

# Ash Dieback – Situation in Bavaria and Germany

JÖRG SCHUMACHER, SINDY LEONHARD, LUDWIG STRASSER AND ROLF KEHR

## Abstract

Ash dieback is currently one of the most important tree diseases in Germany. A countrywide distribution is already ascertained. *Fraxinus excelsior* and *F. angustifolia* of all ages and on various site types are affected in forests, in open landscape as well as in nurseries and urban plantings. The impact of damage still varies with a decreasing tendency from northern to southern regions. Significant economic losses were especially reported in nurseries and forests of Northern Germany. The article presents an overview of the situation in Bavaria based on preliminary data from an ongoing research project started in 2008 as well as results of a recent nursery investigation in Northern Germany. In a large number of three-year-old ash saplings the infection rate, invasion and spreading strategy of the pathogen inside of plant tissues were studied. Additionally, the role of soil-borne Oomycetes as possible primary or accompanying organisms in the disease process were examined. The results confirm the dominant role of *Chalara fraxinea* (teleomorph: *Hymenoscyphus albidus*) and rule out the role of pathogenic Oomycetes. The authors conclude that the fungus is able to spread very effectively in woody tissue as a parasite and does not originate from the root system.

**Keywords** | ash dieback, *Chalara fraxinea*, *Phytophthora* spp., invasion model

## Kurzfasung

### Eschentriebsterben – Situation in Bayern und Deutschland

Das Eschentriebsterben ist gegenwärtig eine der bedeutendsten Baumkrankheiten in Deutschland. Obwohl die Erkrankung bundesweit nachgewiesen ist, bestehen zwischen dem Norden und Süden deutliche Unterschiede im Schädigungsgrad. Die größten ökonomischen Schäden wurden bislang in der Forst- und Baumschulwirtschaft Norddeutschlands festgestellt. Von der Krankheit betroffen sind Eschen (*F. excelsior*, *F. angustifolia*) jeden Alters und auf unterschiedlichen Standorten im Wald, beim Landschaftsgehölz sowie im städtischen Grün. Der Artikel gibt einen Überblick zur aktuellen Situation in Bayern anhand rezenter Daten eines im Jahr 2008 begonnenen Forschungsprojektes und enthält neueste Ergebnisse aus einer Baumschuluntersuchung in Norddeutschland. Anhand dreijähriger Eschenpflanzen wurde die Infektionsrate und Ausbreitungsstrategie des Erregers im Pflanzengewebe sowie die mögliche Bedeutung bodenbürtiger Oomyceten untersucht. Die Ergebnisse bestätigen *Chalara fraxinea* (Teleomorphe: *Hymenoscyphus albidus*) als Haupterreger der Erkrankung und falsifizieren zugleich eine primäre Rolle pilzähnlicher Mikroorganismen im Krankheitsprozess. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass sich der Erreger verholzte Gewebe effektiv erschließt und die Primärinfektion oberirdisch erfolgt.

**Schlüsselwörter** | Eschentriebsterben, *Chalara fraxinea*, *Phytophthora* spp., Invasionsmodell

## General situation and further investigations

Conspicuous symptoms of the disease have been observed in Germany at least since the year 2002. The causal agent was then confirmed for Germany (Schumacher et al. 2007) and for Bavaria (Leonhard et al. 2009) after the description of the recently found hyphomycete *Chalara fraxinea* by Kowalski (2006). So far, noteworthy economical loss was established especially on nursery saplings and young plantations but damage to older stands is increasing.

In Bavaria, the first survey in 2008 according to 182 requested announcements yielded 18 % of returns with distinct symptoms of which 71 % were subsequently confirmed as infected by *C. fraxinea*. In contrast, in all 24 stands with different site conditions selected for the Bavarian research project both typical

symptoms and positive findings for the fungus could be found. In the Free State Bavaria the mostly infested geographical region is still the south-east even though symptoms and damage have been established in all sites with ash trees. An interesting outcome of the Bavarian project was the high agreement regarding the occurrence of the fungus between old assessed data (fruit-bodies of *H. albidus*) by Kriegelsteiner (1993) and recent results (isolations of *C. fraxinea*) by the research project.

In Northern Germany an investigation (cf. Schumacher et al. 2009, 2010) was carried out with 300 coeval nursery saplings in order to quantify the infection rate in different plant tissues and subcategory organs. Ten different *C. fraxinea* cultures were selected to check whether the fungus produces extracellular

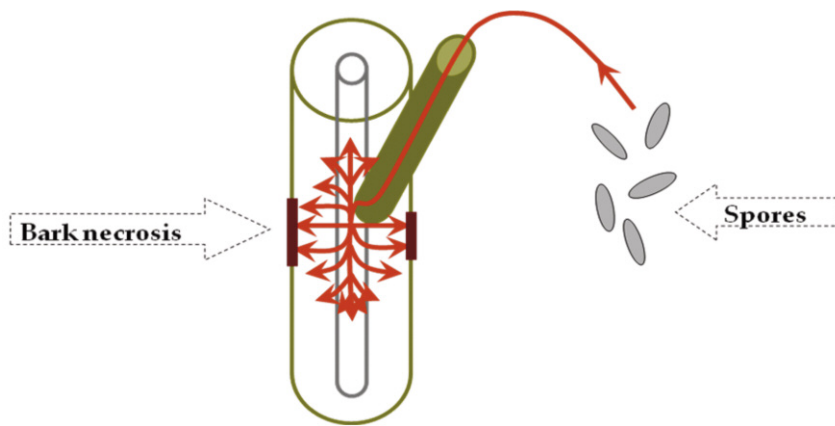


Figure 1: Probable way of invasion and spread of *Chalara fraxinea* in living ash trees.

Abbildung 1: Wahrscheinliche Eintritts- und Ausbreitungswege von *Chalara fraxinea* in einer lebenden Esche.

oxidases. Symptoms were assessed by measuring necrotic bark lesions and discolored wood.

Histological studies were processed by sectioning infected samples with a microtome in radial, tangential and longitudinal planes. In order to accentuate plant cell cytoplasm and fungal mycelium, sections were stained with aniline blue in lactic acid before microscopy. The involvement of Oomycetes in the disease process was verified by flooding saplings in large plastic tubs and by successive isolation of the pathogens with organic baits. In addition, serological proof (DAS-ELISA) based on zoospores was carried out by taking water samples. The extinction level was determined on microtiter plates with a photometer.

In 95 % of all nursery plants, *C. fraxinea* was isolated from symptomatic tissue. The fungus was present at a much higher rate in outer and inner sapwood than in the roots and stem bark. *C. fraxinea* was not isolated from asymptomatic tissue.

The differences between infection rates of root or bark and sapwood were highly significant. Whereas almost half of all positive findings of *C. fraxinea* originated solely in the stem, the fungus was not isolated once solely from the root of a sample tree. Therefore, *C. fraxinea* has no or only limited endophytic abilities and its pathogenesis is evidently induced in above-ground plant organs.

The results of the measurements showed significant correlation between bark necroses and discolored sapwood. Firstly, the size of bark necroses increased with the length of sapwood discoloration. Secondly, the length of sapwood discoloration is generally larger than the corresponding bark necrosis. Light microscopy of histological sections showed that hyphae were

observed especially in the axial and paratracheal ray tissue containing primary metabolites (e.g. starch and fatty substances). Many hyphae were found in the radial parenchyma of the wood rays from the pith to the phloem. In axial direction, hyphae were observed mainly in the vessels, in the paratracheal parenchyma and in the pith. Tissue with intense discoloration also showed increasing amounts of hyphae in the fibre cells and in the phloem. Passage of hyphae from cell to cell mainly occurs through pits, apparently through mechanical pressure. This information leads to the presumed invasion model that the fungus initially invades the pith and vessels via the ray parenchyma where growth is fastest and subsequently outward towards the cambium and phloem triggering the colonization of secondary fungi in necrotic bark (e.g. Cech 2006a, 2006b, 2006c; Bakys et al. 2008; Kowalski and Holdenrieder 2008).

The investigations concerning the role of soil-born Oomycetes lead to the conclusion that the involvement of such pathogenic micro-organisms in the disease process can be ruled out. Neither the baiting tests nor the serological proof showed any signs of *Phytophthora* infections.

The test for extracellular oxidases with different geographic isolates showed a positive reaction for all strains on guajacol agar, but only for three isolates on tannin agar. The ability to degrade wood is not uncommon among Ascomycetes which are involved in natural pruning (Butin and Kowalski 1992). Fruiting of the teleomorph on petioles and shoots (Kowalski and Holdenrieder 2009) indicate that the fungus may originally belong to this ecological group.

## Allgemeine Situation und weiterführende Studien

Auffällige Krankheitssymptome werden in Deutschland spätestens seit dem Jahr 2002 beobachtet. *C. fraxinea* wurde für Deutschland erstmalig im Jahr 2006 (Schumacher et al. 2007) und für Bayern im Jahr 2008 (Leonhard et al. 2009) nachgewiesen, nachdem der durch Kowalski (2006) neu entdeckte Hyphomycet beschrieben worden war.

Die größten ökonomischen Verluste sind bislang in Baumschulen und jungen Anpflanzungen zu beklagen; die Schäden in älteren Waldbeständen nehmen jedoch deutlich zu.

In Bayern ergab eine erste Erhebung im Jahr 2008, dass 18 % der Eschenbestände typische Symptome der neuartigen Erkrankung aufwiesen. In den symptomatischen Beständen konnte *C. fraxinea* zu 71 % nachgewiesen werden. Eine spätere Untersuchung offenbarte, dass die Krankheit mit unterschiedlicher Intensität bereits in allen Eschenbestockungen verbreitet war, wenngleich der Schwerpunkt weiterhin im Südosten des Freistaates liegt. Ein interessantes Ergebnis des Projektes ist die hohe Übereinstimmung zwischen älterem Datenmaterial (*H. albidus*-Fruchtkörper) von Kriegelsteiner (1993) und den aktuellen *C. fraxinea*-Nachweisen.

In Norddeutschland wurden insgesamt 300 gleichaltrige Baumschulpflanzen mit dem Ziel untersucht (cf. Schumacher et al. 2009, 2010), die tatsächlichen Infektionsraten in den verschiedenen Geweben (Rinde, äußerer und innerer Splint und Mark) und Organen (Wurzel, Spross) zu ermitteln. Mit zehn ausgewählten Pilzisolaten wurde die Fähigkeit zur Produktion extrazellulärer Oxydasen überprüft. Die Symptome wurden erhoben, indem sowohl die äußere Nekrotisierung in der Rinde als auch die innere Verbräunung des Holzkörpers vermessen worden ist.

Mikrotomschnitte aus der Quer-, Tangential- und Längsebene des infizierten Holzes wurden für histologische Studien angefertigt. Die Schnitte wurden für die Mikroskopie mit Anilinblau in Milchsäure zum Hervorheben von Hyphen und Zytoplasma angefärbt. Der Oomyceten-Nachweis wurde durch Flutung von Pflanzen in großen Plastikwannen mit anschließender Beköderung sowie anhand serologischer (DAS-ELISA) und photometrischer Verfahren durchgeführt.

Bei 95 % der Pflanzen konnte *C. fraxinea* aus symptomatischem Gewebe isoliert werden. Die Isolationsraten waren am höchsten im äußeren sowie inneren Splint und deutlich geringer in der Wurzel sowie Rinde. Diese

Unterschiede erwiesen sich als hoch signifikant. In gesundem Gewebe wurde der Erreger dagegen nicht nachgewiesen. Während etwa die Hälfte aller Positivbefunde ausschließlich die oberirdischen Pflanzenteile betraf, wurde der Pilz in der Wurzel allein in keinem Fall nachgewiesen. Enge, proportionale Korrelationen bestehen ebenfalls zwischen den Rinden- und Holzverfärbungen. Der Erreger besitzt demnach kein oder lediglich ein eingeschränktes, endophytisches Potenzial. Die Ausdehnung der inneren Holzverbräunung ist dabei stets größer als die dazugehörige äußere Nekrotisierung der Rinde.

Die Auswertung der Mikrotomschnitte ergab, dass *C. fraxinea* vorzugsweise die mit Primärmetaboliten (vor allem Stärke, Fette, Nährsalze) angereicherten Gewebe besiedelt. Die radiale Ebene erschließt sich der Pilz zumeist über die Parenchymzellen der Holzstrahlen, wodurch er rasch vom zentralen Mark bis in das Phloem gelangt. Das Mark und die Gefäße ermöglichen dagegen die Ausbreitung in Längsrichtung. In einem späteren Stadium lässt sich *C. fraxinea* zunehmend auch in den Faserzellen sowie im Kambium und Phloem nachweisen. Die Ausbreitung von Zelle zu Zelle bzw. in ein benachbartes Gewebe erfolgt durch Penetration der Tüpfel mithilfe mechanischen Druckes. Diese Ergebnisse führen zu dem Invasionsmodell, dass der Pilz zunächst Mark, Gefäße und paratracheales Parenchym über die Holzstrahlen infiziert und erst nachfolgend das Kambium und Phloem, womit schließlich die Besiedlung durch sekundäre Rindenpilze induziert wird (z. B. Cech 2006a, 2006b, 2006c; Bakys et al. 2008; Kowalski und Holdenrieder 2008). Die Untersuchungen zu den bodenbürtigen Oomyceten ließen erkennen, dass pilzähnliche Mikroorganismen keine primäre oder maßgebliche Bedeutung im Krankheitsprozess einnehmen. Weder die Ködertests noch die serologischen Studien gaben Hinweise auf *Phytophthora*-Infektionen. Positive Oxydasereaktionen zeigten sich bei *C. fraxinea* uneingeschränkt auf dem Guajakol-Agar, jedoch nur für vier Teststämme auf dem Tannin-Agar. Die Fähigkeit zum Holzabbau ist verbreitet bei Ascomyceten der natürlichen Astreinigung (Butin und Kowalski 1992). Die Bildung des generativen Fruchstadiums an den Blattstielen und Trieben (Kowalski und Holdenrieder 2009) könnte ein Hinweis auf die ursprüngliche Zugehörigkeit des Pilzes zu dieser ökologischen Gruppe sein.

## References/Literatur

- 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.

- Butin, H., Kowalski, T. 1992: Die natürliche Astreinigung und ihre biologischen Voraussetzungen. Versuche zum Holzabbau durch Astreinigerpilze. Eur. J. For. Path., 22: 174-182.
- Cech, T. L. 2006a: Auffallende Schadfaktoren an Waldbäumen im Jahr 2005. Forstschutz Aktuell, Wien, (35): 6-7.
- Cech, T. L. 2006b: Eschenschäden in Österreich. Forstschutz Aktuell, Wien, (37): 18-20.
- Cech, T. L. 2006c: Neuartige Eschenschäden. Forstzeitung, Leopoldsdorf, 117(11): 41.
- Kowalski, T. 2006: *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. For. Path., 36: 264-270. doi:10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.
- Kowalski, T., Holdenrieder, O. 2008: Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa. Schweiz. Z. Forstwes., 3: 45-50.
- Kowalski, T.; Holdenrieder, O. 2009: The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. For. Path., 39: 304-308. doi:10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x
- Krieglsteiner, G. J. 1993: Verbreitungsatlas der Großpilze Deutschlands (West). Band 2, 596 pp.
- Leonhard, S., Strasser, L., Nannig, A., Blaschke, M., Schumacher, J., Immler, T. 2009: Neues Krankheitsphänomen an der Esche. Das von *Chalara fraxinea* verursachte Eschentriebsterben ist auch in Bayern nachgewiesen. LWF Aktuell, 71: 60-63.
- Schumacher, J., Wulf, A., Leonhard, S. 2007 a: Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eschen. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz., 59: 121-123.
- Schumacher, J., Kehr, R., Leonhard, S. 2009: Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infested by *Chalara fraxinea*. For. Path., 40: 419-429. doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00615.x.
- Schumacher, J., Kehr, R., Leonhard, S., Wulf, A. 2010: Neue Erkenntnisse zur Pathogenese des Triebsterbens an Esche (*Fraxinus excelsior*). Journal für Kulturpflanzen, 62: 1-9.
- Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (editors) 1993: *Ceratocystis* and *Ophiostoma* – taxonomy, ecology, and pathogenicity. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Jörg Schumacher, Bavarian State Institute of Forestry, Department for Forest Protection, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 1, 85354 Freising, Germany; **current affiliation:** Forest Research Institute Baden-Württemberg, Department for Forest Protection, Wonnhaldestraße 4, 79100 Freiburg im Breisgau, Germany, Phone: +49-761-4018-221, E-Mail: joerg.schumacher@forst.bwl.de
- Sindy Leonhard and Ludwig Straßer, Bavarian State Institute of Forestry, Department for Forest Protection, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 1, 85354 Freising, Germany
- Rolf Kehr, University of Applied Arts and Sciences, Faculty of Resource Management, Büsgenweg 1a, 37077 Göttingen, Germany