

Schlussbericht zum Projekt

**Ein neuer Ansatz zum Management des Eschentriebsterbens: Anlage einer
Versuchspflanzung mit asiatischen Fraxinus-Arten**

Projektnr. 2013.01

O. Holdenrieder
Professur Forstschutz & Dendrologie,
Institut für Integrative Biologie, ETH Zürich
Universitätsstr. 16, 8092 Zürich
ottmar.holdenrieder@usys.ethz.ch

Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung, Bundesamt für Umwelt BAFU

Laufzeit des Projektes: Juni 2013 - Dezember 2015

Zusammenfassung

Die Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior*) in Europa ist vom Eschentriebsterben betroffen, einer letalen Krankheit, die durch den aus Ostasien eingeschleppten Pilz *Hymenoscyphus fraxineus* verursacht wird. Asiatische Eschen sind jedoch gegen dieses Pathogen resistent bzw. tolerant. Diese Eigenschaft könnte durch Einkreuzung auf die europäische Esche übertragen werden oder asiatische Eschen könnten als Ersatzbaumarten dienen. Um die Beobachtung des ökologischen Verhaltens solcher Arten zu ermöglichen, wurden im Schweizerischen National- Arboretum Aubonne zwei Versuchspflanzungen mit japanischen Herkünften von *F. mandshurica* und *F. platypoda* angelegt. Diese ergänzen einen bereits vorhandenen Bestand von *F. chinensis* ssp. *rhynchohylla*. Diese Art und *F. platypoda* blieben während der Beobachtungsperiode (2014 - 2015) vollständig befallsfrei. Bei der Mandshurischen Esche traten bei 4% der jungen Pflanzen Triebnekrosen auf, aus denen jedoch nur in Einzelfällen *H. fraxineus* isoliert werden konnte. Die Mehrzahl der abgestorbenen Triebe war durch *Phomopsis* spp. (*Diaporthe* spp.) besiedelt. Die Blätter waren hingegen regelmässig mit *H. fraxineus* infiziert und gegen Ende der Vegetationsperiode entwickelten sich zahlreiche Blattnekrosen. Bei zwei älteren Bäumen von *F. mandshurica* wurden keine Infektionen festgestellt. Nach Wundinokulation der Haupttriebe von *F. mandshurica*-Sämlingen entwickelten sich jedoch stets Nekrosen. Ein Vergleich der endophytischen Pilze in Blättern von *F. mandshurica* und *F. excelsior* ergab keine signifikanten Unterschiede. Beobachtungen an älteren Einzelbäumen diverser Eschenarten im Arboretum bestätigten die hohe Resistenz der Sektion Melioides (*F. americana*, *F. latifolia*, *F. pennsylvanica*). Auch einzelne Sorten bzw. Genotypen von *F. angustifolia* und *F. excelsior* blieben bisher symptomfrei. *Fraxinus pauciflora*, *F. velutina* und *F. xanthoxyloides* wurden als neue Wirtsarten für *H. fraxineus* festgestellt. Auf den Fruchtblügeln von *F. xanthoxyloides* wurden Apothezien beobachtet. Dies zeigt, dass das Pathogen auch mit Eschensamen verbreitet werden kann. Die hier präsentierten Befunde belegen die Bedeutung von Freilandbeobachtungen in Arboreten für die Entwicklung von Managementstrategien für das Eschentriebsterben.

Une nouvelle approche pour la gestion de la chalarose du frêne : mise en place d'une plantation expérimentale d'espèces asiatiques du genre *Fraxinus*.

En Europe, le frêne commun (*Fraxinus excelsior*) est menacé par la chalarose, une maladie mortelle causée par *Hymenoscyphus fraxineus*, un champignon originaire d'Asie. Les frênes asiatiques sont toutefois résistants (respectivement tolérants) à ce pathogène. Cette propriété pourrait être transférée par croisement au frêne commun ou alors, les frênes asiatiques pourraient servir d'espèces de remplacement. Afin de pouvoir observer le comportement écologique de ces nouvelles espèces, deux plantations de frênes d'origine japonaise (*F. mandshurica* et *F. platypoda*) ont été mises en place à l'Arboretum National du Vallon de l'Aubonne. Ces plantations complètent un peuplement présent de *F. chinensis* spp. *rhynchophylla*. Cette dernière espèce ainsi que *F. platypoda* se sont avérées parfaitement immunes par rapport à la chalarose durant la période d'observation (2014-2015). Chez *Fraxinus mandshurica*, des nécroses des rameaux ont été observées, mais *H. fraxineus* n'a pu être isolé que dans de très rares cas. La majorité des rameaux morts étaient colonisés par *Phomopsis* spp. (*Diaporthe* spp.). Les feuilles, par contre, étaient souvent colonisées par *H. fraxineus* et de nombreuses nécroses foliaires se sont développées en fin de saison végétative. Sur 2 arbres plus âgés de *F. mandshurica*, aucune infection n'a été observée. L'inoculation par blessure des tiges principales de semis de *F. mandshurica* a toutefois permis le développement de nécroses. Une comparaison des champignons endophytes des feuilles de *F. mandshurica* et de *F. excelsior* n'a pas mis en lumière de différences significatives. Des observations sur des individus matures isolés de différentes espèces de frênes confirment une haute résistance de la section Melioides (*F. americana*, *F. latifolia*, *F. pennsylvanica*). Certaines sortes ou génotypes de *F. angustifolia* et de *F. excelsior* n'ont montré aucun symptôme de maladie. *Fraxinus pauciflora*, *F. velutina* et *F. xanthoxyloides* peuvent être considérées par contre comme de nouvelles espèces hôtes pour *H. fraxineus*. Des apothécies ont été observées sur les ailes des samares de *F. xanthoxyloides*. Ceci montre que le pathogène peut aussi être disséminé par les graines. Les résultats présentés ici démontrent l'importance des observations de terrain dans les Arboretums pour le développement de stratégies liées à la chalarose du frêne.

Traduction: V. Queloz

Inhaltsübersicht

1 Beteiligte Personen und Tätigkeiten	7
2 Einführung	7
3 Material und Methoden	8
3.1 Untersuchungsgebiet und Baumarten	8
3.2 Pflanzung und Pflege	9
3.3 Phytopathologische Untersuchungen	9
3.4 Untersuchung von Blattendophyten	11
3.5 Inokulationsexperimente	12
4 Ergebnisse	13
4.1 Entwicklung der neu angelegten Versuchsflanzungen	13
4.2 <i>Fraxinus mandshurica</i> (Versuchspflanzung)	16
4.2.1 Symptome und Pilzbesiedlung der Blätter	16
4.2.2 Isolierungen aus abgestorbenen Trieben	18
4.2.3 Endophyten in Blättern von <i>F. mandshurica</i> und <i>F. excelsior</i>	19
4.3 <i>Fraxinus platypoda</i> (Versuchspflanzung)	22
4.4 Symptome und Pilzbesiedlung an anderen <i>Fraxinus</i> -Arten und -Sorten	23
4.4.1 <i>Fraxinus americana</i>	23
4.4.2 <i>Fraxinus angustifolia</i> 'Raywood'	24
4.4.3 <i>Fraxinus angustifolia</i> ssp. <i>oxycarpa</i>	24
4.4.4 <i>Fraxinus angustifolia</i> ssp. <i>syriaca</i>	25
4.4.5 <i>Fraxinus chinensis</i> ssp. <i>rhynchophylla</i>	25
4.4.6 <i>Fraxinus excelsior</i> 'Diversifolia'	26
4.4.7 <i>Fraxinus excelsior</i> 'Doorenbos'	26

4.4.8 <i>Fraxinus excelsior</i> 'Pendula'	27
4.4.9 <i>Fraxinus excelsior</i> 'Jaspidea'	27
4.4.10 <i>Fraxinus excelsior</i> 'Rogovna'	27
4.4.11 <i>Fraxinus latifolia</i> ssp. <i>oregona</i>	27
4.4.12 <i>Fraxinus ornus</i>	27
4.4.13 <i>Fraxinus pauciflora</i>	28
4.4.14 <i>Fraxinus pennsylvanica</i>	28
4.4.15 <i>Fraxinus velutina</i>	28
4.4.16 <i>Fraxinus xanthoxyloides</i>	30
4.5 Inokulationsexperimente	30
5 Diskussion	32
6 Literatur	35
Beilagen	
Beilage 1: Gliederung der Gattung <i>Fraxinus</i> nach Wallander (2012)	
Beilage 2: Liste der Kollektionen	
Beilage 3: Publikation Gross & Holdenrieder (2015): Inokulationsexperiment an Trieben von <i>F. mandshurica</i> -Sämlingen	
Beilage 4: Publikation Meier (2015): Kurzbeschreibung des Projektes	

1 Beteiligte Personen und Tätigkeiten

- Dipl. Forst-Ing. Beat Forster, Waldschutz Schweiz, WSL (einzelne entomologische Diagnosen)
- Anja Gall, ETH Zürich (technische Assistenz, Medienherstellung, Extraktions- und Sequenzierungsarbeiten)
- Dr. Andrin Gross, ETH Zürich (Symptomerfassung und Erregernachweis 2014, Stamminokulationen)
- Prof. Dr. Ottmar Holdenrieder, ETH Zürich (Projektleitung, Erregernachweis und Pilzbestimmungen, Inokulationsexperiment mit Askosporen, mykologische Untersuchungen an verschiedenen Eschenarten des Arboretums)
- Dipl. Forst-Ing. Sylvain Meier (Durchführung sämtlicher Anzucht-, Pflanz- und Pflegearbeiten, Symptombeobachtungen und Zuwachsmessungen)
- Dr. Lioba Paul (Mitwirkung bei Symptomerfassung und Probenahmen 2015)
- Dr. Valentin Queloz, ETH Zürich (Probenahmen 2013, einzelne Pilzbestimmungen)
- Dipl. Biol. Markus Schlegel, ETH Zürich (Vergleich der Endophytenfloren)
- Dr. Thomas Sieber, ETH Zürich (Unterstützung bei Pilzbestimmung und Datenanalyse)

2 Einführung

Die Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior*) ist in fast ganz Europa sehr stark vom Eschentriebsterben betroffen, einer für diese Baumart letalen Krankheit, welche durch den aus Ostasien eingeschleppten Pilz *Hymenoscyphus fraxineus* (Syn. *H. pseudoalbidus*, *Chalara fraxinea*) verursacht wird. In welcher Form die Eschen aus dem Herkunftsgebiet des Erregers mit diesem zusammenleben, ist für die Zukunft unserer Esche von grossem Interesse. Die mit *F. excelsior* sehr nahe verwandte Mandshurische Esche (*F. mandshurica*) ist in ihren Herkunftsgebiet sehr häufig infiziert, Symptome wurden dort jedoch nicht beobachtet. In Estland weist die Mandshurische Esche vereinzelt Krankheitssymptome auf, die Art gilt aber auch dort als sehr tolerant (Gross et al. 2014ab). Die Mandshurische Esche ist sehr wahrscheinlich mit *F. excelsior* kreuzbar (beide gehören zur Sektion *Fraxinus*). Das Pathogen wurde in Korea auch auf *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* (Syn. *F. japonica*) nachgewiesen (Gross & Han 2015, Han et al. 2015). Diese Baumart ist mit der in Südeuropa und Kleinasien verbreiteten Blumenesche (*F. ornus*) nah verwandt (aber im Gegensatz zu dieser windbestäubt). Auf der Breitstieligen Esche (*F. platypoda*) in Japan wurde vor kurzem *H. linearis* entdeckt, eine nicht pathogene Pilzart, die sehr nahe mit dem Krankheitserreger *H. fraxineus* verwandt ist (Gross et al. 2015b).

Die Einkreuzung von Resistenzgenen aus den Herkunftsgebiet des Pathogens in *F. excelsior* ist eine interessante Option für die nachhaltig wirksame Bekämpfung der Epidemie. Alternativ könnte an einen Ersatz von *F. excelsior* durch asiatische Eschenarten gedacht werden, vor allem unter dem Aspekt, dass auch herbivore Insekten aus Asien, (z.B. der Asiatische Laubholzbock (ALB, *Anoplophora glabripennis*) und der "Emerald Ash Borer" (EAB, *Agrilus planipennis*) die europäischen Eschen gefährden. Aufgrund der Coevolution im Herkunftsgebiet ist anzunehmen, dass die asiatischen *Fraxinus*-Arten auch gegen diese Insekten resistent bzw. tolerant sind.

Kenntnisse über das Verhalten dieser Baumarten in der Schweiz sind somit eine wichtige Voraussetzung für den Umgang mit der aktuellen und zukünftigen Bedrohung der einheimischen Eschen durch eingeschleppte Schadorganismen. Das Projekt hatte zum Ziel, eine Versuchspflanzung mit den asiatischen Eschenarten *Fraxinus mandshurica* (Mandshurische Esche) und *F. platypoda* (Breitstielige Esche, Syn.: *F. spaethiana*) im Schweizerischen National-Arboretum Aubonne zu etablieren und erste Ergebnisse zur Reaktion dieser Arten auf das Eschentriebsterben und ihren Befall mit anderen Organismenarten zu liefern. Ergänzend wurden weitere im Arboretum vorhandene *Fraxinus*-Arten auf Infektionen durch *H. fraxineus* untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgebiet und Baumarten

Das Projekt wurde im Schweizerischen National-Arboretum Aubonne (Kt. Waadt; www.arboretum.ch) realisiert, welches die benötigten Flächen zur Verfügung stellte.

In diesem Arboretum gibt es bereits einen im Aufbau befindlichen sehr artenreichen "Japanwald", der bezüglich *Fraxinus* vor Projektbeginn allerdings nur einen Kleinbestand von *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* (Herkunft: Japan) enthielt. Im Rahmen des Projektes wurden zwei neue Pflanzungen (insgesamt 1400 m²) mit japanischen Provenienzen von *F. mandshurica* und *F. platypoda* (Syn.: *F. spaethiana*) angelegt. Zum Vergleich wurden (zusätzlich zur reichlich vorhandenen Naturverjüngung) Sämlinge von *F. excelsior* ausgepflanzt. Die Bäume wurden individuell nummeriert und kartiert.

Im "Eschenquartier" des Arboretums (Abb.1) und vereinzelt auch an anderen Stellen befinden sich ältere Einzelexemplare diverser exotischer *Fraxinus*-Arten (*F. angustifolia*, *F. americana*, *F. latifolia*, *F. mandshurica*, *F. pauciflora*, *F. pennsylvanica*, *F. velutina*, *F. xanthoxyloides*) sowie verschiedener Sorten von *F. excelsior* und *F. ornus*.

Die Benennung der *Fraxinus*-Arten folgt Wallander (2012). Eine Übersicht über die Synonyme befindet sich im Anhang 1. Die Identität des Pflanzmaterials wurde durch ITS-Sequenzierung einzelner Exemplare nach der Methode von Wallander (2008) überprüft.



Abb.1: Links: Eschenquartier im Arboretum Aubonne, beim Baum in der Mitte handelt es sich um *F. mandshurica* (No. 823, 13. 10. 2015), rechts: *F. mandshurica* No. 2265 (14. 07. 2013).

3.2 Pflanzung und Pflege

Die Pflanzung erfolgte im Jahr 2013 auf zwei benachbarten, für diesen Zweck gerodeten und standörtlich geeigneten Flächen im Auenbereich des Flusses Aubonne im Arboretum. Als Schutz gegen Mäusefrass wurde jeweils eine eingeschnittene PET-Flasche um die Stammbasis platziert. Als Verbisschutz kamen Gitter zum Einsatz (Abb. 3, 5). Zudem wurde das Gelände eingezäunt. Die Bäume wurden regelmässig kontrolliert und bei Bedarf freigeschnitten. Dabei wurde die - auf den Versuchsflächen sehr üppige - Konkurrenzvegetation gezielt reguliert, um das Risiko für Spätfrostschäden zu minimieren. Während der aussergewöhnlichen Trockenheit im Sommer 2015 mussten die Pflanzungen von Hand bewässert werden.

3.3 Phytopathologische Untersuchungen

Die Pflanzen wurden über zwei Vegetationsperioden (2014 und 2015) beobachtet und photographisch dokumentiert. Abgestorbene Triebe bzw. Blätter mit und ohne Symptome bzw.

Blattstreu wurden entnommen und im Labor auf das Vorkommen von *H. fraxineus* und zum Teil auch von anderen Pilzarten untersucht.

Bei Trieben wurden nach oberflächlicher Desinfektion mit konzentriertem Ethanol und Entfernung der Rindengewebe unter sterilen Bedingungen Xylemproben entnommen und auf Malzagar (15 g l⁻¹ Malzextrakt, 20 g l⁻¹ Agar) mit einem Zusatz von 40g l⁻¹ *F. excelsior*-Blättern und 50 mg l⁻¹ Terramycin (Oxytetracyclin) inkubiert.

Die Blätter wurden in feuchten Kammern (transparente Runddosen aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 15 cm und einer Höhe von 3 cm mit minimaler Belüftung, ausgelegt mit angefeuchtetem Papier) bei Zimmertemperatur bzw. im Kühlschrank, zum Teil auch bei 18°C unter UV-Licht inkubiert (Details s. Herbarliste, Anhang 2) und in feuchtem Zustand unter dem Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 63x - 160x im Durchlicht (ohne Deckglas) auf das Vorkommen der typischen *Chalara*-Phialiden des Erregers untersucht (Abb.6,17). Diese entwickelten sich in der Regel im Verlauf von ca. 2 Wochen bei Zimmertemperatur bzw. ca. 3 - 4 Wochen im Kühlschrank. Von ausgewählten Proben wurden Totalpräparate (ca. 5 x 5 mm grosse Stücke aus der Blattspreite montiert in Michsäure) angefertigt und diese bei höherer Vergrößerung untersucht. Die Blattspreiten wurden mit der Unterseite nach oben beginnend von der Basis entlang der Mittelrippe durchmustert, da hier am häufigsten Phialiden gebildet wurden. Pro Baum wurden in der Regel 3-4 zufällig ausgewählte Fiederblättchen untersucht.

Von ausgewählten Blättern wurden auch Isolierungen aus der Rhachis oder der Blattspreite durchgeführt. Das Material (ca. 1-2 cm lange Abschnitte der Rhachis bzw. ca. 1-2 cm² grosse Stücke der Blattspreite, bei kleinen Blättern ganze Blättchen) wurde mit 70% Ethanol und konzentriertem Wasserstoffperoxyd (30 sek. konz. Ethanol, 30 -60 sek H₂O₂, 30 sek. Ethanol) oberflächlich desinfiziert. Am Ende wurde die anhaftende Flüssigkeit durch kurzzeitiges Auflegen auf saugfähiges Papier entfernt und aus den zentralen Bereich der Objekte wurden unter sterilen Bedingungen kleine Explantate (mehrere ca. 3 x 3 - 5 x 5 mm grosse Blattstücke oder ca. 3-5 mm lange Rhachissegmente) entnommen. Diese wurden auf Eschen-Malzagar mit Terramycin (Oxytetracyclin, 50 mg l⁻¹) oder auf Malzagar mit Terramycin bei 20 °C inkubiert. In Einzelfällen wurden Blattstücke auch auf Wasseragar inkubiert, um auf Malzagar besonders konkurrenzschwache Arten in Reinkultur zu überführen.

Im Frühjahr entnommene Blattproben aus der Streu wurden unter UV-Licht (Leach 1971) inkubiert und *H. fraxineus* wurde anhand der Fruchtkörper (Apothezien) nachgewiesen (Abb. 2, 17). Zur Unterscheidung von der einheimischen, nahe verwandten Pilzart *H. albidus* wurden von einzelnen Fruchtkörpern Multiaskosporenkulturen angelegt und diese auf das Vorkommen der charakteristischen Phialiden von *H. fraxineus* untersucht.

Die Reinkulturen wurden lichtmikroskopisch oder anhand ihrer ITS-Sequenzen nach der bei Gross et al. (2015b) beschriebenen Methode identifiziert. Für die Zuordnung einer Sequenz zu einer bestimmten Art wurden eine Übereinstimmung von mindestens 98% vorausgesetzt. Ein Teil der steril bleibenden Kulturen wurde unter langwelligem UV-Licht inkubiert um die Sporulation zu induzieren (Leach 1971).

Die Piznachweise sind mit Kollektionsnummern belegt. Detailinformationen zu den einzelnen Proben bzw. Pilzisolaten sind der Beilage 2 zu entnehmen.

3.4 Untersuchung von Blattendophyten

Die Endophytengemeinschaften in grünen, weitgehend symptomfreien Blättern von *F. mandshurica* und *F. excelsior*-Sämlingen wurden von M. Schlegel untersucht. Hierzu wurden Sämlinge der beiden Arten jeweils paarweise ausgewählt (nächst benachbarte Pflanzen ähnlicher Grösse). Die Probenahmen erfolgten zu folgenden Terminen: 19. 9. 2013 (12 Paare), 3. 9. 2014 (5 Paare + 6 *F. mandshurica*) und 21. 7. 2015 (18 Paare). Die Beprobung 2015 wurde früher durchgeführt, da aufgrund der aussergewöhnlichen Hitze ein vorzeitiger Blattfall befürchtet wurde. Die abweichende Probenzahl 2014 ergab sich durch Ausfälle bei *F. excelsior* infolge einer Infektion mit *H. fraxineus*. Im Jahr 2015 wurden die ausgefallenen Pflanzen durch ähnliche Exemplare in der Nähe ersetzt. Pro Baum wurden 2013 zwei, 2014 und 2015 vier gesunde Teilblätter von jeweils 2 bzw. 4 über den ganzen Baum verteilten Blättern gesammelt und für den Transport sowie über Nacht kühl gelagert. Die Verarbeitung erfolgte am nächsten Tag. Die Teilblätter wurden oberflächlich desinfiziert (1 min mit 70% Ethanol, 3 min mit NaOCl/Javelwasser 4%, 1 Min. mit autoklaviertem Leitungswasser und 30 sek mit 70% Ethanol. Nach ca. 5 min Trocknungszeit wurden aus jedem Fiederblättchen 5 Blattscheiben mit 7 mm Durchmesser ausgestanzt. Je eine zufällig ausgewählte Scheibe pro Blättchen wurde auf Terramycin- Malzagar (TMA, 2% Malzextrakt, 1.5 % Agar, 50 mg l⁻¹ Terramycin) inkubiert. Das übrige Material wurde für die DNA-Analyse eingefroren. Bei den Proben aus dem Jahr 2013 wurden zusätzlich zwei Petiolen-Segmente von ca. 5 mm Länge isoliert. Die aus den Blattstücken herausgewachsenen Pilze wurden mithilfe eines von Ibrahim (2014) und M. Schlegel erstellten Kataloges in Morphotypen eingeteilt. Häufig vorkommende Typen wurden durch ITS-Sequenzierung und Vergleich mit den in der Genbank vorhandenen Daten (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) spezifischen Taxa zugeordnet. Die Auswertung wurde in R (R Core Team 2014) gemacht. Für die Grafiken wurde das package ggplot2 benutzt, die NMDS wurde mit der Funktion *metaMDS* im package *vegan* (Oksanen et al. 2015) mit den

Standardeinstellungen (Bray-Curtis-Distanzmass) gerechnet. Für die Signifikanztests wurde die Funktion *envfit* aus demselben Programm benutzt.

3.5 Inokulationsexperimente

Ein Inokulationsexperiment mit Askosporen wurden am 11. 7. 2014 an getopften Sämlingen von *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* von einer ostrussischen Provenienz (Saatgut erhalten vom Botanischen Garten Tallinn, Nr. D 364) und *F. excelsior* durchgeführt. Zur Sporenproduktion wurden im Freiland gesammelte pseudosklerotische Blattstengel von *F. excelsior* unter UV-Licht inkubiert (vgl. Gross et al. 2014) und die Schalen mit sporulierenden Fruchtkörpern wurden in einem Plastikbehälter (60 x 38 x 34 cm) montiert und als Inokulumquelle für 48h über die Pflanzen in einem gleich grossen Behälter gestülpt (Abb.2). Anschliessend wurden die Pflanzen in Zürich unter Freilandbedingungen weiterkultiviert.



Abb. 2: Inokulationsexperiment mit Ascosporen; links: Versuchspflanzen in Plastikbehälter; Mitte: montierte Inokulumquellen; rechts: Platte (Durchm. 15 cm) mit sporulierenden Fruchtkörpern von *H. fraxineus*. Ein gebogener Draht verhindert das Herabfallen der Blattstengel.

In einem weiteren, separat publizierten Experiment wurden getopfte Mandshurische Eschen im Labor über Wunden am Stamm mit *H. fraxineus* inokuliert (Gross & Holdenrieder 2015).

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung der neu angelegten Versuchsflanzungen

Bei *F. mandshurica* entwickelten sich trotz häufiger Blattinfektionen (s. u.) bis Ende der Vegetationsperiode 2015 nur an 4% der untersuchten Bäume (n=178) Triebinfektionen, welche jedoch zu keinen Ausfällen führten, da die befallenen Triebe entfernt wurden. *F. platypoda* blieb in beiden Jahren befallsfrei. Zwischen der Baumhöhe bzw. dem Zuwachs dieser beiden Arten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4). *F. mandshurica* zeigte eine sehr starke Streuung des Zuwachses, deren Ursache unklar ist. Spätfrostschäden wurden im Beobachtungszeitraum nicht beobachtet. Bei *F. excelsior* kam es bereits 2014 zu einem starken Befall durch *H. fraxineus* : 28% der Pflanzen (n = 66) entwickelten Stammnekrosen und 6 Pflanzen (9%) starben im Folgejahr ab.

Sowohl bei *F. mandshurica* als auch bei *F. excelsior* traten gegen Ende der Vegetationsperiode sehr häufig Blattnekrosen auf (Abb. 5). Auch im Sommer 2015 entwickelten sich trotz der extrem trockenen Witterung bei beiden Arten gegen Ende der Vegetationsperiode sehr häufig Blattnekrosen (vgl. Kap. 4.2.1), in denen *H. fraxineus* nachgewiesen wurde (151013.3, 151013.10). Die Abb. 3 zeigt eine Ansicht der Pflanzflächen.



Abb. 3: Versuchsfläche mit *F. platypoda* (links) und *F. mandshurica* (rechts) im März 2015.

Schäden durch Wildverbiss und Nagetiere konnten durch die Schutzmassnahmen vollständig verhindert werden. An den asiatischen Eschen wurde nahezu kein Insektenfrass festgestellt. Ausnahmen waren vereinzelter Lochfrass durch ein unbekanntes Insekt (Abb. 5) und ein Trieb mit ausgefressenem Mark bei *F. mandshurica* (150828.17b) sowie eine einzige Platzmine (sehr wahrscheinlich Fliedermotte, *Gracillaria syringella*) an *F. platypoda*. Der Minierfrass im Trieb von *F. mandshurica* wurde möglicherweise vom Hasel-Linienbock (*Oberea linearis*) verursacht,

welcher im Arboretum ein Zweigsterben an *Alnus japonica* verursachte (eine dort vorhandene Larve wurde von B. Forster molekulargenetisch identifiziert).

Die Trockenperiode 2015 wurde durch künstliche Bewässerung überbrückt und es gab keine Ausfälle infolge dieser extremen Witterungsperiode. An *F. platypoda* gab es vereinzelt geringfügige Hagelschäden, die Blätter blieben danach aber grün und von den Verletzungen gingen bis zum Laubfall keine Sekundärinfektionen aus. Auf den Pflanzflächen entwickelte sich eine sehr üppige Konkurrenzvegetation, die durch wiederholten Rückschnitt reguliert wurde. Dieser erfolgte lokal, da wegen Spätfrostgefahr die Entstehung von grösseren Kahlflächen nicht erwünscht war.

Das Projekt wurde im Bulletin des Arboretums vorgestellt (Meier 2015, Anhang 3). Die ursprünglich vorgesehene Installation einer Hinweistafel wurde vorerst zurückgestellt, da derzeit das Informationskonzept des Arboretums überarbeitet wird und auch ein gewisses Risiko besteht, dass die noch sehr kleinen Pflanzen dieser - derzeit auf dem Markt nicht erhältlichen - Arten gestohlen werden könnten.

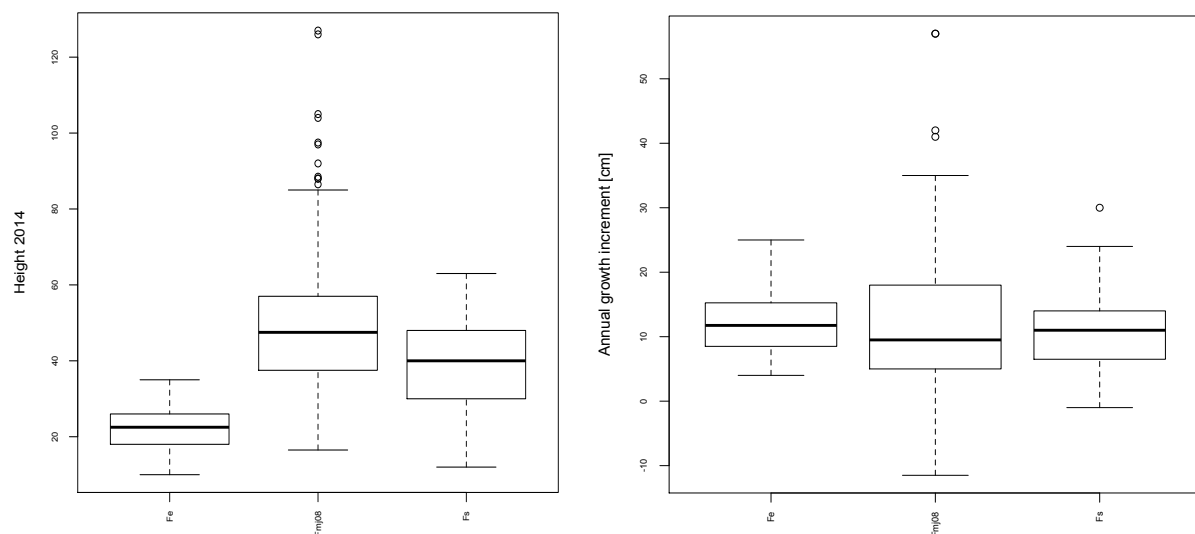


Abb. 4: Höhe von gepflanzten *F. excelsior* (Fe, n=58), *F. mandshurica* (Fm/08, n= 178) und *F. platypoda* (Fs, n= 64) am Ende der Vegetationsperiode 2014 (linkes Bild) und Vergleich der Zuwächse (rechtes Bild).



Abb. 5: Entwicklung von *F. platypoda* 2014 (oben links) und 2015 (oben Mitte, das Schutzgitter wurde für die Aufnahme entfernt); oben rechts: Starkwüchsiges Exemplar von *F. mandshurica* am Ende der Vegetationsperiode 2015. Mittlere Bildreihe: *F. mandshurica* im belaubten Zustand am 28. 8. 2015 (links) mit vereinzelt diffuse Blattnekrosen (Mitte und rechts); untere Reihe links: Insektenfrass an *F. mandshurica*; unten Mitte und rechts: Durch *H. fraxineus* verursachte Blattnekrosen an *F. excelsior* (14. 10. 2015).

4.2 *Fraxinus mandshurica* (Versuchspflanzung)

4.2.1 Symptome und Pilzbesiedlung an Blättern von *F. mandshurica*

Gegen Ende der Vegetationsperiode 2014 entwickelten sich bei *F. mandshurica* zahlreiche Blattnekrosen (Abb. 5-7). Am 3. September 2014 wurden von A. Gross von 10 zufällig ausgewählten Exemplaren Blätter entnommen und auf das Vorkommen von *H. fraxineus* untersucht (Phialiden-Nachweis bzw. Isolierungen). Zu diesem Zeitpunkt hatte der Laubfall bereits eingesetzt, die Blätter waren teilweise vergilbt und hatten unterschiedlich grosse Nekrosen, einzelne Exemplare waren jedoch noch voll belaubt und grün. Neben mehr oder weniger ausgedehnten, irregulär geformten hellbraunen Blattflecken traten auch rundliche dunkle Blattnekrosen auf (im Gegensatz zu *F. excelsior* breiteten sich die Nekrosen häufig nicht bevorzugt entlang der Adern aus). Diese entwickelten sich in Feuchtschalen rasch weiter und es bildeten sich massenhaft Phialiden von *H. fraxineus*. (Abb. 7) Auch aus der Rhachis wurde der Pilz oft isoliert (17 von 20 Proben waren positiv). Dieser Befund wurde durch sehr häufige Fruktifikation von *H. fraxineus* auf inkubierter Streu 2015 bestätigt. Nach Inkubation der im Frühjahr gesammelten Blattstreu unter UV entwickelten sich massenhaft Fruchtkörper von *H. fraxineus* (150326.15-16, 150326.54). Daneben wurden verschiedene Coelomyceten (u.a. der selten beobachtete Pilz *Chaetospermum chaetosporum*) und diverse Hyphomyzeten gefunden. Im Sommer 2015 wurde *H. fraxineus* wiederum in grünen Blättern mit schwärzlichen- und hellbraunen Nekrosen nachgewiesen, allerdings nicht in allen Fällen (150828.27-29). Auf der frischen Blattstreu war das Pathogen aber regelmässig vorhanden (Abb. 6, 151013.27-37).



Abb.6: Linkes Bild: Frisch abgefallenes Blatt von *F. mandshurica* mit typischer Verfärbung. Rechtes Bild: Massenhafte Entwicklung von Phialiden von *H. fraxineus* nach Inkubation (diese waren nur auf den helleren Teilen der Blattspreite zu finden).

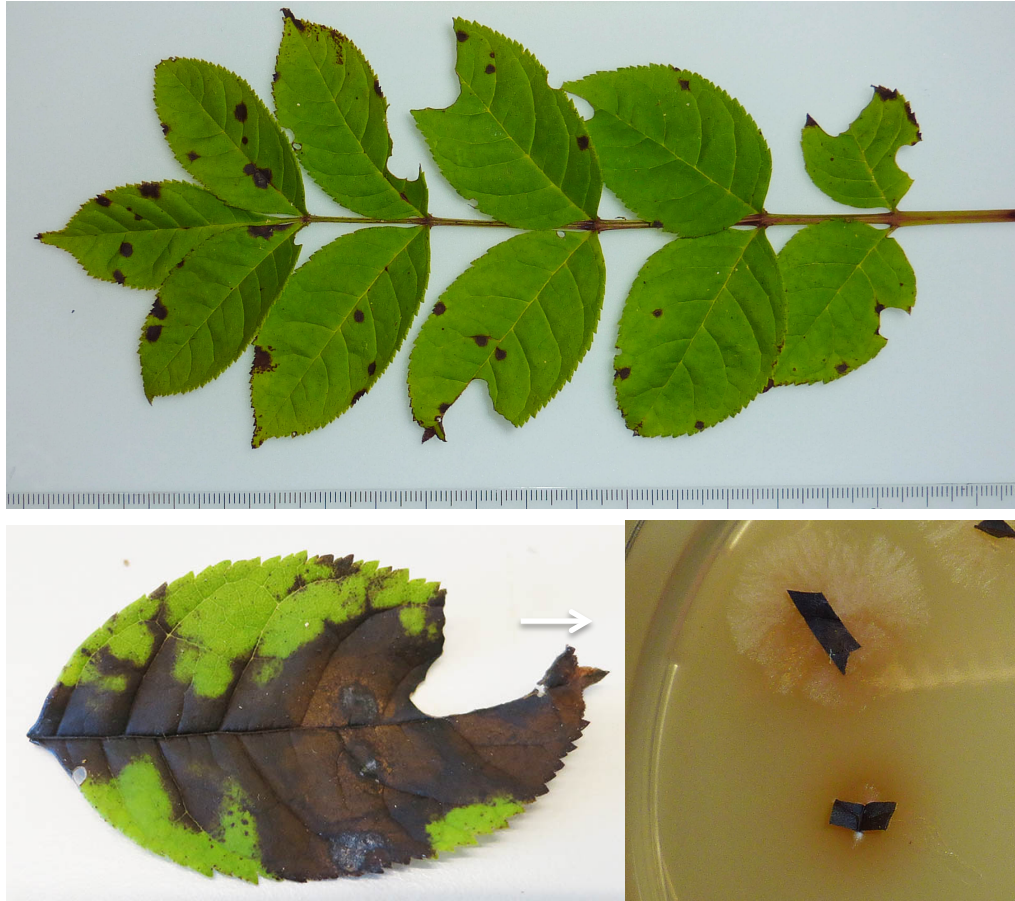


Abb. 7: Symptome einer *H. fraxineus*-Infektion an *F. mandshurica* im Frühstadium (oben, Zustand am 03. 09. 2014). Das mittlere untere Fiederblättchen wurde inkubiert (unten links, Zustand am 16. 09. 2014) und anschliessend isoliert (unten rechts). Der Pfeil bezeichnet das auswachsende Myzel von *H. fraxineus*. Das Medium wird durch den Pilz charakteristisch bräunlich verfärbt. Die Infektion ist mit einem schnellwachsenden Pilz assoziiert, welcher aus den beiden Proben in der oberen Bildhälfte auswächst.

Bei zwei grösseren Exemplaren von *F. mandshurica* im Eschenquartier des Arboretums (Baum 2265 und 823, vgl. Abb. 2) war 2015 *H. fraxineus* auf Blättern nicht nachweisbar, obwohl sich im Sommer häufig Adernekrosen entwickelten (Abb. 8, Proben 150828.17a, 150828.20, 151013.16, 151013.26). Auch aus toten Trieben dieser Bäume war *H. fraxineus* nicht isolierbar (vgl. Kap. 4.2.2).



Abb. 8: Oben links: *F. mandshurica* (Baum 2265) mit oberflächlichen Adernekrosen im August 2015; oben rechts: Zustand am Ende der Vegetationsperiode; unten links: Im August 2015 vorzeitig abgefallene Blätter (Baum 823) mit auffälligen Adernekrosen.

4.2.2 Isolierungen aus abgestorbenen Trieben

In der Versuchspflanzung von *F. mandshurica* traten nur sehr vereinzelt abgestorbene Triebe auf und nur in zwei von 10 Fällen wurde *H. fraxineus* isoliert (150429.5-6). Dagegen war dieses Substrat dominant von *Phomopsis* spp. besiedelt, zum Teil assoziiert mit einem *Diplodia*-ähnlichen sterilen dunklen Myzel (150326.5-6, 8-9 und 11-14, 150429.4, 150929.5). Eine Auswahl dieser Isolate (n=9) wurde sequenziert und ergab verschiedene Taxa aus dem 'Phomopsis-Komplex' (*Diaporthe rudis* und weitere, nicht identifizierbare *Diaporthe* - Arten). Nur zweimal wurden andere Pilze gefunden (*Boeremia exigua* und ein nicht identifiziertes steriles Myzel).

Von den beiden Bäumen im Eschenquartier wies der Baum Nr. 823 bereits 2014 zahlreiche Totäste auf und während des Winters 2014/15 starben auch die wenigen noch lebenden Äste im unteren Kronenbereich ab. Der jüngere Baum (2265) hatte 2015 in der Krone einzelne kleine

abgestorbene (vorjährige) Triebe. Eine Isolierung von *H. fraxineus* aus toten Trieben an den älteren Bäumen war in keinem Fall möglich (150326.47, 150828.17b).

4.2.3 Endophyten in Blättern von *F. mandshurica* und *F. excelsior*

Die Isolierungen aus grünen Blättern (durchgeführt von M. Schlegel) ergaben eine artenreiche Endophytenflora, die bei beiden Eschenarten sehr ähnlich war (Abb. 9 -1 2). Blattspreiten und Blattstiele wiesen fast das gleiche Endophytenspektrum auf (Abb.10). Die Kolonisierungsrate war im Sommer 2015 deutlich niedriger als in den Vorjahren (Abb. 11). Am häufigsten wurden Vertreter der *Xylariaceae* isoliert (*Nemania*, *Kretzschmaria*, *Biscogniauxia* u. a.). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Baumarten festgestellt werden [p-Wert (envfit) für die drei Zeitpunkte: 0.091, 0.375 und 0.878]. Auch zwischen Blattspreite (L) und Petiole (P) konnte kein Unterschied festgestellt werden ($p = 0.433$) (Abb.12).

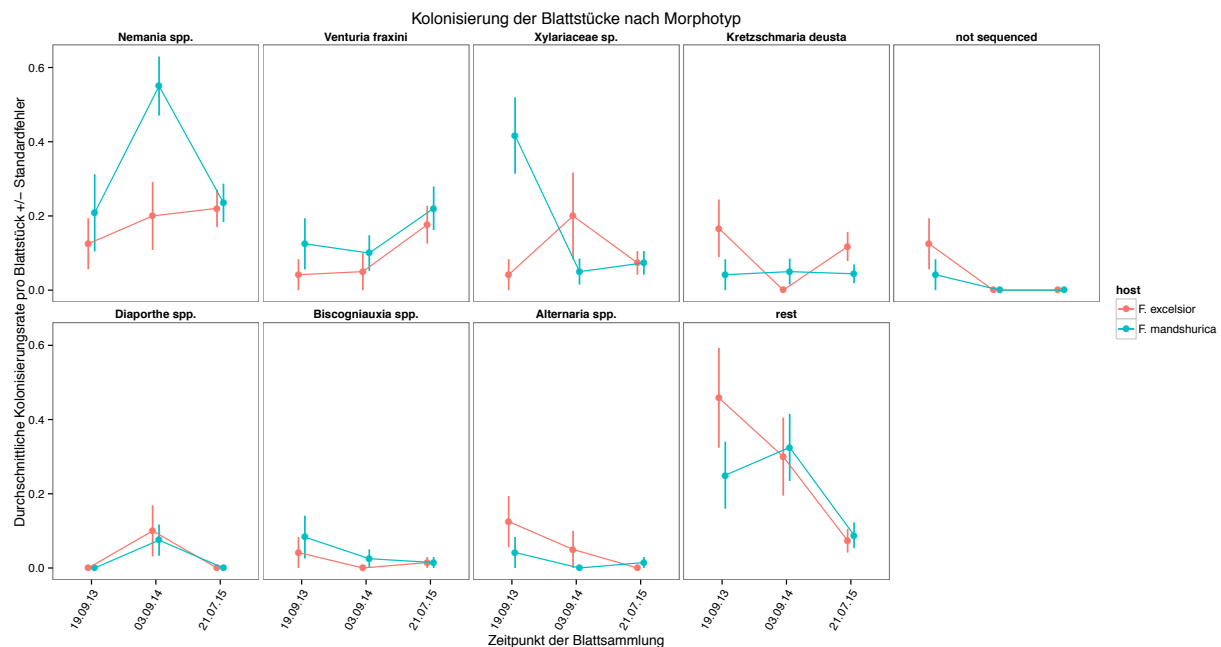


Abb.9 : Entwicklung der Kolonisierungsrate der häufigsten Morphotypen über die Zeit, unterschieden nach Wirtsbaumart (rot = *F. excelsior*, blau = *F. mandshurica*). Es wurden hier nur Isolate aus der Blattspreite berücksichtigt. Alle selteneren Taxa sind unter "Rest" zusammengefasst.

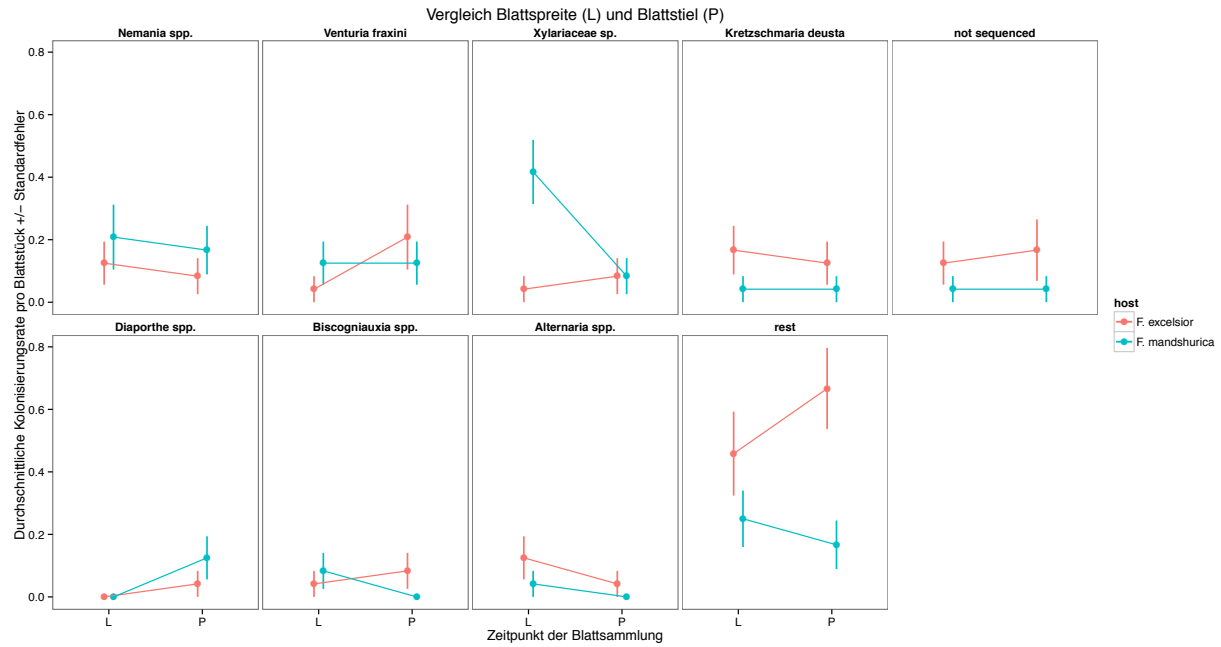


Abb 10: Kolonisierungsrate der wichtigsten Morphotypen im Material vom 19.09.2013, unterschieden nach Baumart und Blattorgan (L=Blattspreite, P=Petiole).

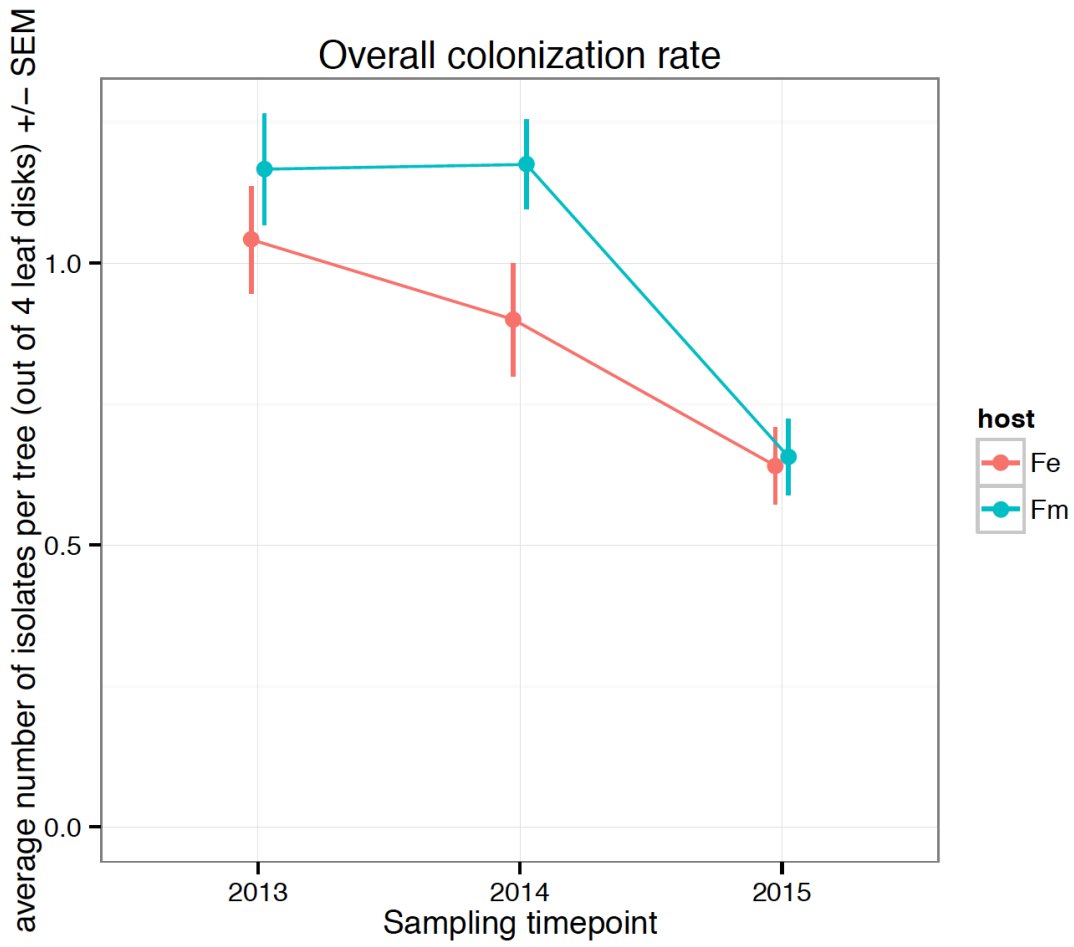


Abb. 11: Kolonisierungsrate aller Pilze in den Blattspreiten über die Zeit, unterschieden nach Wirtsbaumart.

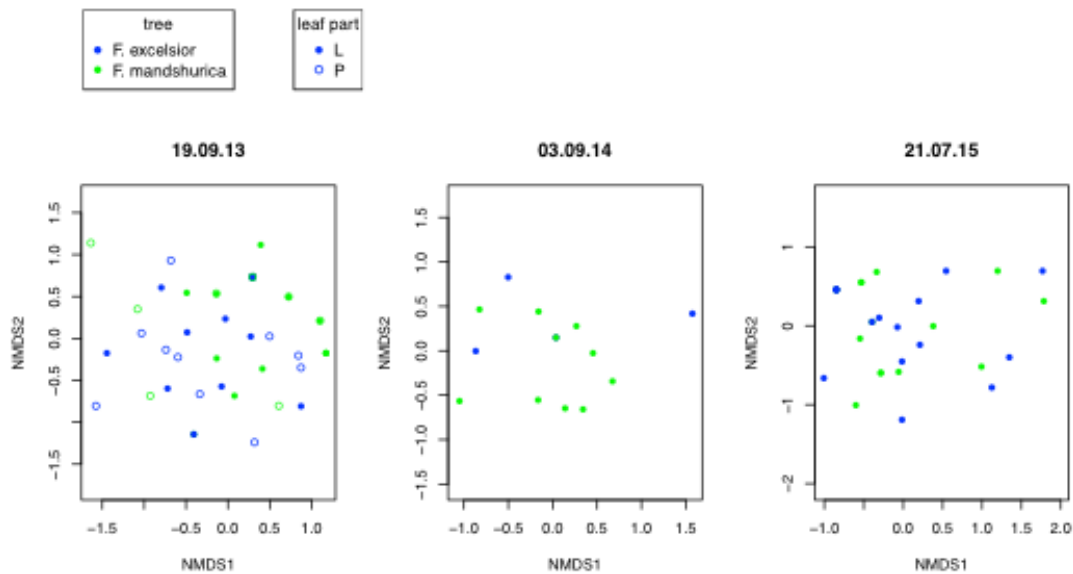


Abb. 12: Analyse der Pilzgemeinschaften mittels nicht-metrischer multidimensionaler Skalierung (NMDS, mittels metaMDS in vegan).

4.3 *Fraxinus platypoda* (Versuchspflanzung)

In der Versuchspflanzung von *F. platypoda* konnte 2014 und 2015 kein Befall mit *H. fraxineus* beobachtet werden. Auf der im Frühjahr gesammelten unter UV inkubierten Streu von *F. platypoda* entwickelten sich keine Fruchtkörper von *H. fraxineus* (150326.17-23, 150429.14-15).

Am 3. September 2015 wurden von 10 zufällig ausgewählten Pflanzen senescente bzw. frisch abgefallene Blätter auf das Vorkommen von *H. fraxineus* untersucht (Phialiden-Nachweis bzw. Isolierungen). Das Pathogen konnte in keinem Fall nachgewiesen werden (151013.11-14, 151013.38), was die Beobachtungen vom Vorjahr (141217.1-2) bestätigte. Es wurden bei *F. platypoda* auch keine Triebnekrosen festgestellt.

4.4 Symptome und Pilzbesiedlung an anderen *Fraxinus*-Arten und -Sorten

4.4.1 *Fraxinus americana*

Während des Sommers 2015 wurden bei einem jüngeren Baum (Nr. 2208, Abb. 13) vereinzelt sehr kleine dunkle, auf die Oberseite beschränkte Blattflecke beobachtet (ähnlich dem Initialstadium der Infektion an *F. excelsior*, vgl. Abb.19), eine Blattbesiedlung durch *H. fraxineus* war jedoch nicht nachweisbar (150828.5, 151013.22, 151013.45). Aus vereinzelt kleinen toten Trieben am Stamm des Baumes 2208 wurde nur *Phomopsis* isoliert (151028.5). Ein bislang nicht bestimmter grosser Baum (Nr. 820, Abb. 13) wurde molekular als *F. americana* identifiziert. Dieses Exemplar befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft einer sehr stark vom Eschentriebsterben befallenen *F. excelsior* 'Pendula'. Trotz hohem Infektionsdruck wies auch dieses Exemplar von *F. americana* in beiden Vegetationsperioden 2014 und 2015 keinerlei Symptome auf.



Abb. 13: *F. americana* (oben links Baum 2208, Mitte u. rechts Baum 820). Untere Bildreihe: Blätter von Baum 2208 mit Punktnekrosen im August 2015 (links u. Mitte) sowie kurz nach dem Laubfall (rechts).

4.4.2 *Fraxinus angustifolia* 'Raywood '

Ein grosses Exemplar (Baum No. 843, Abb. 14) mit symptomfreier Krone wies eine starke Besiedelung durch *H. fraxineus* in der Streu auf (150326.52,53,55), in der Vegetationsperiode 2015 war jedoch keine Blattbesiedlung durch *H. fraxineus* nachweisbar. Die seneszenten Blätter (Abb. 14) waren dominant von einem nicht identifizierten Pilz besiedelt (151013.20). Es traten auch keine Rindennekrosen auf. Drei weitere Exemplare dieser Sorte in Zürich entwickelten weder Blattsymptome noch Fruktifikation in der Streu (nach UV-Inkubation zahlreicher Proben), obwohl *F. excelsior* in der Umgebung Symptome aufwies. Nach sehr starker Inokulation abgetrennter Blätter mit Ascosporen von *H. fraxineus* entwickelten sich jedoch Nekrosen.



Abb. 14: Grosses symptomfreies Exemplar von *F. angustifolia* 'Raywood' (843) und Blattzustand 13.10.2015.

4.4.3 *Fraxinus angustifolia* ssp. *oxycarpa*

Der Baum (Nr. 834) hatte sehr gutem Kronenzustand, aber einzelne abgestorbene Triebe und vereinzelte fleckige deformierte Blätter im unteren Kronenbereich (Abb. 15). Es war keine Blattbesiedlung durch *H. fraxineus* nachweisbar (150828.14b, 151013.24) und der Pilz konnte

auch aus frisch abgestorbenen Zweigen nicht isoliert werden (150828.6, 150828.14, 151013.24). Auf den Blattnekrosen entwickelte sich ausschliesslich *Phoma* sp.



Abb. 15: *F. angustifolia* ssp. *oxycarpa* (Baum 834), praktisch symptomfreies Exemplar mit sehr vereinzelt toten Trieben. Auf den Blattnekrosen sind Pyknidien von *Phoma* sp. sichtbar.

4.4.4 *F. angustifolia* ssp. *syriaca*

Der Baum 842 wies vereinzelt kleine tote Zweige auf, aus denen nur *Phomopsis* sp. und andere Pilze isoliert wurden (150828.6). Die Blätter waren symptomfrei und *H. fraxineus* war dort nicht nachweisbar.

4.4.5 *Fraxinus chinensis* ssp. *rhynchophylla*

Bei der Chinesischen Esche war keine Blattbesiedlung durch *H. fraxineus* nachweisbar (141003.2-5, 151013.41). Aus vereinzelt frisch abgestorbenen kleineren Seitentrieben an jungen Bäumen (Abb. 16) konnte *H. fraxineus* nicht isoliert werden (150429.7). An zwei älteren Bäumen (an staunassem Standort im 'Japanwald') wurden zahlreiche Totäste beobachtet, die von diversen Pilzenarten (Abb.16) besiedelt waren, *H. fraxineus* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (150326.49, 150429.10-11). Auch in Blättern von inokulierten Pflanzen wurde der Pilz nicht gefunden (Kap. 4.5). Vereinzelt wurde auf den Blättern von *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* aus dem Arboretum auch *Zygosporium* sp. beobachtet (141003.2), ein Hyphomyzete der bei niedriger Vergrößerung evtl. mit *H. fraxineus* verwechselt werden könnte (Abb. 16).

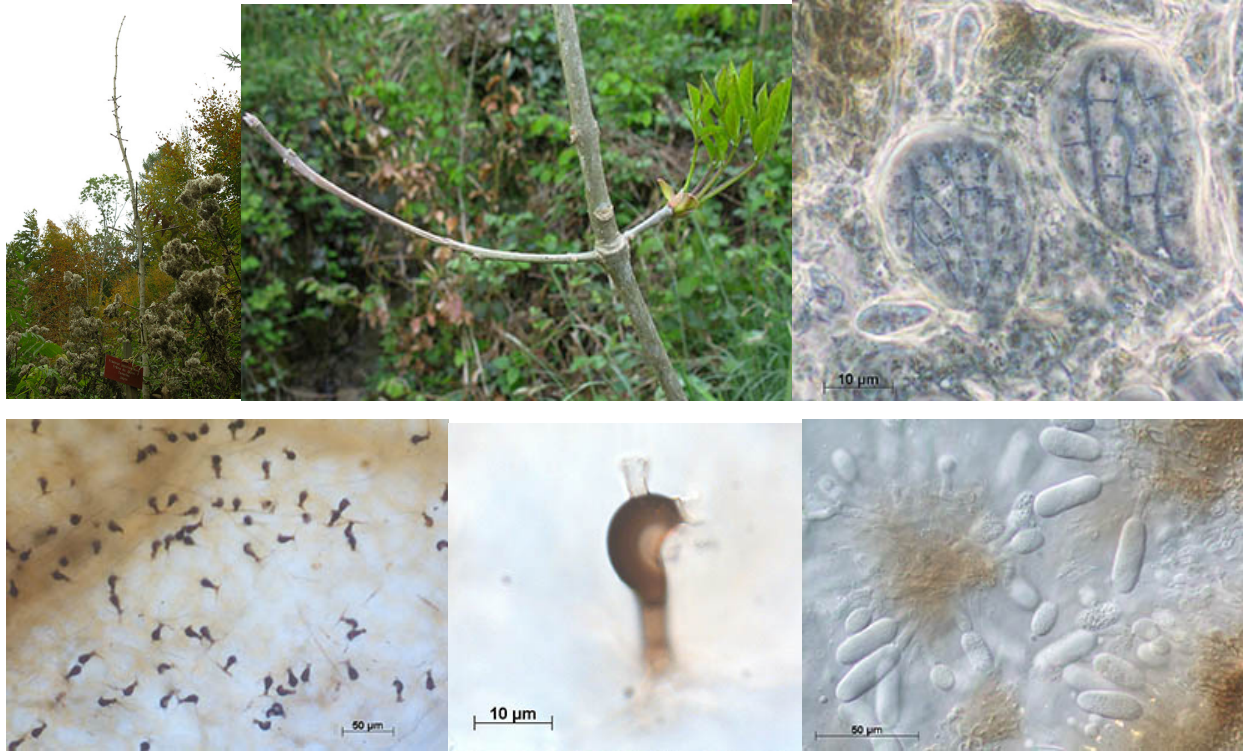


Abb. 16: *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* und damit assoziierte Pilze. Obere Reihe: Stark wüchsiges Exemplar im 'Japanwald', abgestorbener Seitentrieb, Asci von cf. *Elsinoe* sp. (häufig an abgestorbenen Zweigen); untere Reihe: *Zygosporium* sp. (links u. Mitte), *Diplodia* sp. (rechts).

4.4.6 *Fraxinus excelsior* 'Diversifolia'

Baum mit normalem Kronenzustand, keine Blatinfektion durch *H. fraxineus* nachweisbar, auch aus einem abgestorbenen Trieb konnte das Pathogen nicht isoliert werden (150828.7).

4.4.7 *Fraxinus excelsior* 'Doorenbos'

Baum mit relativ vielen kleineren Totästen in der Krone. Es war keine Blattbesiedlung durch *H. fraxineus* nachweisbar (151013.23). Auch auf vorjähriger Blattstreu war keine Fruktifikation nach Inkubation unter UV nachweisbar (150326.26, Zuordnung der Streu allerdings unsicher).

4.4.8 *Fraxinus excelsior* 'Pendula'

Das einzige vorhandene Exemplar weist einen sehr starken Befall durch das Eschentriebsterben auf, es sind zahlreiche Totäste vorhanden. Die Sorte 'Pendula' ist als sehr anfällig bekannt.

4.4.9 *Fraxinus excelsior* 'Jaspidea'

Eine Blattbesiedlung durch *H. fraxineus* wurde im Oktober nachgewiesen (151013.19), während im August kein Nachweis gelungen war (150828.9). Aus einzelnen toten Trieben war keine Isolierung des Pathogens möglich (150828.9).

4.4.10 *Fraxinus excelsior* 'Rogovna'

Aus vereinzelt vorhandenen abgestorbenen Trieben konnte kein *H. fraxineus* isoliert werden (150828.18) und es wurden keine Blattsymptome beobachtet.

4.4.11 *Fraxinus latifolia* ssp. *oregona*

Ein ca. 3 m hohes Exemplar (beim Teich) wies zahlreiche tote Triebe auf (Erscheinungsbild wie Eschentriebsterben). Isolierungen aus 5 relativ frisch abgestorbenen Trieben ergaben *Phomopsis* als dominanten Besiedler (150326.45, später molekular als *Diaporthe cotoneastri* bestimmt), *H. fraxineus* wurde nicht nachgewiesen.

4.4.12 *Fraxinus ornus*

Die Blätter entwickelten in Aubonne gegen Ende der Vegetationsperiode zahlreiche kleinfleckige Nekrosen, eine Besiedlung der Blätter durch *H. fraxineus* konnte jedoch nur bei einem von 4 Blättern nachgewiesen werden (151013.18). In Zürich wurden Fruchtkörper von *H. fraxineus* dagegen wiederholt in der Streu von *F. ornus* beobachtet und bei einem Baum entwickelten sich auch einzelne Blattnekrosen, die sich rasch entlang der Rhachis ausbreiteten.

4.4.13 *Fraxinus pauciflora* (= *F. tomentosa*)

Der Baum hatte sowohl im Sommer 2014 als auch 2015 einen sehr guten Kronenzustand. Die Blätter aus der Vegetationsperiode 2014 waren im folgenden Frühjahr stark von *H. fraxineus* besiedelt (150326.44), bei Blättern der Vegetationsperiode 2015 war jedoch keine Infektion nachweisbar (150828.12, 151013.15). Der Baum wies vereinzelte tote Triebe auf, aus einem von 3 Trieben konnte das Pathogen isoliert werden, die anderen waren von *Phomopsis* sp. besiedelt (150326.44b).

4.4.14 *Fraxinus pennsylvanica* 'Variegata'

Die Blätter dieses Baumes waren mehrheitlich deformiert und wiesen Blattrandnekrosen auf, die von einem Hyphomyzeten (cf. *Ulocladium*) besiedelt waren. Im Wurzelbereich befand sich Materialablagerung vom Wegebau (Hackschnitzel), die offensichtlich einen Wurzelschaden verursacht hatte. Es war keine Blattbesiedlung durch *H. fraxineus* nachweisbar (150828.19, 150828.19). Auch die wiederholte Beobachtung von zwei Exemplaren der Wildform in Zürich (inkl. Inkubation von Streuprobe) ergab keine Anhaltspunkte für eine Infektion.

4.4.15 *Fraxinus velutina*

Ein grosser Baum (833) war 2015 fast völlig symptomfrei, ein zweiter, etwas kleinerer Baum (825) hatte zahlreiche Totäste in der Krone (vermutlich Wurzelschaden wg. Materialablagerung). *H. fraxineus* wurde sowohl in grünen Blättern als auch in der Streu nachgewiesen (Abb. 17, 150326.44, 151013.21, die Proben 150828.8 u. 150828.10 waren jedoch negativ, obwohl vereinzelt sehr deutliche Nekrosen vorhanden waren). Die Phialiden von *H. fraxineus* waren nach Inkubation der Blätter auf diesem Wirt nur sehr zerstreut, aber grossflächig vorhanden (Abb. 17).

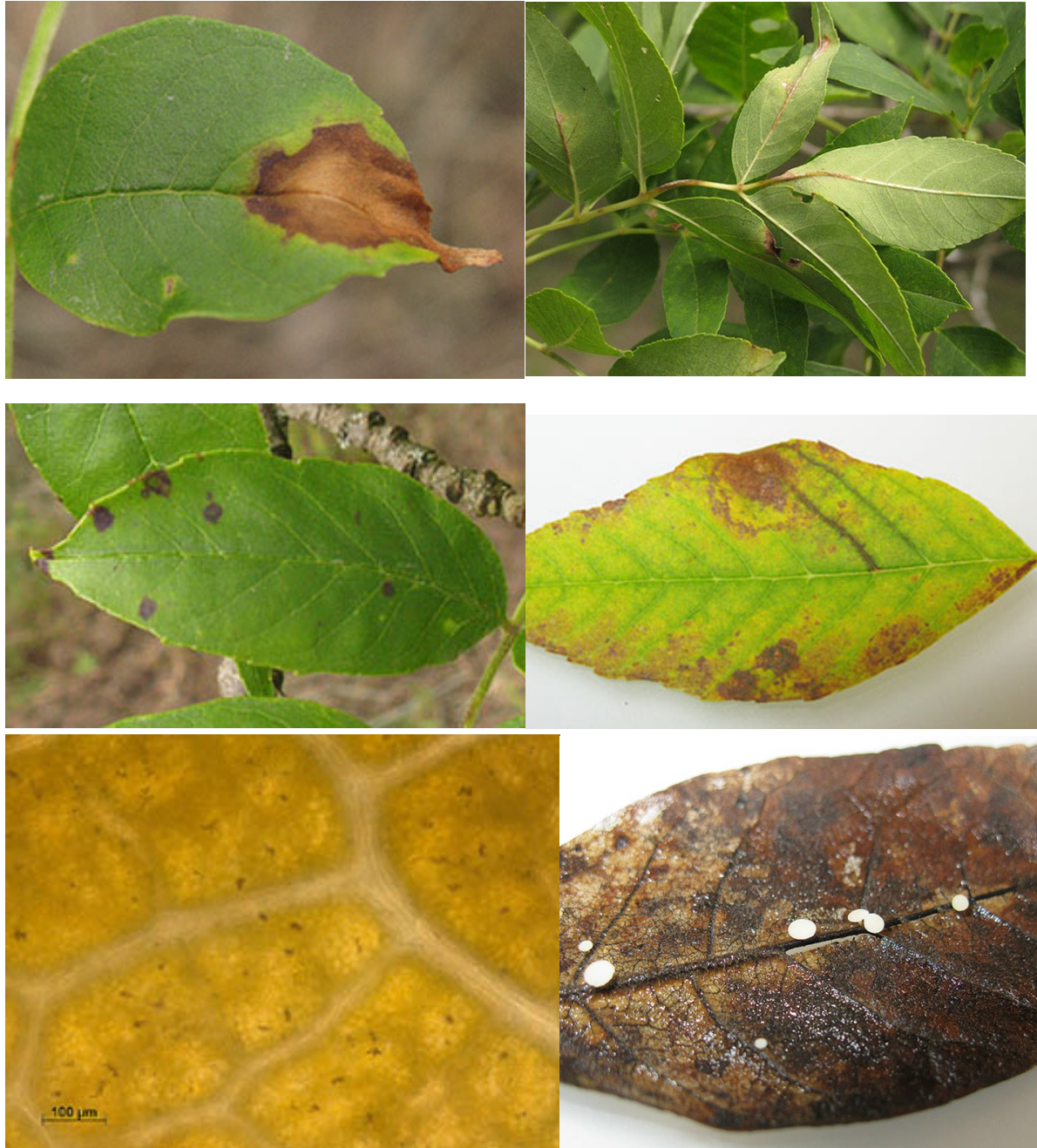


Abb.17: Blattsymptome an *F. velutina*; oben links: hellbraune Nekrose, kein *H. fraxineus* nachweisbar; oben rechts: Deformation der Blätter durch oberflächliche Nekrosen, kein *H. fraxineus* nachweisbar, Mitte links: vermutlich durch *H. fraxineus* verursachte Blattflecke, Erreger jedoch nicht nachweisbar; Mitte rechts: Frühstadium einer Infektion durch *H. fraxineus* mit Adernekrosen (Pilz nachgewiesen); links unten: zersteute Phialiden auf inkubiertem Blatt, rechts unten: Fruchtkörper von *H. fraxineus* in der Streu.

4.4.16 *Fraxinus xanthoxyloides*

Die Art zeigte keine Kronensymptome. Bei im August entnommenen Proben war der Befund negativ (150828.11), am Ende der Vegetationsperiode war *H. fraxineus* jedoch nachweisbar (151013.17-18). Nach Inkubation unter UV wurde häufig eine Infektion der Fruchtflügel durch *H. fraxineus* beobachtet (Abb. 18). Auch die Blätter in der Streu waren stark infiziert (150326.29-30, 48).



Abb.18: Fruchtkörper von *H. fraxineus* auf einem Fruchtflügel von *F. xanthoxyloides*.

4.5 Inokulationsexperimente

Die massive Inokulation von getopften Sämlingen von *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* und *F. excelsior* mit Ascosporen (11.7.2014, 4 Töpfe mit je 1-3 Sämlingen pro Baumart) führte bei allen *F. excelsior* (n=8) innerhalb von 6 Wochen zu zahlreichen kleinen dunklen Blattnekrosen (Abb. 19). Nach etwa 11 Wochen waren mit einer Ausnahme sämtliche Pflanzen vollständig entlaubt. Diese eine 'resistente' Ausnahme-Pflanze wies nur sehr vereinzelte kleinflächige Blattflecken auf (Abb. 19). Aus diesen Blättern wurde (neben verschiedenen anderen Pilzarten wie *Colletotrichum* spp. und *Mycosphaerella coacervata*, 141001.8a) wiederholt *H. fraxineus* isoliert bzw. entwickelte sich nach Inkubation (z.B. 141001.6-7, 141011.1, 141017.9). Die Kontrollpflanzen blieben symptomfrei.

Fraxinus chinensis ssp. *rhynchophylla* zeigte nach der Inokulation keine Unterschiede zu den Kontrollpflanzen. Die seneszenten Blätter waren von verschiedenen Pilzen (vor allem *Colletotrichum acutatum* und anderen *Colletotrichum* -Arten, *Nemania* sp. und *Mycosphaerella* spp.)

besiedelt (140925.1 -141001.3, 141007.1-2). Nach Inkubation unter UV entwickelte sich dominant *Stachybotrys* sp. (141210.3). *Hymenoscyphus fraxineus* konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.



Abb. 19: Ergebnisse des Inokulationsexperimentes an *F. excelsior* und *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* mit Askosporen (Inokulation am 11.7.2014). Oben links: Blattflecke bei *F. excelsior* am 23.8.2015, oben rechts: Symptomfreie *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* am 30.9.2015, unten links: Zustand von *F. excelsior* am 30.9.2015, rechts unten: Die einzige 'resistente' Pflanze von *F. excelsior*, von oben gesehen.

Stamminokulationen mit *H. fraxineus* an getopften Sämlingen von *F. mandshurica* im Labor führten in allen Fällen zu ausgedehnten Nekrosen, die von denen an *F. excelsior* nicht unterscheidbar waren. Dieser - so nicht erwartete - Befund wurde separat publiziert (Gross & Holdenrieder 2015).

5 Diskussion

Im Rahmen des beschriebenen Projektes wurden im Arboretum Aubonne zwei Versuchsflächen mit *F. mandshurica* und *F. platypoda* angelegt. Während der ersten beiden Vegetationsperioden nach der Pflanzung (2014 und 2015) entwickelten sich bei *F. mandshurica* nur sehr wenige Triebnekrosen, bei *F. platypoda* blieben sämtliche Triebe symptomfrei. Der Zuwachs war jedoch vor allem bei *F. mandshurica* sehr variabel und häufig auch sehr gering; einzelne Exemplare erreichten jedoch eine Höhe von über einem Meter (Abb. 4, 5). Zumindest ein Teil der Pflanzen dürfte somit sehr wahrscheinlich längerfristig überleben. Zusammen mit der bereits etablierten Pflanzung von *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* stehen damit drei Bestände asiatischer Eschenarten für die Forschung zur Verfügung, welche in Europa einmalig sind.

Bei den genannten Arten handelt es sich um 20-30 m hohe Bäume, die unter den hiesigen Klimabedingungen sehr wahrscheinlich gut existieren können und deren Holz im Ursprungsgebiet auch genutzt wird (Flora of China 2015). Aus Berlin ist eine *F. platypoda* (Syn.: *F. spaethiana*) mit einer Höhe von 14 m bekannt (www.ddg-web.de). *F. mandshurica* ist sehr wahrscheinlich mit *F. excelsior* kreuzbar. Somit könnten für die Toleranz gegen *H. fraxineus* verantwortliche Gene introgressiv auf *F. excelsior* übertragen werden. *F. mandshurica* ist die einzige Art in der Sektion *Fraxinus*, die aufgrund von Coevolution eine Toleranz gegen den Erreger des Eschentriebsterbens aufweist. Diese Toleranz wurde durch die Beobachtungen im Rahmen des vorliegenden Projektes klar bestätigt. Trotz regelmässiger Infektion der Blätter kam es bei der Mandshurischen Esche - im Gegensatz zu *F. excelsior* - in der Regel zu keinen Triebinfektionen. Ein Inokulationsexperiment (Wundinokulationen am Stamm) unter Laborbedingungen führte jedoch - entgegen der Erwartung - zu ausgedehnten Nekrosen (Gross & Holdenrieder 2015). Das deutet darauf hin, dass die Wirt-Parasit-Interaktion hier sehr subtil reguliert wird (z. B. durch eine wirksame Abwehrreaktion an der Übergangsstelle zwischen Blattstiel und Stamm). In abgestorbenen Trieben war *H. fraxineus* nur sehr selten nachweisbar und der Askomyzet *Phomopsis* (Hauptfruchtform: *Diaporthe*) war dominant vorhanden. Vertreter dieser Artengruppe gelten als Endophyten und opportunistische nekrotrophe Parasiten (Bakys 2013). Möglicherweise ersetzen sie aber auch *H. fraxineus* in den Trieben und breiten sich auch im angrenzenden Wirtsgewebe aus, allerdings meist ohne die ganze Pflanze zum Absterben zu bringen. Die Interaktion von *H. fraxineus* und *Phomopsis* spp. sollte deshalb genauer untersucht werden.

Blattsymptome an *F. mandshurica* werden hier erstmals beschrieben. Im Ursprungsgebiet wurden Blattnekrosen bisher nicht beobachtet (vgl. Gross et al. 2014, Han et al. 2015), was mit einer stärkeren Symptombildung unter den Umweltbedingungen in Europa zusammenhängen könnte. Eine Entwicklung von Phialiden wurde auch auf Blattbereichen beobachtet, die zum Zeitpunkt der Probenahme grün waren. Eine Isolierung aus grünen Blättern gelang jedoch nie. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass der Pilz in vitro sehr konkurrenzschwach ist. Die Beantwortung der Frage, ob *H. fraxineus* als Endophyt auftritt, ist somit nur durch molekulargenetische Untersuchungen (Metabarcoding) möglich (derzeit in Bearbeitung, Dissertation M. Schlegel).

Im Gegensatz zu *F. mandshurica* blieben *F. platypoda* und *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* vollständig befallsfrei. Selbst eine massive Inokulation von *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* mit Askosporen führte zu keiner Infektion (Kap. 4.5). Dieser Befund steht im Gegensatz zu Berichten aus Korea, wo diese Art häufig symptomlos von *H. fraxineus* besiedelt wird (Gross & Han 2015, Han et al. 2015). Möglicherweise gibt es bei *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* Provenienzenunterschiede, welche für diesen Unterschied verantwortlich sind. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen diese Hypothese jedoch nicht: Die im Arboretum gepflanzten Exemplare stammen aus japanischem Saatgut, das Inokulationsexperiment wurde an Sämlingen aus einer Herkunft aus Ostrussland durchgeführt. In beiden Fällen wurde *H. fraxineus* trotz intensiver Suche nicht nachgewiesen.

Die Breitstielige Esche (*F. platypoda*) konnte bisher keiner Sektion zugeordnet werden (Wallander 2012). Die Art ist offensichtlich vollständig resistent gegen *H. fraxineus*, sie wird aber im Ursprungsgebiet von der erst kürzlich entdeckten nahe verwandten und nicht pathogenen Pilzart *H. linearis* infiziert (Gross et al. 2015b).

Der Vergleich der Endophytengemeinschaften von *F. excelsior* und *F. mandshurica* erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Kap. 4.2.3), was die nahe Verwandtschaft dieser beiden Baumarten reflektiert. Bei beiden Arten traten sehr häufig Vertreter der *Xylariaceae* (*Nemania*, *Kretzschmaria*, *Biscogniauxia* u.a.) auf. Auch *Venturia fraxini* war auf beiden Wirten zu finden, während auf *F. ornus* eine separate *Venturia*-Art vorkommt (Ibrahim et al., unpubl.) Diese Befunde sind aber lückenhaft, da sie nur auf Isolierungen basieren und der Nachweis der betreffenden Arten von ihrer Konkurrenzfähigkeit in vitro abhängt. Die derzeit laufende molekulargenetische Untersuchung wird ein vollständigeres Bild liefern. Zudem sind während des Experiments mehrere Versuchspflanzen von *F. excelsior* abgestorben, was zu einem reduzierten Probenumfang 2014 führte und die Sommertrockenheit 2015 schlug sich in deutlich reduzierten Infektionsraten nieder.

Mit einer Askosporeninokulation konnten bei *F. excelsior* zwar Blattinfektionen, aber keine Stamminfektionen erzielt werden. Der Grund dafür war der vorzeitige Abwurf der Blätter. Dieser wurde sehr wahrscheinlich durch den hohen Infektionsdruck ausgelöst, bei zukünftigen Inokulationen sollte deshalb die Sporendichte deutlich reduziert werden. Eine einzige Pflanze von *F. excelsior* entwickelte nur sehr geringe Blattsymptome und behielt die Blätter sehr lange. Der Pilz konnte sich auch hier nicht in den Stamm ausbreiten. In den Blättern dieser 'resistenten' Pflanze wurde neben *H. fraxineus* vor allem *Colletotrichum acutatum* s.l. nachgewiesen.

Bei *F. chinensis* ssp. *rhynchophylla* blieben nach der Inokulation alle Exemplare bezüglich *H. fraxineus* befallsfrei und die Endophytenflora der Blätter wurde ebenfalls von *C. acutatum* s.l. dominiert. Dieser Pilz ist von verschiedenen Substraten als Endophyt und nekrotropher Pflanzenparasit bekannt, u.a. von Gallen von *Dryokosmus kuriphilus* an der Edelkastanie (S. Rosselli, pers. Mitt.) und umfasst mehrere, schwer unterscheidbare Taxa (Damm et al. 2012). Es ist unwahrscheinlich, dass *C. acutatum* das Wachstum von *H. fraxineus* in Eschenblättern beeinflusst, da in vitro kein Effekt nachgewiesen werden konnte (M. Schlegel, unpubl.). Die Chinesische Esche wird in Ostasien von *H. fraxineus* häufig (offenbar symptomlos) besiedelt (Gross et al. 2014, 2015a, Han et al. 2015), die Ursache für den fehlenden Infektionserfolg in Europa nach künstlicher und natürlicher Inokulation bleibt vorerst ungeklärt.

Die Untersuchungen an den übrigen im Arboretum als Einzelexemplare vorhandenen Eschenarten erbrachten ebenfalls neue Befunde, die zum Verständnis der Biologie von *H. fraxineus* und der Anfälligkeit verschiedener Arten bzw. Sorten beitragen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die Epidemie des Eschentriebsterbens in Aubonne erst im Anfangsstadium befindet und der Sommer 2015 ausserordentlich trocken war, was für Blattinfektionen ungünstig ist. Für definitive Schlussfolgerungen sind Beobachtungen über mehrere Jahre notwendig. Trotz dieser Einschränkungen sind folgende Aussagen möglich:

Fraxinus velutina, *F. pauciflora* (Sektion Melioides) und *F. xanthoxyloides* (Sektion Sciadanthus) wurden als neue Wirtsarten für *H. fraxineus* nachgewiesen. Die Infektion verlief hier weitgehend asymptomatisch, die genannten Arten könnten jedoch als Vektoren für das Pathogen dienen. Für die Verbreitung des Pilzes ist das Vorkommen von Fruchtkörpern auf Fruchtblügeln von *F. xanthoxyloides* von Interesse, welches hier erstmals beobachtet wurde. In Saatgut von *F. excelsior* wurde der Pilz bereits molekulargenetisch nachgewiesen, wobei es sich jedoch auch um eine oberflächliche Kontamination durch Sporen handeln könnte (Cleary 2012). Auf Früchten von *F. excelsior*, die am 16.10.2016 in einem stark infizierten Bestand bei Amden gesammelt worden waren, entwickelten sich jedoch nach Stratifikation (4 Mo) und anschliessender Inkubation unter UV-Licht (2 Mo) keine Fruchtkörper (n=255).

Die Schmalblättrige Esche (*F. angustifolia*) gilt als sehr anfällig (Kessler et al. 2012). Dies konnte in unserer Untersuchung aber nicht bestätigt werden. Bei der Sorte 'Raywood' (die vermutlich zur ssp. *oxycarpa* gehört) wurde zwar im Frühjahr 2015 eine starke Besiedlung der Blattstreu beobachtet, aber es wurden im Sommer weder Blattinfektionen noch Triebnekrosen gefunden. In Zürich blieb diese Sorte bisher ebenfalls befallsfrei, obwohl Exemplare von *F. excelsior* in der Umgebung Symptome aufwiesen. Auch an zwei weiteren Exemplaren von *F. angustifolia* ssp. *oxycarpa* und ssp. *syriaca* in Aubonne war *H. fraxineus* nicht nachweisbar, obwohl der Pilz bei anderen Eschenarten am gleichen Standort vorkam und die ssp. *syriaca* in Estland anfällig ist (Drenkhan et al. 2015). Auch verschiedene Sorten von *F. excelsior* blieben im Aboretum Aubonne bislang symptomfrei, z.B. 'Jaspidea' und 'Diversifolia', die als anfällig gelten (Lösing 2013). Die bekanntermassen hochanfällige Sorte 'Pendula' war jedoch am gleichen Standort stark befallen. Es bleibt abzuwarten, ob diese Unterschiede auch in den kommenden Jahren bestehen bleiben. Es ist nicht auszuschliessen, dass einzelne Sorten hochanfälliger Arten Resistenzgene besitzen, welche auf die Ausgangsart übertragen werden könnten. Dies könnte z.B. bei *F. angustifolia* der Fall sein, die wahrscheinlich im Südosten ihres Verbreitungsgebietes mit *F. mandshurica* hybridisiert hat und die gut mit *F. excelsior* kreuzbar sein dürfte (Hinsinger et al. 2013).

Bei mehreren Arten der Sektion Melioides (*F. americana*, *F. latifolia*, *F. pennsylvanica*) war der Erreger des Eschentriebsterbens in Aubonne nicht nachweisbar. Die Resistenz bzw. hohe Toleranz von Arten dieser Sektion unter Freilandbedingungen wurde auch in Deutschland (Lösing 2013), Estland (Drenkhan & Hanso 2010) und Polen (Kowalski et al. 2015) beobachtet. Im Laborversuch (nach Wundinokulation am Stamm) war *F. pennsylvanica* zwar weniger anfällig als *F. excelsior*, entwickelte aber doch häufig Stammnekrosen (Gross & Sieber 2015). Für eine Beurteilung der Resistenz bzw. Toleranz verschiedener Eschenarten sind deshalb Beobachtungen unter Freilandbedingungen unverzichtbar.

6 Literatur

Bakys, R. (2013): Dieback of *Fraxinus excelsior* in the Baltic Sea Region. Associated fungi, their pathogenicity and implications for silviculture. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Cleary MR, Arhipova N, Gaitnieks T, Stenlid J, Vasaitis R (2013): Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*. Forest Pathology 43: 83-85.

Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW (2012): The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37-113.

Flora of China, http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10625 (konsultiert am 19.11.2015).

Drenkhan R, Hanso M (2010): New host species for *Chalara fraxinea*. *New Disease Reports* 22, 16 [doi:10.5197/j.2044-0588.2010.022.016]

Drenkhan R, Adamson K, Hanso M (2014): *Fraxinus sogdiana*, a Central Asian ash species, is susceptible to *Hymenoscyphus fraxineus*: *Plant Protection Science* 51 (3): 150-1532.

Gross A, Holdenrieder O, Pautasso M, Queloz V, Sieber TN (2014). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of ash dieback. *Molecular Plant Pathology* 15 (1): 5-21.

Gross A, Han J (2015) *Hymenoscyphus fraxineus* and two new *Hymenoscyphus* species identified in Korea. *Mycological Progress* 14: 19, doi 10.1007/s11557-015-1035-1

Gross A, Holdenrieder O (2015): Pathogenicity of *Hymenoscyphus fraxineus* and *H. albidus* towards *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *Forest Pathology* 45: 172-174.

Gross A, Hosoya T, Queloz V (2015a): Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Molecular Ecology* 23: 2943-2960.

Gross A, Hosoya T, Zhao YJ, Baral HO (2015b): *Hymenoscyphus linearis* sp. nov: another close relative of the ash dieback pathogen *H. fraxineus*. *Mycol. Progress* 14: 20.

Gross A, Sieber TN (2015): Virulence of *Hymenoscyphus albidus* and native and introduced *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus pennsylvanica*. *Plant Pathology* (in press) doi: 10.1111/ppa.12450

Han JG, Shrestha B, Hosoya T, Lee KH, Sung GH, Shin HD (2015): First report of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in Korea. *Mycobiology* 42(4): 391-396.

Hinsinger DD, Basak J, Gaudeul M, Cruaud C, Bertolino P, Frascaria-Lacoste N, et al. (2013) The Phylogeny and Biogeographic History of Ashes (*Fraxinus*, Oleaceae) Highlight the Roles of Migration and

Vicariance in the Diversification of Temperate Trees. PLoS ONE 8(11): e80431.
doi:10.1371/journal.pone.0080431

Ibrahim M (2104): Diversität endophytischer Blatt-Pilze auf *Fraxinus ornus*. Masterarbeit. ETH Zürich.

Kessler M, Cech TL, Brandstetter M, Kirists T (2012): Dieback of ash (*Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*) in Eastern Austria: Disease development on monitoring plots from 2007-2010. J. of Agricultural Extension and Rural Development 4(9): 223-226.

Kowalski T, Bilanski P, Holdenrieder O (2015): Virulence of *Hymenoscyphus albidus* and *H. fraxineus* on *Fraxinus excelsior* and *F. pennsylvanica*. PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0141592

Leach CM (1971): A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. In: Booth C (ed) Methods in Microbiology, vol. 4. Academic Press, London, pp. 609-664.

Lösing H (2013) Susceptibility of *Fraxinus* species to ash dieback caused by *Chalara fraxinea*. Acta Horticulturae 1014: 201-203.

Meier S (2015) : Menace sur le frêne commun. Bulletin Arboretum du vallon de l'Aubonne, pp. 24-25
Oksanen J, F., Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, PSolymos P, Stevens MHH, Wagner H (2015): vegan: Community Ecology Package. R package version 2.2-1.
<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>

R Core Team (2014): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Wallander E (2008): Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. Plant Syst. Evol. 273: 25--49.

Wallander E (2012): Systematics and floral evolution in *Fraxinus* (Oleaceae). Belgische Dendrologie Belge 2012: 39-58.