterben. *Forstzeitung*, 120 (04-2009), 8-9; ISSN 1012-4667.
- KIRISITS T, MATLAKOVA M, MOTTINGER-KROUPA S, CECH T, HALMSCHLAGER E, 2009b. The Current Situation of Ash Dieback Caused by *Chalara fraxinea* in Austria. *Faculty of Forestry Journal, Special Issue, Serial: A*, page: 97-119, ISSN: 1302- 7085. Proceedings of the Conference of IUFRO Working Party 7.02.02. Eğirdir, Turkey, 11-16 May. http://iufro.sdu.edu.tr/iufro_journal.pdf
- KIRISITS T, MATLAKOVA M, MOTTINGER-KROUPA S, HALMSCHLAGER E, LAKATOS F, 2009c. *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). *Plant Pathology* **58**, in press & *New Disease Reports*. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02162.x. <http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=019043>, **Volume 19**.
- KJÆR ED, NIELSEN LR, THOMSEN IM, SKOVSGAARD JP, 2009. Forskning om asketoptørre [Research on ash dieback]. *Skoven* **02/2009**, 92-94.
- KOWALSKI T, 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* **36**, 254-270.
- KOWALSKI T, HOLDENRIEDER O, 2008. Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa [A new fungal disease of ash in Europe]. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen* **159**, 45-50.
- KOWALSKI T, HOLDENRIEDER O, 2009a. Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology* **39**, 1-7.
- KOWALSKI T, HOLDENRIEDER O, 2009b. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology*, in press. Doi: 10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x.
- NEUMÜLLER A, 1994. Beteiligung von Pilzen am Zweig- und Aststerben der Fichte im Revier Sonnenwald (Böhmerwald). Forstliche Schriftenreihe, Universität für Bodenkultur Wien, Bd. 7, ÖGWEB (Österr. Ges. f. Waldökosystemforschung und experimentelle Baumforschung) ISBN 3-900865-06-x.

- OGRIS N, HAUPTMANN T, JURC D, 2009. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. *Plant Pathology* **58**, in press & *New Disease Reports* <http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=019015>, **Volume 19**.
- OLRIK DC, KJÆR ED, DITLEVSEN B, 2007. Klonforskelle i angreb af asketoptørre [Clones differ in the infestation by ash dieback]. *Skoven* **11/2007**, 522-525.
- RACK K, BUTIN H, 1948. Experimenteller Nachweis nadelbewohnender Pilze bei Koniferen. *Eur. J. Forest Pathology* **14**, 302-310.
- LYGIS V, VASILIAUSKAS R, LARSSON KH, STENLID J, 2005. Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **20**, 337-346.
- PRZYBYŁ K, 2002. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology* **32**, 387-392.
- PUKACKI PM, PRZYBYŁ K, 2005. Frost injury as a possible inciting factor in bud and shoot necroses of *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Phytopathology* **153**, 512-516.
- SCHUMACHER J, WULF A, LEONHARD S, 2007. Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eschen [First record of *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Germany – a new agent of ash decline]. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **59**, 121-123.
- SKOVGAARD JP, THOMSEN IM, SKOVGAARD IM, MARTINUSSEN T, 2009. Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Forest Pathology*, in press. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2009.00599.x.
- SZABÓ I, 2008. First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. *Plant Pathology* **58**, in press & *New Disease Reports* <http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=018030>, **Volume 18**.
- TALGØ V, SLETTEN A, BRURBERG MB, SOLHEIM H, STENSVAND A, 2009. *Chalara fraxinea* isolated from diseased ash in Norway. *Plant Disease* **93**, 548.

- THOMSEN IM, SKOVSGAARD JP, BARKLUND P, VASAITIS R, 2007. Svampesygdom er årsag til toptørre i ask [A fungal disease is the cause of ash dieback]. *Skoven* **05/2007**, 234-236.
- THOMSEN IM, SKOVSGAARD JP, KJÆR ED, NIELSEN LR, 2009. Status for asketopptørre i Danmark og Europa [The status of ash dieback in Denmark and Europe]. *Skoven* **02/2009**, 87-91.
- ZASPEL I, PHAM TLH, 2009. Studies on *Chalara fraxinea* infection process of ash. In: Dogmus Lehtijärvi, T. H. (Ed.), International Union of Forest Research Organizations, Working Party 07.02.02., Foliage, shoot and stem diseases of forest trees, Meeting in Eğirdir, Isparta – Turkey, May 11-16, 2009.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Natürliche Verjüngungsfläche im Nasswald mit spärlicher Belaubung	4
Abb. 2: Scharf vom Bast abgegrenzte Rindennekrose im Ansatzbereich von einem Seitentrieb	4
Abb. 3: Kolonien von <i>C. fraxinea</i> auf Malzextraktagar mit weißlich-braunem Myzel und dunklen sklerotischen Bereichen.....	5
Abb. 4: Flaschenförmige Phialiden und Konidien von <i>C. fraxinea</i> : 100-fache Vergrößerung im Durchlichtmikroskop (re), Pfeil: erste Konidie sowie REM Aufnahme (li). Fotos: Halmschlager, Mottinger-Kroupa	6
Abb. 5: Apothezien des Weißen Stengelbecherchens (<i>Hymenoscyphus albidus</i>), an im Vorjahr abgefallenen Blattspindeln. Foto: Kirisits	6
Abb. 6: Welkender zweijähriger Sämling im Forstgarten.....	9
Abb. 7: Charakteristische Welke der Blätter an dreijährigen Pflanzen im Forstgarten	9
Abb. 8: Diffuse Rindennekrose Abb. 9: Abgegrenzte Rindennekrose.....	11
Abb. 10: Arbeitsablauf zur Oberflächensterilisation (aus: NEUMÜLLER 1994 nach RACK & BUTIN 1984, verändert).....	12
Abb. 11: <i>F. excelsior</i> Versuchspflanzen	14
Abb. 12: <i>F. angustifolia</i> Versuchspflanzen.....	14
Abb. 13: Randomisierte Pflanzen mit den zugeordneten Pilzisolaten	18
Abb. 14: Verlauf der Inokulation: Anfertigung des Schnitts am Stämmchen, Einsetzen des Inokulums, Umwicklung der Wunde mit Parafilm	19
Abb. 15: Welke – Symptome an den Versuchspflanzen.....	20
Abb. 16: Durch Inokulation mit <i>C. fraxinea</i> entstandene Rindennekrose: äußerlich sichtbare Nekrose an der Rinde (A), Nekrose im Bast (B) und Holzverfärbung (C).....	21
Abb. 17: Reisolierungen aus den Versuchspflanzen: A: <i>Fraxinus excelsior</i> - <i>Chalara fraxinea</i> (re) und andere Pilzkultur (li). B: <i>F. excelsior</i> – <i>C. fraxinea</i> (li) und andere Pilzkultur (re). C: <i>F. angustifolia</i> - Reinkulturen von <i>C. fraxinea</i> , (re & li). D: <i>F. ornus</i> - Reinkultur von <i>C. fraxinea</i>	22
Abb. 18: Überblick über die Pilzisolate, die für die Inokulation und den Wachstumstest verwendet wurden	24
Abb. 19: Isolierungsraten (% , n) von <i>C. fraxinea</i> aus den Freilandproben, getrennt nach Untersuchungsstandorten	26
Abb. 20: Anzahl der Freilandproben (n, %) aus den Standorten Neuwaldegg und Nasswald getrennt nach Nekrosetypen	27
Abb. 21: Isolierungsraten (% , n) von <i>C. fraxinea</i> an den Untersuchungsstandorten Neuwaldegg und Nasswald, getrennt nach Nekrosetypen	28

Abb. 22: Anzahl der Proben vom Standort Neuwaldegg getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm) und Ausprägung der Rindennekrose.	30
Abb. 23: Anzahl der Proben vom Standort Nasswald getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm) und Ausprägung der Rindennekrose	30
Abb. 24: Isolierungsraten (% , n) von <i>C. fraxinea</i> aus Proben des Standorts Neuwaldegg getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm).....	31
Abb. 25: Isolierungsraten (% , n) von <i>C. fraxinea</i> aus Proben des Standorts Nasswald getrennt nach Durchmesserklassen (Durchmesserklasse 1: 5 – 7,9 mm, 2: 8 – 10,9 mm, 3: 11 – 13,9 mm, 4: 14 – 29 mm).....	32
Abb. 26: <i>Fraxinus excelsior</i> : Kumulative Darstellung der welkenden Pflanzen (n, %) in Abhängigkeit von der Anzahl von Tagen nach der Inokulation	35
Abb. 27: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von <i>Fraxinus excelsior</i> in Abhängigkeit von den verwendeten Isolaten (HO II/6/1, N 5/4/A, NWE 1/2/H1, N 1/3 Holz und T 8/1/H3; Mai – Inokulationstermin) und (HO II/4/2, MIB 2/1, T 16/1/H2, MDF 1/5/1 und SFB II/7/2; Juni – Inokulationstermin)	36
Abb. 28: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von <i>C. fraxinea</i> (n, %) aus den inokulierten <i>Fraxinus excelsior</i> Pflanzen, getrennt nach Pilzisolaten und Inokulationstermin	37
Abb. 29: Auftreten von <i>C. fraxinea</i> und anderen Pilzen (% , n) im Zuge der Reisolierung von <i>Fraxinus excelsior</i> in Abhängigkeit von der gewählten Abimpfungsstelle (unteres Ende, aus der Mitte bzw. oberes Ende der Nekrose; gepoolte Daten des Mai- und Juni – Inokulationstermins).....	38
Abb. 30: <i>Fraxinus angustifolia</i> : Kumulative Darstellung der welkenden Pflanzen (n, %) in Abhängigkeit von der Anzahl von Tagen nach der Inokulation	39
Abb. 31: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von <i>Fraxinus angustifolia</i> in Abhängigkeit von den verwendeten Isolaten HO II/6/1 (Mai – Inokulation) und HO II/4/2 und MIB 2/1 (Juni – Inokulationstermin)	40
Abb. 32: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von <i>C. fraxinea</i> (n, %) aus den inokulierten <i>Fraxinus angustifolia</i> Pflanzen, getrennt nach den Pilzisolaten HO II/6/1 (Mai – Inokulationstermin) und HO II/4/2 und MIB 2/1 (Juni – Inokulationstermin)	41
Abb. 33: Auftreten von <i>C. fraxinea</i> und anderen Pilzen (% , n) im Zuge der Reisolierung von <i>Fraxinus angustifolia</i> in Abhängigkeit von der gewählten Abimpfungsstelle (unteres Ende, aus der Mitte bzw. oberes Ende der Nekrose; gepoolte Daten des Mai- und Juni – Inokulationstermins).....	42
Abb. 34: <i>Fraxinus ornus</i> (Mai – Inokulation): Kumulative Darstellung der welkenden Pflanzen (n, %) in Abhängigkeit von der Anzahl von Tagen nach der Inokulation (Anm.: bei der Inokulation im Juni kam es zu keinen Welkeerscheinungen an den inokulierten Versuchspflanzen!).....	43
Abb. 35: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von <i>Fraxinus ornus</i> bei Verwendung der Isolate HO II/6/1 (Mai – Inokulationstermin) und HO II/4/2 (Juni – Inokulationstermin).....	44

Abb. 36: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von <i>C. fraxinea</i> (n, %) aus den inokulierten <i>Fraxinus ornus</i> Pflanzen, getrennt nach Pilzisolaten und Inokulationsterminen.....	44
Abb. 37: Auftreten von <i>C. fraxinea</i> und anderen Pilzen (% , n) im Zuge der Reisolierung von <i>Fraxinus ornus</i> in Abhängigkeit von der gewählten Abimpfungsstelle (unteres Ende, aus der Mitte bzw. oberes Ende der Nekrose; gepoolte Daten des Mai- und Juni – Inokulationstermins).....	45
Abb. 38: Auftreten von Welkesymptomen (% , n) an Versuchspflanzen von <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>F. angustifolia</i> und <i>F. ornus</i> nach Inokulation mit dem Isolat HO II/6/1 (Mai – Inokulation) und dem Isolat HO II/4/2 (Juni – Inokulation).....	46
Abb. 39: Auftreten von Welkesymptomen (% , n) an Versuchspflanzen von <i>Fraxinus excelsior</i> und <i>F. angustifolia</i> nach Inokulation mit dem Isolat MIB 2/1 (Juni – Inokulation).....	47
Abb. 40: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>F. angustifolia</i> und <i>F. ornus</i> bei Verwendung des Isolates HO II/6/1 (Mai – Inokulationstermin) und Isolates HO II/4/2 (Juni – Inokulationstermin)	48
Abb. 41: Länge der äußeren Nekrose (Rinde), der Nekrose im Bast und der Holzverfärbung (in cm) an Pflanzen von <i>Fraxinus angustifolia</i> und <i>F. excelsior</i> bei Verwendung des Isolates MIB 2/1 (Juni – Inokulationstermin)	49
Abb. 42: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von <i>C. fraxinea</i> (n, %) aus inokulierten Pflanzen, getrennt nach Baumart und Inokulationstermin.....	50
Abb. 43: Anzahl der positiven und negativen Reisolierungen von <i>C. fraxinea</i> (n, %) in Abhängigkeit vom Entstehen von Welkesymptomen getrennt nach Inokulationsterminen	51
Abb. 44: Radiale Wachstumsraten (RWR) (mm/Tag) der Pilzisolat auf Eschensaft- und Malzextraktagar.....	53
Abb. 45: Zusammenhang zwischen mittlerer Nekrosenlänge im Bast (cm) und der radialen Wachstumsrate (mm/Tag) auf Malzextraktagar für die an <i>Fraxinus excelsior</i> inokulierten Pilzisolat	54

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verlauf des Eschentriebsterbens in Europa	2
Tab. 2: Untersuchungsstandorte mit Koordinaten und der Beschreibung der Proben	8
Tab. 3: Anzahl der beprobten Bäume je Standort	10
Tab. 4: Durchmesserklassen der Probenstücke	11
Tab. 5: Überblickstabelle über die mit <i>Chalara fraxinea</i> inokulierten Versuchspflanzen (N = Anzahl der Pflanzen)	15
Tab. 6: Versuchsdesign – Inokulationsversuche	16
Tab. 7: Bezeichnung, CBS Nummern und Herkunft der bei der Inokulation verwendeten Isolate von <i>C. fraxinea</i>	17
Tab. 8: Überblick über die in Abhängigkeit vom jeweiligen Pilzisolat verwendeten Farben zur Markierung der verwendeten Eschenpflanzen beim ersten und zweiten Inokulationstermin	19
Tab. 9: Durchmesser der gesammelten Proben aus Neuwaldegg und Nasswald.....	29
Tab. 10: Ergebnisse des Inokulationsversuches: Anzahl der Pflanzen mit Welkesymptomen, Nekrosenlängen und Reisolierungsraten getrennt nach Inokulationsterminen (Mai bzw. Juni) und Pilz-Isolaten.....	34

ANHANG

Malzextraktagar 2%ig:

20 g Malzextrakt (getrocknet und pulverisiert), 16 g Agar-Agar, 1000 ml Leitungswasser, 100 mg/l Streptomycinsulfat. Malzextrakt und Agar-Agar wurden mit Wasser in einer Glasflasche vermischt und 20 min bei 121° C im Autoklaven sterilisiert. Nach dem Abkühlen des Agarmediums auf ca. 50° C wurde in Wasser gelöstes Streptomycinsulfat, mittels 20 ml Spritze über Sterilfilter zugegeben und das Medium am Magnetrührer gut durchgemischt. Folglich wurde Agarmedium, möglichst rasch in Petrischalen ausgegossen.

Eschensaft-Agar:

500ml Eschensaft, 10g Malzextrakt, 16g Agar-Agar, 500ml Leitungswasser. Bei der Zubereitung wurde die Hälfte des benötigten Wassers durch Eschensaft ersetzt. Dieser wurde wie nachfolgend beschrieben zubereitet.

Eschensaft: Eschenblätter wurden im Dampfdruckkochtopf 15 min gekocht, anschließend mit soviel Leitungswasser in der Küchenmaschine zerhackt, sodass ein dünnflüssiger Brei entstand, der durch ein feinmaschiges Sieb gefiltert wurde. Der so gewonnene Extrakt wurde danach autoklaviert.

INHALTVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Literaturüberblick zum neuartigen Eschensterben und Auftreten von <i>C. fraxinea</i> in Europa	2
1.1.1	Chronologie des Eschensterbens in Europa	2
1.1.2	Erstnachweis und weiteres Auftreten von <i>C. fraxinea</i> in Europa	3
1.2	Symptome des Eschentriebsterbens	3
1.3	Beschreibung des Erregers (<i>Hymenoscyphus albidus</i> , Anamorph: <i>Chalara fraxinea</i>)	5
2.	Material und Methoden	8
2.1	Nachweis von <i>C. fraxinea</i> an symptomatischen Eschen	8
2.1.1	Untersuchungsstandorte und Symptomatik der beprobten Eschen	8
2.1.2	Probennahme	10
2.1.3	Pilzisolierung und –identifizierung	11
2.1.4	Datenauswertung	12
2.2	Inokulationsversuche	13
2.2.1	Versuchspflanzen	13
2.2.2	Inokulation der Versuchspflanzen	16
2.2.3	Kontrolle und Aufarbeitung der Versuchspflanzen	20
2.2.4	Reisolierung des Erregers	21
2.2.5	Datenauswertung	22
2.3	Wachstumstests	23
2.3.1	Durchführung des Tests	24
2.3.2	Datenauswertung	25
2.4	Statistik und Analysen	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	Isolierungsergebnisse (Nachweis von <i>C. fraxinea</i> auf weiteren Standorten in Österreich)	26
3.1.1	Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit vom Standort	26
3.1.2	Isolierungsergebnisse getrennt nach Nekrosetypen	26
3.1.3	Auftreten von Nekrosetypen und Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit von der Durchmesserklasse der Probe	29
3.2	Ergebnisse des Inokulationsversuches mit <i>C. fraxinea</i> an <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>F. angustifolia</i> und <i>F. ornus</i>	32
3.2.1	<i>Fraxinus excelsior</i>	32
3.2.2	<i>Fraxinus angustifolia</i>	39
3.2.3	<i>Fraxinus ornus</i>	43
3.2.4	Vergleich jener Isolate, die an mehreren Eschenarten getestet wurden	46
3.2.5	Reisolierungsraten in Abhängigkeit von den untersuchten Eschenarten	50
3.3	Ergebnisse des Wachstumstests	52
4.	Diskussion	55
4.1	Isolierungsergebnisse (Nachweis von <i>C. fraxinea</i> auf weiteren Standorten in Österreich)	55
4.1.1	Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit vom Standort und Nekrosetyp	55

4.2	Ergebnisse des Inokulationsversuches mit <i>C. fraxinea</i> an <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>F. angustifolia</i> und <i>F. ornus</i>	56
4.2.1	Welkesymptome und Ausbildung von Rindennekrosen	56
4.2.2	Nekrosenlängen	57
4.2.3	Reisolierung	59
4.3	Wachstumstest	61
5.	Zusammenfassung	62
6.	Literaturverzeichnis	64
7.	Abbildungsverzeichnis	69
8.	Tabellenverzeichnis	72
	ANHANG	73