

Julia Kuch<sup>1</sup>, Thomas L. Cech<sup>2</sup>, Heino Konrad<sup>3</sup>, Gerhard Bedlan<sup>4</sup>

## Erstnachweis von *Diplodia mutila* an *Ligustrum vulgare* – Beiträge zur Taxonomie von *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker

First report of *Diplodia mutila* on *Ligustrum vulgare*, taxonomy of *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker

136

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Erstnachweis des Auftretens von *Diplodia mutila* an *Ligustrum vulgare* erbracht. Im Rahmen eines Infektionsversuches wurde die Pathogenität eines von Liguster stammenden Isolates von *D. mutila* bei *Ligustrum vulgare* 'Atrovirens', *Prunus avium* und *Thuja occidentalis* 'Smaragd' bestätigt, nicht jedoch bei den Gehölzarten *Crataegus monogyna* und *Forsythia × intermedia*.

Im Rahmen eines Wachstumsversuches wurde für das Isolat von Liguster 25°C als optimale Temperatur des Myzelwachstums ermittelt.

**Stichwörter:** *Diplodia mutila*, *Botryosphaeria stevensii*, *Ligustrum vulgare*, Erstnachweis, Taxonomie

### Abstract

This is the first report of *Diplodia mutila* on *Ligustrum vulgare*. The pathogenicity of an isolate originating from privet was confirmed by inoculation tests. The pathogenicity tests were positive for *Ligustrum vulgare* 'Atro-

virens', *Prunus avium* and *Thuja occidentalis* 'Smaragd', but negative for *Crataegus monogyna* and *Forsythia × intermedia*.

In vitro trials showed an optimum temperature for mycelial growth of 25°C for the isolate from privet.

**Key words:** *Diplodia mutila*, *Botryosphaeria stevensii*, *Ligustrum vulgare*, first report, taxonomy

### Einleitung

Im Jahr 2011 wurde in einem Privatgarten in Niederösterreich Absterben einer Hecke von Liguster (*Ligustrum vulgare* L.) beobachtet (Abb. 1).

Auf zurücksterbenden Zweigen waren Pilzfruchtkörper erkennbar, die aufgrund der Morphologie der Konidien zur Anamorphe von *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker, *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., gehörten.

*B. stevensii* ist eine in Früchten, Samen, Zweigen und Blättern endophytische Art (ÁLVAREZ-LOAYZA et al., 2008, 2011). Sie ist weit verbreitet und tritt auf zahlreichen Wirtspflanzen (meist Gehölzen) als Saprophyt und fakultativer Parasit, z.B. Wundparasit auf, was für viele Arten

### Institut

Universität für Bodenkultur, Abteilung für Garten-, Obst- und Weinbau, Wien, Österreich<sup>1</sup>

Bundesforschungs- und Ausbildungszentrums für Wald, Naturgefahren und Landschaft, Institut für Waldschutz, Wien, Österreich<sup>2</sup>

Bundesforschungs- und Ausbildungszentrums für Wald, Naturgefahren und Landschaft, Institut für Waldgenetik, Wien, Österreich<sup>3</sup>

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für Nachhaltige Pflanzenproduktion, Wien, Österreich<sup>4</sup>

### Kontaktanschrift

DI Julia Kuch, Universität für Bodenkultur, Abteilung für Garten-, Obst- und Weinbau, Gregor-Mendel-Straße 33, 1180 Wien, Österreich, E-Mail: julia.kuch@hotmail.com

Dr. Thomas L. Cech, Bundesforschungs- und Ausbildungszentrums für Wald, Naturgefahren und Landschaft, Institut für Waldschutz, Seckendorff-Gudent-Weg 8, 1131 Wien, Österreich, E-Mail: thomas.cech@bfw.gv.at

Dr. Heino Konrad, Bundesforschungs- und Ausbildungszentrums für Wald, Naturgefahren und Landschaft, Institut für Waldgenetik, Seckendorff-Gudent-Weg 8, 1131 Wien, Österreich, E-Mail: heino.konrad@bfw.gv.at

Univ.-Doz. Dr. Gerhard Bedlan, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für Nachhaltige Pflanzenproduktion, Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien, Österreich, E-Mail: gerhard.bedlan@ages.at

### Zur Veröffentlichung angenommen

13. November 2013



Abb. 1. Durch *Diplodia mutila* geschädigte Ligusterhecke.

der *Botryosphaeriaceae* charakteristisch ist (SLIPPERS und WINGFIELD, 2007). In den vergangenen Jahren wurde *B. stevensii* als Erreger von Krebswucherungen und Triebsterben an Gehölzen identifiziert. Vor allem im mediterranen Bereich ist der Erreger ein ernstes Problem an Eichen (RAGAZZI et al., 2000). Auch im Obstbau nehmen wirtschaftlich bedeutende Schäden durch *B. stevensii* zu (MARTINEZ, 2010). Liguster war bisher nicht als Wirtspflanze von *B. stevensii* bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zuerst die Identität des Pilzes mittels morphologischer und molekularer Methoden festgestellt, wobei auch auf die Verwandtschaft von *Botryosphaeria stevensii*/*Diplodia mutila* und anderen *Botryosphaeria*- bzw. *Diplodia*-Arten näher eingegangen wird. Danach wurden biologische Parameter (Temperaturabhängigkeit der Konidienkeimung sowie des Myzelwachstums) und die Pathogenität der Pilzart an Liguster und einigen anderen Gehölzen untersucht.

## Material und Methoden

### Bestimmung der Art – Morphologie

Zur morphologischen Artbestimmung wurden Fruchtkörper absterbender Ligusterzweige unter Anwendung der gängigen mykologischen Routinemethoden der Lichtmikroskopie untersucht. Für die Ermittlung der Konidienmaße wurden pro Probe mindestens 20 Konidien gemessen.

Zusätzlich wurden Herbarbelege von *Diplodia mutila* (inkl. Synonyme wie *Sphaeropsis malorum* (Berk.) Berk., *D. quercina* Westend., *D. quercus* Fuckel) sowie Belege ähnlicher Arten aus dem Naturhistorischen Museum Wien in die Untersuchungen einbezogen und die Größen der Konidien verglichen.

### Kulturversuche

Die nachstehend beschriebenen Versuche erfolgten mit einem Isolat aus Sporenmateriale der Proben vom Liguster (CJK1).

**Konidienkeimung.** Zur Ermittlung des Beginnes der Konidienkeimung wurden reife Konidien aus Fruchtkörpern

vom natürlichen Substrat (Liguster) in Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) – Petrischalen verteilt, die Schalen bei 25°C aufbewahrt und der Zustand der Konidien bis zu deren Keimung stündlich kontrolliert.

**Wachstumsversuch.** Zur Feststellung der Minimal-, Optimal- und Maximaltemperatur des Myzelwachstums wurden Einzelsporkulturen auf PDA überimpft und die Schalen in Klimaschränken bei 16 h hell/8 h dunkel inkubiert. Das Wachstum wurde bei 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, und 35°C untersucht. Der Versuch erfolgte in 20-facher Wiederholung (n = 140).

Nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen wurde der Durchmesser des Myzels gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse unter Verwendung von Microsoft Office Excel 2007.

**Infektionsversuch.** Die Pathogenität des Isolates CJK1 an Liguster und anderen Gehölzarten wurde mittels eines Infektionstests überprüft. Die Auswahl der Arten erfolgte nach ihrer Bedeutung innerhalb der Ziergehölze in Österreich. Im Sommer 2011 wurden jeweils 15 Pflanzen von *Ligustrum vulgare* 'Atrovirens', *Prunus avium*, *Crataegus monogyna*, *Thuja occidentalis* 'Smaragd' und *Forsythia × intermedia* mit dem Isolat beimpft (Myzel-Inokulation in die Rinde). Weitere 25 Pflanzen wurden als Kontrolle, wie beschrieben, behandelt, aber nicht beimpft. Die inokulierten Pflanzen wurden im Glashaus der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) bei durchschnittlich 27,4°C (Min: 26,5°C, Max: 28,1°C) und durchschnittlich 47,1% rF (Min: 35,8% rF, Max: 61,1% rF) exponiert. Die Symptomausprägung an den Versuchspflanzen wurde insgesamt viermal in einmonatigen Abständen erfasst und dokumentiert, die Länge der Nekrosen gemessen und das Auftreten von Fruchtkörpern überprüft. Für die statistischen Berechnungen wurden verschiedene Verfahren unter SPSS 9.0 (SPSS Inc.) verwendet. Zur Erfüllung der Koch'schen Postulate wurde der Pilz von den infizierten Pflanzen rückisoliert. Die Bestimmung dieser Isolate erfolgte mit molekularen Methoden.

### Molekulargenetische Charakterisierung

Zur Bestätigung der morphologischen Diagnose wurden zum Vergleich ein Isolat von Liguster und jeweils ein Isolat von *Diplodia pinea* (an *Pinus sylvestris*; leg. T. CECH, 08.2011, Wien) und *Phaeobotryosphaeria visci* (syn. *Sphaeropsis visci*, an *Viscum album*; leg. J. KUCH, 08.2011, Wien) an mehreren Genabschnitten untersucht. Zusätzlich wurde auch ein Isolat von *Sphaeropsis tumefaciens* Hedges (ATCC 20908; von *Callistemon viminalis*, Ort nicht bekannt) in die Untersuchungen einbezogen, um ausschließen zu können, dass es sich an Liguster um diesen zunächst vermuteten Erreger handelt. Ebenso wurden die aus dem Infektionsversuch rückisolierten Pilzstämmen genetisch charakterisiert.

Die DNA wurde mit dem DNeasy® Plant (Mini) Kit (Qiagen) extrahiert. Die folgenden Genregionen wurden mit den jeweiligen Primern untersucht: 18S, ITS und 28S

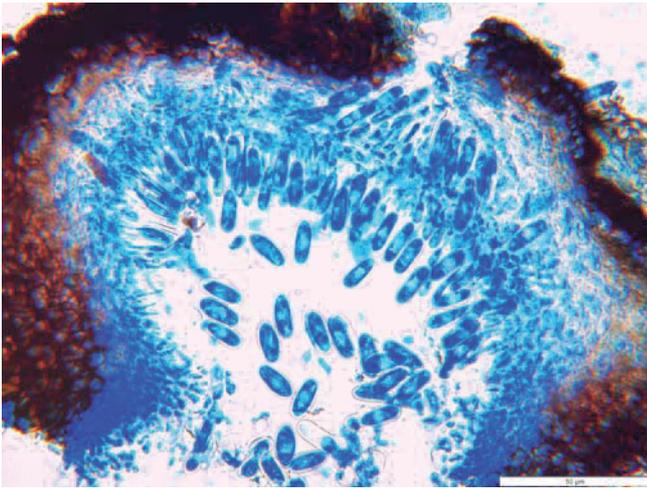


Abb. 2. Unpigmentierte Konidien mit aufgebrochenem Pyknidium (Anilinblau-Lactophenol-Färbung).

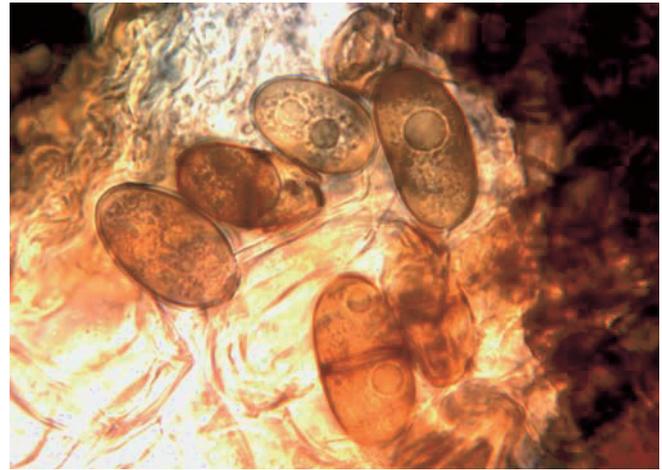


Abb. 3. Reife, pigmentierte Konidien, teilweise bereits zweizellig.

der ribosomalen DNA (Primer: NS1, NS4; ITS1, ITS4; LROR, LR5; WHITE et al., 1990), sowie  $\beta$ -Tubulin und Aktin (Bt2a, Bt2b; act-512f, act-783R; GLASS und DONALDSON, 1995; CARBONE und KOHN, 1999). Die PCR wurde nach DE WET et al. (2008) durchgeführt, unter Verwendung von peqGOLD Polymerase (PEQLAB)<sup>1</sup>. Die Basenabfolge der so gewonnenen Fragmente wurde mittels Sanger-Sequenzierung über einen privaten Anbieter ermittelt (CRC DNA Sequencing Facility, Chicago). Zur Rekonstruktion der Stammbäume wurden Neighbor-joining und Maximum parsimony-Verfahren, die in der Software MEGA Version 5 (TAMURA et al., 2011) implementiert sind, verwendet.

In Anlehnung an die Arbeit von DE WET et al. (2008) wurde auch eine gemeinsame Auswertung der ITS,  $\beta$ -Tubulin und Aktin-Genregionen vorgenommen. Dafür wurden die Alignments dieser drei Genregionen in einer Eingabedatei kombiniert und ähnlich wie die einzelnen Genregionen analysiert. Bei dieser Auswertung wurden alle von DE WET et al. (2008) verwendeten Gensequenzen sowie die eigenen Sequenzen von CJK1 (*D. mutila*) und CJK2 (*D. pinea*) verwendet. Wie bei DE WET et al. (2008) beschrieben, wurde *Mycosphaerella konae* (Isolat STE-U2125) als Outgroup in dieser Analyse verwendet. Auf die Anwendung eines Partitions-homogenitätstests für diesen kombinierten Datensatz wurde verzichtet, da ein solcher bereits von DE WET et al. (2008) durchgeführt worden war, und zeigte, dass die verschiedenen Genregionen homogene Mutationsraten und damit ein ähnliches phylogenetisches Signal anzeigen. Die Kombination des Datensatzes stellte also kein Problem dar.

## Ergebnisse

### Fruchtkörper

Die schwarzen, kugeligen Pyknidien waren einzeln und in Gruppen im Rindengewebe eingesenkt, was mit der

Beschreibung von SHOEMAKER (1964) und ALVES et al. (2004) für *D. mutila* übereinstimmt.

### Konidien

Die Pyknidien enthielten dickwandige, aseptierte und glattwandige, längliche bis eiförmige und an beiden Enden abgerundete Konidien, die zunächst farblos, später braun und gelegentlich septiert waren (Abb. 2 und 3). Im Zuge des Versuches zur Konidienkeimung (siehe unten) wurde festgestellt, dass auch vollständig farblose Konidien bereits keimfähig waren. Die Konidienmaße betragen  $20,38\text{--}29,17 \times 7,22\text{--}12,20 \mu\text{m}$  und im Mittel  $24,68 \times 9,01 \mu\text{m}$  (Tab. 1).

Wie Tab. 1 zeigt, liegen die Längen-Werte des Belegs von Liguster innerhalb der Bandbreite des Isotyps von MONTAGNE, die Sporenbreiten hingegen liegen darunter. Im Vergleich mit Belegen einiger Synonyme von *D. mutila* erkennt man, dass bei einer recht weiten Bandbreite der Konidiengrößen der Beleg vom Liguster (1) im Spektrum liegt (Tab. 1).

### Konidienkeimung

Die Konidienkeimung setzte bereits nach 5 ½ Stunden ein. Innerhalb von 24 Stunden waren mit freiem Auge Myzelien sichtbar. Diese rasche Keimung bei vergleichsweise hohen Temperaturen deckt sich mit den Ergebnissen von ÚRBEZ-TORRES et al. (2006).

### Myzel

Das Isolat CJK1 bildete auf PDA ein anfangs weißes flockiges Luftmyzel, das sich bei einer Temperatur von 25°C bereits nach 4 Tagen braun verfärbte (Abb. 4). Nach einer Inkubation von einem Monat war das Myzel bei 25°C schwarz verfärbt (Abb. 5). Bei anderen Temperaturen erfolgte diese Verfärbung deutlich langsamer.

Tab. 2 veranschaulicht das Myzelwachstum bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (IZ) und Inkubationstemperaturen (IT).

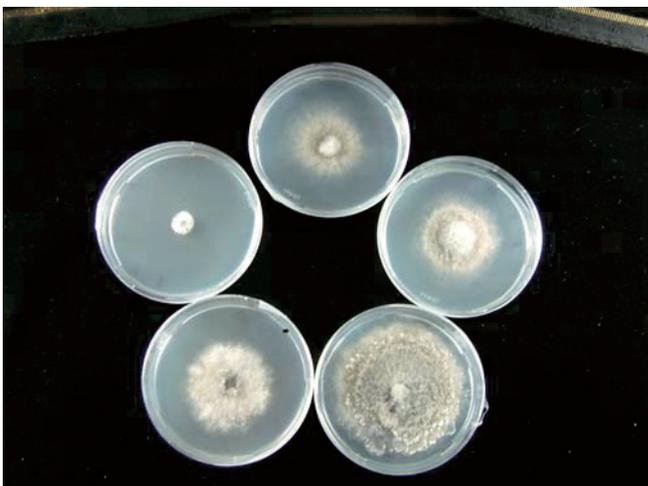
Das Myzelwachstum setzte beim Isolat CJK1 bei 5°C ein, um bis zum Optimum von 25°C anzusteigen. Ab

<sup>1</sup> <http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticlesByGroup&which=Pol>: Zugriff am 06.04.2012

**Tab. 1. Konidiengrößen, Beleg CJK1 (*Ligustrum vulgare*), Belege aus dem Naturhistorischen Museum Wien (NHM).**

Isolat	Art	Wirt	Länge der Sporen [µm]	Breite der Sporen [µm]	Jahr	Leg.	Belegnummer NHM bzw. Zitat
1	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Ligustrum vulgare</i>	(20.38–) 24.68 (–29.17)	(7.22–) 9.01 (–12.20)	2011	J. Kuch	CJK1
K(M)99664*	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Populus nigra</i>	(23.5–) 25.1–25.7 (–27.4)	(12.4–) 13.2–13.5 (–14.3)	n.b.	Montagne	ALVES et al., 2004
3	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Ulmus glabra</i>	(23.42–) 24.82 (–27.63)	(10.71–) 13.59 (–15.67)	1996	Butin	2003
4	<i>Diplodia quercus</i>	<i>Quercus</i> sp.	(12.73–) 15.886 (–18.734)	(7.174–) 9.336 (–12.838)	1894	Fuckel	2302
5	<i>Sphaeropsis malorum</i>	<i>Malus</i> sp.	(18.84–) 21.18 (–23.79)	(8.32–) 9.51 (–11.81)	1921	J.F. Brenckle	651
6	<i>Diplodia ligustri</i>	<i>Ligustrum vulgare</i>	(13.78–) 19.752 (–24.03)	(6.76–) 9.71 (–13.85)	1913	F. Petrak	661
7	<i>Diplodia ligustri</i>	<i>Ligustrum vulgare</i>	(12.83–) 14.63 (–16.13)	(4.33–) 5.27 (–7.64)	1918	F. Petrak	387
8	<i>Diplodia quercina</i>	<i>Quercus pubescens</i>	(9.88–) 12.42 (–14.96)	(4.11–) 5.11 (–6.24)	1944	K.H. Rechinger	2228
9	<i>Diplodia quercina</i>	<i>Quercus pedunculata</i>	(7.51–) 9.84 (–12.11)	(3.61–) 5.39 (–7.53)	1918	F. Petrak	392
10	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Populus nigra</i>	(12.65–) 15.23 (–17.87)	(3.5–) 5.75 (–8.16)	1874	Saccardo	339

\* Konidiengrößen des Isotyps von *D. mutila* aus ALVES et al. (2004)



**Abb. 4.** Oberseite von PDA-Kulturen des Isolates CJK1 nach 4 Tagen bei Temperaturen von 10°C, 15°C, 20°C, 25°C und 30°C (im Uhrzeigersinn, links in der Mitte beginnend).



**Abb. 5.** Verfärbung des Myzels von PDA-Kulturen des Isolates CJK1 von Hell zu Dunkel bei 25°C; nach 2 Wochen weiß-gräulich (rechts), nach 4 Wochen schwarz (links).

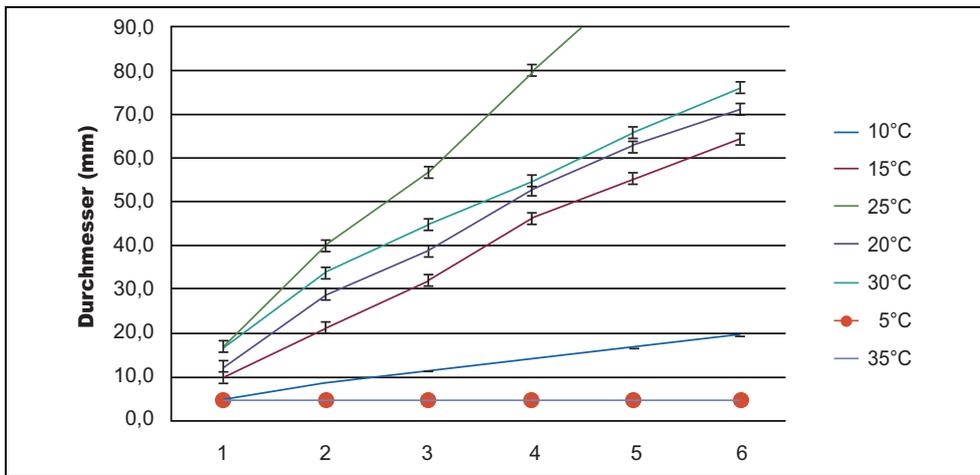
30°C nahm das Wachstum ab und bei 35°C war kein Wachstum mehr festzustellen. Die Mittelwerte der einzelnen Temperaturstufen wurden in EXCEL mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse verglichen (Abb. 6). Sie unterschieden sich signifikant ( $p = 0.05$ ).

#### Infektionsversuch

Im Infektionsversuch zeigten sich bei den Pflanzen von *Forsythia* sowie *Crataegus* keinerlei Krankheitssymptome, und das inokulierte Isolat konnte nicht rückisoliert werden. Bei den anderen Arten (*Ligustrum*, *Prunus*) waren

**Tab. 2.** Durchschnittliches Myzelwachstum (mm) von Isolat CJK1 auf PDA bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (IT) und nach 1–6 Tagen Inkubationszeit (IZ). Ein Durchmesser von 5 mm stellt den Ausgangspunkt dar. Jede Stichprobe wurde horizontal und vertikal vermessen, von den Stichproben (n = 20) pro Temperaturstufe und pro Zeiteinheit (Tage) ist der Mittelwert dargestellt

IZ/IT	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
1	5	5	10	12	16	16	5
2	5	9	22	29	41	35	5
3	5	11	33	39	57	45	5
4	5	14	47	53	80	55	5
5	5	17	56	63	> 90	66	5
6	5	20	65	71	> 90	76	5



**Abb. 6.** Wachstum des Myzels des Isolates CJK1 bei unterschiedlichen Temperaturstufen auf PDA. Ein Durchmesser von 5 mm stellt das Ausgangsniveau des Wachstums dar. Die horizontale Achse zeigt die Anzahl der Inkubationstage. Die Linien basieren auf den beobachteten Mittelwerten und die Fehlerbalken stellen das 95%ige Konfidenzintervall dar.



**Abb. 7.** Infektionsstelle bei *Ligustrum vulgare*. Es sind deutlich die Verfärbungen des Gewebes zu sehen. Rund um die Inokulationsstelle haben sich bereits Fruchtkörper gebildet.

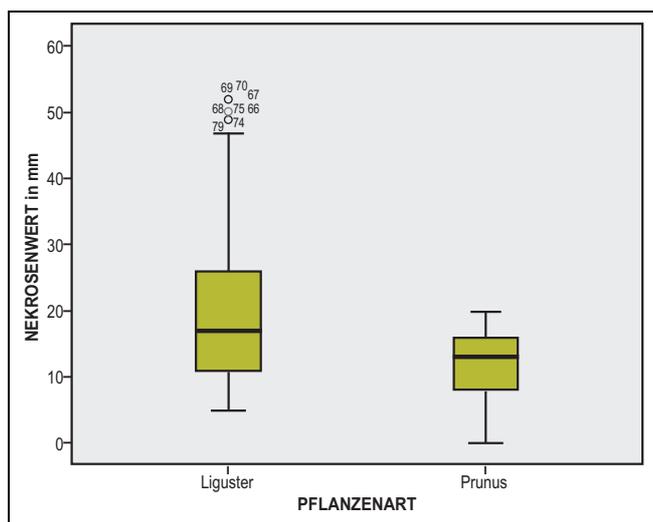
rund um die Impfstelle Nekrosen entstanden (Abb. 7), bzw. trat eine Spitzendürre auf (*Thuja occidentalis*). Rückisolierungen des Isolates waren bei diesen Pflanzenarten erfolgreich. Bei *Ligustrum vulgare* kam es bei einigen der Versuchspflanzen zusätzlich auch zum Absterben von Trieben oberhalb der Inokulationsstelle. Bei diesen Arten

wurde die Pathogenität somit nachgewiesen und die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet.

Die untere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls lag bei beiden Pflanzenarten deutlich über diesem Grenzwert. Die mit CJK1 inokulierten Pflanzen unterschieden sich somit signifikant von der Kontrollgruppe hinsichtlich der Nekrosenlänge ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney U-Test). Der Median liegt bei *Ligustrum vulgare* höher als der Median bei *Prunus avium* und die Werte bei *Ligustrum vulgare* streuen stärker (Abb. 8).

Bei *Thuja occidentalis* 'Smaragd' war der Leittrieb in seiner Gesamtheit betroffen. Hier wurde die Symptomausprägung in die Kategorien „kein Zurücksterben“ und „Zurücksterben“ unterteilt. Die Triebe vertrockneten von der Impfstelle ausgehend oberhalb (Wipfeldürre), was mit einer Braunfärbung eingeleitet wurde. Da 3 Pflanzen des inokulierten Kollektives ausfielen (Trockenschäden), verblieben 12 Individuen in diesem Kollektiv. Am Ende des Versuches waren 7 dieser 12 Individuen oberhalb der Inokulationsstelle abgestorben, 5 zeigten keine Symptome. Bei den 5 Individuen der Kontrollgruppe waren ebenfalls keine Symptome sichtbar. Die statistische Absicherung der Pathogenität des Isolates CJK1 bei *Thuja occidentalis* 'Smaragd' erfolgte mit einem  $\chi^2$ - bzw. Mann-Whitney U-Test:

Die Anteilswerte und Konfidenzintervalle innerhalb des Kollektivs der inokulierten Pflanzen waren:



**Abb. 8.** Länge der Nekrosen bei *Ligustrum vulgare* und *Prunus avium* im Vergleich.

Kein Zurücksterben: (5 von 12): 41,7% (CI: 19% –69%)  
 Zurücksterben: (7 von 12): 58,3% (CI: 32% –81%)

### Molekulargenetische Charakterisierung

In Abb. 9 ist das Ergebnis der Analyse mittels Maximum Parsimony dargestellt. Die Analyse mittels neighbour-joining Verfahren lieferte beinahe identische Ergebnisse und wird daher nicht dargestellt.

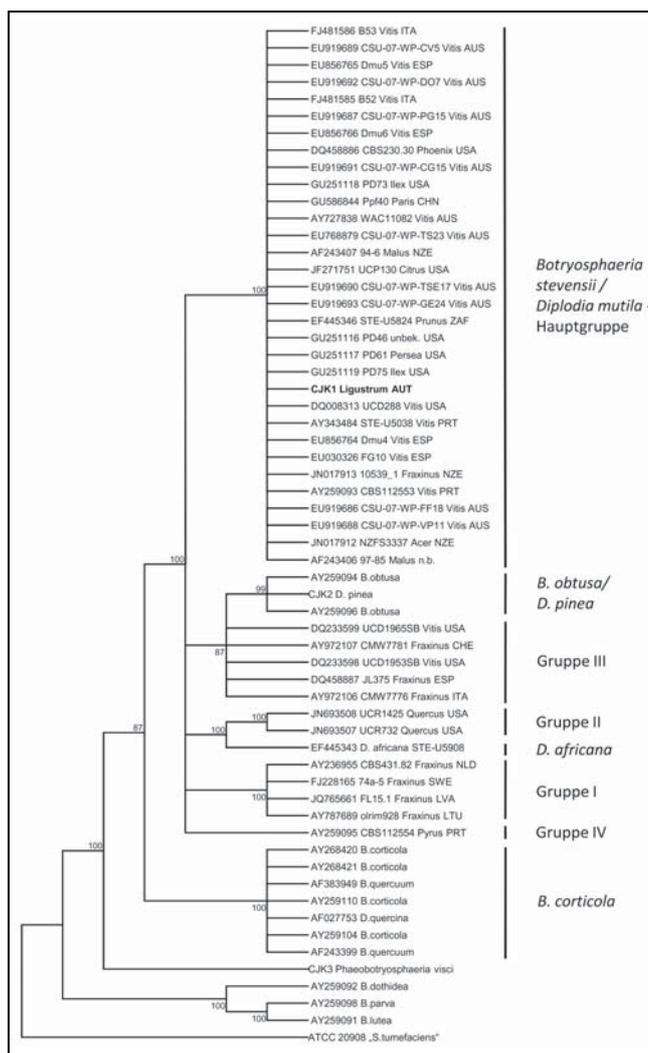
Bei ITS hat CJK1 100% Identität mit der als Hauptgruppe definierten Gruppe „*B. stevensii*/*D. mutila*“; in dieser Gruppe liegt auch das Isolat (CBS112553) welches von ALVES et al. (2004) in deren Untersuchung verwendet und als Isotyp designiert wurde. Die Art *D. africana* ist eng verwandt mit *D. mutila* (DAMM et al., 2007). Dies zeigt sich auch im ITS-Stammbaum. Zwei Isolate von *D. mutila* von *Quercus agrifolia* aus Kalifornien gruppieren sich sehr nahe an diese Art. Das Isolat von *S. tumefaciens* welches in die Untersuchung mit einbezogen worden war, ist nicht näher mit den anderen untersuchten Arten verwandt. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Erreger des Triebsterbens an Liguster um diesen, zunächst als Krankheitserreger an Liguster vermuteten Organismus handelt.

In Abb. 10 ist das Ergebnis der kombinierten Analyse nach der Arbeit von DE WET et al. (2008) dargestellt. Auch hier ist die Gruppierung des Isolates von Liguster eindeutig bei *D. mutila*/*B. stevensii*.

### Diskussion

Die morphologischen Untersuchungen ergaben weitgehende Übereinstimmung des auf Liguster aufgetretenen Pilzes mit *B. stevensii*/*D. mutila*.

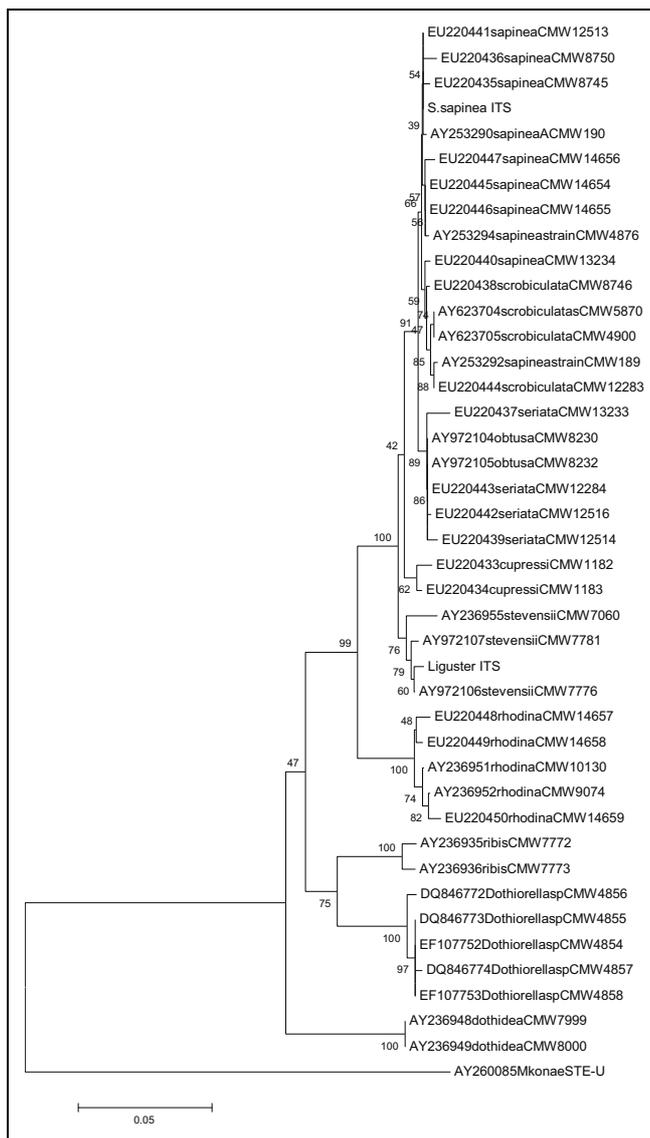
Die weite Bandbreite der Sporenmaße von *D. mutila* (Literatur und Vergleichsuntersuchung der Herbarbelege) rechtfertigt die Einordnung des Pilzes vom Liguster von den Konidienmaßen her in die Art *D. mutila*.



**Abb. 9.** Maximum parsimony Baum der Isolate von *D. mutila* aus dieser Arbeit und der GenBank. Zusätzlich in dieser Arbeit sequenzierte Arten sind in Fettdruck beschriftet. Der Consensus-Baum aus 261 „most parsimonious“ Bäumen ist dargestellt. Der consistency index ist 0.872587 (0.780000), der retention index ist 0.902941 (0.902941), und der composite index ist 0.787895 (0.704294) für alle Stellen im Alignment bzw. für Parsimony-informative Stellen (in Klammern). Die Prozentzahl der Bäume, in denen die assoziierten Taxa zusammenclustern ist neben den Knoten dargestellt. Der MP-Baum wurde durch den Close Neighbor-Interchange Algorithmus, bei dem die Anfangsbäume durch zufällige Anknüpfung der Sequenzen (mit 10 Wiederholungen) ermittelt wurden. Lücken im Alignment wurden als fehlende Daten für alle Individuen interpretiert. Von den insgesamt 511 Positionen im Alignment waren 80 für die Analyse informativ.

Das im Wachstumsversuch ermittelte Temperaturoptimum stimmt mit dem von ÚRBEZ-TORRES et al. (2006) festgestellten überein.

Durch Sequenzanalysen der ribosomalen DNA sowie zwei weiterer nuklearer Genregionen erfolgte die Identifizierung von *B. stevensii* als die 2011 an Liguster aufgetretene Pilzart. Damit ist der Erstnachweis des Erregers an dieser Gehölzart erbracht. Allerdings steht eine taxonomische Bearbeitung von *B. stevensii* unter Einbeziehung der Typusbelege von bisher auf *Ligustrum* beschriebenen *Diplodia*-Arten noch aus.



**Abb. 10.** Neighbour-joining Baum basierend auf der Kombination der Genregionen ITS,  $\beta$ -Tubulin und Aktin. Vergleichssequenzen aus DE WET et al. (2008). Abgebildet ist der Konsensus-Baum aus 1000 Bootstrap-Replikaten, Distanzen wurden nach der Kimura-2-Parameter-Methode berechnet. Zahlen zeigen die %-Anzahl der gesamten Bäume die die jeweilige Gliederung teilen. Der Maßstabsbalken gibt die Distanz zwischen den Sequenzen an (Basensubstitution/Position). Insgesamt wurden 798 Positionen von 42 Taxa in die Analyse einbezogen. Die Analyse wurde mit MEGA v5 durchgeführt.

Die enge Verwandtschaft zu *D. pinea*/*Sph. sapinea* ist deutlich in der 18S und ITS Sequenz zu sehen, dies wird auch von SMITH und STANOSZ (1995) bestätigt. Die Hauptgruppe von *D. mutila* in der phylogenetischen Auswertung, der auch das Isolat CJK1 von Liguster angehört, wird vor allem von Isolaten von Wein und Apfel gebildet, es sind jedoch auch Isolate von *Prunus*, *Fraxinus*, *Citrus*, *Acer*, sowie *Ilex*, *Paris* und *Phoenix* darunter. Diese Gruppe von Isolaten dürfte die am weitesten verbreitete sein und auch den größten Wirtspflanzenkreis aufweisen.

Neben der Hauptgruppe von *D. mutila*, der die Mehrzahl der Isolate angehört, wurden bei den Analysen auch 4 weitere Gruppen entdeckt, die teilweise auf starke Wirtsspezifität und kryptische Artbildung hindeuten.

Auch ZHOU und STANOSZ (2001a, 2001b) und ALVES et al. (2004) bemerken, dass *D. mutila* noch starke Variation in sich birgt, die noch aufgeklärt werden muss. Die vorliegende Arbeit hat dazu wichtige Erkenntnisse gebracht, an die in weiteren Untersuchungen angeknüpft werden kann. Die erste Untergruppe wird von 4 Isolaten gebildet, die alle von Esche (*Fraxinus excelsior*) aus Nordeuropa (Lettland, Litauen, Schweden) und den Niederlanden stammen. Der Erreger wurde unter anderem in den letzten Jahren sehr häufig im Zuge des Eschentriebsterbens erwähnt. Die primäre Ursache des Eschentriebsterbens ist der Pilz *Chalara fraxinea* (KOWALSKI, 2006). Eine Reihe von Pilzen ist an der Esche identifiziert worden, die verantwortlich für krebsartige Wucherungen und das Absterben von Triebspitzen sind. Am häufigsten waren: *Alternaria alternata*, *Chalara* spp., *Cytospora ambiens*, *Diplodia mutila*, *Fusarium lateritium*, *Gloeosporidiella turgida*, *Phomopsis controversa* und *Phomopsis scobina* (KOWALSKI und LUKOMSKA, 2005; HEYDECK et al., 2005). Es ist zu erwähnen, dass *D. mutila* sehr häufig in Studien mit dem Eschentriebsterben als Sekundärparasit bezeichnet wird. Diese Arbeit zeigt, dass die Isolate des Erregers an *Fraxinus excelsior* nicht gleich gesetzt werden können mit den Isolaten von *D. mutila* aus der Hauptgruppe.

Die zweite Untergruppe wird von zwei Isolaten von *Quercus agrifolia* aus Kalifornien gebildet. Diese Isolate zeigen hohe Sequenzhomologie mit einer relativ neu beschriebenen Art, *D. africana* (DAMM et al., 2007), die bisher nur aus Südafrika bekannt war. Diese Isolate könnten *D. africana* zugerechnet werden, bzw. stellen sie eine eigene eng verwandte Art dar. Möglicherweise ist diese (oder sehr ähnliche Arten) also auch in anderen subtropischen Klimaten verbreitet.

Die dritte Gruppe wird von Isolaten gebildet, die einerseits von Esche in Europa sowie von Wein aus Kalifornien stammen. Auch diese Gruppe wurde durch die Bootstrapping-Werte stark unterstützt. Im Alignment der Sequenzen sind bei diesen Isolaten mehrere Insertionen zu bemerken, was auf relativ starke Divergenz zur Hauptgruppe schließen lässt.

Die vierte Untergruppe, die von nur einem Isolat von *Pyrus communis* aus Portugal gebildet wird, ist diejenige, die am stärksten von den übrigen abweicht und ebenfalls noch eingehender untersucht werden sollte. WOLLENWEBER und HOCHAPFEL (1941) beschreiben eine Varietät von *D. mutila* von *Pyrus communis* in Polen (Schlesien). Diese var. *major* soll größere Konidien als *D. mutila* haben und ähnelt damit *D. africana*. Auch hier wären weitere Untersuchungen insbesondere in Bezug auf diese 4. Untergruppen sicher lohnend. Diese vier Untergruppen waren sehr gut durch die Bootstrap-Werte unterstützt. Eingehende morphologische und weitere molekulare Untersuchungen sind nötig, um zu klären ob es sich dabei um eigene Arten handelt (kryptische Artbildung; vgl. ALVES et al., 2004).

*Diplodia mutila* wird auch als Pathogen von Koniferen beschrieben (z.B. *Juniperus scopulorum*). Auch der Infektionsversuch in dieser Arbeit bestätigt die Pathogenität an *Thuja*. Allerdings sind in der Genbank bisher keine

Vertreter der Art von Koniferen enthalten. DE WET et al. (2008) weisen darauf hin, dass es auch zu Verwechslungen zwischen *D. cupressi*, die nur an Koniferen vorkommt, und *D. mutila* gekommen sein könnte. So auch in der Arbeit von ALVES et al. (2004): dort werden zwei Isolate von *Juniperus* fälschlich als *B. stevensii* bezeichnet, während es sich tatsächlich um *D. cupressi* handelt (ALVES et al., 2006). Auch Verwechslungen mit *D. pinea* könnten vorkommen. Ob *D. mutila* tatsächlich spontan auch an Koniferen vorkommt, sollte noch eingehender untersucht werden.

*Sphaeropsis tumefaciens*, der Erreger eines Krebses an verschiedenen *Citrus*-Gewächsen sowie an *Nerium* und *Ilex*, ist offenbar nicht näher mit *D. mutila* und anderen Vertretern der *Botryosphaeriaceae* verwandt. Die nächsten Verwandten stammen offenbar aus der Gruppe der wenig untersuchten *Capnodiales*; Taxonomie und Systematik sind daher noch zu klären. Statt *Sphaeropsis* ist nach DENMAN et al. (2000) *Diplodia* zu verwenden; da es allerdings bereits eine Art *Diplodia tumefaciens* (Shear) Zalasky (an Pappel) gibt (ZALASKY, 1964), ist der Name daher nicht eindeutig und bedarf dringend einer Revision.

Im Infektionsversuch erwies sich *B. stevensii* vom Liguster als pathogen an Ligusterpflanzen sowie an Pflanzen von *Prunus avium*, es entwickelten sich Rindennekrosen von einigen Zentimetern Länge. Weiterführende Literatur zur Pathogenität von *B. stevensii* an *Prunus avium* wurde nicht gefunden. MORET BENASET und NADAL PUIG-DEFABREGAS (1991) wiesen in Katalonien *B. stevensii* unter anderem auch an *Prunus avium* nach, es fehlen jedoch Hinweise auf die Pathogenität und die Symptomausprägung.

Bei *Thuja occidentalis* ‘Smaragd’ löste die Inkulation Wipfelsterben aus: Auch zu dieser Pflanzenart fanden sich zur Symptomatik bei Befall mit *B. stevensii* in der Literatur keine Hinweise.

An *Crataegus* und *Forsythia* wurde in der vorliegenden Untersuchung mit dem *B. stevensii* – Isolat vom Liguster keine Pathogenität festgestellt. Dies ist insbesondere bei Weißdorn interessant, da *B. stevensii* beim nahe verwandten Apfel als Pathogen auftritt (HARMON, 2005).

## Literatur

- ÁLVAREZ-LOAYZA, P., J.F.J. WHITE, M.S. TORRES, H. BALSLEV, T. KRISTIANSEN, J.C. SVENNING, N. GIL, 2011: Light converts endosymbiotic fungus to pathogen, influencing seedling survival and niche-space filling of a common tropical tree, *Iriartea deltoidea*. *PLoS ONE* **6**, e16386. doi: 10.1371/journal.pone.0016386.
- ÁLVAREZ-LOAYZA, P., J.F. WHITE, M. BERGEN, C. CADENAS, 2008: *Diplodia corticola* causing seedling mortality of the palm *Iriartea deltoidea*. *Plant Pathology* **57**, 382.
- ALVES, A., A. CORREIA, J. LUQUE, A. PHILLIPS, 2004: *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. *Mycologia* **96**, 598-613.
- ALVES, A., A. CORREIA, A.J.L. PHILLIPS, 2006: Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* **23**, 1-15.
- CARBONE, I., L.M. KOHN, 1999: A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**, 553-556.
- DAMM, U., P.W. CROUS, P.H. FOURIE, 2007: *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* **99**, 664-680.
- DENMAN, S., P.W. CROUS, J.E. TAYLOR, J.C. KANG, I. PASCOE, M.J. WINGFIELD, 2000: An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* **45**, 129-140.
- DE WET, J., B. SLIPPERS, O. PREISIG, B.D. WINGFIELD, M.J. WINGFIELD, 2008: Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**, 116-126.
- GLASS, N.L., G. DONALDSON, 1995: Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1323-1330.
- HARMON, P.F., 2005: Differences in susceptibility of ornamental holly cultivars to *Sphaeropsis tumefaciens*. UF IFAS Department of Plant Pathology, 1453 Fifield Hall, Gainesville, FL 32611. <http://www.tbwg.org/Research/Harmon%202005%20Holly%20Report%20final.pdf> (Stand: 2. Februar 2012).
- HEYDECK, P., M. BEMMANN, H.G. KONTZOG, 2005: Shoot mortality in ash (*Fraxinus excelsior*) in northeastern lowlands of Germany. *Forst und Holz* **60**, 505-506.
- KOWALSKI, T., 2006: *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* **36**, 264-270.
- KOWALSKI, T., A. LUKOMSKA, 2005: The studies on ash dying (*Fraxinus excelsior* L.) in the Wloszczowa Forest Unit stands. *Acta Agrobotanica* **58**, 429-439.
- MARTINEZ, O., 2010: Neuartiger Rindenbrand im Streuobstbau. Campus-Magazin Forschungsanstalt Geisenheim 03/2010, 4-9.
- MORET BENASET, A., M. NADAL PUIG-DEFABREGAS, 1991: Distribución de *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. en Catalunya. *Acta Botánica Malacitana* **16**, 93-96.
- RAGAZZI, A., S. MORICCA, I. DELLAVALLE, E. TURCO, 2000: Italian expansion of oak decline. In: RAGAZZI, A., I. DELLAVALLE, S. MORICCA, P. CAPRETTI, P. RADDI (eds.): Decline of oak species in Italy – problems and perspectives. Firenze, Italy: Accademia Italiana di Scienze Forestali.
- SHOEMAKER, R.A., 1964: Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* **42**, 1297-1301.
- SLIPPERS, B., M.J. WINGFIELD, 2007: *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**, 90-106.
- SMITH, D.R., G.R. STANOSZ, 1995: Confirmation of 2 distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States using RAPDS. *Phytopathology* **85**, 699-704.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, S. KUMAR, 2011: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.
- ÚRBEZ-TORRES, J.R., G.M. LEAVITT, T.M. VOEGEL, W.D. GUBLER, 2006: Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* **90**, 1490-1503.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE, J. TAYLOR, 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. New York, Academic Press.
- WOLLENWEBER, H.W., H. HOCHAPFEL, 1941: Beiträge zur Kenntnis parasitärer und saprophytischer Pilze 1. *Diplodia* und ihre Beziehung zur Fruchtfäule. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **12**, 167-250.
- ZALASKY, H., 1964: Nomenclature and description of *Diplodia tumefaciens* (Shear) Zalasky [= *Macrophoma tumefaciens* apud Hubert]. *Canadian Journal of Botany* **42**, 1049-1055.
- ZHOU, S., G.R. STANOSZ, 2001a: Primers for amplification of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of *Botryosphaeria* and associated anamorphic fungi. *Mycological Research* **105**, 1033-1044.
- ZHOU, S., G.R. STANOSZ, 2001b: Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA Sequences. *Mycologia* **93**, 516-552.