

Hymenoscyphus albidus besitzt kein Chalara-Stadium

Thomas Kirisits und Katharina Kräutler

Abstract

Hymenoscyphus albidus does not have a Chalara stage

Examination of isolates of *Hymenoscyphus albidus* from France revealed that this fungus does not form a *Chalara* state or any other anamorphic stage. This is in contrast to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, whose *Chalara fraxinea* stage is formed in culture and has also been observed in the field. The lack of an asexual stage in *H. albidus* or its presence in *H. pseudoalbidus* is the most conspicuous morphological difference between these two similar ascomycete fungi and appears to be consistent with their different reproductive modes.

Keywords |

Hymenoscyphus pseudoalbidus, *Chalara fraxinea*, *Fraxinus excelsior*, anamorph, ash dieback

Kurzfassung | Bei der Untersuchung von Isolaten des Weißen Stengelbecherchens (*Hymenoscyphus albidus*) aus Frankreich wurde festgestellt, dass dieser Pilz kein *Chalara*-Stadium oder eine andere Nebenfruchtform ausbildet. Der Eschentriebsterben-Erreger *Hymenoscyphus pseudoalbidus* ist dagegen mit einem asexuellen Stadium (*Chalara fraxinea*) assoziiert, das in Kultur gebildet wird und auch im Freiland beobachtet wurde. Das Fehlen eines Anamorphs bei *H. albidus* bzw. dessen Vorhandensein bei *H. pseudoalbidus* ist das auffälligste morphologische Unterscheidungsmerkmal zwischen diesen beiden ähnlichen Schlauchpilzen und dies scheint gut mit deren unterschiedlichen Fortpflanzungssystemen übereinzustimmen.

Schlüsselworte | *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, *Chalara fraxinea*, *Fraxinus excelsior*, Anamorph, Eschentriebsterben

H*ymenoscyphus albidus* (Weißes Stengelbecherchen) und *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Falsches Weißes Stengelbecherchen) sind morphologisch nahezu identisch aussehende Schlauchpilze, die auf Eschenblattstielen und -spindeln in der Bodenstreu schwarze Pseudosklerotien ausbilden, auf denen sich während der Vegetationszeit weiße, schüsselförmige Fruchtkörper (Apothecien) entwickeln (Abbildung 1; Kirisits und Cech 2009, Kowalski und Holdenrieder 2009b, Solheim et al. 2011). Das in Europa schon seit 1850 bekannte Weiße Stengelbecherchen ist kein Krankheitserreger, sondern ein Saprobiont an und möglicherweise auch ein Endophyt in Eschenblättern (Husson et al. 2011, Queloz et al. 2011). Das Falsche Weiße Stengelbecherchen ist dagegen ein aggressives Baumpathogen und der Erreger des Eschentriebsterbens (Kowalski und Holdenrieder 2009a, Husson et al. 2011, Queloz et al. 2011).

Queloz et al. (2011) bestimmten zwei Herbarbelege, die 1978 und 1987 in der Schweiz gesammelt worden waren, mit-

hilfe molekulargenetischer Methoden als *H. pseudoalbidus*. Dieser Befund war rätselhaft, da das Eschentriebsterben vor den 1990er-Jahren nicht in Europa bekannt war und erst seit 2007 in der Schweiz auftritt. Bei einer neuerlichen Untersuchung der beiden Herbarbelege wurden diese als *H. albidus* identifiziert und die Ergebnisse von Queloz et al. (2011) korrigiert (Queloz et al. 2012). Es gibt somit keine Hinweise darauf, dass *H. pseudoalbidus* vor 1992, als das Eschentriebsterben erstmals auffällig wurde, in Europa vorkam. Die ersten eindeutigen Nachweise dieser Art in Europa (als *Chalara fraxinea*) stammen aus dem Jahr 2000 (Kowalski 2006). Das plötzliche, sukzessive Auftreten des Eschentriebsterbens in weiten Teilen Europas, ausgehend von Polen, und die überall zu beobachtende hohe Krankheitsintensität lassen vermuten, dass *H. pseudoalbidus* eine in Europa nicht heimische, invasive Art ist (Husson et al. 2011, Queloz et al. 2011, Timmermann et al. 2011).

Kleine morphologische Unterschiede

H. albidus und *H. pseudoalbidus* können in erster Linie aufgrund von DNA-Sequenzvergleichen von fünf verschiedenen nuklearen Genregionen, beispielsweise ITS rDNA, und mit ISSR-PCR (inter-simple sequence repeat anchored PCR) Fingerprinting unterschieden werden (Husson et al. 2011, Queloz et al. 2011). Die Trennung der beiden Arten wird auch durch AP-PCR (arbitrary primed PCR) und Mikrosatelliten-Analysen unterstützt (Bengtsson et al. 2012, Gross et al. 2012a). Aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen ist auszuschließen, dass sich *H. pseudoalbidus* aus *H. albidus* entwickelte, und es gibt keine Hinweise, dass die beiden Arten miteinander hybridisieren (Husson et al. 2011, Queloz et al. 2011, Bengtsson et al. 2012, Gross et al. 2012a).

Morphologisch sind die beiden Pilze nahezu identisch. *H. pseudoalbidus* tendiert dazu, größere Fruchtkörper auszubilden und dessen Ascosporen sind im Durchschnitt länger als jene von *H. albidus* (Kirisits und Cech 2009, Kowalski und Holdenrieder 2009b, Queloz et al. 2011, Solheim et al. 2011). Da sich die Dimensionen der Ascosporen und der Fruchtkörper überlappen, ist aber eine eindeutige Artbestimmung aufgrund dieser oder anderer Merkmale des sexuellen Stadiums nicht möglich.

Zusätzlich zu seinem sexuellen Stadium besitzt *H. pseudoalbidus* ein asexuelles Stadium, das als *Chalara fraxinea* beschrieben wurde (Kowalski 2006). Diese Form des Pilzes wurde zuerst entdeckt, weshalb der Eschentriebsterben-Erreger häufig noch immer unter dem Namen seiner Nebenfruchtform bekannt ist. Das *Chalara*-Stadium von *H. pseudoalbidus* wird

regelmäßig in Kulturen des Pilzes gebildet (Abbildung 2a-c; Kowalski 2006, Kirisits et al. 2008) und wurde in Polen (Kowalski und Bartnik 2010) und Österreich (Abbildung 2d-e; Kirisits et al. 2009) im Herbst bei kühlen Temperaturen auf Eschenblattspindeln in der Bodenstreu beobachtet. Es tritt vereinzelt auch an abgestorbenen Eschenstämmchen auf (Kowalski und Holdenrieder 2009a). Bisher gibt es keine Berichte, ob *H. albidus* ebenso wie *H. pseudoalbidus* ein asexuelles Stadium ausbildet.

Untersuchung von Kulturen von *Hymenoscyphus albidus*

In Österreich wurde das Weiße Stengelbecherchen, von dem es einzelne frühere Nachweise gibt (Kirisits und Cech 2009), seit dem Auftreten des Eschentriebsterbens nicht mehr beobachtet. Allerdings wurde *H. albidus* Ende Juli 2012 unter bachbegleitenden Eschen an einem Standort nahe Carnac (47°37'25.6" N, 03°04'20.6" W) im Süden der Bretagne (Frankreich), wo die Krankheit zum damaligen Zeitpunkt noch nicht vorkam, gefunden (Abbildung 1). Insgesamt wurden 17 Stämme des Pilzes von diesem Standort, jeweils von einer anderen Blattspindel, isoliert. Die Isolate wurden auf Malzextraktagar (MEA; 20 g Malzextrakt, 16 g Agar, 1000 ml Leitungswasser) und auf Eschenblatt-Malz-

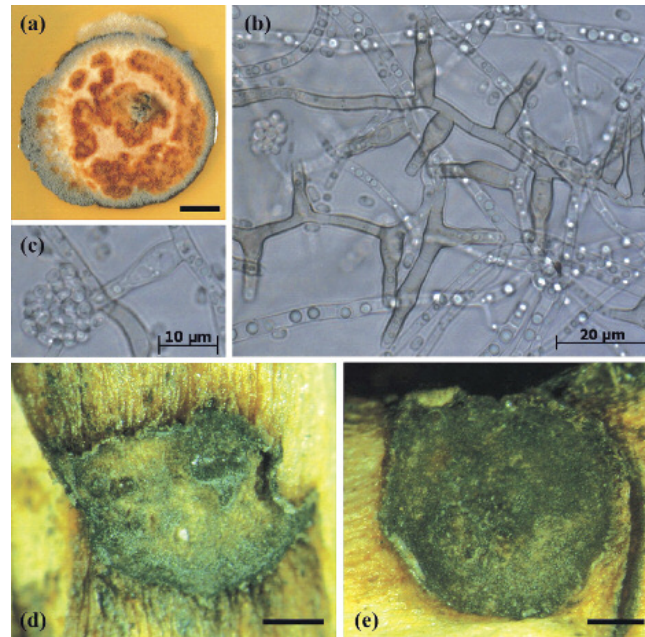


Abbildung 1: Eschenblattspindeln aus der Bodenstreu mit schwarzen Pseudosklerotien und Apothecien von *Hymenoscyphus albidus* (nahe Carnac, Bretagne, Frankreich, 27. und 31.07.2012). Die Scheibchen der größten Apothecien haben einen Durchmesser von zirka 3 mm (oberes Bild) und 5 mm (unteres Bild).

Figure 1: Ash leaf rachises from the leaf litter with black pseudosclerotia and apothecia of *Hymenoscyphus albidus* (near Carnac, Brittany, France, 27. and 31.07.2012). The disc flats of the largest apothecia have a diameter of approximately 3 mm (upper image) and 5 mm (lower image).

Abbildung 2: *Chalara fraxinea*-Stadium von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in Kultur (a-c) und an Eschenblattspindeln im Freiland (d-e): (a) Zuerst bei Raumtemperatur (3 Wochen) und anschließend bei 4 °C (6 Wochen) inkubierte, am Rand intensive sporulierende (graue Bereiche!) Kultur, Balken = 5 mm; (b) Phialophoren und Sporen; (c) Phialophore mit klebrigem Sporentropfen; (d) und (e) Phialophoren an Blättchen-Abbruchnarben von Eschenblattspindeln aus des Bodenstreu (Wien-Sofienalpe, 24.11.2008), Balken = 0,5 mm.

Figure 2: *Chalara fraxinea* stage of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in culture (a-c) and on ash leaf rachises in the field (d-e): (a) Fungal culture first incubated at room temperature (3 weeks) and then at 4 °C (6 weeks) showing intensive sporulation at its margin (grey areas!), bar = 5 mm; (b) Phialophores and spores; (c) Phialophore with slimy spore droplet; (d) and (e) Phialophores on abscission scars of leaflets on leaf rachises from the leaf litter (Vienna-Sofienalpe, 24.11.2008), bars = 0.5 mm.



extraktagar (EMEA; so wie MEA, aber zusätzlich mit 50 g frischen oder gefrorenen Eschenblättchen [wurden nach dem Autoklavieren im Zuge des Ausgießens vom Nährmedium getrennt]; siehe auch Gross et al. 2012b) bei Raumtemperatur und diffusem Tageslicht sowie bei 20 °C in Dunkelheit inkubiert. Zusätzlich wurden manche Kulturen nach dem Anwachsen (bei Raumtemperatur oder 20 °C) bei niedrigen Temperaturen (ca. 6-8 °C) in Dunkelheit inkubiert. Die Isolate wurden in unregelmäßigen Abständen innerhalb von drei Monaten auf das Auftreten von asexuellen Strukturen kontrolliert.

***H. albidus* besitzt kein asexuelles Stadium**

Isolate von *H. albidus* sind auf MEA langsamwüchsig (Abbildung 3a-c), noch langsamwüchsiger als jene von *H. pseudoalbidus* (Kirisits et al. 2008, Kowalski und Bartnik 2010). Auf EMEA wächst *H. albidus* wie auch *H. pseudoalbidus* dagegen deutlich schneller als auf MEA (Abbildung 3c-d). Auf MEA bildet *H. albidus* braune, graue oder schwarze, kompakte, pseudoparenchymatische Strukturen aus; der Rand der Kulturen bleibt häufig hell oder es kann sich ein weißes bis

hellbraunes Luftmycel entwickeln (Abbildung 3a-c). Dunkle pseudoparenchymatische Strukturen werden auch auf EMEA regelmäßig gebildet, diese nehmen oft beträchtliche Teile der Kulturen ein (Abbildung 3d). Die Luftmycelbildung ist auf EMEA intensiver als auf MEA und es treten, ähnlich wie bei *H. pseudoalbidus*, weiße, hellbraune und/oder orange-braune Farbtöne in den Kulturen auf (Abbildung 3d).

Trotz intensiver Suche wurde in den Isolate von

H. albidus aus Frankreich niemals ein asexuelles Stadium beobachtet, weder auf MEA noch auf EMEA und ungeachtet dessen, unter welchen Bedingungen die Isolate inkubiert worden waren. Bei *H. pseudoalbidus* wird die Bildung von Phialophoren des *Chalara fraxinea*-Stadiums durch niedrige Temperaturen stark gefördert (Abbildung 2a; Kirisits et al. 2008, 2009; Kowalski und Bartnik 2010), ebenso stimuliert EMEA die Sporulation. In Kulturen von *H. albidus* kam es jedoch weder auf EMEA noch nach der Inkubation bei niedrigen Temperaturen zur Entwicklung asexueller Strukturen. Im Gegensatz zu *H. pseudoalbidus* dürfte *H. albidus* in Kultur kein *Chalara*-Stadium oder eine andere Nebenfruchtform ausbilden. Da sich die beiden Pilze in den Merkmalen ihres sexuellen Stadiums so sehr ähneln (Kowalski und Holdenrieder 2009b, Queloz et al. 2011, Solheim et al. 2011), ist das Fehlen eines asexuellen Stadiums bei *H. albidus* bzw. dessen Vorhandensein bei *H. pseudoalbidus*, abgesehen von Unterschieden in der Kulturmorphologie, vor allem auf MEA (Abbildung 2a-c), das auffälligste morphologische Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Arten. Dieses Merkmal ist allerdings von geringer

praktischer Bedeutung für die Artbestimmung, die in erster Linie mithilfe genetischer Marker erfolgt (Husson et al. 2011, Queloz et al. 2011).

Übereinstimmung mit den Fortpflanzungssystemen der beiden Pilze

Die Sporen des *Chalara fraxinea*-Stadiums von *H. pseudoalbidus* keimen nicht auf verschiedenen künstlichen Nährböden und auf abgetrennten Eschenblättchen, ebenso traten nach künstlicher Inokulation von Eschenrieben und -blättern mit Sporen keine Krankheitssymptome auf (Kirisits et al. 2009). Es wurde daher vermutet, dass die asexuell gebildeten Sporen des Eschentriebsterben-Erregers nicht infektiös sind und möglicherweise als Spermastien eine Befruchtungsfunktion bei der sexuellen Vermehrung von *H. pseudoalbidus* erfüllen (Kirisits et al. 2009).

Vor kurzem wurden die Fortpflanzungssysteme von *H. albidus* und *H. pseudoalbidus* geklärt (Gross et al. 2012b). *H. pseudoalbidus* ist **heterothallisch**: Zur Apothecien- und Ascosporenbildung kommt es nur nach Kreuzung der beiden Paarungstypen des Pilzes, wobei die Befruchtung der Ascogonien sehr wahrscheinlich durch die als Spermastien fungierenden asexuell gebildeten Sporen des *Chalara fraxinea*-Stadiums erfolgt (Befruchtungstyp: Spermatiogamie) (Gross et al. 2012b). Im Gegensatz dazu ist *H. albidus* **homothallisch**: Ein einzelnes Individuum des Pilzes kann durch Selbstbefruchtung Apothecien und Ascosporen bilden (Gross et al. 2012b). Wenn man davon ausgeht, dass die *Chalara*-Sporen von *H. pseudoalbi-*

us als Spermastien fungieren, so stimmt das Fehlen eines asexuellen Stadiums bei *H. albidus* gut mit dessen homothallischem Fortpflanzungssystem überein, bei dem eine Kreuzung zweier Paarungstypen zur Fruchtkörperbildung nicht erforderlich ist. Insgesamt bestätigen die hier mitgeteilten Beobachtungen hinsichtlich des Vorhandenseins oder Fehlens asexueller Strukturen molekulargenetische, pathologische und ökologische Befunde (Husson et al. 2011, Queloz et al. 2011, Bengtsson et al. 2012, Gross et al. 2012a, 2012b), die zeigen, dass sich *H. albidus* und *H. pseudoalbidus* in vielen Merkmalen grundsätzlich voneinander unterscheiden, viel mehr, als man aufgrund der großen morphologischen Ähnlichkeit ihrer sexuellen Stadien vermuten würde.

Bei einem heterothallischen Schlauchpilz wie *H. pseudoalbidus* kommt es in jeder Generation zur Rekombination des Erbmaterials, was ein hohes Anpassungspotenzial an den Wirt sowie an unterschiedliche Umweltbedingungen und insgesamt eine hohe pathogene Fitness sicherstellen sollte (Bengtsson et al. 2012). Obwohl bei einer homothallischen Art auch Kreuzungen mit anderen Individuen vorkommen können,

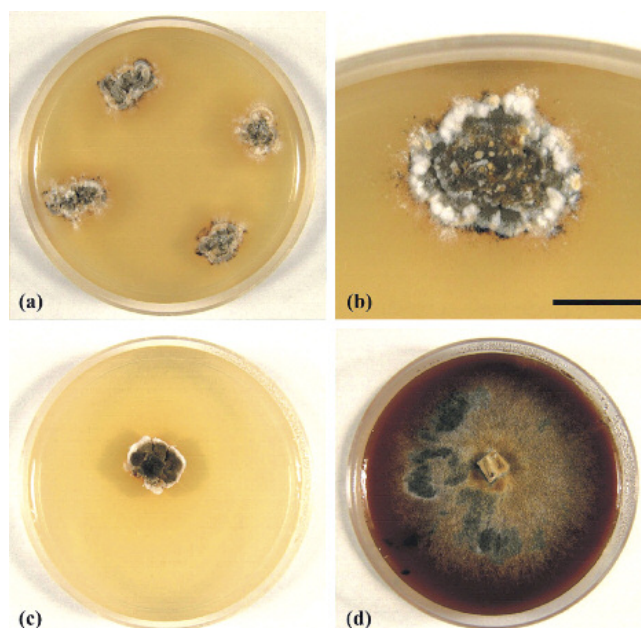



Abbildung 3: Kulturen von *Hymenoscyphus albidus* auf Malzextraktagar (MEA) oder Eschenblatt-Malzextraktagar (EMEA) in 5,2-cm-Petrischalen: (a) 90 Tage alte Primärabimpfungen (auf MEA) von einer Eschenblattspindel aus der Bodenstreu; (b) Detailaufnahme einer 80 Tage alten Primärabimpfung (auf MEA), Balken = 5 mm; (c) und (d) 43 Tage alte, bei 20 °C und Dunkelheit inkubierte Reinkulturen auf MEA (c) und EMEA (d).

Figure 3: Cultures of *Hymenoscyphus albidus* (near Carnac, Brittany, France) on malt extract agar (MEA) or ash leaf malt extract agar (EMEA) in 5.2-cm-diameter Petri dishes: (a) 90-day-old primary isolations (onto MEA) from an ash leaf rachis in the leaf litter; (b) Detailed view of a 80-day-old primary isolation (onto MEA), bar = 5 mm; (c) and (d) 43-day-old pure cultures, incubated at 20 °C and darkness on MEA (c) and EMEA (d).

wäre zu erwarten, dass Populationen von *H. albidus* aufgrund von Selbstbefruchtung eine relativ geringe genetische Vielfalt aufweisen, worauf auch die Untersuchungen von Bengtsson et al. (2012) hinweisen. Die Aggressivität von *H. pseudoalbidus* kann aber in erster Linie dadurch erklärt werden, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen gebietsfremden, invasiven Pilz handelt, gegen den die Esche aufgrund fehlender Koevolution keine Resistenzmechanismen entwickelt hat.

Danksagung

Die Forschungsarbeiten über das Eschentriebsterben werden vom 7. Forschungs-

rahmenprogramm der Europäischen Union (FP7/2007-2012, KBBE 2009-3), Vertragsnummer 245268 (ISEFOR, Increasing Sustainability of European Forests: Modelling for Security Against Invasive Pests and Pathogens under Climate Change), vom Lebensministerium (Forschungsprojekt Nr. 100343, BMLFUW-LE.3.2.3/0001-IV/2/2008), von den Landesregierungen von Niederösterreich, der Steiermark, von Kärnten, Oberösterreich, Salzburg und des Burgenlandes, vom Forstamt der Stadt Wien (MA 49), von der Österreichischen Bundesforste AG und der COST Aktion FP1103 (FRAXBACK) finanziell unterstützt. 

Literatur

Bengtsson, S. B. K., Vasaitis, R., Kirisits, T., Solheim, H., Stenlid, J. 2012: Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*. *Fungal Ecology*, 5: 147-153.

Gross, A., Grünig, C. R., Queloz, V., Holdenrieder, O. 2012a: A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology*, 42: 252-264.

Gross, A., Zaffarano, P. L., Duo, A., Grünig, C. R. 2012b: Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genetics and Biology*, in Druck.

Husson, C., Scala, B., Caël, O., Frey, P., Feau, N., Marçais, B. 2011: *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 311-324.

Kirisits, T., Cech, T. L. 2009: Beobachtungen zum sexuellen Stadium des Eschentriebsterben-Erregers *Chalara fraxinea* in Österreich. *Forstschutz Aktuell*, Wien, (48): 21-25.

Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmschlager, E. 2008: Verursacht *Chalara fraxinea* das Zurücksterben der Esche in Österreich? *Forstschutz Aktuell*, Wien, (43): 29-34.

Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Cech, T. L., Halmschlager, E. 2009: The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria. In: Doğmuş-Lehtijärvi, T. (ed.): Proceedings of the conference of IUFRO working party 7.02.02, Eğirdir, Turkey, 11-16 May 2009. SDU Faculty of

Forestry Journal, ISSN: 1302-7085, Serial: A, Special Issue: 97-119.

Kowalski, T. 2006: *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology*, 36: 264-270.

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*, 39: 304-308.

Kowalski, T., Bartnik, C. 2010: Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. *Acta Agrobotanica*, 63: 99-106.

Queloz, V., Grünig, C., Berndt, R., Kowalski, T., Sieber, T. N., Holdenrieder, O. 2011: Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*, 41: 133-142 (Corrigendum: 2012, *Forest Pathology*, 42: 352).

Solheim, H., Timmermann, V., Børja, I., Hietala A. M. 2011: En liten ascosporesopp, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, truer aska i Europa [Ein kleiner Ascomycet, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, gefährdet die Esche in Europa]. *Agarica*, 30: 82-88.

Timmermann, V., Børja, I., Hietala, A. M., Kirisits, T., Solheim, H. 2011: Ash dieback: Pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *Bulletin OEPP/Eppo Bulletin*, 41: 14-20

Priv. Doz. DI Dr. Thomas Kirisits und Mag. Katharina Kräutler, Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz (IFFF), Department für Wald- und Bodenwissenschaften, Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Hasenauerstraße 38, 1190 Wien, Tel. +43-1-3682433, E-Mail: thomas.kirisits@boku.ac.at, katharina.kraeutler@boku.ac.at