

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

Thema:

Detektion, Charakterisierung und Analysen zum Auftreten von Viren und dem Eschentriebsterben in Sonderbeständen von *Fraxinus excelsior* – Eine Ergänzungsstudie zum Demonstrationsprojekt FraxForFuture (FraxVir)

Teilvorhaben 1: Detektion des Einflusses von abiotischen Stressfaktoren, Krankheiten und Schädlingsbefall an Eschen mit multisensorischen und multitemporalen Daten

Teilvorhaben 2: Erfassung und Beurteilung der Virusvielfalt in Eschen

Teilvorhaben 3: Molekulares Monitoring von *H. fraxineus*

Teilvorhaben 4: Genetik der Esche in Zusammenhang mit der Virenausstattung und dem Eschentriebsterben

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
Katholische Universität Eichstätt-Ingolstadt (KU) Professur für Physische Geographie / Landschaftsökologie und nachhaltige Ökosystementwicklung	Teilvorhaben 1: 2220WK40A4
Humboldt-Universität zu Berlin (HU) Lebenswissenschaftliche Fakultät Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin	Teilvorhaben 2: 2220WK40B4
Universität Hohenheim (UHOH) Institut für Nutztierwissenschaften Fachgebiet für Integrative Infektionsbiologie Nutzpflanze – Nutztier	Teilvorhaben 3: 2220WK40C4
Bayerisches Amt für Waldgenetik (AWG)	Teilvorhaben 4: 2220WK40D4

Laufzeit: **01.10.2021 – 31.12.2024***

*Laufzeitende kann je nach Zuwendungsempfänger abweichen.

Monat der Erstellung: **03/2025**

Datum der Veröffentlichung: **28.07.2025**



Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit
und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) und des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger für den Waldklimafonds unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

SCHLUSSBERICHT

I. Ziele

1. Aufgabenstellung

Die Degeneration der Eschen wird meist auf den Erreger des Eschentriebsterbens *Hymenoscyphus fraxineus* reduziert (McKinney et al. 2011). Da viele Faktoren den Gesundheitszustand der Eschen beeinflussen (Enderle et al. 2019), müssen umfangreiche Erkenntnisse zu den einzelnen, sowie zur Interaktion dieser Stressfaktoren generiert werden. Als Teil des pflanzlichen Phytobioms tragen Viren, die u.a. durch Vektoren und über das Saatgut verbreitet werden können, erheblich zum allgemeinen Gesundheitszustand von Bäumen bei und können wirtschaftliche und ökologische Verluste implizieren. Sie beeinflussen den Stoff- und Energie- wechsel infizierter Wirte, wodurch ihre Widerstandskraft geschwächt wird und Degenerationen und Absterberscheinungen resultieren können. Durch Virusinfektionen ist auch die Prädisposition gegenüber einwirkenden Stressfaktoren verändert (Bos 1977, Takahashi et al. 2019).

Ergänzend zum Demonstrationsprojekt FraxForFuture wurden im Rahmen des Verbundprojekts FraxVir umfassende Untersuchungen zum Gesundheitszustand der Gemeinen Esche durchgeführt, um die Vitalität der Eschen sowie abiotische und biotische Einflussfaktoren eingehend zu beleuchten. Der Fokus lag dabei auf Eschensonderbeständen, welche für die Erhaltung der biologischen Vielfalt, dem Management von Ökosystemen und der nachhaltigen Bewirtschaftung von Wäldern eine besondere Rolle spielen. Der Schutz und die Bewirtschaftung dieser Gebiete ist der Schlüssel zur Erhaltung gesunder Waldökosysteme und zur Gewährleistung ihrer langfristigen Lebensfähigkeit. Die Probenahmestandorte (Abb. 1) umfassten zwei Intensivbeobachtungsflächen (IBF) von FraxForFuture in Bayern (Kaisheim) und Brandenburg (Stegelitz/Melzower Forst), zwei Samenplantagen in Baden-Württemberg (Emmendingen und Schorndorf) und ein Klonarchiv in Bayern (Grabenstätt).



Abb. 1: Untersuchungsgebiete des Projekts FraxVir: IBF Stegelitz/Melzower Forst (Brandenburg), IBF Kaisheim (Bayern), Klonfläche Grabenstätt (Bayern), Samenplantagen Emmendingen und Schorndorf (Baden-Württemberg).

Um komplexe Fragestellungen zu bearbeiten, arbeiteten vier Teilvorhaben interdisziplinär zusammen (siehe Abb. 2). TV 1 setzte innovative und praxistaugliche Methoden ein, um detaillierte Informationen über den Gesundheitszustand der Bäume zu gewinnen. Das Ziel des TV war es, die Vitalität der Esche mit multisensorischen und multitemporalen Daten im Rahmen eines kontinuierlichen und räumlich hoch aufgelösten Monitorings festzustellen. Gleichzeitig sollten abiotische und biotische Einflussgrößen erfasst werden, weshalb Klimastationen sowie Sporenfallen zur Ermittlung des Infektionsdrucks auf den Untersuchungsgebieten installiert wurden. In TV 2 lag der Fokus auf der Erfassung und Bewertung der Virusvielfalt: Virusverdächtige Blattsymptome wie chlorotische Flecken und Ringflecken, Fadenblättrigkeit, Adernvergilbungen, Scheckungen und Deformationen sollten erfasst und dokumentiert werden. In die Untersuchungen wurden Alteschen sowie Individuen der Naturverjüngung einbezogen. Des Weiteren wurden Früchte von Eschen auf den Samenplantagen

entnommen und auf Viren untersucht, um damit zur Aufklärung bisher unbekannter Übertragungswege beizutragen. Die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Esche aus virologischer Sicht vervollständigte das Screening auf Krankheitserreger und ermöglichte in Ergänzung zu den Ergebnissen der anderen FraxForFuture Unterverbänden die Formulierung von Handlungsempfehlungen für die Forstpraxis. Gleichzeitig sollten eingehende Analysen zu möglichen Zusammenhängen zwischen Virusinfektionen und dem Auftreten von *H. fraxineus* Aufschluss über die Rolle von Viren bei der Ausprägung und Entwicklung der Eschendegenerationen und des Eschensterbens geben. Zur Bewertung der Schädigung durch das Eschentriebsterben wurde in TV 3 das Vorliegen von *H. fraxineus* im Gewebe, Laub, der Streu und im Boden mittels Real-Time PCR qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Dabei sollte zwischen inaktiven Altinfektionen und akuten Erkrankungen unterschieden werden. Wiederholte Probenahmen sollten ein differenziertes Bild des Pathogendrucks liefern. TV 4 berücksichtigte erstmals die genetischen Grundlagen in Bezug auf Virusinfektionen an Eschen. Die Suche nach Genen, die in Zusammenhang mit der Virusabwehr stehen, ist aufgrund der bereits vorhandenen genomischen Ressourcen durchaus erfolgversprechend.

Die Ergebnisse dieses Projekts sollten zu konkreten Handlungsempfehlungen für die Generhaltung und für die Forstpraxis zum Umgang mit geschädigten Beständen führen. Dazu war es notwendig, Grundlagenwissen zum Virom zu generieren, genetische Marker hierfür zu bestimmen und abiotische und biotische Einflüsse auf die Esche zu bestimmen und die Vitalität der Eschen mit Fernerkundungsdaten zu detektieren.

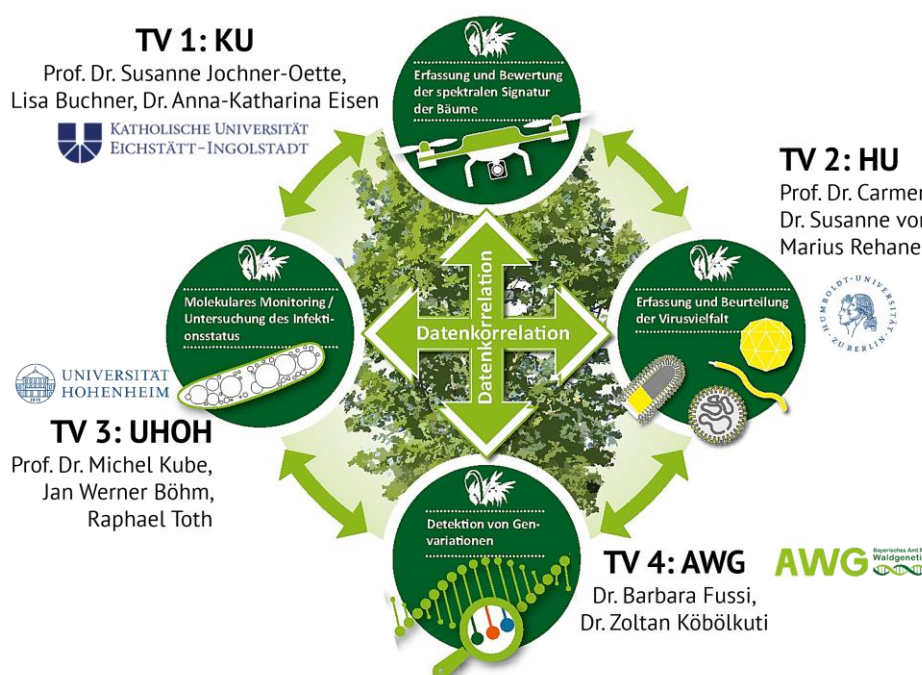


Abb. 2: Inhalte und Zusammenarbeit der vier Teilvorhaben in FraxVir.

2. Stand der Technik

2.1 Eschentriebsterben und Virusinfektion der Gemeinen Esche

In den letzten Jahren wurde der Bestand der Esche durch das Eschentriebsterben stark dezimiert, wodurch ihre forstliche Zukunft zunehmend unsicher erscheint. Die Krankheit, die in fast ganz Europa verbreitet ist, wird durch den invasiven Pilz *Hymenoscyphus fraxineus* verursacht, dessen ungeschlechtliches Stadium als *Chalara fraxinea* bekannt ist. Im deutschsprachigen Raum wird der Erreger auch als „Falsches Weißes Stengelbecherchen“ bezeichnet. Ursprünglich aus Ostasien stammend, zeigt der Pilz ein hohes invasives Potenzial in Europa. Der Infektionsdruck durch *H. fraxineus* geht vom direkten Eintrag der Ascosporen auf das Eschenblatt aus (Gross et al. 2012), von denen der Pilz über die Blattstiele bis in die Sprosse vordringen kann (Haňáčková et al. 2017), aber auch über den Stammfuß (resultierend in Stammfußnekrosen) und insbesondere über die Wurzel. Für den Stamm und die Wurzel ist auch die hohe Erregerkonzentration in der Bodenstreu entscheidend, da sich hier auf den Eschenblattstielen die Fruchtkörper entwickeln. Verdriftung der Sporen durch Wind, aber auch das Einschwemmen in den Boden, üben im Anschluss Infektionsdruck auf die Phyllo- und Rhizosphäre der Esche aus. Eine Infektion von Sämlingen über den kontaminierten Boden konnte entsprechend gezeigt werden (Fones et al. 2016). Trotz der zentralen Rolle dieser Eintragswege für die Infektion fehlen bislang jedoch umfassende Daten zu deren Ausmaß und Auswirkungen.

Neben den Krankheitssymptomen, die dem Eschentriebsterben zuzuordnen sind, treten erschwerend häufig sekundäre Schaderreger hinzu, beispielsweise sekundäre Rindenpilze (u.a. *Neonectria*) oder holzzersetzende Pilze (*Armillaria*). Eine weitere Herausforderung stellt der Eschenbastkäfer (*Hylesinus* ssp.) dar, welcher sich bereits über Russland und der Ukraine weiter in den Westen Osteuropas ausbreitet (Horrocks et al. 2024).

Viren in Eschen können den Stoff- und Energiestoffwechsel verändern, die Widerstandskraft schwächen und können so zu Degenerationen und Anfälligkeit gegenüber weiteren Stressfaktoren beitragen (Bos 1977, Takahashi et al. 2019). Emaraviren stellen in anderen Wirtspflanzen erhebliche Bedrohungen dar und sind teils auf Warnlisten der European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) geführt (Anonymus 2024) bzw. werden aufgrund ihrer weiten Verbreitung als potenzielle Quarantäneschädlinge in Betracht gezogen (Bragard et al. 2022). In der Esche wurden kürzlich zahlreiche bekannte und unbekannte Viren aus unterschiedlichen Virusfamilien nachgewiesen, darunter das ash shoestring-associated virus (ASaV, Familie *Fimoviridae*); Gaskin et al. 2021), das privet leaf blotch-associated virus (PrLBaV, Familie *Mayoviridae*; Navarro et al. 2017) Viren aus der Gruppe der Cytorhabdoviren (Familie *Rhabdoviridae*; Beijerman et al. 2023). Aufgrund ihrer kurzen Historie sind viele Aspekte zu neuartigen Viren unzureichend erforscht. Die größte Herausforderung besteht daher in der Charakterisierung dieser neu entdeckten Viren und die Analyse ihrer Auswirkungen auf den Ebenen Biosicherheit, Handel, Regulierung und Wissenschaft (Massart et al. 2017). Vor allem biologische Aspekte wie die Virusübertragung, die für ein erfolgreiches Management entscheidend sein können, sind oftmals ungeklärt.

Grundsätzlich werden in der Virologie vier verschiedene Mechanismen für die Übertragung von Viren auf Pflanzen diskutiert: die mechanische Übertragung, die Übertragung durch Wasser, Boden und Wurzelverwachsungen, durch Vektoren und durch Samen und Pollen. Alle diese Übertragungsmechanismen sind grundsätzlich in Samenplantagen möglich, insbesondere spielt hier auch die mechanische Übertragung durch Stres-induktion bei Kronenschnitt und Wurzelpflügen eine große Rolle. In den eher naturbelassenen Saatguterntebeständen ist anzunehmen, dass die anderen Übertragungswege im Vordergrund stehen. Viren können mehrere Strategien gleichzeitig nutzen, um neue Pflanzen zu infizieren, insbesondere in Mischinfektionen, wo sie sich gegenseitig beeinflussen und z.B. fremde Proteine für ihre Ausbreitung nutzen. Ein besonderes Beispiel ist die heterologe Enkapsidierung, bei der ein Virus in die Proteinhülle eines anderen Virus gelangt und so einmalig dessen Übertragungswege, etwa durch Vektoren, nutzt (Gaur and Sharma 2014). Die Übertragung von Viren in die nächste Generation über Pollen und Samen ist für die Saatgutproduktion und die zukünftigen Wälder besonders bedeutsam. Als samenübertragbare Viren wären bei der Esche beispielhaft das ArMV, das TRSV, das RBDV, das TMV, das TRV und das ToRSV oder die Caulimoviren zu nennen (Bratsch et al. 2018, Schoelz and Adhab 2020). Neben der Untersuchung von Pollen und Samen als mögliche Überträger von Viren ist die Naturverjüngung von besonderem Interesse. Untersuchungen der natürlichen Verjüngung in älteren Befallsgebieten zeigen einen hohen Anteil an gesunden Jungeschen (Jochner-Oette et al. 2021), was von Enderle et al. (2017) als mögliche evolutionäre Anpassung an die Krankheit gedeutet wird. Daher wird geraten, die natürliche Verjüngung von vitaleren Eschen zu fördern, um eine breite Basis für die natürliche Selektion zu ermöglichen (Enderle et al. 2017).

Der Erreger des Eschentriebsterbens kann in der Esche auf eine große Vielfalt an Viren treffen und mit diesen interagieren. Bislang ist unklar, ob sich diese Viren synergistisch oder antagonistisch in Mischinfektionen mit dem Pilz verhalten. Es ist bekannt, dass sich Viren oder Teile davon auch ins Genom von Pflanzen integrieren und dadurch Genome umstrukturieren und den horizontalen Gentransport befördern (Aiewsakun and Katzourakis 2015, Karasev 2000). Viren als evolutionäre Treibkraft könnten eine entscheidende Rolle bei der genetischen Anpassung unserer Wälder an Störungen, wie den Infektionsdruck durch das Eschentriebsterben, spielen.

Aus aktueller Literatur wird deutlich, dass eine Resistenz gegenüber dem Eschentriebsterben nicht auf der Ebene der Population oder Herkünfte zu suchen ist, sondern auf der Ebene der Individuen (Enderle et al. 2017, Seidel et al. 2025). Ferner zeigen Untersuchungen, dass mischerbige Individuen im Vergleich zu reinerbigen weniger anfällig sind (Fussi and Konnerth 2014). Welche Faktoren im Detail diese genetische Komponente ausmachen, ist noch nicht geklärt. So könnte etwa ein Abwehrmechanismus gegen Pathogene im Allgemeinen (z.B. Viren) eine Rolle spielen. Inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Symptomatik der Eschen hinsichtlich des Eschentriebsterbens und einer bestimmten Virenausstattung besteht, ist noch gänzlich unerforscht.

2.2 Einfluss auf die Pflanzenphysiologie und Einsatz moderner Messverfahren

Der Einfluss des Eschentriebsterbens auf die Pflanzenphysiologie wurde u.a. im Verbundprojekt FraxMon untersucht. Phenolische Einlagerungen in befallenen Trieben und diverse Biomarker erwiesen sich als ungeeignet zur Einschätzung des Eschentriebsterbens oder zur Identifizierung resistenter Eschen. Die Blattanalyse erwies sich als vielversprechender als die Triebanalyse: Einige potenzielle Indikationen konnten identifiziert werden, deren Aussagekraft jedoch durch meteorologische Einflüsse, Standortbedingungen und genetische

Faktoren eingeschränkt ist (FraxMon Schlussbericht 2024; <https://www.fnr.de/fileadmin/projektdatenbank/2219WK20E4.pdf>). Durch phänologische Untersuchungen ist belegt, dass stärker vom Eschentriebsterben geschädigte Bäume tendenziell eine kürzere Vegetationsperiode aufweisen (ca. 1 Woche). Diese kürzere Assimilationsperiode hat möglicherweise eine weitere physiologische Relevanz für die Esche, z.B. in Bezug auf den Wasser- und Kohlenstoffhaushalt (Kahlenberg and Jochner-Oette submitted) und FraxMon Schlussbericht 2024; <https://www.fnr.de/fileadmin/projektdatenbank/2219WK20E4.pdf>).

Erkenntnisse zu den physiologischen Auswirkungen von virusinfizierten Eschen existieren bislang nicht. Neuere Erkenntnisse in anderen Baumarten zum Einfluss von Viren auf die Holzqualität zeigen deutliche Veränderungen in der Morphologie von Xylem und Phloem, was vermutlich virusbedingte Störungen der Transportvorgänge im Baum zur Folge hat. Dies könnte nicht nur die Standfestigkeit und vorzeitige Degeneration beeinflussen, sondern auch das Absterben von Blättern begünstigen, wodurch Photosynthese und Atmung reduziert werden. In der Folge kommt es zu Aststerben und einem verminderten Dickenwachstum des Stammes, während die Auswirkungen auf die Wurzeln noch weitgehend unbekannt sind. Beispiele aus dem Gartenbau verdeutlichen die erhebliche Bedeutung von Pflanzenviren für Gehölze, da Symptome an verschiedenen Organen zu massiven Schädigungen und Wachstumsdepressionen führen können, was letztlich große Ertragsinbußen zur Folge hat (Garnsey and Moreno 2010).

Im Allgemeinen lassen sich Pflanzenschädigungen nach Zhang et al. (2019) in vier Kategorien einteilen: Die Reduktion von Biomasse und des LAI (Blattflächenindex), Läsionen oder Nekrosen, Zerstörung der Pigmentsysteme und Welkeerscheinungen durch Dürrestress oder Insekteneinwirkungen. Zur Bestimmung des Vorhandenseins, bzw. des Grades von Stresseinwirkungen wie Wasser- oder Nährstoffdefizite, Krankheiten und Pflanzenschädlinge eignen sich Fernerkundungsdaten, bzw. terrestrische/*in situ* Bildaufnahmen (Barbedo 2019).

Die meisten Pflanzenkrankheiten induzieren physiologische Veränderungen (z.B. der Photosynthese, Respiration), welche mit typischen Symptomen in Verbindung stehen (z.B. Zerfall von photosynthetischen Pigmenten, Blattfall, reduzierte Wasseraufnahme) (Smigaj et al. 2015). Diese Veränderungen können in bestimmten Spektren der Wellenlängen erfasst werden, auch wenn die Variation der Signale in Abhängigkeit vom Blattalter, der Symptomstärke oder dem Einfluss weiterer Stressoren unterschiedlich ausfällt (Barbedo 2019). Multispektrale Daten, die einen Wellenlängenbereich vom VIS- bis NIR-Spektrum umfassen, eignen sich daher für ein umfassendes Monitoring der Vitalität von Waldbäumen (Zhang et al. 2019). Die Vitalität von Eschen wurde von (Murfitt et al. 2016) mit Hilfe des NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) analysiert, um Aussagen über die Auswirkungen des Eschenprachtkäfers auf nordamerikanische Eschen zu treffen. Multispektrale Daten wurden auch zur Klassifizierung des Eschentriebsterbens auf Samenplantagen (Augustin 2019, Kampen et al. 2019), in Reinbeständen (Hocheder 2018) oder in Mischwäldern (Waser et al. 2014) verwendet. Dennoch waren die Zusammenhänge mit multispektralen Kennwerten, bzw. die Klassifizierungsergebnisse nicht immer eindeutig, bzw. die verwendeten Ansätze sehr komplex und nicht praxisnah umsetzbar.

Thermale Kennwerte werden verwendet, um eine Reduzierung der stomatären Leitfähigkeit und damit verbundene Wärmeableitung, verursacht durch Wasserstress, zu detektieren. Da jedoch eine verringerte stomatäre Leitfähigkeit auch eine Folgewirkung von anderen Stresseinwirkungen, z.B. Krankheiten, ist (Smigaj et al. 2015), kann diese – begleitet durch Feldmessungen – auch indikativ für multiple Umwelteinflüsse sein (Barbedo 2019). Die Schließung der Stomata kann auch als ein Abwehrmechanismus verstanden werden, der das Eindringen von beispielsweise Mikroben in das Gewebe verhindert (Smigaj et al. 2015). Die Analyse thermaler Bildaufnahmen hat beispielsweise bereits zur frühzeitigen Feststellung des Befalls von Weinreben mit *Plasmopra viticola* geführt (Stoll et al. 2008) und ermöglichte bei Baumwolle die Unterscheidung von abiotischen und biotischen Stressfaktoren (Falkenberg et al. 2007).

Obwohl die originäre und vordergründige Anwendung von RGB-Bilddaten in der Analyse der Vegetationsentwicklung liegt (Anderson et al. 2016, Richardson 2019), eignen sich derartige Bildquellen auch zur Dokumentation von bereits sichtbaren Schädigungssymptomen, deren Entwicklung durch eine längere Zeitreihe dokumentiert und nachverfolgt werden kann (Barbedo 2019). Farbbasierte Indices finden beispielsweise Verwendung beim Monitoring von physiologischen Veränderungen, die in Zusammenhang mit der Wasserversorgung der Pflanze stehen (Graham et al. 2006). Erfolgreich eingesetzt wurden RGB-Bilddaten zudem bei der Detektion von Krankheiten wie der Cercospora-Blattfleckenkrankheit (Atlas et al. 2018) oder auch zur Bestimmung der Stickstoffversorgung von Mais (Corti et al. 2019) oder Reis (Zheng et al. 2018).

2.3 Synthese

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen widmete sich das Projekt FraxVir nun der umfassenden Untersuchung von Viren als potenzielle Einflussfaktoren auf die Vitalität der Esche. Während das Eschentriebsterben primär durch den Pilz *Hymenoscyphus fraxineus* verursacht wird, deuten aktuelle Forschungsergebnisse darauf hin, dass auch Viren den Gesundheitszustand der Bäume beeinflussen können – sei es durch direkte

Auswirkungen auf Stoffwechselprozesse oder durch eine veränderte Prädisposition gegenüber weiteren Stressfaktoren. Ziel war es daher, die Rolle von Viren im Zusammenspiel mit anderen biotischen und abiotischen Einflüssen zu analysieren. Die Auswirkungen des Eschentriebsterbens auf den Gesundheitszustand der Eschen wurden hierbei sehr detailliert untersucht und über einen längeren Zeitraum kontinuierlich beobachtet. Dabei wurden modernste Monitoring- und Analysemethoden genutzt, um ein umfassendes Bild der Interaktionen zwischen Viren, dem Eschentriebsterben und Umweltbedingungen zu gewinnen.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Als Ergänzungsprojekt zum Demonstrationsvorhaben FraxForFuture förderte das Projekt auch die Kooperation mit den anderen Verbundprojekten. Dabei gab es einen intensiven wissenschaftlichen Austausch und konkrete Synergien, insbesondere bei der Probenahme. Zwei der im Projekt untersuchten Standorte (Saatguterntebestände Melzower Forst und Kaisheim) waren als Intensivbeobachtungsflächen (IBF) Teil der Untersuchungen des übergeordneten FraxForFuture Demonstrationsprojektes. Boniturdaten zu den Symptomen des ETS wurden teilweise in FraxVir erhoben und teilweise von den Teilprojekten FraxGen und FraxMon übernommen. Im Zuge der Versuchsdurchführungen bestand ein wissenschaftlicher Austausch mit Teilprojekten aus FraxSilva und FraxGen, indem stichprobenartig bspw. gepfropfte Eschensämlinge, die für das Anlegen *H. fraxineus*-toleranter Samenplantagen vorgesehen waren, visuell inspiziert und molekularbiologisch getestet wurden. Auch in diesen Proben wurden vereinzelt Cytorhabdoviren in Sämlingen detektiert, die Scheckungen und Fleckungen der Blätter aufwiesen. Ein intensiver Austausch fand auch mit den Projektpartnern aus FraxMon statt, etwa in Angelegenheiten zur Sporenmessung und der Verwendung des neu entwickelten Boniturschlüssels (Peters et al. 2021), um die Daten zu vergleichen und weiterführende Erkenntnisse zu gewinnen.

Aufbauend auf den Voruntersuchungen zu Emaraviren in Forstgehölzen und der erfolgreichen Etablierung eines DAS-ELISA für das common oak ringspot-associated virus (CORaV) in der Stieleiche wurde ein Antikörper für den serologischen Nachweis des im Projekt zu detektierenden ASaV generiert. Die Arbeiten erfolgten in Kooperation mit der Firma Loewe Biochemica (Sauerlach, Deutschland). Das RNA 3-kodierte Nukleokapsidprotein wurde heterolog exprimiert, aufgereinigt und als Antigen für eine Immunisierung von Kaninchen genutzt. Der Antikörper ist in der Lage, das rekombinante ASaV P3 Protein zu detektieren, erbrachte im DAS-ELISA aber keinen erfolgreichen Virusnachweis. Die Befunde fließen in die künftige Entwicklung neuer Nachweismethoden ein. So können zum Beispiel anwendungsfreundliche und praxistaugliche Methoden etabliert werden, um die forstwirtschaftlich relevante Virusgruppe der Emaraviren zuverlässig nachzuweisen.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Zusammenfassung der wesentlichsten Erkenntnisse

An allen Untersuchungsstandorten wurden in TV 2 phytopathogene Viren nachgewiesen, die verschiedenen Virusfamilien angehören. Besonders verbreitet ist das Emaravirus ASaV, das in Alt- und Jungeschen nachgewiesen wurde und mit spezifischen Blattsymptomen verbunden ist. Weitere Viren wie das Idaeovirus PrLBaV und Cytorhabdoviren wurden ebenfalls identifiziert, wobei letztere in symptomfreiem Blattmaterial vorkommen und keine makroskopisch sichtbaren Symptome verursachen. Neue Viren aus den Familien Closteroviridae und Betaflexiviridae wurden ebenfalls nachgewiesen, mit Hinweisen auf eine mögliche Saatgutübertragbarkeit, insbesondere von ASaV und PrLBaV. Insgesamt konnte eine hohe Diversität (unterschiedliche Virusfamilien) und Abundanz belegt werden. Ebenso wurden in Jungeschen (IBF BY1) mehrere Viren im Wirt (Mischinfektionen aus Doppel- und Dreifachinfektionen) nachgewiesen. Alle Virusbefunde wurden in den folgenden Vegetationsperioden bestätigt und sind gesichert.

Unsere Analyse in TP4 identifizierte einen SNP-Marker in einem Virusabwehrgen, der mit dem Auftreten viraler Symptome statistisch signifikant korreliert, wobei die Variation dieses Locus zwischen symptomatischen und asymptomatischen virusinfizierten Eschen auftritt. Diese genetische Variation könnte eine Rolle bei der Unterdrückung von Symptomen spielen und somit für eine markerunterstützte Selektion in Züchtungsprogrammen genutzt werden. Eine Korrelationsanalyse mit den Genotypisierungsergebnissen und der Bonitur zum Eschentriebsterben an 144 Proben ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit für Virusinfektionen und dem Eschentriebsterben. Da jedoch nur eine einzelne Mutation getestet wurde und sich die Proben auf einen einzigen Standort beziehen, sind abschließende Aussagen mit dieser Methodik nicht möglich. Eine alternative Untersuchungsmethode in TV 3 prüfte den Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und Eschentriebsterben in einem molekularen Ansatz zum Nachweis des Pathogens in den Blättern bei 20 Bäumen. Hier zeigte die multifaktorielle Analyse keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Virusinfektionen und *H. fraxineus*.

Aufgrund der Ausdehnung einer Baumkrone lassen sich Blattsymptome nur schwer systematisch erfassen, zumal sie oft nur vereinzelt auftreten und große Bereiche des Blattwerks symptomfrei bleiben. Entsprechend konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der spektralen Signatur bei virusinfizierten und symptomtragenden und symptomfreien Eschen durch UAV-Befliegungen in TV 1 nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Blattphysiologie und -morphologie fokussierte sich auf durchschnittliche und gesund erscheinende Blätter. Auch hier unterschieden sich die Mittelwerte von z.B. Chlorophyll, SLA und Blattdicke nicht signifikant zwischen diesen Bäumen. Im Gegensatz dazu führte das Eschentriebsterben mit zunehmender Schädigung zu einer statistisch signifikanten Verringerung der spezifischen Blattfläche (SLA) und teilweise des Chlorophyllgehalts, während die Blattdicke tendenziell zunahm. UAV-Befliegungen ermöglichten eine flächendeckende Einschätzung des Gesundheitszustands anhand der Berechnung von Vegetationsindizes und der Anwendung von Schwellenwerten. Besonders geeignet sind die multispektralen Indizes NDVI, GNDVI und DVI sowie die RGB-Indizes GRVI, ExG und RGRI. Eine grobe Segmentierung der Baumkronen ist meist ausreichend für die Mittelwertbildung der Indizes, während ein neu entwickelter Workflow eine präzisere Segmentierung ermöglicht, bei der insbesondere Kronenlücken – relevant für stark geschädigte Eschen – ausgeschlossen werden.

Ein wichtiger methodischer Fortschritt in Bezug auf das Eschentriebsterben war die Etablierung der quantitativen PCR zur absoluten Quantifizierung von *H. fraxineus*-DNA-Markern in der Rhizosphäre durch TV 3. Die Analysen zeigten saisonale, regionale und horizontale Unterschiede in der Pathogenlast, sowie eine vertikale Translokation des Pathogens im Boden, was wichtige Implikationen für die Bewertung von Plusbäumen und die Erhaltung genetischer Ressourcen hat.

Highlights

- An allen untersuchten Standorten wurden verschiedene, teils neu entdeckte, Viren nachgewiesen.
- Mischinfektionen aus Doppel- und Dreifachinfektionen sind möglich.
- Es gibt Hinweise auf eine mögliche Saatgutübertragung, insbesondere von ASaV und PrLBaV.
- Einige Viren lassen sich anhand der Symptomatik makroskopisch von anderen Krankheitserregern abgrenzen
- Virusinfektionen und Eschentriebsterben (ETS) treten unabhängig voneinander auf.
- Die Pathogenlast von *H. fraxineus* unterscheidet sich erheblich nicht nur zwischen Beständen, sondern auch kleinräumig im jeweiligen Bestand an den einzelnen Eschen.
- Das ETS führt zu deutlicheren Veränderungen in der Blattphysiologie und -morphologie als Virusinfektionen.
- RGB- und Multispektral-Daten sind geeignet, unterschiedliche Schädigungsgrade des ETS zu diskriminieren.

- Neue genetische und molekulare Methoden liefern wertvolle Einblicke in Resistenzmechanismen und die Verbreitung von Pathogenen.

1.1 Standortbedingungen und ETS-Bonitur

Die Analyse der Standortbedingungen stellt eine essenzielle Grundlage für das Verständnis ökologischer Zusammenhänge dar. In diesem Kapitel werden die spezifischen Standortfaktoren der fünf ausgewählten Untersuchungsstandorte dargestellt. Dazu gehören zentrale Parameter wie Bodenart, Bodenfeuchte, Temperatur und Niederschlag. Für die beiden letztgenannten meteorologischen Größen werden nicht nur innerhalb des Projektzeitraums erhobene Daten präsentiert, sondern auch langfristige Mittelwerte (1981-2010).

Diese Umweltparameter sind von entscheidender Bedeutung für die Charakterisierung der Standorte hinsichtlich ihrer mikroklimatischen und bodenphysikalischen Eigenschaften und weisen eine besondere Relevanz im Kontext der aerobiologischen Sporenbelastung sowie der Pathogenlast im Boden auf. Es ist bekannt, dass Bodenfeuchte und Temperatur die Lebensbedingungen des Pilzes *H. fraxineus* (Goberville et al. 2016) sowie die Sporemission und -ausbreitung in der Luft (Timmermann et al. 2011) maßgeblich beeinflussen. Folglich könnten diese Standortparameter eine zentrale Rolle für die Krankheitsanfälligkeit und den allgemeinen Gesundheitszustand der Gemeinen Esche spielen. Die im Folgenden dargestellten Daten tragen somit auch zur tiefergehenden Analyse der biotischen und abiotischen Faktoren bei, die für die Entwicklung und Ausbreitung relevanter Pathogene von Bedeutung sind.

1.1.1 Klimatische und meteorologische Bedingungen

Die klimatischen und meteorologischen Bedingungen der fünf untersuchten Gebiete variieren aufgrund ihrer geographischen Lage. Basierend auf den Mittelwerten der Temperatur und des Niederschlags für den Zeitraum 1981–2010 (1 km x 1 km Rasterdaten des Deutschen Wetterdiensts, DWD Climate Data Center (CDC)) zeigt sich eine Spannbreite der mittleren Jahrestemperaturen zwischen 8,2 °C (Kaisheim) und 10,6 °C (Emmendingen). Die Niederschlagsmengen variieren noch stärker und reichen von 564 mm im Melzower Forst bis 1374 mm in Grabenstätt (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Mittelwerte der Temperatur und des Niederschlags im Zeitraum 1981-2010 (DWD Climate Data Center (CDC))

	Temperatur [°C]	Niederschlag [mm]
Melzower Forst	8,7	564
Kaisheim	8,2	838
Emmendingen	10,6	951
Schorndorf	9,7	837
Gabenstätt	8,6	1374

Abb. 3 zeigt die täglichen Mittelwerte der Temperatur für die fünf Untersuchungsgebiete über den betrachteten Zeitraum. Da die Temperaturmessungen ursprünglich u.a. mit Hobo-Sensoren durchgeführt wurden, diese jedoch aufgrund von Batterieausfällen nicht durchgehend Daten lieferten, basieren die Ergebnisse aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenso auf den 1 km x 1 km Rasterdaten des Deutschen Wetterdienstes (DWD Climate Data Center, CDC). Es ist erkennbar, dass die Temperaturverläufe saisonalen Schwankungen unterliegen, wobei die Tiefstwerte häufig an den Standorten Melzower Forst und Grabenstätt erreicht werden. Maximalwerte sind häufig, aber nicht ausschließlich, in Emmendingen zu verzeichnen. Die Temperaturmerkmale einzelner Jahreszeiten (Minimum-, Maximum-, Durchschnittstemperaturen und Niederschlagssummen) zeigt Tab. 2.

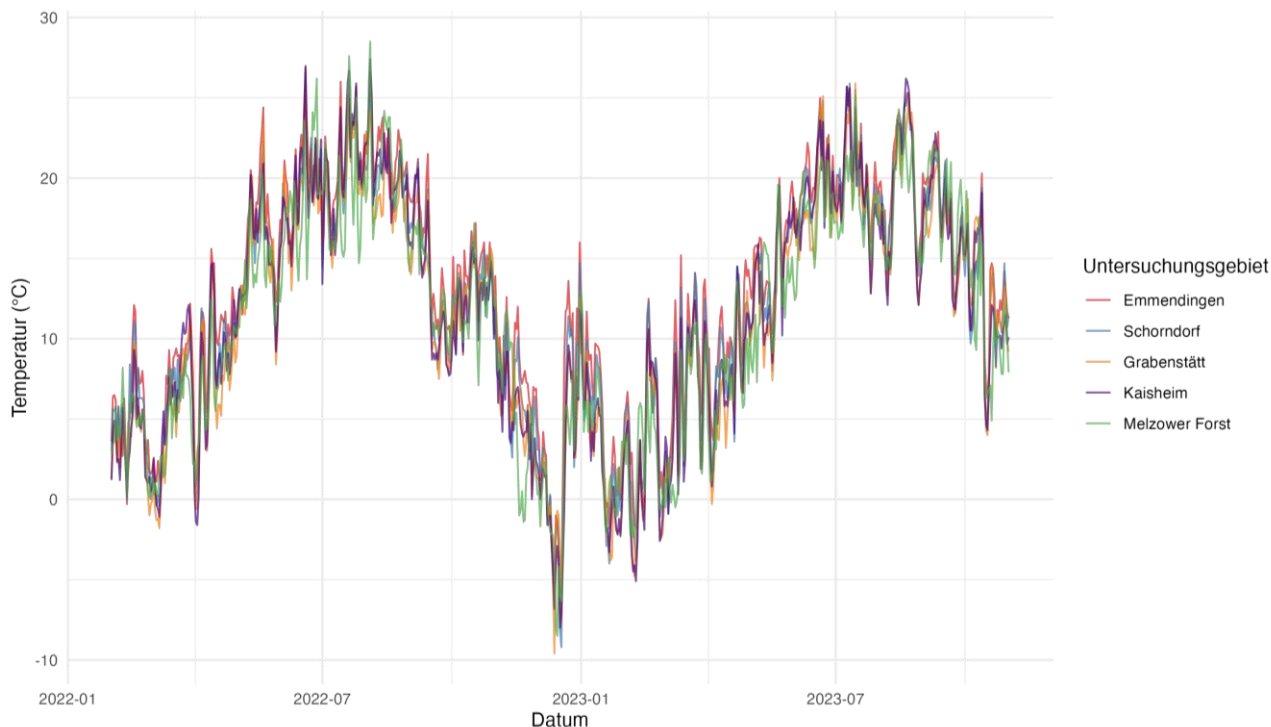


Abb. 3: Temperaturverlauf von Februar 2022 bis November 2023 für die fünf Untersuchungsgebiete (DWD Climate Data Center (CDC)).

Tab. 2: Gemessene Minimum- (Min), Maximum- (Max) und Durchschnittswerte (Mean) der Lufttemperatur (in °C) und Minimum- (Min), Maximum- (Max) und Summe (Sum) des Niederschlags (in mm) einzelner Jahreszeiten für 2022 und 2023 für die fünf Untersuchungsgebiete (DWD Climate Data Center (CDC)).

		März, April, Mai 2022				Juni, Juli, Aug. 2022				Sept., Okt. Nov. 2022				Dez., Jan., Feb. 2022			
		Min	Max	Mean	Sum	Min	Max	Mean	Sum	Min	Max	Mean	Sum	Min	Max	Mean	Sum
Emmendingen	Temperatur	0.8	24.4	10.9		15.9	27	20.9		4.6	21.5	12.6		-5.8	16	4.3	
	Niederschlag	0	17.3		134.6	0	36.8		189.8	0	39.6		230.8	0	10.9		107.9
Schorndorf	Temperatur	-0.4	22.3	9.7		14.5	26.6	19.9		1.6	21	11.2		-9.2	14.7	3.23	
	Niederschlag	0	33.8		201	0	53.6		249.8	0	19.1		241.6	0	11.8		103.2
Grabenstätt	Temperatur	-1.8	23.3	9		13	25.2	19.4		0.2	19.6	10.7		-9.6	12.5	2.1	
	Niederschlag	0	21.7		203.4	0	60.4		342.1	0	42		295.2	0	17.4		149.6
Kaisheim	Temperatur	-1.6	20.9	9.5		13.4	27.4	20.2		0	20.6	10.4		-8	11.8	1.9	
	Niederschlag	0	25		130.8	0	12.7		78.6	0	14.8		172.4	0	11.4		77.1
Melzower Forst	Temperatur	0.2	20.3	8.6		12.3	28.5	19.2		-1.4	17.4	10.5		-8.5	13	2.3	
	Niederschlag	0	7.6		35.2	0	11.8		96.2	0	36.8		83.5	0	13.2		106.8
		März, April, Mai 2023				Juni, Juli, Aug. 2023				Sept., Okt. Nov. 2023				Dez., Jan., Feb. 2023			
		Min	Max	Mean	Sum	Min	Max	Mean	Sum	Min	Max	Mean	Sum	Min	Max	Mean	Sum
Emmendingen	Temperatur	0.1	20	10.9		14.2	25.7	20.3		1.2	22.9	12.9		-2.6	10.6	5.8	
	Niederschlag	0	23.3		209.8	0	36.5		260.3	0	26.6		248.3	0	26.9		73
Schorndorf	Temperatur	-0.9	17.8	9.8		13.9	25.9	19.8		0	21.3	12.1		-6.1	9.9	4.5	
	Niederschlag	0	19.4		172.1	0	20.9		188.9	0	34.9		223.3	0	13.1		75.4
Grabenstätt	Temperatur	-0.3	18.8	8.6		12.1	25.9	19		-1.3	21	11.7		-6.9	10.8	3.8	
	Niederschlag	0	33.8		369.4	0	40.7		440.3	0	30		323.1	0	37.3		139.2
Kaisheim	Temperatur	-0.9	19.5	9		12.1	26.2	19.3		-1.3	22.8	11.5		-8.5	8.8	3	
	Niederschlag	0	28.8		185	0	22.5		259.5	0	28.5		173.4	0	15.4		80.6
Melzower Forst	Temperatur	-0.5	19.6	8.2		12.4	25.1	18.3		-4.9	22.1	11.6		-7.7	8.4	2.9	
	Niederschlag	0	9.1		95.5	0	46.5		226.4	0	19.1		108.2	0	8.2		62.8

1.1.2 Edaphische Bedingungen

Die Bodenanalytik der fünf Untersuchungsgebiete (siehe Abb. 4) zeigt, dass die Bodenart aller fünf Untersuchungsgebiete von Schluff und Sand geprägt ist. Die Unterschiede in der Schluffanteilstärke in den sandigen Böden der fünf Untersuchungsgebiete beeinflussen direkt die Wasser- und Nährstoffspeicherung im Boden. Für die Esche – die einerseits gut durchlässige, jedoch auch ausreichend feuchte, aber nicht staunasse Standorte benötigt (Dobrowolska et al. 2011) – sind insbesondere die Standorte mit stark bis mittlerem Schluffanteil (Grabenstätt, Kaisheim, Schorndorf) vorteilhaft, da sie in trockenen Phasen einen guten Wasserspeicher bieten. Der schwach schluffige Sand im Melzower Forst hingegen führt zu einer geringeren Wasserspeicherung, was sich insbesondere in trockenen Phasen negativ auf die Esche auswirken kann. Die Messung der Bodenfeuchte zeigt deutlich trockenere Bedingungen im Melzower Forst für fast die gesamte Dauer der Datenaufnahme. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sich die vor Ort beobachteten Bodengegebenheiten stark unterscheiden (z.B. feuchte Senken) und der Bodenfeuchtelogger in einem trockeneren Teil des Waldes Daten aufzeichnete. Unplausible Werte der Bodenfeuchte für Grabenstätt im Zeitraum November 2022 – April 2023 und dem Melzower Forst im Jahr 2022 wurden aus der Abbildung entfernt.

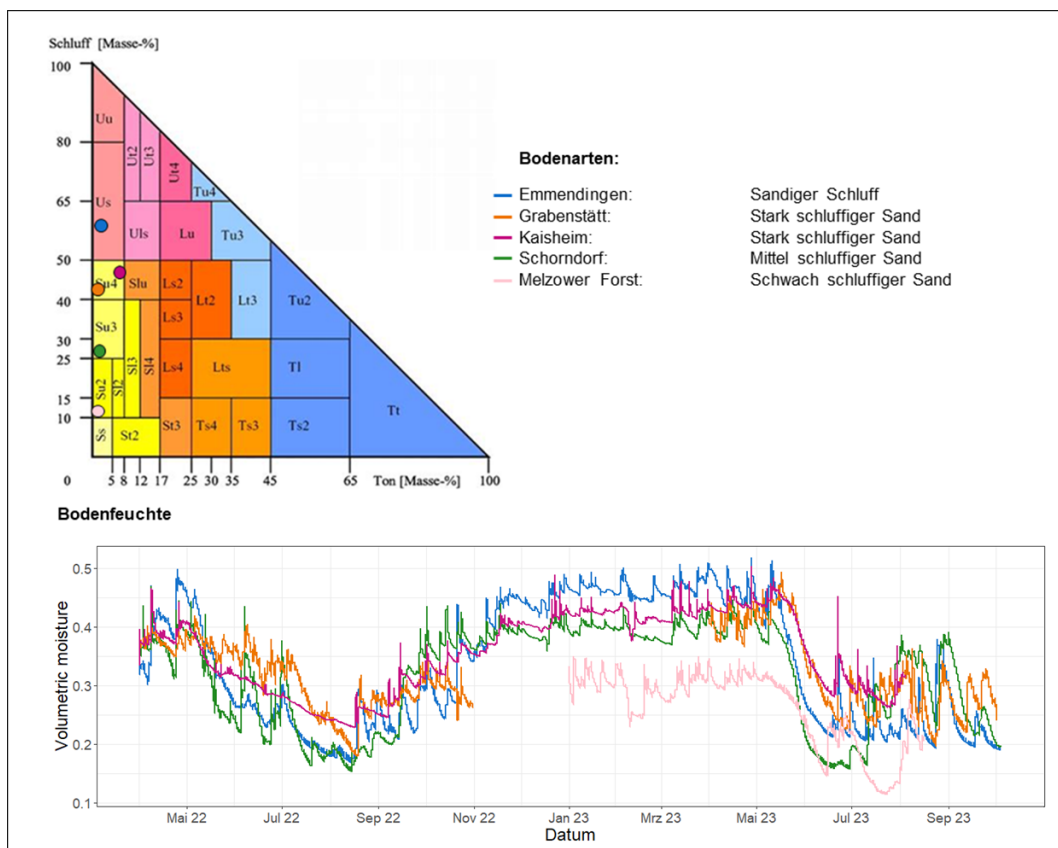


Abb. 4: Bodenarten (oben) und Bodenfeuchtemessungen von April 2022 bis Oktober 2023 (unten) für die fünf Untersuchungsgebiete.

1.1.3 Schadensbonitur in Zusammenhang mit dem Eschentriebsterben

Die kontinuierliche Aufnahme der Bonitur zur Bestimmung des Schadausmaßes durch das Eschentriebsterben verdeutlicht das Fortschreiten der Krankheit. Auf allen Flächen hat sich der Anteil stark geschädigter, bzw. abgestorbener Eschen innerhalb weniger Jahre deutlich erhöht, während der Anteil nur gering geschädigter Eschen kontinuierlich abgenommen hat (siehe Abb. 5). Insbesondere auf der im Jahr 2014 angelegten Klonfläche in Grabenstätt ist der Anteil abgestorbener Eschen mit über 30 % außergewöhnlich hoch. Allerdings hat sich dieser Wert mittlerweile weitgehend stabilisiert. Die Klonfläche in Grabenstätt liegt in einem eschengeprägten Wald an der Tiroler Ache, wo sich der Pilz stark vermehren kann (Fussi 2020). Auf den Samenplantagen Schorndorf und Emmendingen ist ein noch vergleichsweise höherer Anteil vitaler Eschen vorzufinden. Diese Samenplantagen sind durch eine größere Distanz der Bäume geprägt. Die beiden Saatguterntebestände stellen für die jeweiligen Regionen typische Landwälder dar. Da der Infektionsdruck maßgeblich durch das Vorkommen des Erregers und den Standortbedingungen geprägt ist und auf diese Weise das Schadgehen beeinflusst (Grosdidier et al. 2018, Klesse et al. 2021), wird in Kapitel 1.6.2 zum Infektionsdruck und der Pathogenlast nochmals drauf eingegangen.

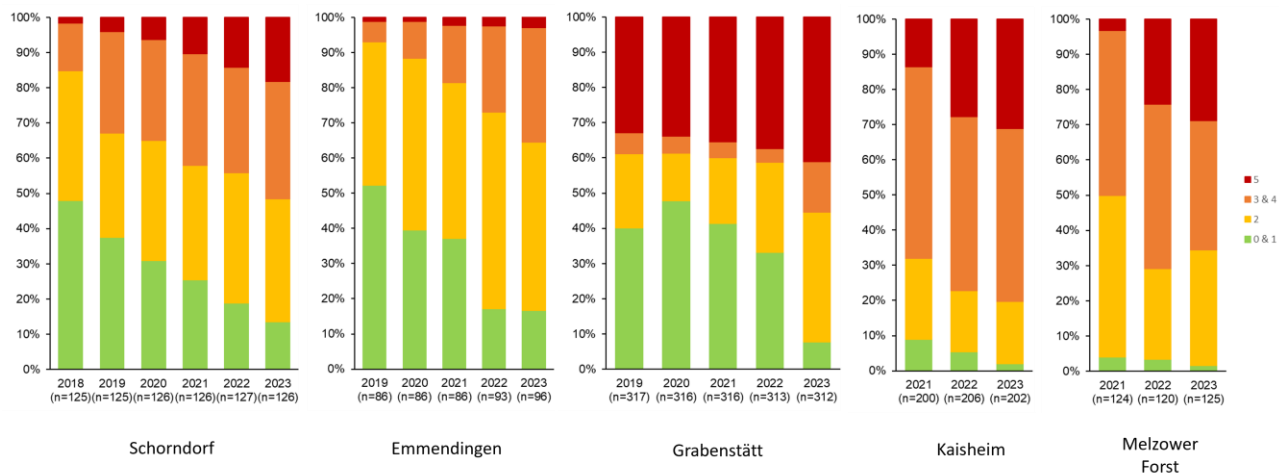


Abb. 5: Entwicklung der Bonitur für die fünf Untersuchungsgebiete bis 2023. Für Schorndorf, Emmendingen und Grabenstätt existieren aufgrund von Vorstudien (Eisen et al. 2024, Fussi 2020) Daten seit 2018 bzw. 2019.

1.2. Erfassung und Beurteilung der Virusvielfalt in Eschen

Zusätzlich zur Bonitur der Symptome des Eschentriebsterbens wurden die Eschen der Untersuchungsstandorte über drei Vegetationsperioden hinsichtlich Virussympomen visuell bonitiert, beprobt und molekular auf Virusinfektionen getestet. Insgesamt wurden im Projektzeitraum 500 Eschenproben untersucht, darunter 403 Blattproben, 68 Blütenproben und 29 Fruchtproben.

1.2.1 Auftreten von Blattsymptomen in Verbindung mit einer Virusinfektion

Virusverdächtige Symptome wurden an Sämlingen und Altbäumen des Melzower Forsts sowie an Jungeschen und Sämlingen am Standort Kaisheim beobachtet ($n = 73$, 18 % der untersuchten Blattproben). Zu den verdächtigen Symptomen zählten im Melzower Forst chlorotische Ringflecken, Scheckungen und Adernvergilbung in Kombination mit Blattdeformationen sowie eine Verringerung der Blattspreite, die sogenannte Fadenblättrigkeit. Die Symptome waren sowohl an den Sämlingen als auch den Altbäumen weit verbreitet (siehe Abb. 6a und b). Die Baumkronen der hohen Altbäume wurden mit Hilfe einer Hebebühne inspiziert und das Blattmaterial entnommen. Virusverdächtige Symptome waren hier unregelmäßig verteilt und auf bestimmte Kronenbereiche beschränkt. Eine umfassende Betrachtung der Baumkronen bei Alteschen ist entscheidend, damit virusverdächtige Symptome nicht übersehen werden und Daten zur Virusinfektion ermittelt werden können. In Kaisheim wurden virusverdächtige Symptome an jungen Eschen beobachtet. Zu den virusverdächtigen Symptomen zählten chlorotische Ringflecken, Scheckungen, chlorotische Linienmuster und Eichenblattmuster ohne Blattverformung (siehe Abb. 6c). Von den 73 Proben mit virusverdächtigen Symptomen wurden 60 positiv auf das Emaravirus ASaV getestet, entweder als Einzelinfektion oder als Mischinfektion in Kombination mit dem Ideavirus PrLbAV oder Cytorhabdoviren. Diese 60 Proben wiesen alle Blattsymptome auf, die in der Literatur als ASaV-typisch beschrieben wurden (Fadenblättrigkeit, chlorotische Ringflecken, Scheckungen und Adernvergilbung in Kombination mit Blattdeformationen). Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dieser Symptomatik und dem ASaV-Nachweis, was für weitere Untersuchungen ein wertvoller Befund ist. ASaV-typische Blattsymptome können mit geschultem Auge identifiziert werden und eine erste Einschätzung der Infektion mit dem Emaravirus vorgenommen werden. Einige Proben wurden zu fortgeschrittener Vegetationsentwicklung im Oktober untersucht. Durch die einsetzende Seneszenz an den Blättern wurden virusverdächtige Symptome teils überlagert, sodass Symptome nicht zweifelsfrei angesprochen werden konnten. Für das zuverlässige Erkennen virusinduzierter Symptome ist die Zeitspanne zwischen Juni und September zu empfehlen. In Kaisheim traten neben den oben beschriebenen ASaV-typischen Symptomen chlorotische Linienmuster und Eichenblattmuster ohne Blattverformung als virusverdächtige Symptome auf. Diese wurden positiv auf Mischinfektionen mit PrLbAV und Cytorhabdoviren getestet. Gleiche Symptome wurden bei einzelinfizierten Proben nicht beobachtet, was darauf hindeutet, dass Doppelinfektionen mit PrLbAV und Cytorhabdovirus für diese Symptome ursächlich sind.

Unspezifische Blattsymptome wie chlorotische Flecken und Läsionen, Blattrandchlorosen und nekrotische Läsionen wurden an allen Probenahmestellen ($n = 184$, 46 % der untersuchten Blattproben) dokumentiert, insbesondere in den Samenplantagen Emmendingen und Schorndorf und dem Klonarchiv in Grabenstätt (siehe Abb. 6d-h). Der Anteil der Proben mit solchen Symptomen lag bei 85 % in Emmendingen, 45 % in Schorndorf und 33 % in Grabenstätt. In Blattmaterial mit unspezifischen Symptomen konnten in den meisten Fällen Cytorhabdoviren detektiert werden. Vereinzelt wurden ASaV und PrLbAV sowie Mischinfektionen aus den drei Viren nachgewiesen. In 48 % der Proben mit unspezifischen Blattsymptomen wurden keine Viren nachgewiesen.

Es wurde weiterhin von allen Untersuchungsstandorten Blattmaterial von Eschen untersucht, das keine Symptome aufwies (n = 146, 36 % der untersuchten Blattproben). In 50 % der Proben ohne Symptome konnten Viren nachweisen werden, wobei Infektionen mit Cytorhabdoviren am häufigsten vorkamen, gefolgt von Mischinfektionen aus Cytorhabdoviren und PrLBaV sowie PrLBaV-Einzelfinfektionen.

Das Monitoring virusverdächtiger Symptome ist ein wichtiger Schritt in der Virusdiagnostik. Nichtsdestotrotz gibt die visuelle Bonitur keinen kompletten Aufschluss über den Virusstatus des Baumes. Erst ein molekularer Nachweis liefert eindeutige Befunde.

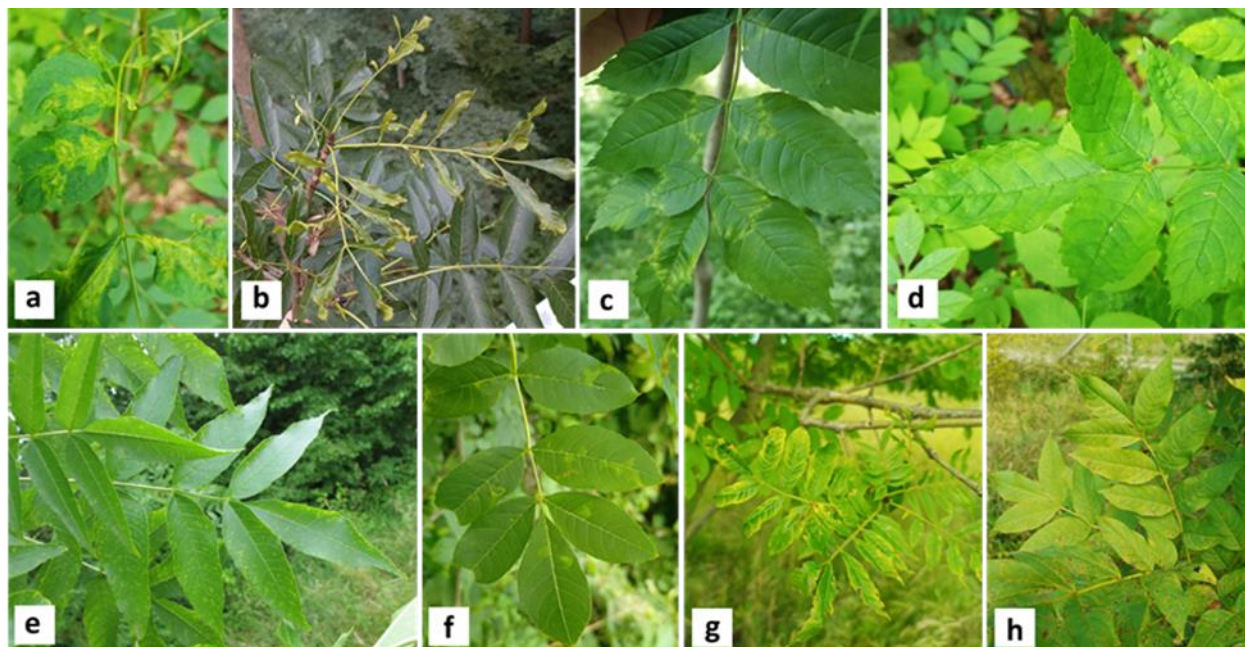


Abb. 6 Blattsymptome an der Gemeinen Esche. Während des Projektzeitraums wurden vielfältige Symptome beobachtet. Dazu zählten virusverdächtige Symptome, darunter chlorotische Ringflecken und Blattdeformation an Sämlingen (a) und Fadenblättrigkeit an Alteschen (b) des Melzower Forsts, chlorotische Linienmuster und Eichenblattpattern an Jungeschen (c) in Kaisheim sowie unspezifische Symptome, darunter Scheckungen (d), chlorotische Läsionen (e), chlorotische Flecken (f), Randchlorosen (g) und nekrotische Läsionen (h). Entnommen aus Rehanek et al. (2024).

1.2.2 Abundanz und Diversität der Viren

Mit Hilfe der etablierten und optimierten Nachweisverfahren (siehe Anhang, Seite 30) konnten die Viren zuverlässig detektiert werden. In mehr als der Hälfte der untersuchten Proben wurden, unabhängig von der Symptomatik, Virusinfektionen nachgewiesen. Cytorhabdoviren waren die am häufigsten detektierten Viren, die in 35 % der Blattproben nachweisbar waren, gefolgt von ASaV (13 %) und PrLBaV (2 %). In 8 % der Blattproben wurden Mischinfektionen nachgewiesen, wobei es sich in den meisten Fällen um Doppelinfektionen handelte. In zwei Eschen in Kaisheim wurden Dreifachinfektionen nachgewiesen. Ausgewählte PCR-Ergebnisse wurden durch eine Sanger-Sequenzierung bestätigt. Die Nepoviren arabis mosaic virus (ArMV) und cherry leaf roll virus (CLRV) wurden an den Untersuchungsstandorten weder molekular noch serologisch nachgewiesen und spielen somit in Eschen an den Untersuchungsstandorten keine Rolle (Abb. 7). Bestehende Infektionen konnten während des gesamten Projektzeitraums durch wiederholte Analysen im Folgejahr oder in den Folgejahren bestätigt werden.

Zusätzlich zu den Blattproben wurden im Projekt auch Eschenblütenproben männlicher Eschen aus den Samenplantagen Emmendingen und Schorndorf (n = 68) getestet. Dabei konnte wie in den Blättern eine weite Verbreitung von Cytorhabdovirus nachgewiesen werden.

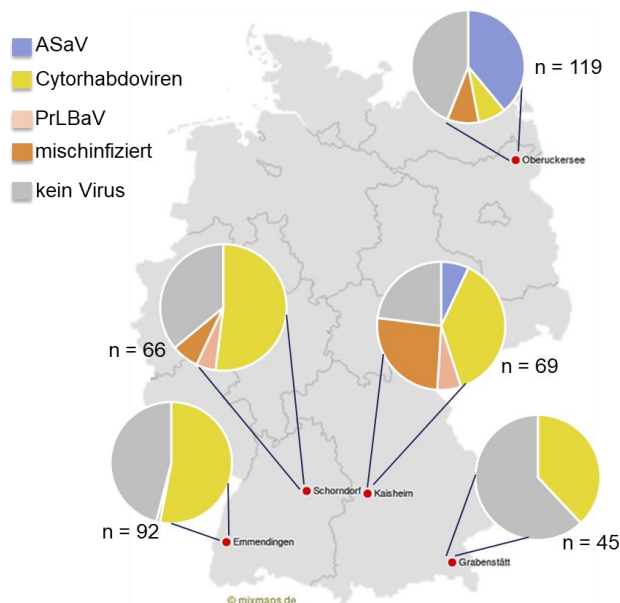


Abb. 7: Abundanz und Diversität der Viren. Darstellung der Virusnachweise für alle Untersuchungsstandorte im Projektzeitraum. n gibt die Anzahl der untersuchten Proben für jeden Standort an. Entnommen aus Rehanek et al. (2024).

Bei den im Projekt untersuchten Standorten handelt es sich um Eschensonderbestände, die enorme Bedeutung haben, z.B. als Lieferanten von qualifiziertem Saatgut im Falle der Saatguterntebestände und der Samenplantagen oder aufgrund von Toleranz- oder Resistenzeigenschaften der Bäume im Falle des Klonarchivs. Für die virologischen Untersuchungen wurde daher an den Samenplantagen neben Blatt- und Blütenmaterial auch Saatgut von Einzelbäumen entnommen und auf die verschiedenen Viren getestet. An den Saatguterntebeständen wurden neben den Mutterbaumbeständen auch die Sämlinge der Naturverjüngungen bonitiert und auf ihren Virusstatus getestet. In den Eschenfrüchten konnten Cytorhabdoviren und das PrLBaV detektiert werden, was für die Übertragung von großer Bedeutung sein kann. Das Emaravirus ASaV konnte in den Sämlingen der Naturverjüngungen häufig detektiert werden, was ein Saatgutübertragbarkeit dieser Viren nahelegt.

Die in allen untersuchten Geweben am häufigsten nachgewiesenen Cytorhabdoviren wurden phylogenetisch vertiefend eingeordnet. Mit Hilfe vergleichender Genomanalysen konnten zwei verschiedene Cytorhabdovirusarten (*Fraxinus gammacytorhabdovirus1*, FraGCRV1 und *Fraxinus gammacytorhabdovirus2*, FraGCRV2) identifiziert werden, die jeweils an allen Untersuchungsstandorten auftraten und neben der Gemeinen Esche auch die Blumenesche (*Fraxinus ornus*) und die Rot-Esche an europäischen Standorten (*Fraxinus pennsylvanica*) infizieren (siehe Anhang, S. 30; Rehanek et al. 2024)

Neben dem im Projekt untersuchten Viren sind am Eschenvirom weitere Viren beteiligt. Mit Hilfe einer HTS-Analyse wurden Eschenmischproben von den Standorten Emmendingen und Schorndorf auf virale Sequenzen bekannter und unbekannter Viren untersucht. Neben den im Projekt mittels RT-PCR detektierten Viren konnten zusätzlich Sequenzen neuartiger Viren generiert werden, die größte Ähnlichkeiten zu Viren der Familien *Betaflexiviridae* und *Closteroviridae* aufwiesen. Diese neuen Viren konnten mit Hilfe neu entwickelter diagnostischer Oligonukleotide durch RT-PCR Systeme in Einzelbäumen bestätigend detektiert werden. Die Bedeutung dieser neuen Viren für die Esche als Pathogen bzw. für die Interaktionen mit den anderen Viren des Eschenviroms bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

1.3 Genetik der Esche in Zusammenhang mit der Virenausstattung und dem ETS

Alle Bäume in den Samenplantagen und im Klonarchiv wurden beprobt; 200 Altbäume aus Kaisheim und 138 aus dem Melzower Forst sowie 200+200 Nachkommen wurden per GPS erfasst, gekennzeichnet, beprobt und genotypisiert. Insgesamt wurden von 29 Bäumen in den Plantagen von Emmendingen und Schorndorf Saatgut geerntet. Mit Hilfe zweier Software-Pakete CERVUS 3.0.7 (Kalinowski et al. 2007) and COLONY 2.0.6.9 (Jones and Wang 2010) wurden zunächst Abstammungsanalysen für alle Sämlinge und Altbäume aus Kaisheim durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurden 16 Altbäume (mit bekanntem Infektionsstatus) und 68 benachbarte Sämlinge aus dem Melzower Forst ebenfalls genotypisiert und die Abstammung mit den beiden Programmen analysiert, woraufhin die übereinstimmenden Ergebnisse ausgewählt wurden. In einem letzten Schritt wurde eine Abstammungsanalyse für alle Altbäume und Sämlinge aus dem Melzower Forst durchgeführt, wobei wiederum das übereinstimmende Ergebnis beider Programme ausgewählt wurde. Die Analysen wurden sowohl für die Mütter als auch für die Väter durchgeführt.

Wir haben Virusabwehrgene im Eschengenom annotiert und alle von uns entwickelten Primerpaare an codierenden Teilen und Promotoren dieser Gene im Labor an vier zufällig ausgewählten Eschen-DNA-Proben getestet. Alle Primerpaare, die klare Elektrophoresegelebilder ergaben, wurden für die anschließende Sequenzierung ausgewählt. Auf dieser Grundlage wurden PCR-Produkte gezielt sequenziert, die durch 38 Primerpaare für codierende Sequenzen und 36 für Promotorsequenzen an acht Proben amplifiziert wurden. Dabei hatten vier Proben Virussymptome und vier Proben waren ohne Symptome. In einem nächsten Schritt wurden basierend auf relevanten Polymorphismen aus allen Markerkandidaten sechs ausgewählt und an einer größeren Anzahl von Proben getestet. Schließlich wurde aus sechs ein Markerkandidat ausgewählt und hinsichtlich relevanter Polymorphismen an 115 virusinfizierten und nicht infizierten, symptomatischen und asymptomatischen Proben getestet. Der letzte Schritt der Markerentwicklung bestand aus einer Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen der Genotypisierung mit dem Markerkandidaten, dem Infektionsstatus und den Symptomen der Proben. Unter Verwendung verschiedener Versionen zur Bewertung des Genotyps zeigte ein Locus eine Korrelation mit dem Phänotyp bei einem p-Wert $\leq 0,05$ (konservatives Niveau). Daraus lässt sich schließen, dass es einen Zusammenhang zwischen den viralen Symptomen und der Mutation (SNP-Marker, Single Nucleotide Polymorphism) in dem untersuchten Gen gibt, wenn auch keinen eindeutigen. Der Locus variiert zwischen den virusinfizierten symptomatischen und asymptomatischen Eschen. Von dieser Variation könnte eine mögliche Reaktion der Esche auf Virusinfektionen ausgehen, indem Bäume mit der Variation die Ausbildung von Symptomen unterdrücken könnten. Dies könnte für eine markerunterstützte Selektion innerhalb von Züchtungsprogrammen verwendet werden.

Um den möglichen Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit gegenüber dem Eschentriebsterben und der Anfälligkeit gegenüber Virusinfektionen zu prüfen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dabei wurde das Ergebnis des entwickelten Virusabwehrmarkers mit den Boniturdaten des Eschentriebsterbens an 144 Proben aus Grabenstätt aus den Jahren 2019 bis 2023 verrechnet. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Genotypen des Virusabwehrmarkers und den Boniturdaten zum Eschentriebsterben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein Zusammenhang zwischen der Virusinfektion und dem Eschentriebsterben festgestellt werden konnte. Es ist aber anzumerken, dass aufgrund einer einzigen getesteten Mutation keine endgültigen Schlussfolgerungen gezogen werden können.

1.4 Einflüsse auf die Blattphysiologie und Blattmorphologie der Esche

Im Jahr 2022 und 2023 wurden auf allen fünf Untersuchungsgebieten zahlreiche Feldmessungen zur Blattphysiologie und Blattmorphologie durchgeführt. Diese wurden mit den jeweils im Sommer aufgenommenen Boniturdaten verknüpft und in Bezug zum Eschentriebsterben und zu Virusinfektionen gesetzt und ausgewertet.

1.4.1 Eschentriebsterben

Die Auswertung der Chlorophyllmessungen zeigte für die Flächen Emmendingen, Schorndorf, Grabenstätt und Kaisheim, dass zwischen Chlorophyllgehalt und unterschiedlichen Vitalitätsstufen nur teilweise ein signifikanter Unterschied bestand. Obwohl für die beiden Plantagenflächen ein leichter Rückgang des Chlorophyllgehalts bei stärker geschädigten Eschen beobachtet wurde, konnte dies für Grabenstätt und Kaisheim nicht bestätigt werden (Abb. 8). Die Arbeiten stützen demnach auch die Ergebnisse von Kahlenberg et al. (submitted).

Mittels des Fv/Fm-Messgerät wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz ermittelt, wodurch eine Einteilung in gestresste und nicht gestresste Pflanzen ermöglicht wurde. Unterschiede in der Anzahl gestresster Bäume je nach Boniturklasse konnten festgestellt werden. Da jedoch mit dem Fv/Fm-Messgerät nicht bestimmt werden kann, welcher Art von Stress die Bäume ausgesetzt sind, kann nicht abschließend festgelegt werden, ob der erhöhte Anteil gestresster Bäume auf das fortgeschrittene Eschentriebsterben zurückgeführt werden kann. Insbesondere in Grabenstätt konnten zudem sichtbare Hitzestresssymptome festgestellt werden, was die Schwierigkeiten in der praktischen Anwendung verdeutlicht.

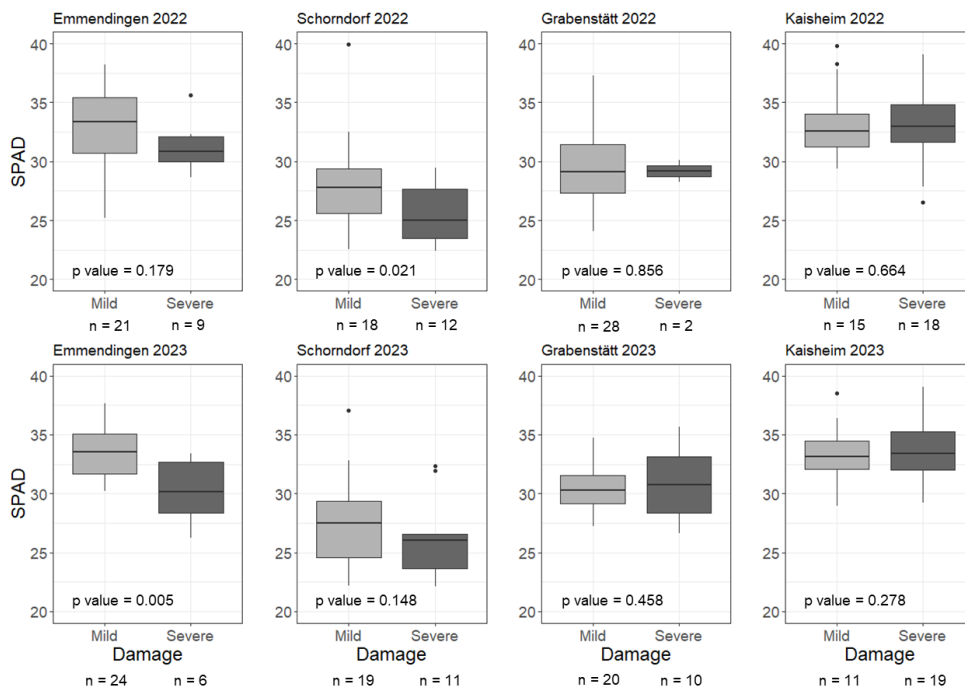


Abb. 8: Chlorophyllgehalt in Zusammenhang mit der Stärke der Schädigung durch das Eschentriebsterben für 2022 und 2023 (Bild verändert nach Buchner et al. (2024)).

Hinsichtlich der Blattmorphologie wurden die Spezifische Blattfläche (SLA), die Blattdicke und die Fluktuierende Asymmetrie (FA) untersucht. Hierfür wurden bis zu 20 Blätter für jeweils 30 Bäume für die Flächen Emmendingen, Schorndorf, Grabenstätt und Kaisheim gesammelt, im Labor gescannt, die Blattdicke bestimmt, getrocknet und gewogen. Die Messungen der Blattdicke zeigen eine leichte Zunahme dieser mit stärkerer Schädigung der Bäume durch das Eschentriebsterben; diese war jedoch nur für Schorndorf 2022 und Kaisheim 2023 statistisch signifikant. Die spezifische Blattfläche unterscheidet sich je nach Boniturklasse und es zeigte sich eine leichte Abnahme der Blattfläche mit zunehmender Schädigung durch das Eschentriebsterben. Dieser Unterschied war jedoch nur für die Fläche Schorndorf 2022 und 2023 und Kaisheim 2023 signifikant (Abb. 9).

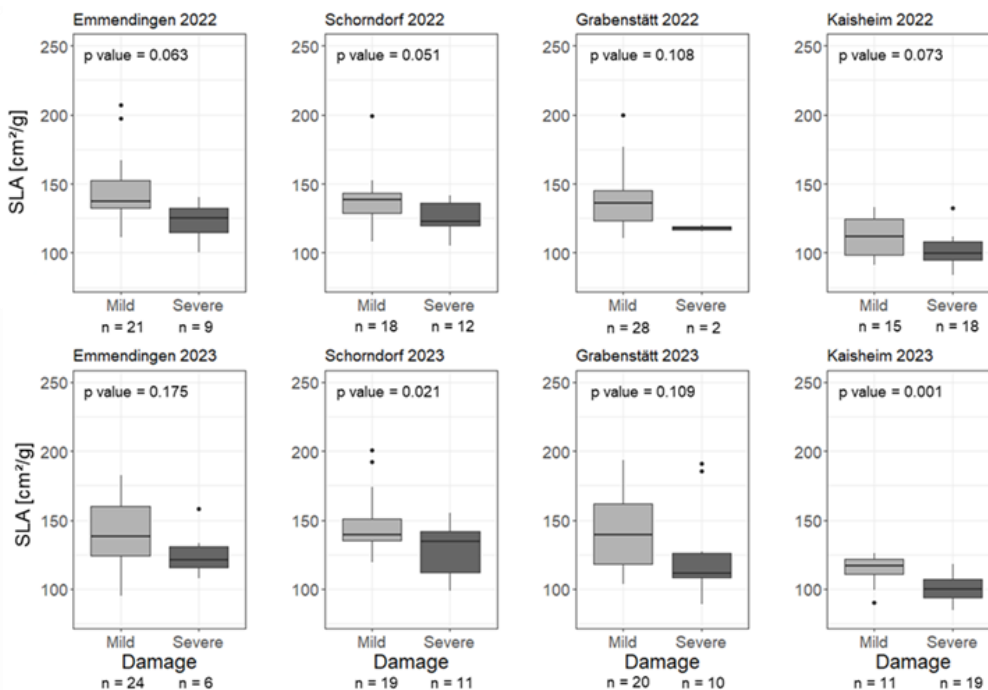


Abb. 9: Spezifische Blattfläche (SLA) in Zusammenhang mit der Stärke der Schädigung durch das Eschentriebsterben für 2022 und 2023 (Buchner et al. 2024).

1.4.2 Virusinfektion

Der Zusammenhang zwischen Chlorophyll-Gehalt, SLA und Blattdicke mit Virusinfektionen wurde geprüft, jedoch konnte nur für die Chlorophyll-Messungen und Virusinfektionen für Kaisheim 2022 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 10). Dies legt nahe, dass Virusinfektionen unabhängig vom Eschenriebsterben keinen wesentlichen Einfluss auf die Blattphysiologie und Blattmorphologie der Eschen haben – zumindest im Rahmen der hier untersuchten Parameter. Es ist zu beachten, dass für diese Untersuchung gezielt gesunde und vital erscheinende Blätter ausgewählt wurden, um potenzielle Auswirkungen auf den gesamten Baum zu analysieren. Zudem war die Stichprobengröße in einigen Fällen, wie in Schorndorf 2022, begrenzt, was die Effektstärke beeinflussen könnte.

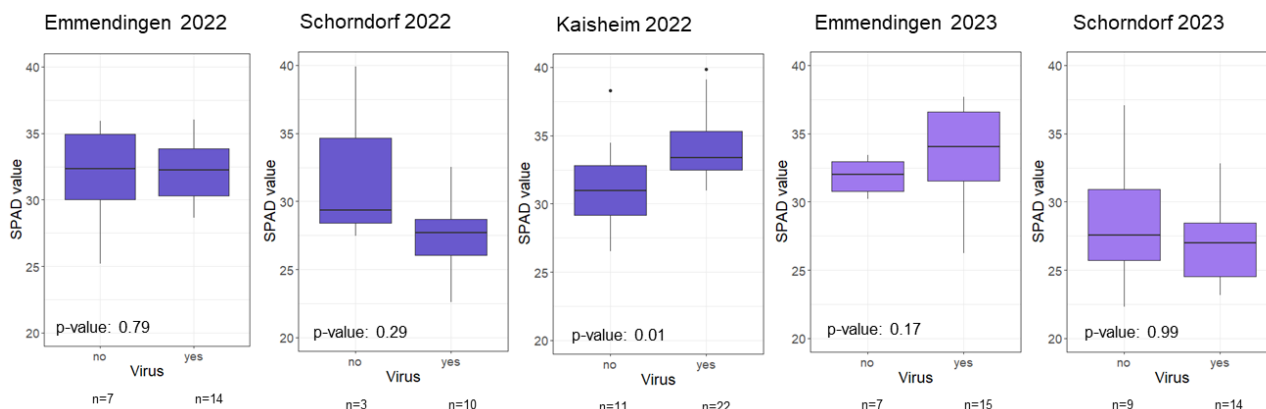


Abb. 10: Chlorophyll-Gehalt in Zusammenhang mit Virusinfektionen.

1.5 Veränderungen der spektralen Signatur in Abhängigkeit des Gesundheitszustands

Drohnenaufnahmen, die zwischen Mai und Oktober generiert wurden, lieferten qualitativ hochwertige Bilddaten und detaillierte Orthophotos der Untersuchungsgebiete. Pro Fläche und Jahr wurden zwischen zwei und vier Befliegungen durchgeführt. Verwendet wurden hierfür die RGB- und Thermaldrohne DJI Mavic 2 EA, der Hexacopter XR6 mit der Multispektralkamera Tetracam und die Multispektraldrohne DJI Mavic 3 M. Die aufgenommenen Einzelbilder wurden nachbearbeitet, im Falle der thermalen Daten konvertiert und zu Orthophotos zusammengesetzt. Jeweils zehn RGB- und zehn multispektrale Vegetationsindizes wurden auf ihre Eignung zur Detektion des Schädigungsgrads bzw. von Virusinfektionen untersucht.

Die Baumkronen der Eschen wurden in den Orthophotos manuell segmentiert (Abb. 11), so konnte sichergestellt werden, dass nur die tatsächliche Blattfläche der Eschen in die Segmente mit aufgenommen wurde. Bodenbereiche und größere Astbereiche wurden ausgeschlossen. Die RGB und multispektrale Vegetationsindizes wurden berechnet und auf ihr Potential, schwach geschädigte Eschen von stark geschädigten Eschen zu unterscheiden, überprüft. Hierbei zeigten sich in vielen Fällen signifikante Unterschiede der Indexwerte je nach Boniturstufe.

Dabei zeigten sich in vielen Fällen signifikante Unterschiede der Indexwerte in Abhängigkeit von der Boniturstufe.

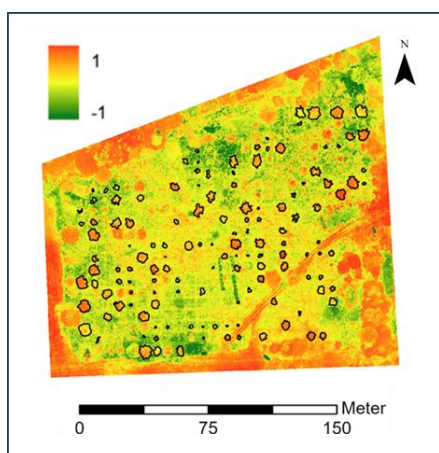


Abb. 11: Vegetationsindex GNDVI für die Plantage Schorndorf (13.06.2023) zur Verdeutlichung der manuellen Segmentierung der Baumkronen.

1.5.1 Spektrale Signatur und Eschentriebsterben

Als am besten geeignet zur Einschätzung des Gesundheitszustands erwiesen sich die multispektralen Indizes NDVI, DVI und GNDVI sowie die RGB-Indizes GRVI, ExG und RGRI (Berechnungen siehe Abb.18 im Anhang, siehe Abb. 12), wobei multispektrale Daten (erste Zeile der Abbildung) etwas besser geeignet sind, die Auswirkungen des Eschentriebsterbens zu detektieren.

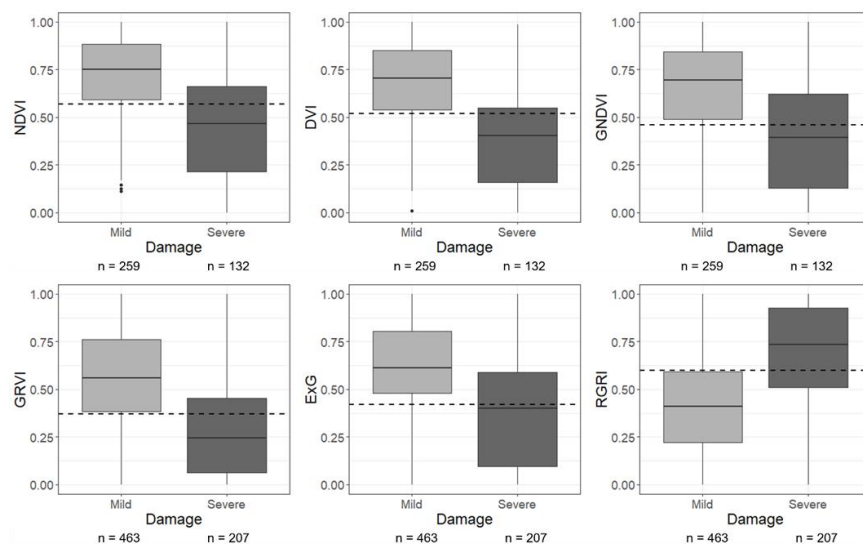


Abb. 12: Die multispektralen Indizes NDVI, DVI, GNDVI und die RGB-Indizes GRVI, ExG und RGRI mit den jeweils bestimmten Schwellenwert (gestrichelte Linie) der Sommerbefliegungen für Emmendingen und Schorndorf, zusammengefasst für schwach und stark geschädigte Eschen (Buchner et al. 2025).

Die Berechnung von Schwellenwerten zur Unterscheidung stark (Bonitur 3 und 4) und schwach (Bonitur 1 und 2) geschädigten Eschen (siehe gestrichelte Linie in Abb.12; Details siehe Anhang Seite 23-24) wurde mittels *density plots* (Beispiel siehe Abb. 13) realisiert und für die untersuchten RGB- und multispektralen Indizes angewandt. Somit konnte erstmals ein praxistauglicher Workflow (siehe Anhang, S. 24) zur Detektion unterschiedlich geschädigter Eschen präsentiert werden.

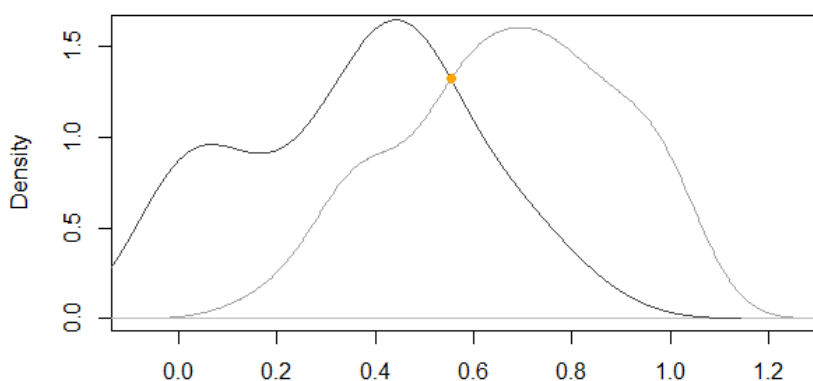


Abb. 13: Bestimmung von Schwellenwerten zwischen stark (Bonitur 3 und 4) und schwach (Bonitur 1 und 2) geschädigten Eschen mittels *density plots*. Der orange Punkt stellt in diesem Beispiel den entsprechenden Schwellenwert dar.

Während die RGB- und die multispektralen Kamerasensoren gute Ergebnisse lieferten, ergaben die thermalen Drohnenaufnahmen keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar konnte der erwartbare Trend von zunehmenden Kronentemperaturen für stärker geschädigte Eschen für einige Befliegungen beobachtet werden, dieser war jedoch nur für Schorndorf im Juni und Oktober 2023 signifikant.

Nahaufnahmen der Baumkronen im Juni, Juli und Oktober 2023 in einer Flughöhe von ca. 8 m über den Baumkronen auf den Flächen Emmendingen und Schorndorf ermöglichten eine detaillierte Untersuchung der Baumkronen. Es zeigte sich, dass die exakte Abgrenzung der Baumkrone von ihrer Umgebung mit Ausschluss aller Bodenpixel nur mit einer feinen Segmentierung erreicht werden kann, eine grobe Segmentierung des Umrisses der Baumkrone führt zur Inklusion von Bodenpixeln. Allerdings sind die Auswirkungen auf gemittelte Vegetationsindexwerte pro Baumkrone gering, aber durchaus vorhanden (Einzelheiten siehe Anhang, S. 24-25).

1.5.2 Spektrale Signatur und Virusinfektion

Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Virusinfektionen und den untersuchten Vegetationsindizes festgestellt werden (Abb. 14). Während sich die Vegetationsindizes mit zunehmender Schädigung durch das Eschentriebsterben deutlich verändern, ließ sich dieser Effekt nicht auf Virusinfektionen übertragen. Dies ist möglicherweise dadurch zu begründen, dass Infektionen z.T. auch symptomlos einhergehen oder nur wenige Bereiche des gesamten Blattwerks betreffen.

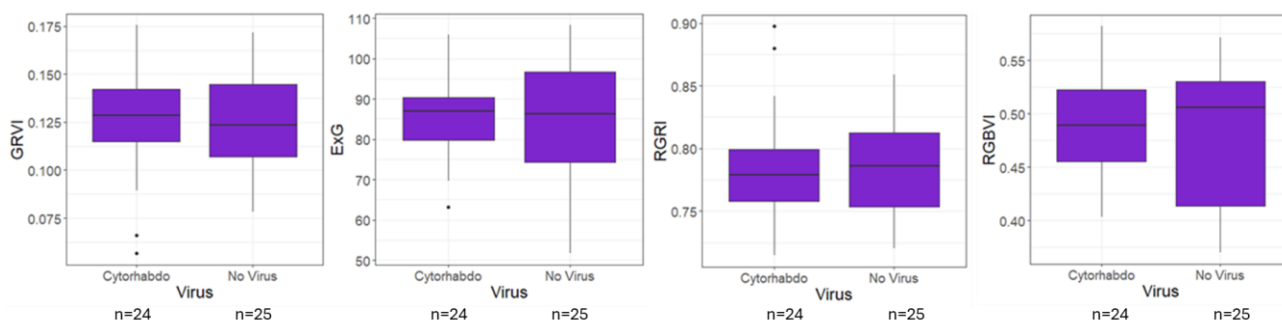


Abb. 14: Auswahl an vier RGB-Vegetationsindizes (GRVI, ExG, RGRI und RGBVI) für Emmendingen im Juli 2022 in Zusammenhang mit einer Cytorhabdovirus-Infektion.

1.6. Pathogenlast und Infektionsdruck

1.6.1 Methodenentwicklung und qualitativer und quantitativer molekularer Nachweis der standortabhängigen Sporenbelastung

Der Eintrag von *H. fraxineus*-Ascosporen in die Eschenbestände ist ein wichtiger Faktor für den Infektionsdruck und das Auftreten des Eschentriebsterbens. Trotzdem konnte die Sporenbelastung in Beständen und die individuelle Belastung am Eschenpflanzort bisher nicht präzise erfasst werden. Insbesondere aufgrund der Bedeutung für die Formation von Stammfußnekrosen bestand damit eine Lücke in der Bewertung von Beständen und bei den Faktoren zur Beurteilung von Plusbäumen. Mit Hilfe eines molekularen Ansatzes zum Nachweis des Pathogens konnten die benötigten Informationen nun bereitgestellt werden. Es wurden notwendige Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Boden, Streu aber auch von passiven Sporenfallen etabliert, um das benötigte Ausgangsmaterial für die Analysen zu erhalten. Mit den angepassten Methoden ist es nun möglich, die Erregerbelastung in der Routine quantitativ und qualitativ (artspezifisch) im TaqMan Real-Time-PCR-Assay zu bestimmen. Im Projekt konnten so in den fünf Beständen zehn bis zwanzig Parzellen untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Erregerlast im jährlichen Verlauf schwankt, zwischen den Beständen und zwischen individuellen Eschen innerhalb von Metern bestehen erhebliche Unterschiede im Sporeneintrag. Der Nachweis des Pathogens gelang in 17 % der Bodenproben, wobei die obersten 5 cm am höchsten belastet waren. Insgesamt stellt der etablierte molekulare Ansatz eine wichtige Methode zur Überwachung der Belastung des Bodens und zur Erfassung des Eintrags bei Sporenfallen dar (Böhm et al. 2024). Diese Ergebnisse können in künftigen *H. fraxineus*-Monitoring Bestrebungen für die Auswahl geeigneter Flächen und Pflanzorten zur Erhaltung und Selektion von Eschenpflanzgut einfließen.

1.6.2 Sporenkonzentrationen

Für die Analyse der Sporenkonzentration von *H. fraxineus* wurden in allen fünf Untersuchungsgebieten Sporenfallen aufgestellt, die in 2022 und 2023 wöchentlich gewechselt wurden. Ausgewertet wurden Filter von insgesamt sieben verschiedenen Standorten (siehe Tab. 3). Auf den Flächen Emmendingen und Grabenstätt wurden je zwei Sporenfallen aufgestellt, da die Heterogenität der Standorte eine zusätzliche Aufnahme notwendig machte. Auf den meisten Flächen wurden Filter im Zeitraum von Mitte Mai (KW 22) bis Anfang Oktober (KW 40) gesammelt. In Emmendingen kam es im Jahr 2023 zu einem Ausfall von zwei bzw. drei Filtern für die beiden Messstandorte in Folge von Sturmereignissen.

Tab. 3: Sporenbelastung in Target Copys pro 40 ng DNA-Input (Summe, Maximum, Minimum und Mittelwert) aller sieben Sporenstandorte in den Jahren 2022 und 2023. Filter ohne Befund sind jene, auf denen keine Sporen gefunden wurden (Nachweisgrenze: 10 Kopien/Reaktion).

Fläche	2022						2023					
	Anzahl Filter	Filter ohne Befund	Σ	Max	Min	MW	Anzahl Filter	Filter ohne Befund	Σ	Max	Min	MW
Emmendingen 1	20	19	96	96	NA	96	21	18	159	104	22	53
Emmendingen 2	20	16	242	117	20	60,5	22	21	44	44	NA	44
Schorndorf	21	20	3	3	NA	3	23	23	0	NA	NA	NA
Grabenstätt 1	23	12	177	275	19	68,4	16	5	1235	1083	12	195,1
Grabenstätt 2	23	17	752	95	7	35,4	16	10	2146	519	27	205,8
Kaisheim	25	13	381	157	11	23,8	20	14	285	77	2	23,8
Melzower Forst	12	NA	38	26	12	19	21	19	2450	2421	29	1225

Die Auswertung der Filter erfolgte mittels qPCR (Methodik siehe Seite 38, Böhm et al. 2024), jedoch konnten mitunter nur sehr geringe Sporenkonzentrationen auf den Flächen festgestellt werden und die Nachweisgrenze wurde oftmals unterschritten (siehe Abb. 15). Dennoch wird ersichtlich, dass die Unterschiede zwischen den Jahren und zum Teil auch zwischen den Beständen (siehe Abb. 16) sehr groß waren. Die Sporenkonzentration erzielte dabei in 2023 und am Standort Grabenstätt Maximalwerte. Interessant ist zudem, dass die Sporenwerte im Melzower Forst in 2023 maximal sind ($\Sigma = 2450$) und sich vor allem durch eine relativ frühe Phase der Sporulation beziehen (KW 23).

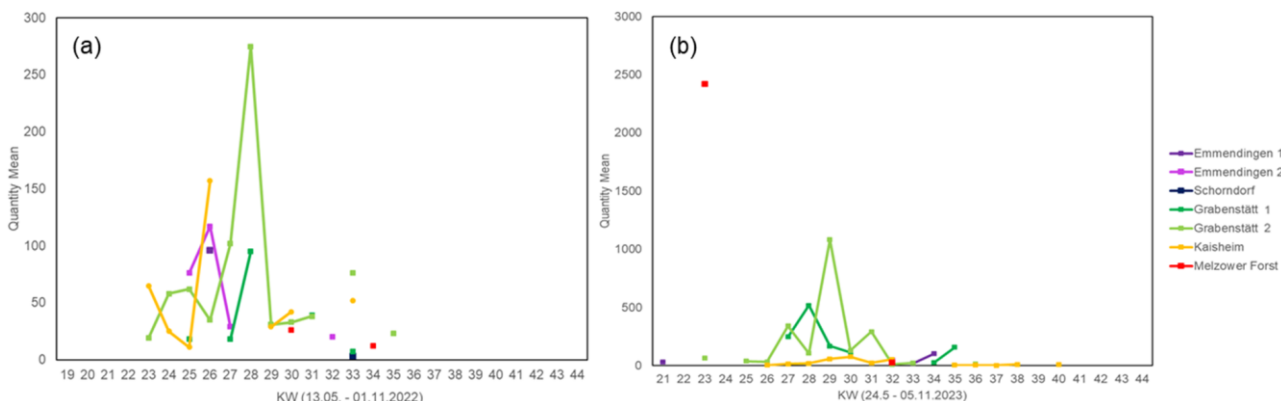


Abb. 15: Sporenkonzentrationen auf den Untersuchungsgebieten für 2022 (a) und 2023 (b).

Aufgrund der geringen Sporenbelastung und dem Unterschreiten der Nachweisgrenze ist der zeitliche Verlauf der nur für wenige Standorte kontinuierlich interpretierbar. Ein Ausnahme stellt die Klonfläche in Grabenstätt dar. In beiden Jahren wurden hier (Messtandort 2) sehr hohe Werte gemessen (siehe Abb. 15 und 16). Ebenfalls spiegelt sich die Tatsache wider, dass im Jahr 2023 die Sporenbelastung deutlich höher war, was sich auf die feuchten Bedingungen in den Monaten Mai und Juni zurückführen lässt (siehe Abb. 4). Auch die Ergebnisse zur Pathogenlast im Boden (TV3) zeigen hohe Werte für den Standort Grabenstätt auf. Die Boniturdaten (siehe Kapitel 1.1.3, Abb. 5) bestätigen mit dem hohen Anteil an stark geschädigten Eschen (Bonitur 3 und 4) und dem starken Rückgang an Eschen in Bonitурklasse 1 im Jahr 2023 den hohen Infektionsdruck.

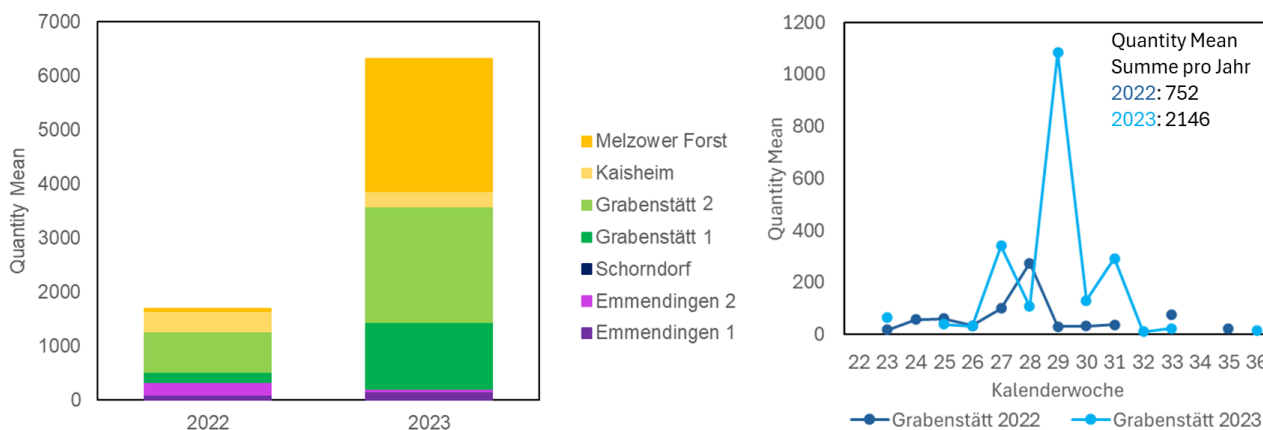


Abb. 16: Sporenkonzentrationen auf allen Flächen für 2022 und 2023 im Vergleich und für den Standort Grabenstätt 2.

2. Verwertung

2.1 Wissenschaftlicher Erkenntnisgewinn und Forschungsausblick

Die Verbreitung der Ascosporen des Erregers des Eschentriebsterbens, *H. fraxineus*, stellt epidemiologisch das größte Problem dar. Unterschiede im jährlichen Sporeneintrag und der kleinflächigen Akkumulationen resultieren mit den differenziert zu betrachtenden Umweltbedingungen in einem unterschiedlichen Infektionsdruck auf Flächen und an individuellen Eschenstandorten. Das Projekt stellt die zuvor nicht etablierten molekulare Methoden und Analysen bereit. Die Projektergebnisse verdeutlichen zudem, dass die Degenerationserscheinungen an *Fraxinus excelsior* nicht auf einen einzelnen Schadfaktor begrenzt werden sollten, sondern auch das Resultat komplexer Interaktionen sind. So tragen die Projektergebnisse auch maßgeblich zu neuen Erkenntnissen bezüglich des Viroms der Esche bei. Die Erkenntnisse der virologischen Untersuchungen belegen gleichzeitig den Bedarf weiterer Studien zum Virom und seinen Auswirkungen auf die Gesundheit der Esche. Das komplette Eschenvirom scheint noch nicht erfasst zu sein. Viren, die seit langem in der Esche beschrieben sind, darunter das *Nepovirus avii* (CLRv) und das *Nepovirus arabis* (ArMV), scheinen dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen, während kürzlich entdeckte Viren wie *Emaravirus fraxini* (ASaV), das *Idaeovirus ligustri* (PrLbaV) oder neuartige Cytorhabdoviren in den Eschen der fünf Untersuchungsstandorte weit verbreitet sind. Darüber hinaus konnten weitere Viren aus den Familien *Betaflexiviridae* und *Closteroviridae* identifiziert werden. Zusätzliche, noch unentdeckte Viren, die ebenfalls am Virom der Esche beteiligt sein, können nicht ausgeschlossen werden. Um die Esche als Wirtschaftsbaum langfristig zu erhalten, sollten sämtliche Faktoren einschließlich der Viren im Zuge interdisziplinärer Studien einbezogen werden.

Die Analysen zur Genetik, Phylogenie und Biologie der untersuchten Viren liefern die Basis für weiterfolgende Studien. Die Hinweise auf eine Saatgutübertragbarkeit einzelner Viren machen darauf aufmerksam, dass diese neuen Erkenntnisse künftig bei der Qualitätssicherung in der Saatgutproduktion als Qualitätskriterium einfließen. Einige Viren sind vektorübertragbar, was zu einer schnellen Verbreitung in einem Bestand führen kann. Die Erforschung weiterer Übertragungswege wie der Boden- und Wasserübertragbarkeit und die Aufklärung der Vektoren als Risiko für die Verbreitung und Chance für die Bekämpfung ist erstrebenswert.

Die Variation im entwickelten Marker könnte Auswirkungen auf die Mustererkennung haben und damit die Immunantwort beeinflussen, die die Toleranz/Anfälligkeit der Gemeine Esche gegenüber Viren anzeigt. Der entwickelte SNP-Marker könnte dabei helfen, Individuen mit geringer Anfälligkeit für Viruserkrankungen erfolgreich zu identifizieren und könnte für die markergestützte Selektion bei der Eschenzüchtung geeignet sein. Die Verbesserung der Effizienz der Selektion auf Virustoleranz bei der Eschenzüchtung durch Markerunterstützung könnte für die zukünftige Bekämpfung von Viruserkrankungen bei Eschen in kürzeren Züchtungszyklen von großer Bedeutung sein.

Zusammen mit diesen Erkenntnissen und den nun zur Verfügung stehenden Methoden zur Quantifizierung und Differenzierung des Pathogendruckes zwischen Beständen und an einzelnen Pflanzorten im Bestand ergeben sich erstmals neue Kriterien für eine verbesserte Bewertung von Standorten und Genotypen.

2.2 Einsatz in der Praxis

Die ermittelten Schwellenwerte der Vegetationsindizes für RGB- und multispektrale Daten in Zusammenhang mit dem Eschentriebsterben können Anwendung in der Forstpraxis finden. Die Verwendung von Drohnen ist weitverbreitet und neue Modelle (wie das hier verwendete System DJI Mavic 3M) integrieren z.T. auch kostengünstig multispektrale Sensoren. Die einfache Bedienung der Drohnen ermöglicht in der Forstpraxis eine großflächige Befliegung von Eschenbeständen. Die anschließende Nachbearbeitung der Daten bis zur Anwendung der Indizes ist anhand der berechneten Schwellenwerten und des erarbeiteten Workflows auch in der Praxis umzusetzen. Diese Schwellenwerte sind überaus praxisorientiert und ermöglichen eine Einschätzung des Gesundheitszustands von Eschen, befallen vom Eschentriebsterben. Die Ergebnisse der Analyse der Blattphysiologie und -morphologie zeigen zudem, dass das Eschentriebsterben auch hier zu einer deutlichen Veränderung der Blätter führt.

Die Weiterentwicklung zuverlässiger Virus-Nachweissysteme und die Entwicklung von Schnelltests oder anwendungsorientierten Nachweisverfahren für die Praxis ist notwendig und wird auf Grundlage der erlangten Erkenntnisse künftig möglich sein.

Bei der Bereitstellung von forstlichem Vermehrungsgut der Esche könnte in Zukunft mithilfe des entwickelten SNP-Markers ein Screening durchgeführt werden, um solche mit verbesserter Toleranz auszuwählen.

Insbesondere bei der Anlage von Sonderbeständen zur Erhaltung der genetischen Vielfalt bei der Esche, aber auch bei der Beurteilung von selektierten Eschenpflanzgut und der Vermehrung von toleranten Genotypen in Samenplantagen, ist eine Analyse des Sporeneintrags zur Beurteilung des lokalen Gefährdungspotentials eine wertvolle Ergänzung. Die hierzu notwendigen Methoden wurden im Projekt etabliert und der Gemeinschaft bereitgestellt (Böhm et al. 2024).

3. Erkenntnisse von Dritten

Es sind keine relevanten, dieses Forschungsvorhaben beeinflussenden Ergebnisse durch die fortlaufenden Recherchen bekannt geworden.

4. Veröffentlichungen

4.1 Publikationen

Veröffentlicht:

- Böhm, J. W.; Böhm, C.; Zübert, G.; Kahlenberg, G.; Jochner-Oette, S.; Kube, M. (2024): Load of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* differs in soil. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(1). DOI: 10.1007/s41348-024-00970-6
- Buchner, L.; Eisen, A.-K.; Jochner-Oette, S. (2024): Effects of ash dieback on leaf physiology and leaf morphology of *Fraxinus excelsior* L. *Trees*, 38(5):1205–1221. DOI: 10.1007/s00468-024-02546-1
- Buchner, L.; Eisen, A.-K.; Jochner-Oette, S. (2025): Identification of Damage Severity in *Fraxinus excelsior* L. Trees Caused by Ash Dieback Using Multisensory and Multitemporal UAV Imagery. *Forest Ecology and Management*, 585, DOI:10.1016/j.foreco.2025.122660
- Köbölkuti, Z. A.; Rehanek, M.; von Bargaen, S.; Büttner, C.; Fussi, B. (2025): Identification and amplification of candidate genes for virus defence in ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Plant Dis Prot*, 132, 30. DOI:10.1007/s41348-024-01018-5
- Nouri, S.; von Bargaen, S.; Rumbou, A.; Gaskin, T. R.; Büttner, C.; Nourinejad Zarghani, S. (2025): Evolutionary Dynamics and Population Genetics of Ash Shoestring-Associated Virus in a European-Wide Survey. *Microorganisms*, 13, 633. DOI:10.3390/microorganisms13030633
- Rehanek, M.; Al Kubrusli, R.; Fernandez, H.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Virusvielfalt in Eschen. In: Steinhart, F.; Burzlaff, T. (Eds.): *FraxForFuture – Erhalt der Gemeinen Esche als Wirtschaftsbaumart*, Berichte Freiburger Forstliche Forschung 106: 40–42
- Rehanek, M.; Kubrusli, R.; Köpke, K.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2024): Detection of viruses in special stands of common ash reveals insights into the virome of *Fraxinus excelsior*. *Forests*, 15(8), 1379. DOI: 10.3390/f15081379

Ein Teilaspekt zum Thema Viren in Eschen wurde im Buchkapitel von Forest Microbiology publiziert:

- Büttner, C.; Landgraf, M.; Fernandez Colino, H. L.; von Bargaen, S.; Bandte, M. (2023): Virus diseases of forest and urban trees. In: Asiegbu, F. & Kovalchuk, A. (Eds.): *Forest Microbiology*, Volume 3. Elsevier, 61–97. DOI:10.1016/B978-0-443-18694-3.00011-0

Eingereicht:

- Köbölkuti, Z. A.; Rehanek, M.; von Bargaen, S.; Büttner, C.; Fussi, B.: An NDR1/HIN1-like gene identified in *Fraxinus excelsior* L. may trigger defence mechanisms in response to virus infection. Im Reviewprozess bei *European Journal of Forest Research*.

Geplant:

- Buchner, L.; Eisen, A.-K.; Jochner-Oette, S.: Close-up multispectral UAV images of *Fraxinus excelsior* L. tree crowns in the context of ash dieback

Eine weitere Veröffentlichung aller im FraxVir Verbund beteiligten Teilvorhaben ist geplant.

4.2 Konferenzbeiträge

Vorträge:

- Böhm, J. W.; Eisen, A.-K.; Buchner, L.; Köbölkuti, Z.; Landgraf, M.; Köpke, K.; Al Kubrusli, R.; von Bargaen, S.; Fussi, B.; Jochner-Oette, S.; Büttner, C.; Kube, M. (2022): Molecular monitoring of *Hymenoscyphus fraxineus*. IUFRO. 6.–9. September in Lissabon, Portugal.
- Buchner, L.; Eisen, A.-K.; Köbölkuti, Z.; Böhm, J. W.; Köpke, K.; Al Kubrusli, R.; Landgraf, M.; von Bargaen, S.; Fussi, B.; Kube, M.; Büttner, C.; Jochner-Oette, S. (2022): Detection of the influence of abiotic and biotic stressors on common ash using multisensorial and multitemporal data. IUFRO. 6.–9. September in Lissabon, Portugal.
- Landgraf, M.; Eisen, A.-K.; Buchner, L.; Köbölkuti, Z.; Böhm, J. W.; Fussi, B.; Kube, M.; Köpke, K.; Al Kubrusli, R.; von Bargaen, S.; Jochner-Oette, S.; Büttner, C. (2022): Detection and evaluation of viral diversity in ash. IUFRO. 6.–9. September in Lissabon, Portugal.
- Buchner, L.; Eisen, A.-K.; Köbölkuti, Z.; Böhm, J. W.; von Bargaen, S.; Rehanek, M.; Kube, M.; Büttner, C.; Fussi, B.; Jochner-Oette, S. (2023): Detektion des Einflusses von abiotischen Stressfaktoren, Krankhei-

- ten und Schädlingsbefall an Eschen mit multisensorischen und multitemporalen Daten – eine Studie im Projekt FraxVir. FowiTa. Forstwissenschaftliche Tagung, 11.–13. September 2023 in Dresden.
- Köbölkuti, Z. A.; Nowak, S.; Fuchs, S.; Ketterl, N.; Fussi, B. (2023): Genetik der Esche in Zusammenhang mit der Virenausstattung und dem Eschentriebsterben. Präsentation im Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung Freising am 14. Juni 2023.
- Köbölkuti, Z. A.; Nowak, S.; Fuchs, S.; Ketterl, N.; Fussi, B. (2023): Genetik der Esche in Zusammenhang mit der Virenausstattung und dem Eschentriebsterben. Präsentation im Statusseminar FraxForFuture 2023.
- Rehanek, M.; Al Kubrusli, R.; Fernandez, H.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Virusvielfalt in Eschen. Deutsche Pflanzenschutztagung, 26.–29. September 2023 in Göttingen.
- Rehanek, M.; Fernandez Colino, H. L.; Al Kubrusli, R.; Eisen, A.-K.; Buchner, L.; Köbölkuti, Z.; Böhm, J. W.; Fussi, B.; Kube, M.; Jochner-Oette, S.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Erfassung und Beurteilung der Virusvielfalt in Eschen – eine Studie im FraxVir Projekt. FowiTa. Forstwissenschaftliche Tagung, 11.–13. September 2023 in Dresden.
- Rehanek, M.; Al Kubrusli, R.; Köpke, K.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2024): Befunde zu Viren in Sonderbeständen der Gemeinen Esche geben Aufschluss über das Virom von *Fraxinus excelsior*. 56. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises „Viruskrankheiten der Pflanze“, 11.–12. März 2024 in Weinstadt.
- Köbölkuti, Z. A. (2024): Präsentation des FraxVir-Projekts während der Wissenschaftlichen Tagung des AWG „60 Jahre im Dienste der Waldzukunft“ am 1. Oktober 2024.

Posterpräsentationen:

- Buchner, L.; von Bargaen, S.; Rehanek, M.; Böhm, J. W.; Köbölkuti, Z.; Büttner, C.; Kube, M.; Fussi, B.; Eisen, A.-K.; Jochner-Oette, S. (2023): Detektion des Einflusses von abiotischen Stressfaktoren, Krankheiten und Schädlingsbefall an Eschen mit multisensorischen und multitemporalen Daten. Deutsche Pflanzenschutztagung, 26.–29. September in Göttingen.
- Fernández Colino, H. L.; Rehanek, M.; Eisen, A.-K.; Buchner, L.; Köbölkuti, Z.; Böhm, J. W.; Fussi, B.; Kube, M.; Jochner-Oette, S.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Nachweis verschiedener Viren in Blütenmaterial aus Samenplantagen der Europäischen Esche (*Fraxinus excelsior*) – eine Studie im Rahmen des FraxVir-Projekts. Deutsche Pflanzenschutztagung, 26.–29. September in Göttingen.
- Frey, L.; Rehanek, M.; Al Kubrusli, R.; Fernandez, H.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Investigations on the virus status of mother trees and seedlings of common ash (*Fraxinus excelsior*) from the Melzower Forest – A study within the FraxForFuture project. 55. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises „Viruskrankheiten der Pflanze“. 20.–21. März 2023 in Berlin.
- Frey, L.; Rehanek, M.; Al Kubrusli, R.; Fernandez, H.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Untersuchungen zum Virusstatus von Mutterbäumen und Sämlingen der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior* L.) aus dem Melzower Forst – Eine Fallstudie im Rahmen des FraxVir Projektes. Deutsche Pflanzenschutztagung, 26.–29. September in Göttingen.
- Köbölkuti, Z. A.; Eisen, A.-K.; Buchner, L.; Jochner-Oette, S.; Rehanek, M.; Köpke, K.; Landgraf, M.; von Bargaen, S.; Al Kubrusli, R.; Büttner, C.; Böhm, J. W.; Kube, M.; Fussi, B. (2023): Allelic variation and post-transcriptional regulation of candidate genes associated with virus defence in *Fraxinus excelsior* L. Second EVOLTREE Conference 2023 RESILIENT FORESTS FOR THE FUTURE, 12.–15. September 2023 in Brasov, Rumänien.
- Rehanek, M.; Al Kubrusli, R.; Frey, L.; Eisen, A.-K.; Buchner, L.; Köpke, K.; Köbölkuti, Z.; Böhm, J. W.; Fussi, B.; Kube, M.; Jochner-Oette, S.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Untersuchungen zum Virusstatus von Mutterbaumbeständen der Gemeinen Esche im Rahmen des FraxVir Projektes. FowiTa. Forstwissenschaftliche Tagung, 11.–13. September 2023 in Dresden.
- Rehanek, M.; Al Kubrusli, R.; Fernandez, H.; Eisen, A.-K.; Buchner, L.; Köbölkuti, Z.; Böhm, J. W.; Fussi, B.; Kube, M.; Jochner-Oette, S.; von Bargaen, S.; Büttner, C. (2023): Erfassung der Virusdiversität in Sonderbeständen von *Fraxinus excelsior*. 26.–29. September in Göttingen.

ANHANG

Teilvorhaben 1 (KU)

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Ziel des Teilprojektes war es, den Gesundheitszustand der Esche im Kontext von u.a. viralen und pilzlichen Krankheiten mit multisensorischen und multitemporalen Daten zu erkennen und den Grad der Schädigung durch das Eschentriebsterben einzuschätzen. Ein kontinuierliches und räumlich hoch aufgelöstes Monitoring der Entwicklung der untersuchten Eschen über einen Zeitraum von zwei Jahren ermöglicht eine detaillierte Beobachtung der Untersuchungsgebiete. Mittels festinstallierter Kamerasysteme und UAV-Befliegungen wurden multisensorische Bilddaten aufgenommen und eine umfassende Vitalitätsbeurteilung von gesamten Beständen bis hin zu einzelnen Blattbereichen durchgeführt. Farbbasierte Vegetationsindizes und thermale Kennwerte wurden in Zusammenhang zu der Vitalität der Eschen gesetzt. Neu bestimmte Schwellenwerte der Vegetationsindizes zur Unterscheidung zwischen schwach und stark geschädigten Eschen sollten wichtige Kriterien für die Forstpraxis zur Detektion des Gesundheitszustands der Eschen liefern. Detaillierte UAV-Nahaufnahmen der Baumkronen differenzieren weiter die unterschiedliche Ausprägung der Schäden durch das Eschentriebsterben innerhalb einer Krone. Feldmessungen (u.a. Chlorophyll-Gehalt, Chlorophyll-Fluoreszenz, Blattmorphologie, Bodenanalytik) lieferten wesentliche Informationen bezüglich der Auswirkungen des Eschentriebsterbens auf die Physiologie und Morphologie der Blätter befallener Eschen.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP 1.1: Koordination des Verbundes FraxVir

Im Rahmen des Projekts wurden umfassende Arbeiten zur Koordination, Vernetzung und wissenschaftlichen Weiterentwicklung des Verbunds durchgeführt. Zahlreiche Projekttreffen, sowohl virtuell als auch teilweise vor Ort im Rahmen der FraxForFuture Tagung in Kassel 2022 und der FraxForFuture Abschlusstagung in Götting 2023, ermöglichten eine enge Abstimmung zwischen den Projektpartnern. Besprochen wurden dabei unter anderem die Planung und Durchführung von Geländearbeiten, der Austausch von Pflanzenmaterial und Proben sowie die Koordination der Datenerhebung und -auswertung. Ein wichtiger Schwerpunkt lag auf der Schaffung einer Cloud-Plattform, die als zentrale Schnittstelle für den Datenaustausch innerhalb des Projekts diente. Alle erhobenen Daten wurden hier hinterlegt, um eine effiziente Zusammenarbeit zu gewährleisten und teilprojektübergreifende Analysen durchzuführen.

AP 1.2: Erstellung von Luftbildern, Datensammlung und Ausstattung der Monitoringflächen inkl. Temperatur-/Feuchteloggern und Sporenfallen inkl. Datenaustausch

Im Rahmen des Arbeitspakets 1.2 wurden in den Jahren 2021 bis 2023 umfangreiche Arbeiten zur Datensammlung und Ausstattung der Monitoringflächen durchgeführt. Bereits im Oktober 2021 wurde ein BR-Bericht über das Projekt aufgezeichnet und am 27.10.2021 ausgestrahlt. Auf den übrigen Flächen, darunter Emmendingen, Schorndorf, Kaisheim und Melzower Forst, befanden sich bereits Klimastationen und/oder Lufttemperatur-/Feuchtelogger. Zudem wurden alle Flächen mit Bodenfeuchteloggern ausgestattet.

Auf allen fünf Untersuchungsflächen wurden die Bodenfeuchtelogger und Lufttemperatur-/Feuchtelogger in regelmäßigen Abständen von etwa vier Monaten ausgelesen. Zudem wurden im 1. und 2. Quartal 2022 Sporenfallen auf den Flächen verteilt. Der wöchentliche Wechsel der Sporenfallen wurde durch Forstmitarbeiter, AWG-Mitarbeiter, Privatpersonen und Studenten sichergestellt. Für die Flächen Emmendingen, Schorndorf und Grabenstätt wurden die Koordinaten der einzelnen Bäume mit einem dGPS (Stonex S9 III) aufgenommen und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt, während die Koordinaten der Bäume für Kaisheim bereits im Rahmen von FraxMon erhoben worden waren.

Im 4. Quartal 2023 begann die DNA-Extraktion der gesammelten Sporenfilter als Vorbereitung für die qPCR-Analyse im Labor der KU. Die Sporenfilter aus den Jahren 2022 und 2023 wurden für weitere Analysen, die an der UHOH durchgeführt wurden, vorbereitet.

AP 1.3: In situ-Bildaufnahmen und UAV-Befliegungen

Im Rahmen von AP 1.3 wurden in den Jahren 2021 bis 2023 umfangreiche Arbeiten zur Durchführung von UAV-Befliegungen und zur Installation sowie Nutzung von *in-situ*-Kamerasystemen auf den Untersuchungsflächen umgesetzt. Bereits im Jahr 2021 wurden Vorbereitungen getroffen, einschließlich der Recherche und Beschaffung geeigneter Kamerasysteme und Drohnen. Dabei wurden drei Mobotix 73 Kamerasysteme mit RGB- und Thermalsensor, Solarausstattung und LTE-Router sowie eine DJI Mavic 2 Enterprise Advanced Drohne angeschafft. Für die geplanten UAV-Befliegungen wurden in Naturschutzgebieten und Naturparks Genehmigungen beantragt.

Im Jahr 2022 wurden die Mobotix-Kameras in Emmendingen, Schorndorf und Grabenstätt installiert. Die Kameras, die in 4-6 Metern Höhe angebracht wurden, lieferten kontinuierlich RGB- und Thermalbilder im

dreistündigen Intervall über das gesamte Jahr hinweg. Die Stromversorgung erfolgte über Solarzellen, während ein LTE-Router die Bilder übertrug. Parallel dazu wurden UAV-Befliegungen durchgeführt, die zunächst mit der DJI Mavic 2 Enterprise Advanced RGB- und Thermalaufnahmen lieferten. Ab Mai 2022 kamen Multispektralaufnahmen mit einer Tetracam μ CA hinzu, bis im Sommer ein Defekt der Multispektralkamera auftrat. Während der Befliegungen wurden Ground Control Points mittels dGPS-System eingemessen, um eine zentimetergenaue Georeferenzierung der UAV-Bilder zu ermöglichen. Diese Bilder wurden anschließend mit Software Agisoft Metashape zu Orthophotos verarbeitet. Erfahrungen mit der Flughöhe zeigten, dass eine Anpassung von ursprünglich 50 m auf 80 m notwendig war, um qualitativ hochwertige Orthophotos zu erhalten. 2023 setzte sich die kontinuierliche Bildaufnahme auf den Untersuchungsflächen fort, jedoch traten unvorhergesehene Probleme auf. In Emmendingen wurde die Solarausstattung der Kamera von Unbekannten entwendet, was zu einer vorzeitigen Beendigung der Bildaufnahme führte. In Grabenstätt stürzte im Juli der Baum um, an dem die Kamera befestigt war, sodass auch hier die Bilddatenaufnahme eingestellt werden musste. Nur in Schorndorf konnte die Bildaufnahme über das gesamte Jahr hinweg fortgesetzt werden. Aufgrund weiterer technischer Probleme und der zum Teil mangelhaften Bildqualität der aufgenommenen Bilder (z.B. Nebel, Wassertropfen vor der Linse) konnte nur ein lückenhafter Bilddatensatz erstellt werden. Deswegen war eine vertiefte Analyse der Bilddaten, insbesondere mit dem Fokus auf die Veränderung der beobachteten Bäume im Laufe der Zeit, nicht möglich. Aufgrund des Defekts der zuvor genutzten Multispektralkamera wurde eine neue Multispektraldrohne (DJI Mavic 3M) beschafft und ab Juni 2023 eingesetzt. Es wurden pro Untersuchungsgebiet mindestens zwei bis vier UAV-Befliegungen mit der DJI Mavic 2 Enterprise Advanced und der neuen DJI Mavic 3M durchgeführt. Nach Zusammensetzung der Einzelbilder und Erstellung der Orthophotos wurden in ArcGIS Pro die Baumkronen der Eschen segmentiert und Vegetationsindizes berechnet (Abb. 17 und Abb. 18). Mittels *density plots* wurden für die Indizes geeignete Schwellenwerte berechnet, um zwischen stark und schwach geschädigten Eschen zu unterscheiden.

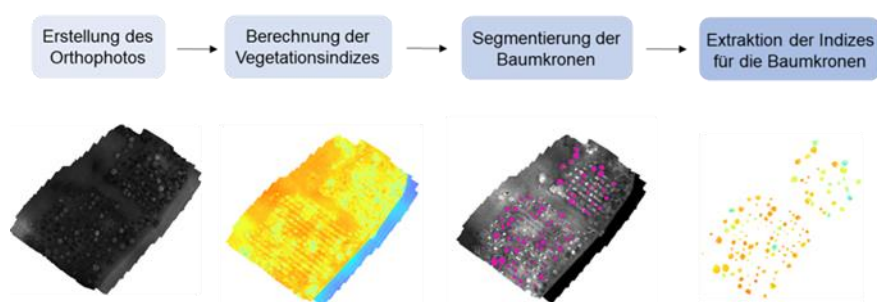


Abb. 17: Workflow zur Extraktion der Indexwerte für die individuellen Baumkronen.

NDVI – Normalized Difference Vegetation Index	$NDVI = \frac{NIR - Red}{NIR + Red}$	GRVI – Green-Red Vegetation Index	$GRVI = \frac{Green - Red}{Green + Red}$
NDRE – Red Edge Normalized Difference Vegetation Index	$NDVire = \frac{NIR - Red\ Edge}{NIR + Red\ Edge}$	ExG – Excess Green	$ExG = 2 * Green - Red - Blue$
GNDVI – Green Normalized Difference Vegetation Index	$GNDVI = \frac{NIR - Green}{NIR + Green}$	ExR – Excess Red	$ExR = 1.4 * Red - Green$
ClgI – Green Chlorophyll Index	$Clg = \frac{NIR}{GREEN} - 1$	ExGR – Excess Green – Excess Red	$ExGR = ExG - ExR$
Clre – Red Edge Chlorophyll Index	$Clre = \frac{NIR}{Red\ Edge} - 1$	GLI – Green Leaf Index	$GLI = \frac{2 * Green - Red - Blue}{2 * Green + Red + Blue}$
CVI – Chlorophyll Vegetation Index	$CVI = \frac{NIR - Red}{Green + Green}$	RGBVI – Red Green Blue Vegetation Index	$RGBVI = \frac{Green^2 - Blue * Red}{Green^2 + Blue * Red}$
DVI – Difference Vegetation Index	$DVI = NIR - Red$	RGRI – Red Green Ratio Index	$RGRI = \frac{Red}{Green}$
REGI – Red Edge Green Index	$REGI = \frac{Red\ Edge - Green}{Red\ Edge + Green}$	GBRI – Green Blue Ratio Index	$GBRI = \frac{Blue}{Green}$
ARI – Anthocyanin Reflectance Index	$ARI = \frac{1}{Red} - \frac{1}{Red\ Edge}$	TGI – Triangular Greenness Index	$TGI = Green - 0.39 * Red - 0.61 * Blue$
PSRI – Plant senescence reflectance index	$PSRI = \frac{Red - Green}{NIR}$	GI – Greenness Index	$GI = \frac{Green}{Red}$

Abb. 18: Berechnete Vegetationsindizes, links multispektral, rechts RGB.

Zusätzlich fanden auf den Plantagen in Emmendingen und Schorndorf sowie auf der Eschenklonfläche Grabenstätt während der Feldmessungen im Juli und August UAV-Nahaufnahmen der Baumkronen nur wenige Meter über den Baumkronen statt. Dabei wurden dieselben 30 Eschen ausgewählt, die auch für Feldmessungen beprobt wurden. Neben den Nahaufnahmen der Kronen wurden im Juli 2023 auf den Flächen Emmendingen und Schorndorf auch Nahaufnahmen einzelner Blätter mit der Multispektraldrohne durchgeführt. Pro Baum wurden jeweils drei Blätter gesammelt, die im Abstand von 50 cm mit der Drohne detailliert aufgenommen wurden. Die Blätter wurden anschließend in definierten Bereichen auf Chlorophyllwerte untersucht und auf Virusinfektionen von der HU analysiert. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen Chlorophyllgehalt, Virusinfektion und der spektralen Signatur festgestellt werden.

AP 1.4: Feldmessungen

In den Jahren 2022 und 2023 wurden umfangreiche Feldmessungen auf den Untersuchungsflächen durchgeführt, ergänzt durch Laboranalysen der gesammelten Proben. Im Frühjahr 2022 wurden Bodenproben auf den

Flächen Emmendingen, Schorndorf, Kaisheim und Grabenstätt entnommen und einer umfassenden Bodenanalytik unterzogen, bei der Korngröße und pH-Wert analysiert wurden. Im Herbst 2022 konnte auch eine Probe aus dem Melzower Forst gewonnen werden, deren Analyse Anfang 2023 abgeschlossen wurde.

Die blattbezogenen Feldmessungen fanden im Sommer der beiden Jahre statt (19.07.–04.08.2022 und 24.07.–08.08.2023). Dabei wurde der Chlorophyllgehalt von 30 ausgewählten Bäumen je Fläche mit 30 Messungen pro Baum mittels des SPAD-502Plus-Geräts bestimmt. Die Chlorophyll-Fluoreszenz der Blätter wurde mithilfe des Plant Stress Kits, bestehend aus einem Fv/Fm Meter und Dark Adaption Clips, erfasst. Um die Anzahl der Clips zu erweitern, wurden zusätzliche Exemplare mittels 3D-Druck angefertigt. Aufgrund der schlechten Erreichbarkeit der Eschenblätter konnten auf den Flächen Kaisheim und Melzower Forst in beiden Jahren keine Fluoreszenz-Messungen durchgeführt werden.

Zudem wurden Blattproben gesammelt, die im Labor analysiert wurden. Die Blätter wurden zunächst auf Blattdicke untersucht, gescannt, getrocknet und anschließend gewogen, um die spezifische Blattfläche (SLA) zu berechnen. Die Analyse der Fluktuierenden Asymmetrie (FA) basierte auf den gescannten Blattbildern und wurde im Herbst 2023 abgeschlossen. Für Kaisheim wurden zusätzlich Blattproben für die Projektpartner der HU gesammelt und zur weiteren Analyse nach Berlin versandt.

Hemisphärische Aufnahmen zur Bestimmung des Blattflächenindex (LAI) wurden 2022 auf den Flächen Emmendingen, Schorndorf und Grabenstätt durchgeführt, während sie in Kaisheim und Melzower Forst aufgrund der dortigen sehr hohen Bäume nicht umgesetzt wurde. Da die Auswertung der Messungen aufgrund des dichten Buschbewuchses um die Stämme der Eschen nicht möglich war, wurden diese Aufnahmen im Jahr 2023 nicht weiter durchgeführt.

Zudem wurde die Bonitur nach dem FraxForFuture-Boniturschlüssel (Peters et al. 2021) auf allen Flächen im Zeitraum Ende Juli bis Anfang August 2022 und 2023 erhoben, um den Gesundheitszustand der Eschen zu dokumentieren.

AP 1.5: Datenintegration

Nach Abschluss der jährlichen Datenaufnahmen Ende Oktober erfolgte in den Jahren 2022 und 2023 jeweils eine umfassende statistische Auswertung der Feldmessungen sowie eine Nachprozessierung der UAV-Bildern. 2022 wurden die Koordinaten der eingemessenen Bäume sowie aktualisierte Pflanzpläne erstellt und den Projektpartnern übermittelt. In beiden Jahren wurden zudem die Boniturdaten und aktualisierte Informationen zu den untersuchten Einzelbäumen zur Verfügung gestellt.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

3.1 Feldmessungen

Die Bodenanalysen ergaben für die Flächen spezifische Bodenarten: sandiger Schluff, pH-Wert 4,6 in Emmendingen, mittel schluffiger Sand, pH-Wert 5,3 in Schorndorf, stark schluffiger Sand, pH-Wert 6,9 in Grabenstätt, stark schluffiger Sand, pH-Wert 4,8 in Kaisheim sowie schwach schluffiger Sand, pH-Wert 3,4 im Melzower Forst. Wünschenswert in weiteren Studien wäre eine höhere Anzahl an Beständen, sodass statistischer Analysen mit z.B. pH Wert und durchschnittlicher Bonitur oder Pathogenbelastung möglich wären.

Die Chlorophyllwerte (SPAD) der Eschen zeigten 2022 für Emmendingen, Schorndorf und Grabenstätt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Boniturstufen. Im Jahr 2023 hingegen konnte in Emmendingen ein signifikanter Unterschied ($p = 0.005$) zwischen schwach (Bonitur 1 und 2) und stark (Bonitur 3 und 4) geschädigten Eschen festgestellt werden. Während in Emmendingen und Schorndorf ein Rückgang des Chlorophyllgehalts bei stark geschädigten Bäumen beobachtet wurde, gab es in Grabenstätt und Kaisheim keine klare Tendenz bzw. sogar gegenläufige Ergebnisse.

Die Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz (Fv/Fm) zeigten, dass kein direkter Zusammenhang zwischen niedrigeren Werten, repräsentativ für gestresste Bäume, und dem Eschentriebsterben festgestellt werden konnte. Auch die Analyse der Fluktuierenden Asymmetrie (FA) ergab keine signifikanten Unterschiede. Lediglich für eine Hauptkomponente der PCA-Analyse für Emmendingen im Jahr 2023 konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden, was jedoch insgesamt darauf hindeutet, dass das Eschentriebsterben keinen starken Einfluss auf die fluktuierende Asymmetrie hat.

Die Untersuchung der spezifischen Blattfläche (SLA) zeigte, dass diese tendenziell mit zunehmender Schädigung abnahm, wobei signifikante Unterschiede für Schorndorf ($p = 0.021$) und Kaisheim ($p = 0.001$) festgestellt wurden. In Emmendingen und Grabenstätt waren die Unterschiede nicht signifikant. Die Blattdicke erwies sich in Kaisheim bei stärker geschädigten Bäumen als signifikant höher ($p = 0.022$), während diese Tendenz auf den anderen Flächen zwar beobachtet, jedoch nicht statistisch abgesichert wurde (siehe Abb. 19).

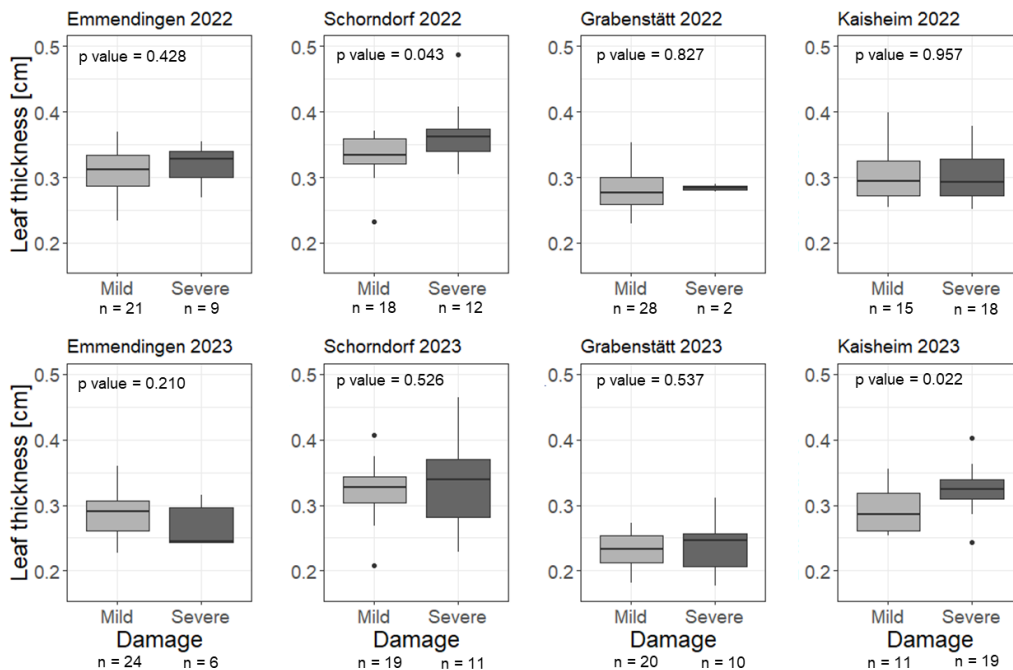


Abb. 19: Ergebnisse der Analyse der Blattdicke für die Flächen Emmendingen, Schorndorf, Grabenstätt und Kaisheim für die Jahre 2022 und 2023 (Buchner et al. 2024).

3.2 UAV-Befliegungen

Bilddaten der UAV-Befliegungen wurden in beiden Jahren mit Agisoft Metashape aufbereitet, wodurch Orthophotos für alle Untersuchungsgebiete generiert wurden. Die Auswertung der thermalen UAV-Befliegungen zeigte signifikante Unterschiede der Kronentemperaturen je nach Boniturstufe nur für zwei der zehn Befliegungen (Schorndorf Juni und Oktober 2023). Die erwartete Zunahme der Kronentemperatur mit zunehmender Schädigung durch das Eschentriebsterben konnte bei mehreren Befliegungen beobachtet werden – hier war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (Abb. 20).

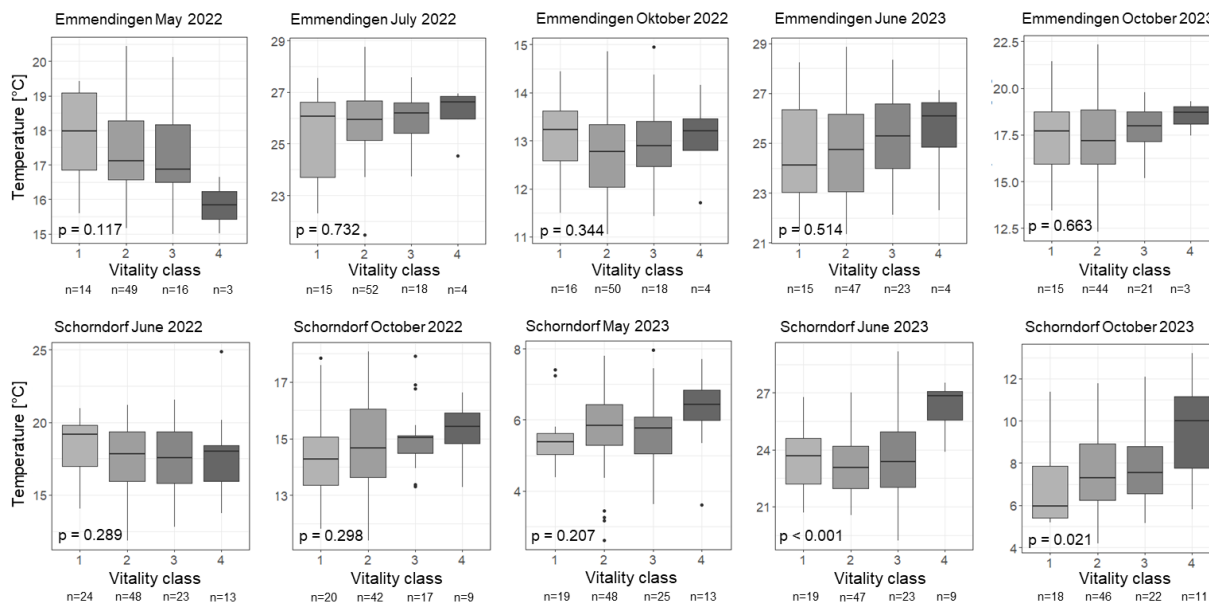


Abb. 20: Boxplots der mittleren Kronentemperaturen für Emmendingen und Schorndorf für 2022 und 2023 in Zusammenhang mit der Boniturstufe (Buchner et al. 2025).

RGB und multispektrale Vegetationsindizes wiesen signifikante Unterschiede der Indexwerte für stark und schwach geschädigte Eschen auf. Schwellenwerte konnten bestimmt werden, um zwischen stark und schwach geschädigten Eschen zu unterscheiden. Abb. 21 verdeutlicht beispielhaft die unterschiedliche Ausprägung des Vegetationsindex GNDVI für die Befliegung in Schorndorf im Juni 2023 in Abhängigkeit von der Boniturstufe.

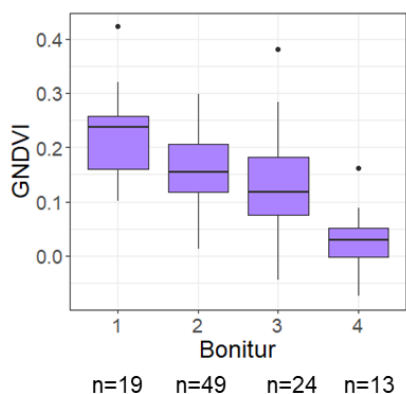


Abb. 21: Boxplots des RGB-Index GNDVI für Schorndorf im Juni 2023 in Zusammenhang mit der Bonitur.

In Tab. 4a und 4b dargestellt sind die drei besten RGB- und multispektralen Indizes mit dem jeweiligen normalisierten Schwellenwert, und den Kennwerten Overall Accuracy (OA), F1 score (F1) und Matthews Correlation Coefficient (MCC) zur Qualitätsbeurteilung der Klassifikation. Die besten Ergebnisse wurden mit dem multispektralen Index DVI bei einer Datenaufnahme im Sommer erzielt. Die Kombination der beiden multispektralen Indizes NDVI und DVI mit dem RGB-Index ExG im Rahmen einer logistischen Regression erreichte zudem eine OA von 77,2 % und somit eine leicht verbesserte Klassifikation im Vergleich zu einem einzelnen Index.

Tab. 4a: Ermittelte Schwellenwerte der drei besten multispektralen Vegetationsindizes und die statistischen Kennwerte Overall Accuracy (OA), F1 score (F1) und Matthews Correlation Coefficient (MCC)

	Sommer- und Herbstbefliegungen				Sommerbefliegungen			
	Schwellenwert	OA	F1	MCC	Schwellenwert	OA	F1	MCC
NDVI	0.58	70.2	0.76	0.38	0.57	73.9	0.80	0.44
DVI	0.50	71.4	0.78	0.38	0.52	74.9	0.80	0.46
GNDVI	0.44	71.5	0.78	0.37	0.46	74.5	0.81	0.43

Tab. 4b: Ermittelte Schwellenwerte der drei besten RGB-Vegetationsindizes und die statistischen Kennwerte Overall Accuracy (OA), F1 score (F1) und Matthews Correlation Coefficient (MCC)

	Sommer- und Herbstbefliegungen				Sommerbefliegungen			
	Schwellenwert	OA	F1	MCC	Schwellenwert	OA	F1	MCC
GRVI	0.42	67.3	0.74	0.34	0.37	73.0	0.80	0.40
ExG	0.45	71.0	0.78	0.36	0.42	72.2	0.80	0.35
RGRI	0.60	69.3	0.76	0.33	0.60	72.5	0.79	0.39

Die Analyse der UAV-Nahaufnahmen der Baumkronen sowie die anschließende grobe und feine Segmentierung (Abb. 22) zeigten, dass die üblicherweise durchgeführte grobe Segmentierung der Baumkrone von der Umgebung häufig Bodenpixel der Umgebung miteinschließt. Im Vergleich dazu erwies sich die hier angewandte feine Segmentierung als präziser und besser abgegrenzt.



Abb. 22: Red edge-Kanal Bild der Multispektraldrohne über einer Baumkrone und die grobe und feine Segmentierung der Baumkrone von der Umgebung (Buchner et al. in prep.).

Wie Abb. 23 verdeutlicht, führt die Verwendung einer groben Segmentierung der Baumkrone allerdings nicht zu einer maßgeblichen Veränderung der mittleren Indexwerte einer Baumkrone, wobei eine leichte Erhöhung der Indexwerte bei feiner Segmentierung zu beobachten ist.

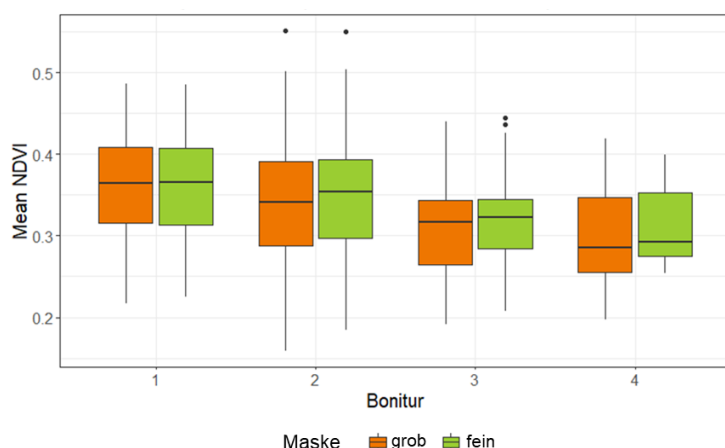


Abb. 23: Vergleich des mittleren NDVI-Werts bei grober und feiner Segmentierung der Baumkrone (Buchner et al. in prep.).

3.3 Sporenmessungen

Die Auswertung der Sporenfilter mittels qPCR ergab in vielen Fällen nur eine geringe Sporenkonzentration auf den Untersuchungsflächen, die Nachweisgrenze wurde hierbei häufig unterschritten. Jedoch gab es in den beiden untersuchten Jahren teilweise sehr große Unterschiede in der Sporenkonzentration zwischen den Jahren und Beständen. Die höchsten Sporenkonzentrationen wurden im Jahr 2022 und auf der Eschenklonfläche Grabenstätt gemessen (Details siehe Kapitel 1.6.4).

3.4 Zusammenhang mit Virusinfektionen

Statistische Zusammenhänge zwischen den durchgeführten Feldmessungen und vorhandenen Virusinfektionen der betroffenen Eschen konnten nicht festgestellt werden. Es empfiehlt sich jedoch, weitere Untersuchungen mit einer größeren Stichprobenzahl anzuschließen und auch dezidiert symptomatische Blätter in die Untersuchung mit einzubeziehen. Ebenso wies keiner der untersuchten insgesamt 20 Vegetationsindizes signifikant unterschiedliche Indexwerte für Eschen mit und ohne Virusinfektionen auf (siehe Kapitel 1.4.2 und 1.5.2).

Teilvorhaben 2 (HU)

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Die Vitalität von Gehölzen wird durch vielfältige Schadfaktoren beeinflusst, unter denen Phytopathogene eine bedeutende Rolle einnehmen. Sie sind Teil des Phytobioms und interagieren mit anderen Pathogenen, indem sie bspw. Arthropoden, Nematoden und Pilze als biologische Vektoren für ihre Übertragung nutzen. Viren der Gattung *Emaravirus*, die bedeutende Forstgehölze wie Eiche, Esche, Ahorn und Pappel infizieren, werden effizient durch Gallmilben übertragen (Rehanek et al. 2022). Als wesentlicher Bestandteil der physiologischen Verfallsspirale können Viren Absterbeprozesse an infizierten Bäumen beschleunigen. Wie für bakterielle und pilzliche Krankheitserreger, muss die Widerstandsfähigkeit forstlicher Baumarten auch gegen virale Schaderreger ein langfristiges Züchtungs- bzw. Selektionsziel sein. Denn eine hohe Widerstandskraft gegenüber einwirkenden Stressfaktoren hat einen großen Einfluss auf das Wachstum und die Stabilität von Forstökosystemen. Insbesondere in sensiblen Beständen, wie beispielsweise Samenplantagen oder Klonarchiven, stellen pathogene Viren eine Bedrohung dar. Dies gilt in gleicher Weise für Arten, welche bereits stark dezimiert und damit in ihrer genetischen Vielfalt beeinträchtigt sind. Die Gemeine Esche wird derzeit durch das Eschentriebsterben (ETS) stark bedroht. Infolge der ungehinderten Ausbreitung der Krankheit, ausgelöst durch den invasiven Ascomyceten *H. fraxineus*, ist die Wirtschaftsbaumart *F. excelsior* und damit die genetische Vielfalt europäischer Eschenpopulationen akut gefährdet. Studien zum ETS fokussieren sich meist auf den pilzlichen Erreger (Langer et al. 2022). Die Aufdeckung weiterer Einflüsse auf das Krankheitsgeschehen, wie pathogene Viren, muss eine hohe Priorität haben.

Trotz wichtiger Fortschritte bei der Erforschung von Viren in Forstgehölzen in den letzten Jahrzehnten, sind Untersuchungen zu diesen Pathogenen unterrepräsentiert. Dies kann zu dem Eindruck führen, dass Viruserkrankungen bei Waldbäumen zu vernachlässigen sind, zumal die Symptome, die sie auslösen, durch visuelle Bonitur oft schwer zu detektieren sind und sich meist auf Blattsymptome beschränken, die aufgrund der meist großen Baumkronen der Bäume leicht übersehen werden können. Neue Technologien in den Bereichen Sequenzierung und Bioinformatik haben demonstriert, dass die Abundanz und die Diversität der Viren weitaus größer sind, als bisher vermutet. Pathogene Pflanzenviren infizieren Wald- und Stadtbäume ebenso wie Nutzpflanzen und verursachen sowohl wirtschaftliche als auch ökologische Verluste (Büttner et al. 2023). In bedeutenden Laubbaumarten wurden unbekannte Viren aus verschiedenen Familien identifiziert (Rumbou et al. 2021). Untersuchungen zum Virom an Birken, die an der Birkenblattrollkrankheit erkrankten, erbrachten Befunde zu drei bisher unbekannte Viren aus den Gattungen *Carlavirus*, *Idaeovirus* und *Capillovirus* (Rumbou et al. 2020). In Laubgehölzen des Forsts und des öffentlichen Grüns Europas haben sich Emaraviren zu bedeutende Viruspathogene für Arten der gemäßigten und borealen Wälder entwickelt (Rehanek et al. 2022). Aufgrund fehlender Routinediagnoseverfahren wie serologischen ELISAs oder spezifischer Oligonukleotide für den molekularen Nachweis wurden in Forstgehölzen bisher vergleichsweise wenige Pflanzenviren nachgewiesen, sodass ihre Bedeutung insgesamt schwer abzuschätzen ist (Büttner et al. 2023). Aufgrund ihrer vielfältigen Übertragungswege über z.B. Vektoren, Samen oder Pollen, können sich Viren schnell in einem Bestand ausbreiten. Viren der Gattung *Nepovirus* werden unter anderem durch verschiedene Nematoden übertragen (Harrison and Murant 1996) und Emaraviren nutzen Gallmilben als natürliche Vektoren.

Ziel des Projekts FraxVir als Ergänzungsstudie zum FraxForFuture Demonstrationsvorhaben waren virologische Untersuchungen in Eschensonderbeständen. Das interdisziplinäre Projekt untersuchte an fünf Standorten, verteilt über Nord- und Süddeutschland, Auftreten von Virose und Zusammenhänge mit dem Eschentriebsterben. Im Teilvorhaben 2 wurde die Virusvielfalt in den Eschen erfasst. Auf der Grundlage visueller Inspektionen wurden virusverdächtige Symptome erkannt und die Viren molekularbiologisch nachgewiesen. Neben den im Projekt beschriebenen Viren sollten weitere, möglicherweise unbekannte Viren entdeckt werden. Die identifizierten Viren sollten näher charakterisiert werden, indem verschiedene Aspekte wie mögliche Übertragungswege und genetische Aspekte wie die Genomausstattung näher beleuchtet wurden. Kenntnisse über die Abundanz und Eigenschaften pathogener Viren sind entscheidend, um deren Rolle als potenziellen Faktor bei den beobachteten Degenerationen der Eschen stärker in den Fokus zu rücken. Besondere Beachtung erfuhren die Saatgutbestände, von denen Mutterbäume und Sämlinge / Jungeschen der Naturverjüngungen auf ihren Virusstatus geprüft wurden. Gleichzeitig wurde entnommenes Saatgut von den Samenplantagen untersucht. Aus den Ergebnisse des Virusscreenings sollte die Bedeutung von Viren für die Eschenpopulationen abgeleitet und darauf aufbauend Empfehlungen für die forstliche Praxis erarbeitet werden. An der Qualitätssicherung von Forstsaatgut sind die Saatgutprüfung und das Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) beteiligt, welches die Erzeugung und das Inverkehrbringen von forstlichem Vermehrungsgut regelt. Durch die Ergebnisse zu den detektierten Viren und die Detektionsverfahren zum Nachweis dieser können Kriterien in der Saatgutproduktion verbessert werden. Gleichzeitig wurden die Screeningergebnisse den anderen Teilvorhaben zur Verfügung gestellt und innerhalb des FraxVir Konsortiums mit Daten zu phänotypischen Analysen (TV 1), zum Monitoring von *H. fraxineus* (TV 3) und genetischen Markern (TV 4) korreliert, um ableitend die Bedeutung dieser komplexen Wechselwirkungen und die Rolle von Viren für den Gesundheitszustand der Eschen besser einschätzen zu können. Um vitale Pflanzen zu fördern und eine Ausbreitung von Viren in

unserer Kulturlandschaft zu verhindern, ist es äußerst wichtig, Fragen zu Virusinfektionen in solchen Beständen zu beantworten.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Im TV 2 wurden vier Arbeitspakete bearbeitet, welche die Virus-Bonitur und Symptomatologie (AP 2.1), die Virus-Identifizierung (AP 2.2), den Virus-Nachweis (AP 2.3) sowie die Virus-Charakterisierung und Interaktion (AP 2.4) beinhalteten.

Im AP 2.1 galt es, eine Bestandsaufnahme der Eschen aus virologischer Sicht vorzunehmen, indem alle Eschen der Untersuchungsstandorte inspiziert und auf virusverdächtige Symptome bonitiert wurden. Dabei sollten vor allem virusbedingte Symptome herausgearbeitet und für die Praxis zur Aufklärung von Viruskrankheiten bereitgestellt werden.

In den AP 2.2 und 2.3 wurde das entnommene Pflanzenmaterial molekularbiologisch auf verschiedene Viren getestet. Zu den Viren gehörten die Nepoviren *Nepovirus arabis* (ArMV) und *Nepovirus avii* (CLRV), sowie die in der Esche neu entdeckten Viren *Emaravirus fraxini* (ASaV), *Idaeovirus ligustri* (PrLbAV) und Viren aus der Gruppe Cytorhabdoviren. Für die Untersuchungen von Blattmaterial konnte auf etablierte Protokolle zur Isolation von Gesamt-RNA zurückgegriffen werden. Zur Untersuchung von Eschenfrüchten wurde eine Methodik für den mechanischen Aufschluss entwickelt und die Methodik für die Gewinnung von RNA optimiert. Mittels RT-PCR wurden die Proben auf die Viren getestet. Dabei wurden existierende Nachweisverfahren genutzt, optimiert und teilweise neu entwickelt. Gleichzeitig wurde für Einzelproben, für die kommerziell verfügbare Antikörper erhältlich waren (CLRV, ArMV), ein serologischer ELISA zur Bestätigung der molekularen Verfahren durchgeführt. Zur Absicherung wurden molekular verschiedene Zielregionen im Genom der Viren untersucht und durch die RT-PCR generierte Produkte für ausgewählte Proben durch eine Sanger Sequenzierung bestätigt. So konnten in den einzelnen Proben die Viren erfasst und jedem Einzelbaum zugeordnet werden. Die molekularen Nachweisverfahren wurden derart etabliert, dass sie auch für Routinetestungen geeignet sind. Um bisher unbekannte Viren in den Eschen zu identifizieren, wurden Blattmischproben einer Hochdurchsatzsequenzierung (HTS) unterzogen. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Blattproben extrahiert, um die rRNA angereichert und in eine cDNA Bibliothek umgeschrieben. Die Sequenzierung wurde von einem kommerziellen Dienstleister durchgeführt. Die entstandenen Rohdatensätze wurden bioinformatisch ausgewertet und auf Virussignaturen durchsucht. Anhand der Ergebnisse sollten diagnostische Nachweismethoden für unbekannte Viren entwickelt werden. In einem zweiten Schritt wurden die Ergebnisse für ein Screening von Einzelbäumen genutzt und mit den Boniturdaten abgeglichen.

Im AP 2.4 sollte eine Charakterisierung der detektierten Viren begonnen werden, indem Kenntnisse zur Verbreitung, der Genetik und der Übertragung generiert wurden. Mit Hilfe von Transkriptom-Datensätzen sollten Zielgene ausgesucht werden, die bei der Suche nach virusassoziierten SNPs von TV 4 eine Rolle spielen. Gleichzeitig sollten die Ergebnisse unseres Virusscreenings mit den Daten zum Eschentriebsterben und den phänotypischen bzw. genetischen Aspekten (SNPs) der Eschen korreliert werden.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Während des Projektzeitraumes wurden 500 Eschenproben untersucht, davon 403 Blattproben, 68 Blütenproben und 29 Fruchtproben. Die visuelle Bonitur der Eschen an den Untersuchungsstandorten erbrachte eine Vielfalt an Blattsymptomen, die an den Bäumen beobachtet wurde. Die Symptome wurden in drei Kategorien eingeteilt. Virusverdächtige Symptome (Fadenblättrigkeit, chlorotische Ringflecken und Adernaufhellung in Kombination mit Blattdeformationen), wie sie in früheren Studien mit einer ASaV-Infektion in Verbindung gebracht wurden, konnten an Sämlingen und Alteschen des Melzower Forsts und an Sämlingen und Jungeschen in Kaisheim beobachtet werden (siehe Hauptteil Abb. 6a und 6b). Diese Kategorie umfasste 73 Blattproben. An den Alteschen waren diese Symptome unregelmäßig verteilt und auf bestimmte Kronenbereiche beschränkt. An Jungeschen in Kaisheim wurden zudem chlorotische Linienmuster und Eichenblattmuster ohne Blattdeformation beobachtet, die sich von den ASaV-typischen Symptomen unterschieden (siehe Hauptteil Abb. 6c).

Unspezifische Blattsymptome wie chlorotische Flecken und Läsionen, Blattrandchlorosen und nekrotische Läsionen wurden an allen Probenahmestellen beobachtet ($n = 183$; siehe Abb. 6d-h). Insbesondere in den Samenplantagen Emmendingen und Schorndorf sowie im Klonarchiv in Grabenstätt war der Anteil der Proben mit solchen Symptomen an der Gesamtprobenzahl hoch (Emmendingen 85 %, Schorndorf 45 % und Grabenstätt 33 %).

An allen Probenahmestandorten traten auch Eschen auf, die keine Symptome aufwiesen ($n = 135$). Gleichwohl konnten an allen Untersuchungsstandorten Pflanzenviren nachweisen werden. Dies betraf Eschen aller Symptomkategorien und war nicht auf virusverdächtige Symptome beschränkt.

Für eines der untersuchten Viren, das *Emaravirus fraxini* (ASaV), konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem molekularen Virusnachweis und dem Vorhandensein spezifischer Symptome wie in Abb. 6a und b gezeigt, hergestellt werden. Von 73 Proben mit virusverdächtigen Symptomen wurden 60 positiv auf ASaV getestet, entweder als Einzelinfektion oder als Mischinfektion in Kombination mit PrLBaV oder Cytorhabdoviren. Im Oktober wurden einige Proben, welche ASaV-typische Symptome aufwiesen, negativ auf das Virus getestet. Aufgrund der einsetzenden Seneszenz, die mit reduziertem Chlorophyllgehalt und einer Vergilbung der Blätter einhergeht, wurden ASaV-induzierte Symptome falsch zugeordnet. Den optimalen Zeitpunkt für die Bonitur und Beprobung stellen die Monate Juni-August dar. Diese Symptome einer ASaV-Infektion sind mit Erfahrung bereits visuell erkennbar und durch entsprechende Schulungen vermittelbar. Vier Proben mit virusverdächtigen Linienmuster- und Eichenblattmuster-Symptomen (siehe Abb. 6c) wurden positiv auf Mischinfektionen mit PrLBaV und Cytorhabdoviren getestet. Über die Hälfte der Blattproben mit unspezifischen Symptomen (52 %) zeigten Virusinfektionen, in den meisten Fällen mit Cytorhabdoviren. Auch Einzelinfektionen mit ASaV und PrLBaV wurden in dieser Symptomkategorie nachgewiesen. Außerdem traten Mischinfektionen mit allen drei Viren auf. In 48 % dieser Proben wurden keine Viren nachgewiesen.

Bei den Proben ohne Symptome konnten in 50 % der Fälle Viren nachgewiesen werden, wobei Cytorhabdoviren am häufigsten detektiert wurde, gefolgt von Mischinfektionen aus Cytorhabdoviren und PrLBaV sowie PrLBaV-Einzelinfektionen. Virusinfektionen müssen nicht mit charakteristischen Symptomen einhergehen. Der Virustiter und die Genetik des Wirtes beeinflussen meist die phänotypische Ausprägung makroskopisch sichtbarer Symptome. Da latente Infektionen auftreten können, muss ein molekulares Monitoring in jeden Fall umgesetzt werden.

An den fünf Untersuchungsstandorten konnten Viren aus unterschiedlichen Familien und Ordnungen nachweisen werden (siehe Hauptteil Abb. 7). Neben Einfachinfektionen traten Mischinfektionen in Form von Doppel- und Dreifachinfektionen auf. Die Ergebnisse des Virusscreenings konnten über mehrere Vegetationsperioden reproduziert werden und sind daher als gesichert zu bewerten. Für den Nachweis wurden sowohl molekulare als auch serologische Detektionsverfahren angewendet und teilweise neu etabliert. PCR-Ergebnisse wurden mittels Sanger-Sequenzierung abgesichert. Während die in der Literatur als Generalisten beschriebenen Viren ArMV und CLRV an keinem der Untersuchungsstandorte nachweisbar waren, spielen neue Viren im Eschenvirom eine bedeutende Rolle. ASaV und vor allem Cytorhabdoviren waren weit verbreitet. PrLBaV wurde vereinzelt in den Samenplantagen und in Kaisheim detektiert.

Für PrLBaV und Cytorhabdoviren konnten keine Korrelationen mit spezifischen Blattsymptomen hergestellt werden. Insbesondere Cytorhabdoviren waren in Blattmaterial aller drei Symptomkategorien nachweisbar. Aufgrund der hohen Abundanz über die Versuchsjahre hinweg wurde die genetische Variabilität der Cytorhabdoviren intensiver untersucht. PCR-Amplikons der partiellen Nukleokapsid (N)-, Phosphoprotein (P)- und Polymerase (L)-kodierenden Genomregionen wurden von Cytorhabdovirus-infizierten Eschen aller Standorte generiert und auf Nukleotid- und Aminosäureebene verglichen. Dabei konnten für alle untersuchten Genomregionen Sequenzunterschiede festgestellt werden, die in Anbetracht der vom internationalen Komitee zur Virustaxonomie (ICTV) für Cytorhabdoviren aufgestellten Artabgrenzungskriterien auf zwei verschiedene Cytorhabdovirus-Arten schließen lassen. Der Befund wurde durch phylogenetische Untersuchungen der Sequenzen bekräftigt. Die ermittelten Sequenzen lassen sich in zwei phylogenetische Hauptgruppen einteilen (Abb. 24). Beide Cytorhabdovirus-Arten traten in Eschen aller Untersuchungsstandorte auf und infizieren neben der Gemeinen Esche auch die Blumenesche (*Fraxinus ornus*) und die Rot-Esche (*Fraxinus pennsylvanica*) (Rehaneck et al. 2024).

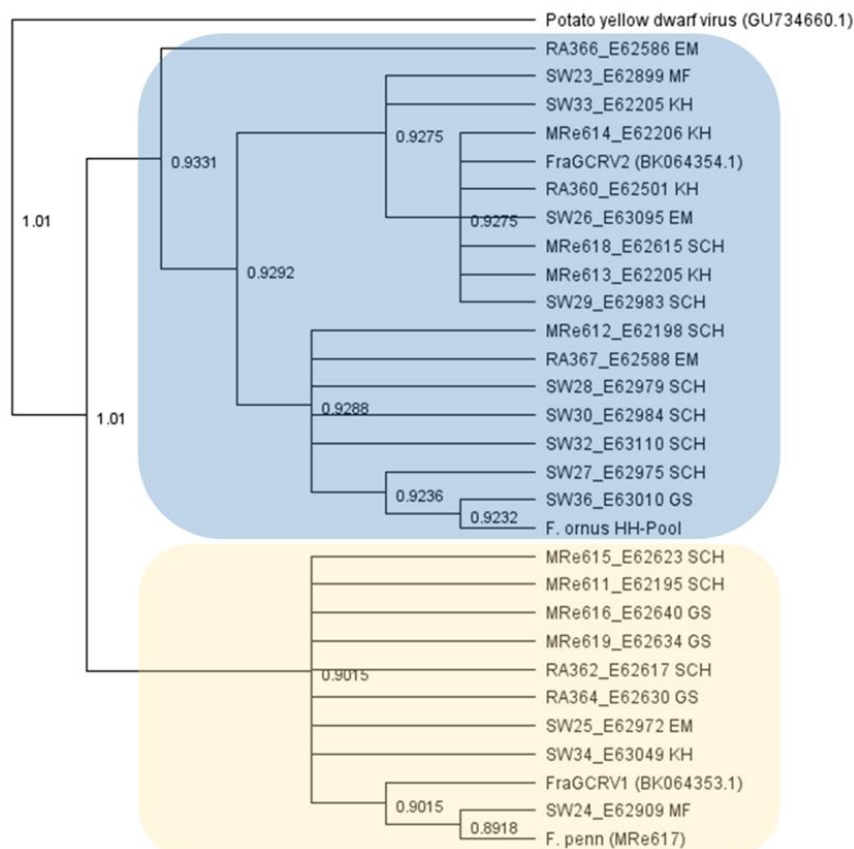


Abb. 24: Phylogenetische Untersuchungen zu den Cytorhabdovirusarten. In den Eschenpopulation treten zwei Cytorhabdovirusarten auf, die sich durch Sequenzunterschiede in verschiedenen Genombereichen auszeichnen. Die zwei Arten (blau und gelb hervorgehoben) treten an allen Untersuchungsstandorten auf. EM - Emmendingen, MF - Melzower Forst, KH - Kaisheim, SCH - Schorndorf, GS – Grabenstätt. Entnommen aus Rehaneck et al. (2024).

Neben den im Projekt getesteten Viren treten in den Eschenpopulationen weitere, bisher unbekannte Viren auf. Für die Samenplantagen Emmendingen und Schorndorf wurden Probenpools, bestehend aus Blatt- und Blütenmaterial, gebildet und HTS-Analysen durchgeführt. Ein Abgleich der generierten Sequenzen mit Referenzsequenzen aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) identifizierte Sequenz-Contigs, die mit Cytorhabdoviren verwandt waren. Dies bestätigte die durch das RT-PCR-Screening festgestellte weite Verbreitung dieser Viren in den Samenplantagen. Zusätzlich konnten Sequenz-Contigs identifiziert werden, die höchste Ähnlichkeiten mit Sequenzen von Ampelo- and Olivaviren aus der Familie *Closteroviridae* und zu Trichoviren aus der Familie *Betaflexiviridae* aufwiesen. Zur Entwicklung RT-PCR-basierter Screenings von Blatt- und Blütenproben wurden diagnostische Oligonukleotide zum Nachweis verschiedener Genombereiche abgeleitet. Mit Hilfe der etablierten RT-PCR Systeme konnten die neu identifizierten Viren in Einzelbäumen detektiert und damit die Ergebnisse der HTS bestätigt werden. Bis auf das Klonarchiv Grabenstätt konnte das neuartige Ampelovirus in Eschen aller Untersuchungsstandorte und in verschiedenen Pflanzengeweben nachgewiesen werden. In den Samenplantagen Emmendingen und Schorndorf konnten sowohl das Olivavirus als auch das Trichovirus nachgewiesen werden.

Neben dem Blattmaterial wurden Viren auch in anderen Organen detektiert. Für Blüten als Ausgangsmaterial zur Virustestung wurde ein Protokoll für die RNA-Isolierung erarbeitet. An Blütenproben männlicher Eschen aus den Samenplantagen Emmendingen und Schorndorf (n = 68) konnte eine weite Verbreitung der Cytorhabdoviren nachgewiesen werden. Auch die neuen HTS-entdeckten Viren konnten in Blütenmaterial detektiert werden.

Tab. 5: Übersicht der im Projekt detektierten Viren mit Angabe der jeweiligen Standorte und der Organe mit positivem Virusnachweis

Virus	Standort/e	Nachweis/e
Ash shoestring-associated virus (ASaV)	Melzower Forst, Kaisheim	Blatt
Privet leaf blotch-associated virus (PrLBaV)	Emmendingen, Schorndorf, Kaisheim	Blatt, Früchte
Cytorhabdoviren	Melzower Forst, Emmendingen, Schorndorf, Kaisheim, Grabenstätt	Blatt, Blüten, Früchte
Ampelovirus-like Virus	Melzower Forst, Emmendingen, Schorndorf, Kaisheim	Blatt, Blüten, Früchte
Trichovirus-like Virus	Emmendingen, Schorndorf	Blatt, Blüten
Olivavirus-like Virus	Emmendingen, Schorndorf	Blatt, Blüten

Zur Diagnostik der untersuchten Viren wurden RT-PCR basierte Nachweismethoden etabliert bzw. existierende Nachweissysteme optimiert. Aufgrund der hohen Abundanz einiger Viren wie dem Emaravirus ASaV wurde die Entwicklung eines serologischen Nachweisverfahrens in Form eines ELISA initiiert, um die Untersuchungen voranzubringen. Die Methodik führt im Vergleich zu Nukleinsäure-basierten Verfahren wie die RT-PCR durch eine sehr einfache und schnelle Probenaufarbeitung in Reihenuntersuchungen schneller zu validen Ergebnissen. Für ein verwandtes Emaravirus in der Stieleiche (*Quercus robur*) konnte in Voruntersuchungen ein Antikörper gegen das virale Nukleokapsidprotein gewonnen werden, mit dessen Hilfe das Virus in Ringfleck-erkrankten Stieleichen mittels DAS-ELISA zuverlässig nachweisbar war. Ein Antikörper gegen das virale ASaV Nukleokapsidprotein konnte in gleicher Weise generiert werden. Im ELISA zeigten sich keine Reaktionen mit ASaV-infiziertem Blattmaterial, weshalb weitere Untersuchungen zur Entwicklung neuer diagnostischer und praxistauglicher Anwendungen nötig sind.

Da die Klärung der generativen Weitergabe der Viren ein entscheidender Aspekt für phytosanitäre Strategien darstellt, wurden bei den Untersuchungen sowohl Eschensamen als auch Sämlinge getestet. Von den Samenplantagen entnommenes Saatgut (n = 29) wurde mit unterschiedlichen Techniken (Trocken- und Nassvermahlung) mechanisch aufgeschlossen und mit verschiedenen Kugelgrößen durch eine Schwingmühle zerkleinert. Die unterschiedlichen Partikelgrößen wurden auf ihre Eignung zur weiterer Probenaufarbeitung getestet. Sowohl aus Einzelsamen als auch aus Saatgutmischproben konnte RNA erfolgreich isoliert werden. In den Proben gelang der Nachweis von Cytorhabdoviren und dem PrLBaV. In Sämlingen der Naturverjüngung an den Standorten Melzower Forst und Kaisheim wurden vermehrt virusverdächtige Blattsymptome beobachtet. Molekularbiologisch konnten ASaV in den Sämlingen nachgewiesen werden. Da ASaV in Voruntersuchungen in Saatgut nachweisbar war, ist für das Emaravirus eine Saatgutübertragbarkeit wahrscheinlich. Von den mittels HTS entdeckten Viren konnte das neuartige Ampelovirus in 19 von 29 getesteten Saatgutproben nachgewiesen werden.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse eine hohe Abundanz und Diversität von Pflanzenviren in den Eschen-sonderbeständen. Ein zuverlässiges molekulares Monitoring ist entscheidend, um virusinfiziertes Pflanzenmaterial frühzeitig zu erkennen. Gleichfalls braucht es die Entwicklung einfacher und leicht durchzuführender Nachweisverfahren für die Praxis, um die Qualitätssicherung in der Saatgutproduktion zu gewährleisten. Um die Bedeutung von Viren zu vermitteln und virusbedingte Symptome an Sämlingen und Jungeschen zu erkennen, sind weitergehende Studien notwendig.

Teilvorhaben 3 (UHOH)

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Teilvorhaben 3 verfolgte den molekularen Nachweis des Pathogens *Hymenoscyphus fraxineus* in verschiedenen Untersuchungsgebieten. Regionale und standortabhängige Nachweise zur Abundanz von *H. fraxineus* in Eschenbeständen standen neben der Optimierung des molekularen Nachweises im Fokus. Es wurde ein umfassenderes Verständnis über die heterogene Verteilung der Pathogenlast und das generelle Vorkommen in den Bodenhorizonten gewonnen.

In enger Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern wurde die Probenahme geplant und abgestimmt. Es wurden gezielt Proben von Streu, der Rhizosphäre sowie Laubproben einzelner Bäume gesammelt. Im Anschluss wurden die Proben im Labor weiterverarbeitet. Herausfordernd war insbesondere das Gewinnen qualitativer hochwertiger Nukleinsäuren, wobei für jedes Probenmaterial spezifische Protokolle zur optimalen Aufbereitung und Extraktion ausgewählt, evaluiert und etabliert wurden, um geeignete Templates für den molekularen Nachweis des Pathogens zu erhalten. Der molekulare Erregernachweis ermöglichte eine fundierte Abschätzung der Pathogenlast in den Beständen und in der Folge Interpretationen über den Verlauf des Infektionsgeschehens. Die absolute Quantifizierung der Pathogenlast wurde mittels qPCR (quantitative PCR) durchgeführt, wobei spezifische DNA-Marker genutzt wurden, die zudem auch qualitative Analysen ermöglichten. Die qPCR-Ergebnisse wurden individuellen Teilflächen zugeordnet, kartiert und mithilfe aktueller Drohnenaufnahmen visualisiert. Der zusätzlich erfolgte Nachweis spezifischer RNA-Marker ermöglichte die Identifizierung aktiver Infektionsstadien, was besonders wertvoll für die Bewertung der aktuellen Infektionslage im Wald ist – insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Infektionen im Winter oft ruhen bzw. ein permanentes Ruhestadium einnehmen können (Bengtsson et al. 2014). Die erzielten molekularen Nachweise von *H. fraxineus* lieferten damit auch wichtige Einblicke in die saisonale Dynamik der Pathogenlast und unterstützen wechselnde Infektionsrisiken korrespondierend mit der Pathogenlast in den verschiedenen Jahreszeiten. Die gesammelten Daten wurden im Rahmen einer multifaktoriellen Analyse mit weiteren Verbunddaten verknüpft und auf mögliche Zusammenhänge untersucht.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP 3.1: Detaillierte Planung der Probenahme

Nach Absprache mit allen beteiligten Projektpartnern konnte auf Grundlage der Pflanzpläne der einzelnen Standorte und mithilfe aktueller Drohnenaufnahmen der Projektpartner (KU) eine umfassende Planung der Probenahme durchgeführt werden (Abb. 25). Diese Vorgehensweise zielte darauf ab, die spezifischen Gegebenheiten und Bedingungen der einzelnen Standorte bestmöglich zu berücksichtigen.

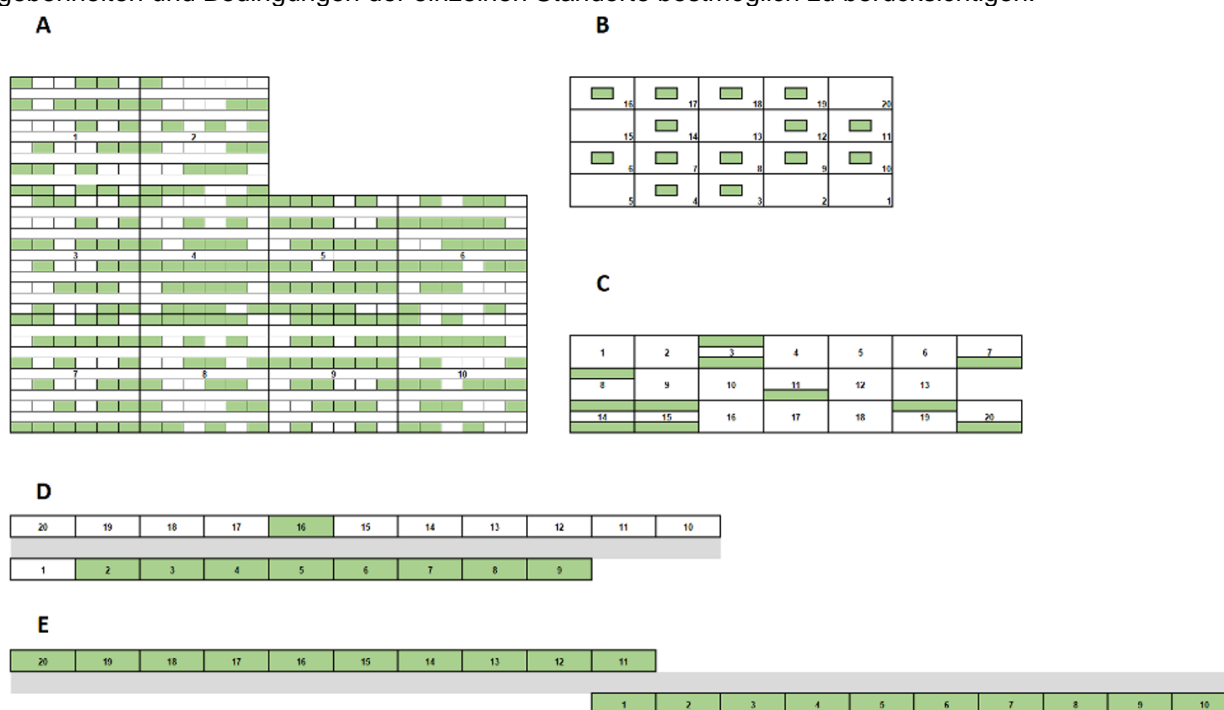


Abb. 25: Versuchsdesign der fünf Standorte (A) Grabenstätt, (B) Emmendingen, (C) Schorndorf, (D) Kaisheim und (E) Melzower Forst. Die einzelnen Versuchsplots umfassen 100 m² und sind mit den Plotnummern versehen. Grün hinterlegte Plots enthielten mindestens eine Gemeine Esche. Die Plots sind nicht skaliert dargestellt.

Für die Probennahme innerhalb der Untersuchungsflächen an den Standorten Schorndorf, Grabenstätt, Kaisheim, Emmendingen und Melzower Forst wurde ein Versuchsplan entwickelt (Abb. 25). Für jede Untersuchungsfläche wurde der Beprobungsplan so entwickelt, dass zwischen 10 und 20 einzelne Plots mit einer Größe von jeweils 100 m² pro Fläche vorliegen. Diese Aufteilung ermöglicht eine detaillierte und vergleichbare Datenerhebung in den einzelnen Bereichen und schafft die Grundlage für eine zuverlässige Analyse. Durch die standardisierte Plotgröße und die wiederholenden Probenahmen in den jeweiligen Plots wurde eine zeitliche Darstellung über die Veränderung der Pathogenlast ermöglicht. An vier der fünf Standorte – Schorndorf, Kaisheim, Emmendingen und Melzower Forst – wurden jeweils 20 Plots mit einer Fläche von 100 m² angelegt. Aufgrund der begrenzten Größe des Standorts Grabenstätt wurde dort ein reduzierter Versuchsplan mit 10 Plots à 100 m² umgesetzt. Eine Orientierung zur Planung war über die Pflanzpläne und die festen Pflanzabstände der Versuchsflächen in Grabenstätt, Emmendingen und Schorndorf gegeben. Im Gegensatz dazu wurden die Plots in den Waldflächen ausgemessen und im Format von zwei Linien à 10 Plots angelegt (Abb. 26).



Abb. 26: Satellitenaufnahmen (Google Maps, 2023) der Standorte (links: Kaisheim, rechts: Melzower Forst). Die Markierungen zeigen die Mittelpunkte der jeweiligen Plots innerhalb der Versuchsfläche und ordnen die Plots von 1 bis 20 zu.

Die Koordinaten der einzelnen Plots in den Waldflächen wurden in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern der KU mit dem dGPS Stonex S9III (STONEX® Srl, Paderno Dugnano, Italy) aufgenommen. Die Plots der Waldflächen wurden mit Stäben markiert und nummeriert (Abb. 27).



Abb. 27: Versuchsplot Nummer 2 der Fläche in Kaisheim mit einer Kantenlänge von 10 m.

AP 3.2: Monitoring des Pathogendruckes durch *H. fraxineus*

Das Monitoring des Pathogendruckes auf den Untersuchungsflächen ermöglichte die Erfassung der Pathogenlast über sechs Zeiträume hinweg, verteilt auf zwei Jahre. Die Probenahmen wurden im Sommer, Herbst und Frühjahr durchgeführt. Nach den Vortests im März 2022 begannen die Probenahmen im Juni und wurden im Oktober desselben Jahres fortgesetzt. Weitere Proben wurden im Frühjahr 2023 (März) sowie im Sommer

(Juli) und Herbst (Oktober) des Jahres entnommen. Die abschließenden Probennahmen fanden im Frühjahr 2024 statt und vervollständigten damit die zweijährige Zeitreihe.

Parallel zur Probennahme wurde die Aufreinigung der Nukleinsäuren aus den Probenklassen Streu und Rhizosphäre erfolgreich etabliert. Insbesondere Rhizosphärenproben gelten als schwer aufzureinigende Matrices (Manfredini et al. 2021, Wang et al. 2017), da sie trotz Aufreinigungsmaßnahmen häufig Inhibitoren enthalten, die molekulare Analysen wie PCR unmöglich machen können. Die Bereitstellung von DNA-Templates mit ausreichender Qualität und Quantität hatte daher die höchste Priorität. Die modifizierte Flüssigphasenextraktion nach Doyle (1991), angepasst für Pflanzenproben, führte zwar zu ausreichenden Mengen an DNA, diese war jedoch nicht amplifizierbar. Weitere Experimente zur erfolgreichen DNA-Aufreinigung konzentrierten sich auf den Einsatz kommerziell erhältlicher Kits. Dabei lieferte das FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland) zufriedenstellende Ergebnisse. Neben der Qualität und Quantität der gewonnenen DNA war auch die mögliche Eingangsmenge des aufzureinigenden Materials ein entscheidendes Kriterium bei der Protokollauswahl. Mit diesem Kit konnten bis zu 500 mg Matrix – sowohl Boden- als auch Streuproben – verarbeitet werden. Die DNA-Ausbeute war über alle Untersuchungsgebiete hinweg exzellent und ist in Tab. 6 exemplarisch für den Herbst 2022 und den Standort Emmendingen dargestellt. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben zu gewährleisten, wurden nach fluorometrischer Konzentrationsbestimmung alle Proben auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. In den nachfolgenden Analysen konnte so auf 4 µl DNA-Lösung je Probe zurückgegriffen werden, was eine gleichmäßige DNA-Menge von 40 ng je Reaktion gewährleistete. Der molekulare Nachweis erfolgte in drei technischen Replikaten mit einer Einsatzmenge von jeweils 40 ng DNA, was einer Gesamtmenge von 120 ng entspricht. Damit stand ausreichend DNA-Template für die Analysen zur Verfügung.

Tab. 6: Bodenproben aus dem Untersuchungsgebiet Emmendingen aus der Probenreihe Herbst 2022. Die Konzentrationen wurden fluorometrisch für 2 µl bestimmt und für die absolute Menge aus der DNA-Aufreinigung von 100 µl Eluat hochgerechnet.

Untersuchungsgebiet	Plot Nummer	Konzentration [ng/µl]	Absolute Menge [ng]
Emmendingen	1	168	16800
	2	166	16600
	3	155	15500
	4	152	15200
	5	180	18000
	6	176	17600
	7	174	17400
	8	142	14200
	9	149	14900
	10	170	17000
	11	171	17100
	12	143	14300
	13	182	18200
	14	181	18100
	15	160	16000
	16	176	17600
	17	189	18900
	18	198	19800
	19	154	15400
	20	149	14900

Für den molekularen Nachweis wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt, die zwei zuverlässige Assays identifizierte (Chandelier et al. 2010, loos et al. 2009). Beide Assays wurden auf dasselbe Target, den *internal transcribed spacer* (ITS), entwickelt. Neben dem Nachweis von *H. fraxineus* sollte ein Duplex-Verfahren etabliert werden, um zusätzlich die Qualität der eingesetzten DNA zu bewerten. Als Amplifikationskontrolle wurde ein Nachweis ubiquitär vorkommender ammoniumoxidierender Bakterien (AOB) basierend auf den Arbeiten von Kowalchuk et al. 1997, Hermansson and Lindgren 2001) eingesetzt. Die Evaluierung des Duplex-Verfahrens zeigte (Abb. 28), dass die Kombination des Assays von Chandelier et al. (2010) mit der AOB-Amplifikationskontrolle die besten Ergebnisse erzielte (Böhm et al. 2024).

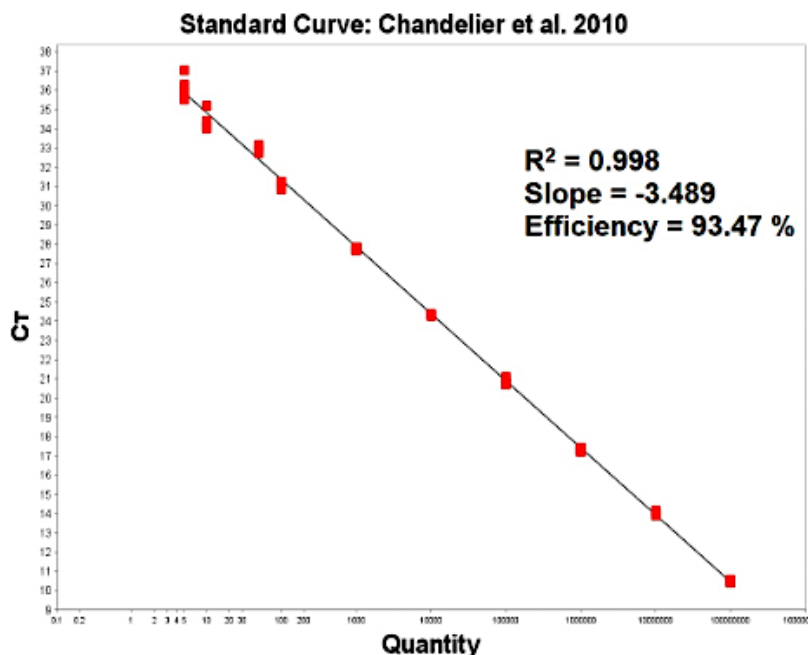


Abb. 28: Standardkurve zum molekularen Nachweis von *H. fraxineus* im Duplex-Verfahren mit AOB.

Die absolute Quantifizierung erfolgte mit synthetischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit bekannter Konzentration (gBlocks™, Integrated DNA Technologies Deutschland GmbH, München, Deutschland), welche die partielle ITS (loos et al. 2009; Chandelier et al. 2010) von *H. fraxineus* kodieren. Die Kopienzahl des Standards wurde anhand des Herstellerprotokolls berechnet, um eine Verdünnungsreihe von sieben Konzentrationen mit steigender Kopien Zahl von 1×10^2 bis 1×10^6 Kopien zu erhalten. Die Proben galten als positiv, wenn alle drei technischen Replikate ein positives Signal für *H. fraxineus* und die interne Kontrolle gleichzeitig aufwiesen. Die Konzentrationen von *H. fraxineus*, die in den Proben nachgewiesen wurden, wurden als Anzahl der Kopien der Zielsequenz in 40 ng des DNA-Templates ausgedrückt. Mit Hilfe der Standards konnte die Effizienz der qPCR bewertet werden (Abb. 28). Die Effizienz von 93,47 % sowie das Bestimmtheitsmaß von 0,988 sind Indikatoren für ein zuverlässiges qPCR-Assay. Weiterhin wurde der Nachweis von *H. fraxineus* mittels PCR und anschließender Sequenzierung bestätigt. Hierbei wurde auf ein Protokoll der „European and Mediterranean Plant Protection Organization“ zurückgegriffen (EPPO 2013, Johansson et al. 2010). Der Nachweis von *H. fraxineus* wurde somit in zwei molekularen Verfahren bestätigt (Böhm et al. 2024). Die generierten Sequenzen wurden in die Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Maryland, USA) hinterlegt und sind unter den Genbank-IDs OR821813 bis OR821818 verfügbar. Die Anwendung der DNA-Marker in der Rhizosphäre wurde erfolgreich abgeschlossen und ein etabliertes Monitoring-Protokoll, z.B. zur Risikoabschätzung bei Neupflanzungen, steht zur Verfügung. Vor dem Hintergrund, dass Infektionen von *H. fraxineus* Wurzeln der gemeinen Esche beschrieben sind (Fones et al. 2016, Baxter et al. 2023), stellt das nun vorliegende Assay ein wichtiges Werkzeug für die Beurteilung von z.B. Waldflächen dar. Der Einfluss von Wurzelinfektionen auf Stammfußnekrosen ist bisher noch unbekannt. Weitere Untersuchungen an betroffenen Bäumen mit erhöhten Pathogenlasten in der Rhizosphäre im Zusammenhang mit Stammfußnekrosen könnten die Relevanz von bodenbürtigen Infektionen verdeutlichen. Zudem kann das Assay als Erfolgskontrolle für diverse hemmende Applikationen gegenüber dem Eschentriebsterben-Erreger in der Erfolgskontrolle genutzt werden, da eine erfolgreiche Hemmung mit niedrigeren Markergen-Nachweisen einhergehen sollte. Die äußerst sensitive Nachweisgrenze von 10 Kopien pro Ansatz stellt dabei einen weiteren Vorteil dar. Eine Anreicherung bzw. Akkumulation der Pathogenlast von *H. fraxineus* über mehrere Messzeitpunkte hinweg konnte lediglich für einzelne wenige Plots (z.B. KA5 und 8, Tab. 6) festgestellt werden. Der Pathogendruck von *H. fraxineus* scheint demnach nicht in den Plots der Untersuchungsgebiete zu überdauern. Eine Abhängigkeit der Pathogenlast von jährlich vorkommenden Sporulations-Ereignissen ist wahrscheinlich und auch für den Lebenszyklus von *H. fraxineus* beschrieben (Gross et al. 2012)

Im Rahmen der Studie wurde neben dem Monitoring-Ansatz an dem Standort Schorndorf eine Probennahme aus drei Bodenschichten durchgeführt (0–5 cm, 5–10 cm, 10–15 cm). Das Experiment diente der Erlangung von Erkenntnissen über das Depositionsverhalten von *H. fraxineus* in Rhizosphären Kompartimenten. Ein aerober Eintrag von Ascosporen sowie ein Abwaschen des Pilzmaterials können zu einer Akkumulation der Pathogenlast in den Bodenhorizonten führen. Des Weiteren ist ein Wachstum von *H. fraxineus* im Bodenlumen, welches mit Konidien inokuliert wurde, bekannt (Fones et al. 2016). Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass insbesondere bei Neupflanzungen eine Vorbelastung des Bodens nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, was zu erheblichen Wuchsdepressionen führen kann. Ein solcher Effekt ist insbesondere in Jahren mit hoher Staunässe zu befürchten (Baxter et al. 2023). Die Ergebnisse der Bodenhorizonte (Abb. 29) demonstrieren,

dass die höchste Pathogenlast im oberen Horizont zu verzeichnen ist. Eine langsame Verlagerung in die tieferen Schichten wird angenommen.

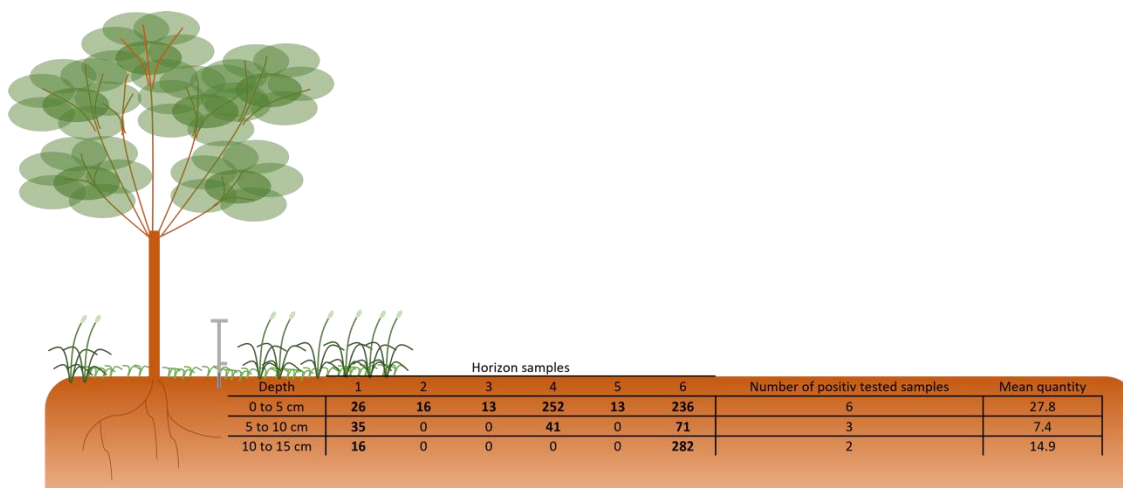


Abb. 29: Ergebnisse der Bodenhorizonte Analyse in Schorndorf. Insgesamt wurden 10 Proben in drei Tiefen genommen. Hier dargestellt sind nur die Proben mit mindestens einem positiven Test innerhalb eines Horizontes.

Im gesamten Untersuchungsmaterial wurden in sechs von 20 Proben positive Erregernachweise für *H. fraxineus* detektiert. Mit zunehmender Tiefe nahm die Anzahl positiver Proben ab, so dass lediglich in zwei von 20 Proben des mittleren Horizonts sowie in drei von 20 Proben des unteren Horizonts ein Befall festgestellt wurde (Abb. 29). Es besteht die Möglichkeit, dass ein Eintrag von Ascosporen haltiger Luft und eine anschließende Verlagerung in tiefere Horizonte erfolgen. In diesem Zusammenhang lässt sich der Einfluss des pilzlichen Wachstums nicht abschätzen. Zudem ist der Einfluss des Reliefs und der damit einhergehenden Staunässe zu erwähnen. Eine weitere potenzielle Quelle für die Verbreitung von Pathogenen ist oberirdisch abfließendes Regenwasser, welches sich in Becken staut. Dadurch kann die Pathogenlast verteilt und am Ablagerungsort für einen sogenannten Hotspot sorgen. Die Kombination aus Pathogenlast und Staunässe birgt ein beträchtliches Gefahrenpotenzial. Diese These wird durch die Beobachtungen von Enderle et al. (2013) gestützt, wonach eine erhöhte Anzahl von Stammfußnekrosen in Senken festgestellt wurde.

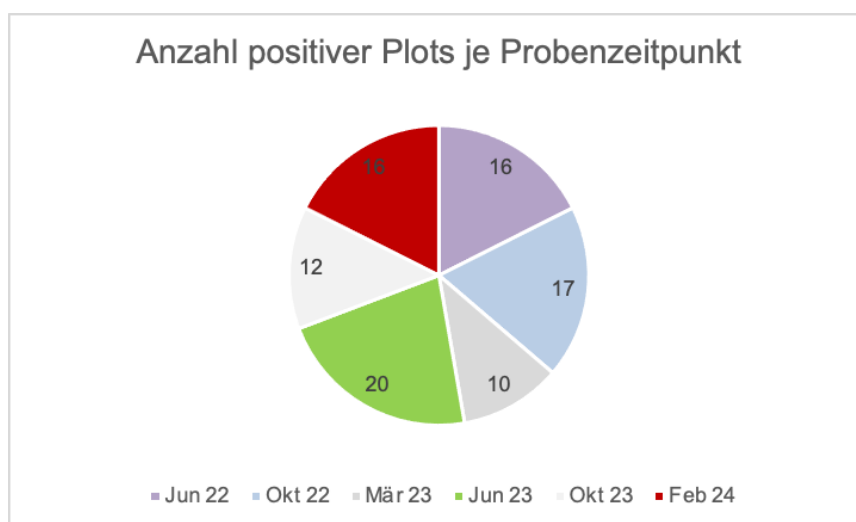


Abb. 30: Anzahl positiv getesteter Plots je Beprobungszeitraum über alle Untersuchungsgebiete hinweg.

Die gesamten Daten des molekularen Nachweises von *H. fraxineus* sind in Tab. 8 zu finden. Die zwei untersuchten Zeitreihen umfassen jeweils die Daten vom Juni 2022 bis März 2023 und Juni 2023 bis Februar 2024. Die Peaks der Mittelwerte über alle Untersuchungsgebiete hinweg liegen im Oktober 2022 und im Juni 2023. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Untersuchungszeiträumen ließ sich beobachten. Insgesamt wurden 420 Bodenproben im Triplikate gemessen, was 1260 Einzelreaktionen entspricht. Hiervon waren 91 Proben positiv und 329 Proben negativ (Tab. 8 und Abb. 30). Auch in der Anzahl positiver Plots je Probenzeitpunkt zeigten sich der Oktober 2022 und Juni 2023 mit 17 bzw. 20 Plots als die Zeiträume mit der höchsten Belastung.

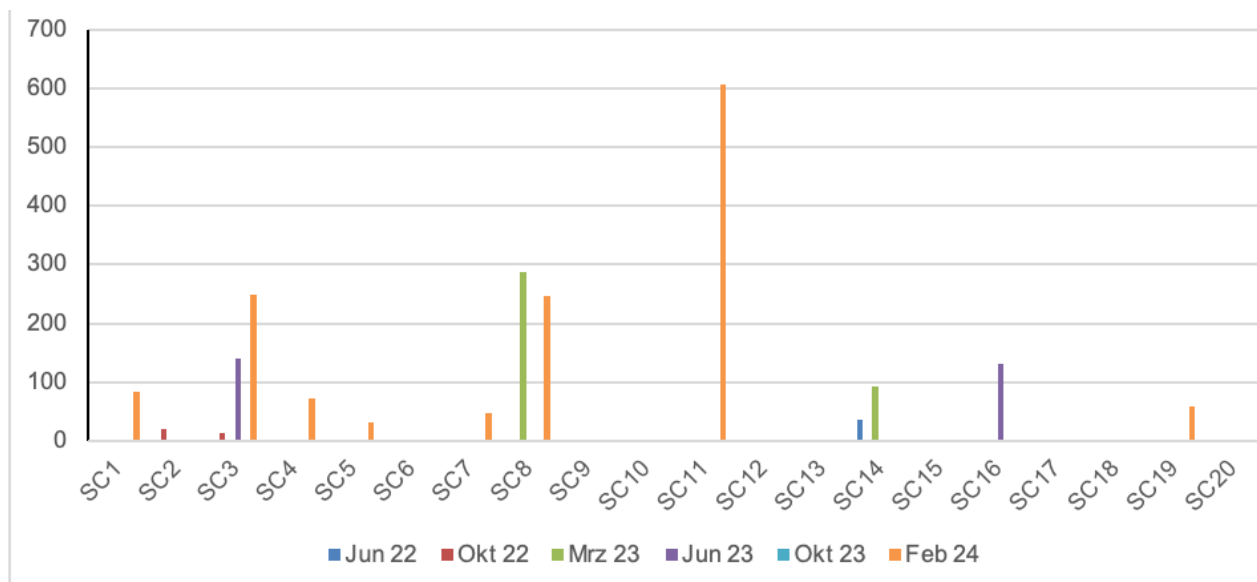


Abb. 31: Daten zur Pathogenlast von *H. fraxineus* für das Untersuchungsgebiet Schorndorf. Farblich kodiert sind die sechs unterschiedlichen Beprobungszeiträume.

Ein weiterer Nachweis von *H. fraxineus*, neben Rhizosphärenproben, erfolgte mittels passiver Sporenfallen (siehe Kapitel 1.6.2), welche mit Papierfiltern und Vaseline als Adhäsiv ausgestattet sind. Die DNA-Extraktion erfolgt durch Ausstanzen zufälliger Filterabschnitte mit einem Einhandlocher. Die Verarbeitung der genannten Abschnitte erfolgt in 2-ml-Laborgefäßen. Die Zerkleinerung wurde mit einem Bead Beater durchgeführt (MP Biomedical, USA), welcher sich insbesondere für Proben wie Ascosporen oder Bodenmaterial als effizientes Instrument zeigte. Das beschriebene Verfahren erlaubt eine unkomplizierte und effektive molekulare Detektion des Pilzes. Die vollständige Prozesskette von der Aufbereitung der DNA bis zur Quantifizierung konnte somit für Sporenfallen erfolgreich implementiert werden.

Bevor Streuproben an den Standorten gesammelt wurden, wurde eine Bonitur der Streu aufgenommen (Abb. 32), dadurch wurde sichergestellt, dass einerseits genügend Eschenstreu für die Untersuchungen zur Verfügung stand und andererseits die Symptome des Eschentriebsterbens an den Standorten beobachtet wurden (siehe Ergebnisse zur Schadensbonitur Seite 9).



Abb. 32: Eschenstreu-Beprobung (links; Oktober 2022) und Blattsymptomatik des Eschentriebsterbens (rechts) in Grabenstätt. Die Infektion wurde in PCR und qPCR bestätigt.

Des Weiteren wurden Streuproben unterschiedlicher Standorte auf den Erreger *H. fraxineus* untersucht. Die aus dem Versuchsstandort Grabenstätt stammenden Probenreihen wiesen zu 100 % positive Ergebnisse auf (Tab. 7), was auf einen hohen Pathogendruck schließen lässt. Im Vergleich dazu war die Streu im Untersuchungsgebiet Schorndorf nur in 79 % der Fälle positiv. Dennoch können aufgrund der hohen Varianz keine signifikanten Unterschiede zwischen den Standorten festgestellt werden. Die gemessene Pathogenlast innerhalb der Streu indiziert jedoch ein hohes Potenzial für die folgenden Sporulationszeiträume, insbesondere da die Streu eine wichtige Quelle für Primär-Inokulum ist (Gross et al. 2012).

Tab. 7: Quantitativer Nachweis von *H. fraxineus* in Eschenstreu an den Standorten SC (Schorndorf) und GR (Grabenstätt) jeweils dargestellt für 20 bzw. 10 Plots. Aufgeführt sind nur die Beprobungszeitpunkte zu denen Streu verfügbar war. Ein positiver Test ist mit einem Wert >0 markiert und wird in der Einheit Kopien/40 ng DNA dargestellt. Negative Proben sind mit X markiert.

	Okt 22	Mrz 23	Okt 23	Feb 24
SC1	47.915	X	5.565.397	682.033
SC2	22	X	2.235.915	6.184.486
SC3	35	X	3.340.894	3111
SC4	X	X	580.552	11.299.319
SC5	85	X	9.856.842	1087
SC6	72	X	592.359	44.769
SC7	82	1.439.353	2.204.653	76.389
SC8	61	X	2.097	697
SC9	35	X	2.176.611	449.555
SC10	102	X	2.097.935	6.086.463
SC11	97	2.020.559	701.115	18.580
SC12	X	775	352.689	5.317.677
SC13	156	X	351.106	7.426.310
SC14	95	X	1.871.852	3447
SC15	15	200	2.175.791	13.089.759
SC16	90	178	4.021.944	1.998.240
SC17	0	X	2.717.106	2344
SC18	18	X	105.731	X
SC19	168	X	3.901.622	1.022.251
SC20	74	1.820.021	3.727.281	438.085
GR1	1.453.411	11.028.154	4.132.224	2.793.291
GR2	2.498.632	9.442.328	3.879.048	5.887.712
GR3	3.330.146	466.655	3.684.603	2.583.580
GR4	297.396	10.471.732	12.353.491	2.810.549
GR5	62.107	2.415.051	1.057.751	9.902.323
GR6	37.418.356	7.827.712	5.573.589	600.801
GR7	512.177	9.461.565	3.041.390	66.387
GR8	11.802.574	9.721.636	5.679.389	3.591.293
GR9	17.176.946	298.493	2.846.859	6.447.734
GR10	52.155.815	3.864.749	13.556.254	2.636.852

AP 3.3: Multifaktorielle Analyse zum Auftreten von *H. fraxineus* an Standorten und Einzelbäumen

Die multifaktorielle Analyse stellt ein Instrument zur Verknüpfung von Gesundheitsdaten und dem Infektionszustand der Eschen dar. Von entscheidender Bedeutung für die Einschätzung des Gesundheitszustandes ist der virale Infektionsstatus einzelner Bäume. Ein Beispiel für virale Symptome konnte im Melzower Forst Versuchsplot 7 beobachtet werden und von den Projektpartnern der HU bestätigt werden. Um einen Zusammenhang zwischen viralen Infektionen an Eschen und dem Eschentriebsterben abschätzen zu können, wurden Proben von den Projektpartnern der HU auf Viren und anschließend von der UHOH auf *H. fraxineus* untersucht. Zu diesem Zweck wurde genetisches Material von 20 Einzelbäumen aus dem Standort Melzower Forst, welche zuvor positiv auf Viren getestet wurden, von den Projektpartnern der HU bereitgestellt. Mittels quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR und RT-qPCR) wurden diese Proben sowohl auf DNA- als auch RNA-Marker von *H. fraxineus* getestet. Die durchgeführten Tests auf DNA- und RNA-Ebene führten zu keinem positiven Ergebnis hinsichtlich eines Befalls mit *H. fraxineus* im beprobten Blattmaterial. Durchgeführte Kontrollen zur Amplifikation pflanzlicher Template zeigten im Gegensatz positive Ergebnisse. Eine virale Infektion und ein Auftreten von *H. fraxineus* zum gleichen Zeitpunkt konnte für diese Testreihe nicht gezeigt werden. Zusätzlich wurden Daten für den Sporenflug in Kooperation mit den Projektpartnern der KU erfasst und ausgewertet.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Im Rahmen des Teilvorhabens wurden vergleichbare Probenpläne für fünf Untersuchungsgebiete entwickelt, wobei die einzelnen Plots eine Größe von jeweils 100 m² aufwiesen. Die Probennahme konnte an sechs festen Zeitpunkten über einen Zeitraum von zwei Jahren erfolgreich durchgeführt werden. Für die Analysen wurden Proben der Rhizosphäre, der Streu sowie aus Sporenfallen entnommen, anschließend verarbeitet, aufgereinigt und analysiert.

Ein zentraler methodischer Fortschritt der Untersuchung war die erfolgreiche Etablierung der quantitativen PCR zur absoluten Quantifizierung von DNA-Markern des Ascomyceten *H. fraxineus* in der Rhizosphäre. Hierbei wurde eine interne Amplifikationskontrolle etabliert, um die Qualität der Analysen zu gewährleisten. Die Analysen zeigen zudem erhebliche Unterschiede in der Pathogenlast sowohl saisonal, regional als auch in der Exposition im Eschenstandort. Weiterhin konnte eine vertikale Transposition von *H. fraxineus* innerhalb der Bodenhorizonte nachgewiesen werden. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Unterschiede in der örtlichen Pathogenlast auch zu drastischen Unterschieden im Infektionsdruck führen. Dies ist ein Erkenntnis, die bei der Bewertung von Plusbäumen und der Erhaltung von genetischen Ressourcen zu berücksichtigen ist. Die Ergebnisse wurden erfolgreich publiziert (Böhm et al. 2024).

Alle Ziele im Teilvorhaben 3 wurden erreicht. Darüber hinaus wurde eine enge Zusammenarbeit mit den Projektpartnern gepflegt, um interdisziplinäre Fragestellungen zu bearbeiten. Dies umfasste insbesondere die Untersuchung des gleichzeitigen Auftretens von Virusinfektionen und *H. fraxineus* sowie den molekularen Nachweis des Pathogens auf passiven Sporenfallen.

Tab. 8: Quantitativer Nachweis von *H. fraxineus* in Rhizosphärenproben an den Standorten SC (Schorndorf), GR (Grabenstätt), EM (Emmendingen) und KA (Kaisheim) jeweils dargestellt für 20 bzw. 10 Plots. Aufgeführt sind die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung von *H. fraxineus* für alle sechs Beprobungszeiträume. Ein positiver Nachweis von *H. fraxineus* ist mit einem Wert >0 markiert und wird in der Einheit Kopien/40 ng DNA, dargestellt. Negative Proben sind mit 0 markiert.

Untersuchungsfläche	Plot	Absolute Anzahl an DNA-Markern von <i>H. fraxineus</i> [Kopien/40 ng DNA]					
		Jun 22	Okt 22	Mrz 23	Jun 23	Okt 23	Feb 24
Schorndorf	SC1	0	0	0	0	0	84
	SC2	0	19	0	0	0	0
	SC3	0	13	0	141	0	248
	SC4	0	0	0	0	0	73
	SC5	0	0	0	0	0	30
	SC6	0	0	0	0	0	0
	SC7	0	0	0	0	0	47
	SC8	0	0	287	0	0	246
	SC9	0	0	0	0	0	0
	SC10	0	0	0	0	0	0
	SC11	0	0	0	0	0	608
	SC12	0	0	0	0	0	0
	SC13	0	0	0	0	0	0
	SC14	35	0	93	0	0	0
	SC15	0	0	0	0	0	0
	SC16	0	0	0	130	0	0
	SC17	0	0	0	0	0	0
	SC18	0	0	0	0	0	0
	SC19	0	0	0	0	0	59
	SC20	0	0	0	0	0	0
Kaisheim	KA1	0	0	0	0	0	0
	KA2	0	0	5	0	72	0
	KA3	0	20	18	69	69	0
	KA4	40	0	0	0	0	0
	KA5	76	0	40	28	43	0
	KA6	53	43	0	77	0	0
	KA7	0	12	0	0	0	0
	KA8	0	96	0	61	47	43
	KA9	0	21	0	0	49	0
	KA10	0	25	24	0	0	0
	KA11	16	0	0	8	159	1683
	KA12	0	0	0	72	69	99
	KA13	52	0	0	0	0	0
	KA14	0	25	5	119	0	0
	KA15	0	0	0	26566	0	0
	KA16	50	0	0	42	0	0
	KA17	0	0	0	45	0	46
	KA18	0	0	0	49	0	0
	KA19	584	0	0	0	459	0
	KA20	0	26275	0	0	0	0
Emmendingen	EM1	0	0	0	0	0	0
	EM2	0	0	0	0	0	0
	EM3	0	0	0	0	0	0
	EM4	0	0	0	24	0	0
	EM5	0	0	0	0	0	0
	EM6	0	0	0	0	0	0
	EM7	0	0	0	0	0	0
	EM8	0	0	0	0	0	0
	EM9	0	0	0	0	0	0
	EM10	0	0	0	0	0	0
	EM11	0	9	0	0	0	0
	EM12	0	16	0	0	0	0
	EM13	0	0	0	0	0	0
	EM14	0	0	0	78	0	0
	EM15	0	0	0	0	0	0
	EM16	0	0	0	0	0	0
	EM17	59	14	0	4295	0	0
	EM18	166	53	0	0	94	0
	EM19	25	0	0	0	0	0
	EM20	0	0	0	0	0	0
Grabenstätt	GR1	0	0	0	0	0	0
	GR2	9	0	0	0	39	0
	GR3	0	0	22	0	0	54
	GR4	864	0	0	0	0	80
	GR5	0	24	0	0	0	0
	GR6	0	0	39	0	0	51
	GR7	18	0	0	19	0	0
	GR8	0	21	60	51	80	0
	GR9	46	406	0	40	0	0
	GR10	119	0	0	18	102	51

Teilvorhaben 4 (AWG)

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Die genetische Ausstattung von Eschen, die gegen den Erreger des Eschensterbens resistent sind, wird im Rahmen des FraxGen-Projekts intensiv erforscht. Die genetischen Grundlagen im Zusammenhang mit Virusinfektionen bei Bäumen werden in diesem Projekt jedoch nicht berücksichtigt. Wenn in langfristigen Konzepten Lösungen für das Eschensterben gesucht werden, ist es notwendig, das Gesamtbild des Zustandes der Esche aufzuzeigen. Für ein solches Gesamtbild ist es notwendig, insbesondere ungelöste Fragen anzusprechen. Auf der Grundlage der obigen Ausführungen besteht das Hauptziel des FraxVir-Teilprojekts darin, das Krankheitsphänomen zu verstehen und Leitlinien für ein nachhaltiges Management zu entwickeln. Ausgehend von der Hypothese, dass es einen Zusammenhang zwischen Virusinfektion und Eschensterben gibt und dass beide einen spezifischen genetischen Hintergrund haben, versucht das Teilprojekt herauszufinden, was die Virusinfektionen definiert, ob die Virusabwehrgene im Eschengenom gefunden und charakterisiert werden können und ob die Variation dieser Gene mit spezifischen Phänotypen in Verbindung gebracht werden kann. Die Klärung der generativen Übertragung der Viren und spezifischer Allele in Resistenzgenen ist ebenfalls ein entscheidender Aspekt bei der Untersuchung des Virusvorkommens in Eschen.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP 4.1: Elternschaftsanalysen zur Studie des Übertragungsweges der Viren

Die Bäume in den Samenplantagen wurden vollständig beprobt und genotypisiert. Die Laboranalysen folgten den Protokollen aus dem Projekt FraxGen. Nach der DNA-Extraktion (Lenfort and Douglas 1999) wurde die Genotypisierung anhand hochvariabler Kernmikrosatelliten durchgeführt, dabei konnten 12 Marker (F27, F30, Frex02, Frex06, Frex10 (Sollars et al. 2017), F6 (Beatty et al. 2015), F21 (Noakes et al. 2014), Fem11, Fem4, Fem19 (Lefort et al. 1999), FR308 (Aggarwal et al. 2011), ASH2429 (Bai et al. 2011)) ausgewählt und in drei Multiplex-Sets zusammengefasst werden. Damit konnten die Klonzuordnungen in den Samenplantagen eindeutig durchgeführt werden. Von 29 Bäumen in den Plantagen Emmendingen und Schorndorf konnten Samen geerntet werden. Bei insgesamt 11 Samen konnte der Virusstatus festgestellt werden. Für eine Vaterschaftsanalyse und der Klärung des Übertragungsweges der Viren durch Pollen waren diese Probenzahlen zu gering. Auf zwei der Intensivbeobachtungsflächen (IBF) aus dem Verbundprojekt FraxForFuture wurden in Kaisheim 200 Altbäume (Abb. 33a) und 200 Sämlinge (Abb. 33b) und im Melzower Forst 138 Altbäume und 200 Sämlinge markiert, nummeriert, beschriftet und beprobt. Die Genotypisierung erfolgte mittels der oben genannten genetischen Marker.

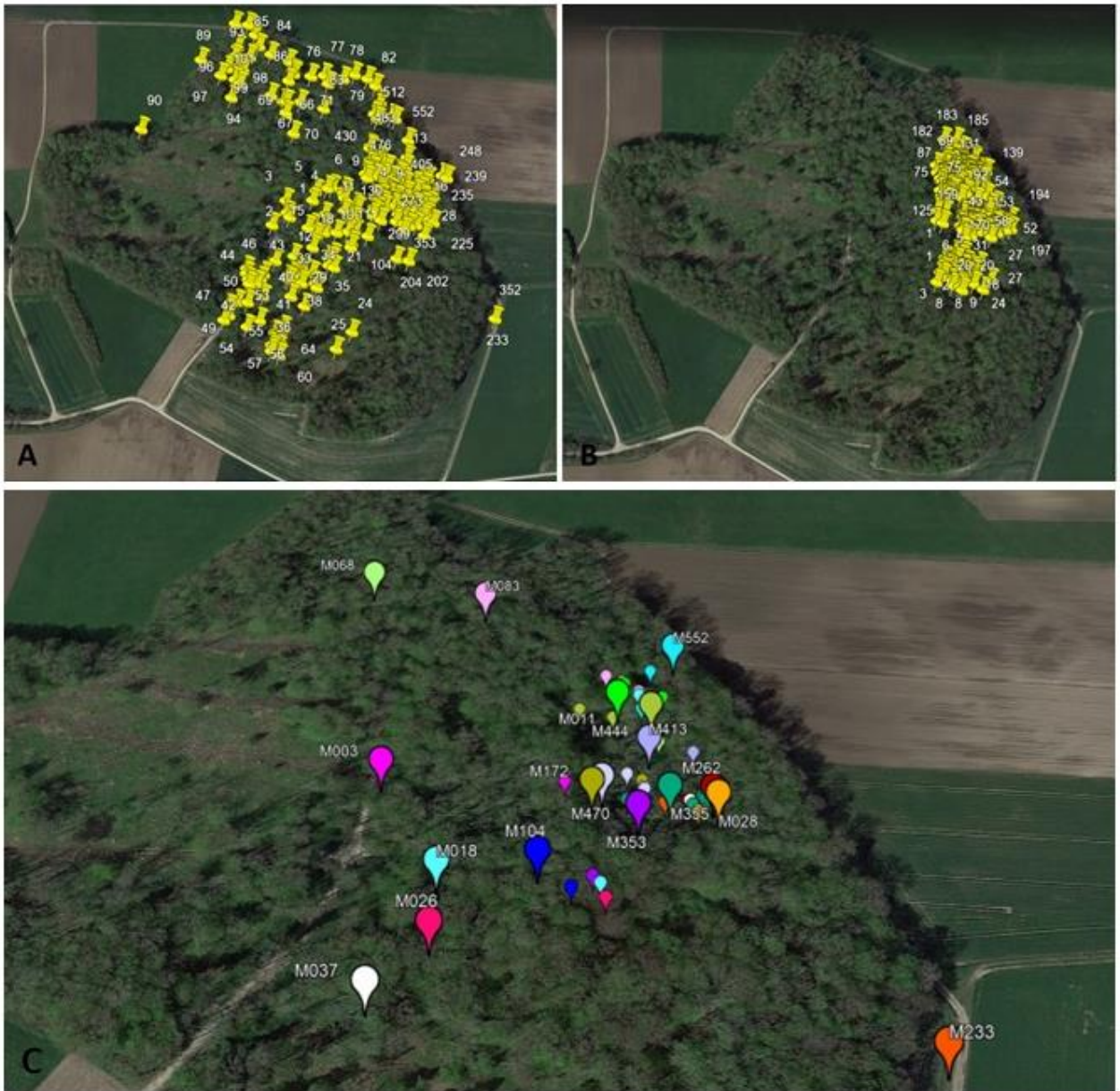


Abb. 33 a-c: Proben und deren Abstammungsanalyse in Kaisheim: A - Altbäume (beprobt im Jahr 2022); B - Sämlinge (beprobt im Jahr 2023); C - Gemeinsames Ergebnis der Mutterschaftsanalyse mit CERVUS und COLONY für die IBF-Fläche in Kaisheim. Nachkommen, die zu einem bestimmten Mutterbaum gehören, sind mit der gleichen Farbe wie der Mutterbaum markiert.

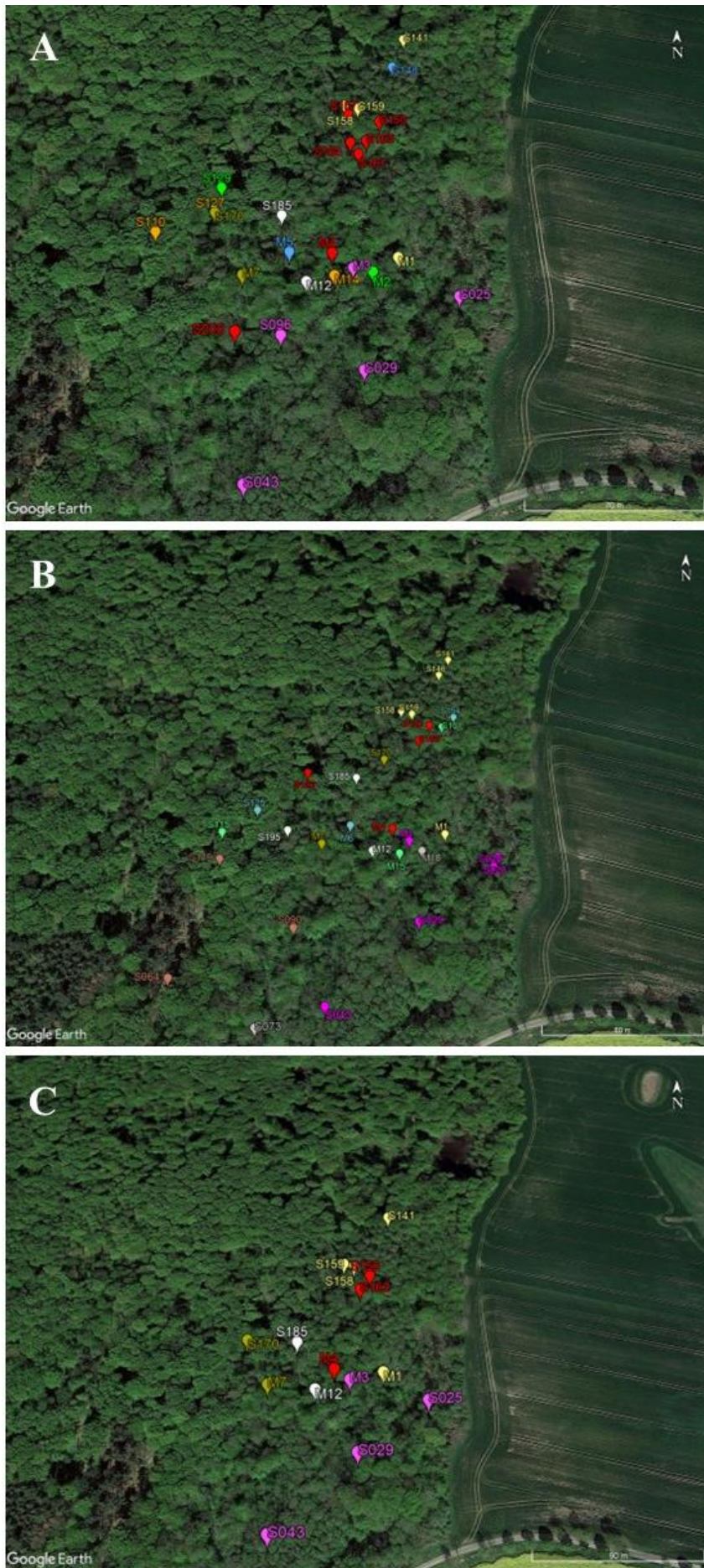


Abb. 34a-c: Durch Mutterschaftsanalyse mit CERVUS (A), COLONY (B) und dem gemeinsamen Ergebnis (C) identifizierte Mutter-Nachwuchs-Paare mit 16 virusgetesteten Altbäumen und 200 Sämlingen, die auf der IBF-Fläche im Melzower Forst beprobt wurden. M-Mutter, S-Sämling. Nachkommen, die zu einem bestimmten Mutterbaum gehören, sind mit der gleichen Farbe wie der Mutterbaum gekennzeichnet.



Abb. 35: Kandidaten für Mutter-Nachwuchs-Paare, die durch Mutterschaftsanalyse mit CERVUS und COLONY identifiziert wurden, wobei 138 Altbäume und 200 Sämlinge auf der IBF-Fläche im Melzower Forst beprobt wurden. M-Mutter, S-Sämling. Nachkommen, die zu einem bestimmten Mutterbaum gehören, sind mit der gleichen Farbe wie der Mutterbaum gekennzeichnet.

Mittels der Software CERVUS (Kalinowski et al. 2007) und COLONY (Jones and Wang 2010) wurden zunächst Abstammungsanalysen für alle alle Sämlinge und Altbäume aus Kaisheim durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurden für 16 Altbäume (mit bekanntem Infektionsstatus) und 68 benachbarte Sämlinge aus dem Melzower Forst ebenfalls eine Abstammungsanalyse durchgeführt, zunächst mit CERVUS (Abb. 34a), dann mit COLONY (Abb. 34b), anschließend wurden die gemeinsamen Ergebnisse ausgewählt (Abb. 34c). In einem letzten Schritt wurde eine Abstammungsanalyse für alle Altbäume und Sämlinge aus dem Melzower Forst durchgeführt, wobei das gemeinsame Ergebnis der Software CERVUS und COLONY ausgewählt wurde (Abb. 35). Die Analyse mit CERVUS und COLONY wurde sowohl für die Mütter als auch für die Väter durchgeführt. Von 200/jedem Standort identifizierten wir mit Hilfe der beiden Softwareprogramme in signifikanter Weise 37 Nachkommen mit einem, 42 Nachkommen mit beiden Elternteilen in Kaisheim, und 67 Nachkommen mit einem, 41 mit beiden Elternteilen im Melzower Forst. Diese Mutterbäume und die nachgewiesenen Nachkommen wurden zur Überprüfung der entwickelten SNP-Marker verwendet (AP 4.2).

AP 4.2: Target-Sequencing von Virenabwehrgenen in der Esche

Die von uns entworfenen Primerpaare testeten wir im Labor an jeweils vier zufällig ausgewählten Eschen-DNA-Proben aus der Emmendinger Samenplantage (Abb. 36). Alle Primerpaare, die eindeutige Elektrophorese-Gelbilder lieferten, wurden für die nachfolgende Sequenzierung ausgewählt. Auf dieser Grundlage wurden 38 Primerpaare für kodierende und 36 für Promotorsequenzen ausgewählt.

1	Standard		
2	pr_ARLAI_C_EM112	314	
3	pr_ARLAI_C_EM018		
4	pr_ARLAI_C_Gr_81.9_27		
5	pr_ARLAI_C_BY1_486_J		
6	pr_ARLAI_C_BY1_111		
7	pr_D8P1_EM112	501	
8	pr_D8P1_EM018		
9	pr_D8P1_Gr_81.9_27		
10	pr_D8P1_BY1_486_J		
11	pr_D8P1_BY1_111		
12	pr_SGS3_EM112		
13	pr_SGS3_EM018	495	
14	pr_SGS3_Gr_81.9_27		
15	pr_SGS3_BY1_486_J		
16	pr_SGS3_BY1_111		
17	pr_NT19_Gr_81.9_27	410	
18	pr_NT19_BY1_486_J		
19	pr_NT19_BY1_111		
20	Standard		

1	Standard		
2	pr_ABH1_EM112	665	
3	pr_ABH1_EM018		
4	pr_ABH1_Gr_81.9_27		
5	pr_ABH1_BY1_486_J		
6	pr_ABH1_BY1_111		
7	pr_CRH1_EM112	518	
8	pr_CRH1_EM018		
9	pr_CRH1_Gr_81.9_27		
10	pr_CRH1_BY1_486_J		
11	pr_CRH1_BY1_111		
12	pr_HEN1_EM112	551	
13	pr_HEN1_EM018		
14	pr_HEN1_Gr_81.9_27		
15	pr_HEN1_BY1_486_J		
16	pr_HEN1_BY1_111		
17	pr_NT19_EM112	410	
18	pr_NT19_EM018		
19	Standard		
20			

Abb. 36: PCR-Produkte von acht Markern, die mit Primern für Promotorregionen amplifiziert wurden. Die erfolgreiche Amplifikation wurde anhand von 2%-Agarosegelen überprüft. Die Zahl unter/über der jeweiligen Abkürzung gibt die Länge der Sequenz an.

Mit diesen 74 Primerpaaren amplifizierten wir PCR-Produkte von zwei Gruppen von Proben. Eine Gruppe bestand aus Eschen, die nachweislich Viren enthielten und Symptome von Viruserkrankungen an den Blättern zeigten. Die zweite Gruppe bestand aus Eschen, die nachweislich Viren enthielten, aber keine Symptome zeigten. Die Virennachweise wurden von PP2 durchgeführt. Jede Gruppe bestand aus vier Individuen. Die Sequenzierungen der PCR-Produkte wurden teilweise im Labor des AWG und teilweise von der Fa. LGC (Berlin) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gereinigt und aus beiden Richtungen sequenziert. Die Sequenzen wurden nachfolgend bearbeitet, visualisiert und ausgerichtet (Abb. 37) und alle relevanten SNPs validiert.

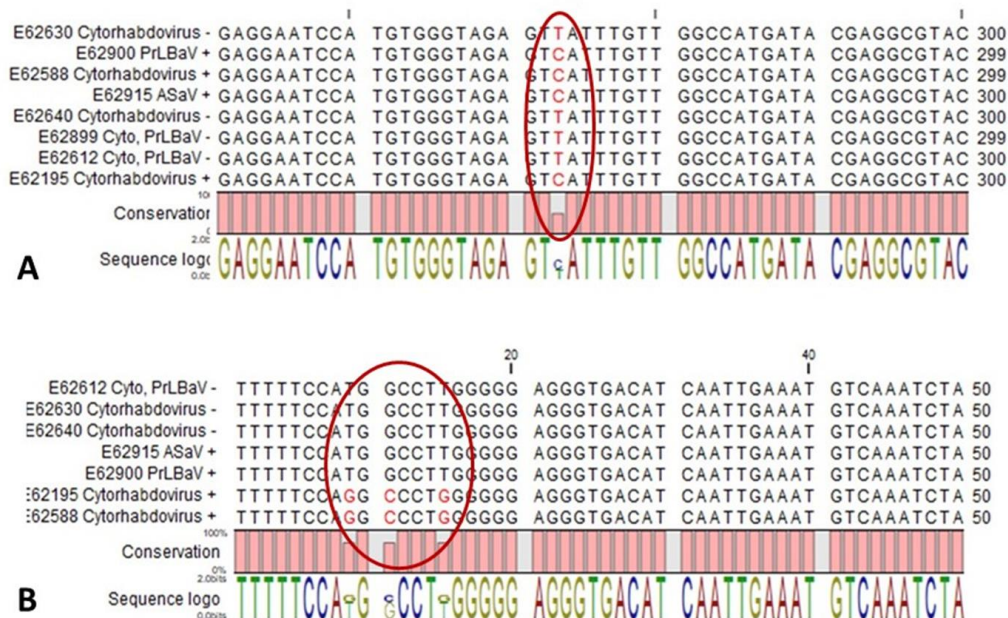


Abb. 37: Vielversprechende Allele in zwei ausgewählten Marker (A - AT3G44220 und B - pr_OZF1), amplifiziert in virusinfizierten symptomatischen und asymptomatischen Proben. + bedeutet mit, - bedeutet ohne Symptom.

Von 74 Markern wählten wir sechs vielversprechende Fragmente für weitere Analysen aus. Für diese sechs Fragmente berechneten wir die Anzahl der polymorphen Stellen, die Anzahl und die Loci möglicher Rekombinationsereignisse (Tab. 9). Um die ausgewählten sechs Marker an einer größeren Anzahl von Proben zu testen, wurde zunächst im Anschluss an die Abstammungsanalyse eine umfassende Untersuchung auf Virusinfektion und Virussympptome im Melzower Forst an Nachkommen durchgeführt, die eine signifikante Abstammung von den untersuchten Mutterbäumen aufwiesen, die zuvor auf Virusinfektion getestet wurden. Der Melzower Forst ist ein Waldbestand mit stark vernässtem Boden und dichter Bodenvegetation, der stark vom Eschensterben betroffenen ist. Bei der Suche und Phänotypisierung der Nachkommen mit einer Größe von 20-40 cm wurde folgende Strategie angewandt: Zunächst wurde den Nachkommen, die sowohl mit CERVUS als auch mit COLONY identifiziert wurden, Priorität eingeräumt. Anschließend wurden die Nachkommen gesucht und phänotypisiert, die von den beiden Programmen getrennt identifiziert wurden und am Standort gefunden werden konnten (Abb. 38). Um anschließend zu prüfen, ob die ausgewählten Markerkandidaten in größeren Stichproben tatsächlich relevant sind, wurden Proben von allen beprobten Altbäumen und Nachkommen von 16 auf Virusinfektion und Symptomatik untersuchten Mutterbäumen (Tab. 10) und deren Nachkommen aus einer Mutterbaumanalyse im Melzower Forst (Abb. 38) sowie Proben von 22 Altbäumen in Kaisheim, 31 Individuen in Schorndorf, 32 Bäumen in Emmendingen und fünf Nachkommen in Grabenstätt ausgewählt. Insgesamt 115 Proben wurden in diesem letzten Schritt für die Markerauswahl auf der Grundlage relevanter Polymorphismen in Korrelation mit dem symptomatischen/asymptomatischen Status verwendet. Von allen sechs Kandidaten wurde nur eine Sequenz (AT3G44220) gefunden, die eine Nukleotidvariation aufwies, die die symptomatische und die asymptomatische Gruppe von Proben unterschied. Was die virale Infektion betrifft, so waren von den 115 genotypisierten Proben 68 nur mit Cytorhabdovirus infiziert; vier mit Cytorhabdovirus und ASaV; acht mit Cytorhabdovirus und PrLBaV; eine mit Cytorhabdovirus, PrLBaV und ASaV; bei 33 wurde keine Infektion mit ASaV, PrLBaV oder den Cytorhabdoviren FraGCRV1 und FraGCRV2 festgestellt. Was die Symptomatik dieser Proben anbelangt, so wiesen von der Gesamtzahl der Proben 52 unspezifische lokalisierte Läsionen auf, fünf zeigten spezifische Symptome, während 58 keinerlei Symptome aufwiesen. Nach der Sequenzierung wurden von 111 Proben Sequenzen von guter Qualität erhalten. Die PCR-Produkte von vier Proben (Melzower Forst 11, Schorndorf 56, Melzower Forst 9 und Schorndorf 83) wiesen keine klaren Chromatogramme auf und wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Mit Ausnahme von acht Proben wiesen alle 30 infizierten Proben ohne Symptome die Base Thymin (T) und alle infizierten Proben mit spezifischen Symptomen die Base Cytosin (C) am Locus 273 des AT3G44220-Genfragments auf. Die Proben, die von diesem Muster abwichen, waren: Melzower Forst Sämling 29, Melzower Forst 7, Kaisheim 44, Melzower Forst 6, Melzower Forst 19, Schorndorf 2, Schorndorf 98 und Schorndorf 36. 10 aller genotypisierten Proben erwiesen sich als Heterozygoten, neun davon ohne oder nur mit unspezifischen Symptomen.

Tab. 9. Statistiken zu den sechs ausgewählten Markern mit DnaSp-Software (Rozas and Rozas 1995).

Marker	Number of sites	Number of segregating sites	Min. number of recombination events	Recomb. between sites	Relevant SNP's position in seq	Encoded protein (in <i>Olea europaea</i>)
AT3G44220	546	5	1	273, 399	273	transmembrane protein (R receptor)
AT5G42950	541	3	0	no recombination	532	GYF domain containing protein
pr_ABCG15	519	22	0	no recombination	31, 473, 477	ABC transporter
pr_MIPS2	200	5	1	129, 194	103, 194	inositol-3-phosphate synthase
pr_MPB2C	460	4	0	no recombination	71, 96, 218	Hop-interacting THI110
pr_OZF1	145	5	1	15, 95	9, 11, 15	zinc finger CCCH domain-containing protein

Abb. 38: Neun der getesteten Altbäume von *F. excelsior*, die 2023 beprobt und 2024 auf der IBF-Fläche im Melzower Forst gefunden wurden, wurden hinsichtlich der Virusinfektion und der Symptomatik bewertet und für die Genotypisierung ausgewählt.Tab. 10: Alle *F. excelsior*-Altbäume in der IBF-Fläche im Melzower Forst wurden auf Virusinfektion und Symptomatik untersucht und für Markertests und Selektion verwendet.

Nr.	Tree number	Geographical position (WGS84 coordinates)		Virus infection status	Symptomatic status
		latitude	longitude		
1	1	53.18636188	13.95514014	Cytorhabdovirus	no symptoms
2	11	53.1862974	13.95451238	Cytorhabdovirus	no symptoms
3	12	53.18625275	13.95451496	Cytorhabdovirus, ASaV	specific symptoms
4	13	53.18623381	13.95463141	no virus detected	no symptoms
5	14	53.18628021	13.95470422	no virus detected	no symptoms
6	15	53.1862422	13.95474719	no virus detected	no symptoms
7	18	53.1862605	13.95493816	Cytorhabdovirus	no symptoms
8	19	53.18617368	13.95499161	Cytorhabdovirus	no symptoms
9	2	53.18629679	13.95496497	Cytorhabdovirus	no symptoms
10	3	53.18631511	13.95483028	Cytorhabdovirus, ASaV	specific symptoms
11	4	53.18638378	13.95468479	Cytorhabdovirus	no symptoms
12	5	53.18638828	13.95438865	Cytorhabdovirus, ASaV	specific symptoms
13	6	53.18639285	13.9543155	Cytorhabdovirus	no symptoms
14	7	53.18628279	13.95407723	Cytorhabdovirus	no symptoms
15	8	53.1862369	13.95435851	Cytorhabdovirus	no symptoms
16	9	53.18621502	13.95436503	no virus detected	no symptoms

Der letzte Schritt der Markerentwicklung bestand aus einer Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen der Genotypisierung, dem Infektionsstatus und den Symptomen der 111 Proben. Nach der Sequenzierung der PCR-Produkte aller 111 Proben mit den ausgewählten Markerkandidaten wurde für jede SNP-Variante-Symptom-Kombination eine Assoziationsanalyse durchgeführt, die in Tassel (Bradbury et al. 2007) als allgemeine lineare Modellfunktion (GLM) wie folgt implementiert wurde: Die Sequenzen der 111 Proben wurden einer Qualitätsprüfung unterzogen und nach Qualität gefiltert, auf gleiche Länge getrimmt, dann ausgerichtet und die Position der in der vorherigen Phase ausgewählten relevanten SNP-Loci erneut bestimmt. Die FASTA-Datei des Alignments wurde als Eingangsgenotypdatei für die Software Tassel verwendet. Indel-Stellen wurden entfernt, die FASTA-Datei wurde in eine numerische Datei umgewandelt, dann wurde eine PCA-Analyse auf der Grundlage der Kovarianz und beschränkt auf drei Komponenten durchgeführt. Da die Gründe für den infektiösen und unterschiedlichen symptomatischen Status von Anfälligkeit über Toleranz bis hin zu vollständiger Resistenz variieren können, wurden der Infektionsstatus und die Symptome der Proben in der numerischen Eingabedatei des Phänotyps in drei Varianten (a, b, c) quantifiziert (Tab. 11), wobei jede dieser Varianten mit dem Genotyp in Verbindung gebracht wurde. Der Genotyp, jede Version der Phänotypdateien und das Ergebnis der PCA-Analyse wurden durch Intersect Join zusammengeführt. Die GLM-Analyse wurde mit 1000 Permutationen durchgeführt, und alle Optionen wurden als Standard eingestellt. Die p-Werte der assoziierten Marker wurden anhand von Signifikanzschwellen auf den Signifikanzniveaus 0,05 (konservativ), 0,01 und 0,001 (stringent) getestet. Unter Verwendung der Versionen „b“ und „c“ der Phänotyp-Datei für die Analyse, von allen polymorphen Loci im Markerkandidaten AT3G44220, zeigte der Locus an Position 183 eine Korrelation mit dem Phänotyp bei einem p-Wert $\leq 0,05$ (konservatives Niveau) (Tab. 12).

Tab. 11: Versionen der Phänotypdatei a, b, c, die für den Nachweis von Loci in der Sequenz AT3G44220 verwendet wurden, die an 111 Proben amplifiziert wurden und mit der Virusinfektion und der Symptomatik korrelieren. Der Begriff „unspezifisches Symptom“ bedeutet eine unauffällige lokale Läsion.

Phenotype file versions	Infection and symptomatic status of groups	Numerical equivalent of groups in file
a	no symptom	1
	unspecific symptom	2
	specific symptom	3
b	virus detected, with specific or unspecific symptom	1
	virus detected, without any symptom	2
	no virus detected	3
c	virus detected, with specific symptom	1
	virus detected, with unspecific symptom	2
	virus detected, without symptom	3
	no virus detected	4

Tab. 12: Locus 183 in der Sequenz AT3G44220, der in 111 Proben amplifiziert wurde, korreliert mit den Phänotypdateien „b“ und „c“, beide signifikant bei einem p-Wert $\leq 0,05$, was als signifikantes Ergebnis für die GLM-basierte Methode gilt.

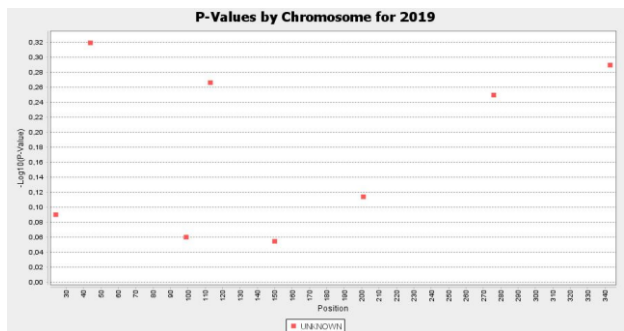
Trait	Marker	Position	Phenotype file version	marker_F	p-value
Virus caused leaf symptoms	AT3G44220	183	b	4.08199	0.01976
			c	3.90232	0.02334

AP 4.3: Assoziationsanalysen der genetischen Muster der Esche mit Virusinfektion

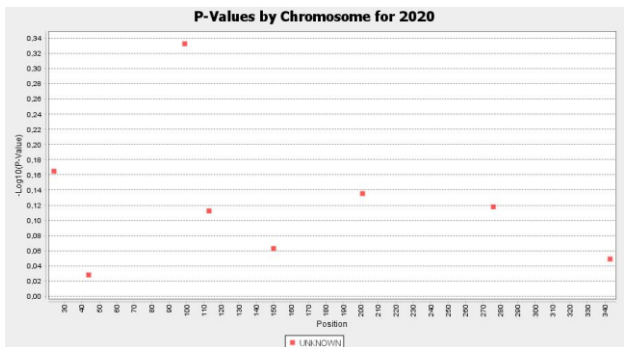
Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit gegenüber dem Eschentriebsterben und der Anfälligkeit gegenüber Virusinfektionen besteht, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen der Genotypisierung mit dem entwickelten Virusabwehrmarker und den Eschentriebsterben-Scoring-Daten aus Grabenstädt durchgeführt. Die 144 Proben wurden auf der Grundlage der Daten zum Eschentriebsterben so ausgewählt, dass die Gruppen mit hoher, mittlerer und geringer Anfälligkeit gegenüber dem Eschentriebsterben zu je ca. 1/3 der Gesamtzahl der Proben vertreten sind. Die FASTA-Datei des Alignments von AT3G44220 an 144 Proben aus Grabenstädt wurde als Eingabe-Genotyp-Datei für die Tassel-Software verwendet. Die Phänotyp-Datei bestand aus den Eschentriebsterben-Scoring-Daten derselben Individuen, die zwischen 2019 und 2023 im Rahmen des Projekts FraxGen registriert wurden. Der Genotyp, jede Version der Phänotyp-Dateien (2019-2023) und das Ergebnis der PCA-Analyse wurden mit Intersect Join zusammengeführt. Die GLM-Analyse wurde mit 1000 Permutationen durchgeführt, und alle Optionen wurden als Standard eingestellt. Die p-Werte der assoziierten Marker wurden mit Signifikanzschwellen auf den Signifikanzniveaus 0,05 (konservativ), 0,01 und 0,001 (stringent) getestet.

Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen den durch die Virusabwehrmarker definierten Genotypen und den durch die Eschentriebsterben-Scores definierten Phänotypen bei den 144 Proben aus Grabenstädt festgestellt (Abb. 39).

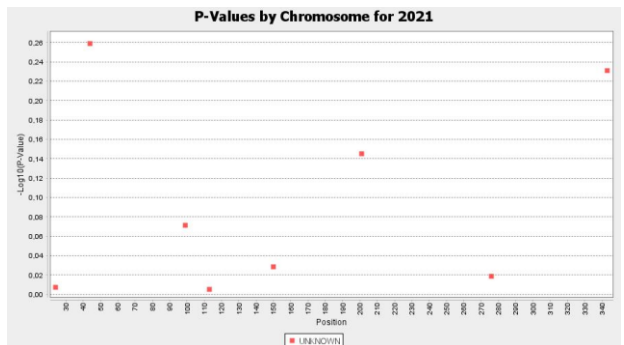
Ash dieback scoring period	SNP position in marker	Fixation index	p-value
2019	24	0.05626	0.81285
2019	44	0.50333	0.47923
2019	99	0.02654	0.87081
2019	113	0.37414	0.54176
2019	150	0.02202	0.88224
2019	201	0.08636	0.76929
2019	276	0.33649	0.5628
2019	343	0.42944	0.51334



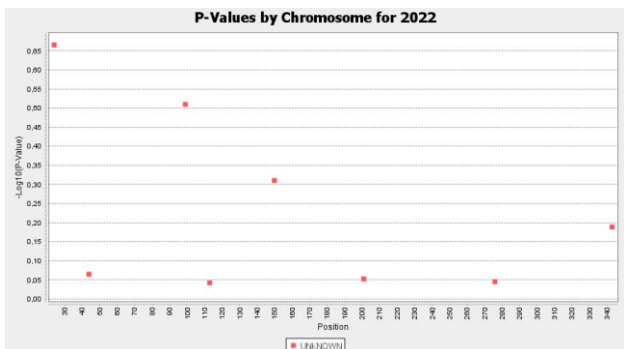
Ash dieback scoring period	SNP position in marker	Fixation index	p-value
2020	24	0.16591	0.6844
2020	44	0.0062	0.93737
2020	99	0.53763	0.46465
2020	113	0.08441	0.77184
2020	150	0.02894	0.86516
2020	201	0.11751	0.73227
2020	276	0.09176	0.76241
2020	343	0.0181	0.89318



Ash dieback scoring period	SNP position in marker	Fixation index	p-value
2021	24	4.4521E-4	0.9832
2021	44	0.35764	0.55079
2021	99	0.03671	0.84834
2021	113	2.2966E-4	0.98793
2021	150	0.0064	0.93636
2021	201	0.13304	0.71585
2021	276	0.00283	0.95766
2021	343	0.29571	0.58746



Ash dieback scoring period	SNP position in marker	Fixation index	p-value
2022	24	1.54449	0.21606
2022	44	0.03013	0.86246
2022	99	1.04237	0.30906
2022	113	0.01355	0.90751
2022	150	0.48014	0.48953
2022	201	0.02041	0.88661
2022	276	0.01546	0.90124
2022	343	0.20905	0.64823



Ash dieback scoring period	SNP position in marker	Fixation index	p-value
2023	24	0.12351	0.72579
2023	44	0.06827	0.79426
2023	99	0.45117	0.5029
2023	113	0.36051	0.54921
2023	150	0.07842	0.77987
2023	201	0.19113	0.66266
2023	276	0.35102	0.55451
2023	343	0.15217	0.69707

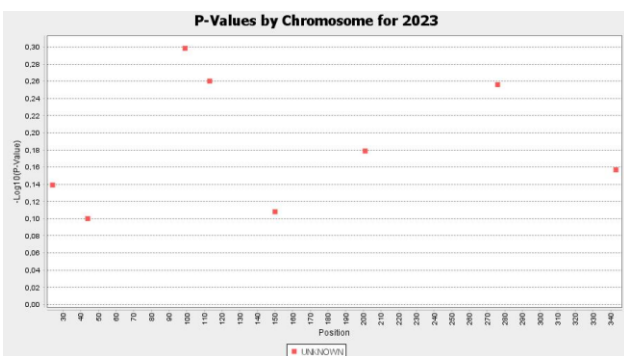


Abb. 39: Ergebnisse der Assoziationsanalyse zwischen den durch die Virusabwehr definierten Genotypen und den durch die Eschentriebsterben-Scoring-Daten definierten Phänotypen (2019-2023) von 144 Proben aus Grabenstätt.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Die Hauptarbeit bestand aus umfangreichen Laborarbeiten, Sequenzanalysen, Probenahmen und Abstammungsanalysen. Es wurden Primerpaare für kodierende Abschnitte und Promotoren von Genen entwickelt. Diese Gene wurden identifiziert und es wird vermutet, dass sie an der molekularen Kontrolle der Virusabwehr beteiligt sind. Bei einer größeren Anzahl von Proben wurde eine vielversprechende Gensequenz identifiziert, die signifikante Unterschiede zwischen symptomatischen und asymptomatischen Eschen in Bezug auf Virus-symptome zeigt. Durch die Verwendung dieses Markers wurde jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Anfälligkeit gegenüber Viren und dem Eschentriebsterben festgestellt.

Referenzen

- Aggarwal RK, Allainguillaume J, Bajay MM, Barthwal S, Bertolino P, Chauhan P, Consuegra S, Croxford A, Dalton DL, Belder E den, Díaz-Ferguson E, Douglas MR, Drees M, Elderson J, Esselink GD, Fernández-Manjarrés JF, Frascaria-Lacoste N, Gäbler-Schwarz S, Garcia de Leaniz C, Ginwal HS, Goodisman MAD, Guo B, Hamilton MB, Hayes PK, Hong Y, Kajita T, Kalinowski ST, Keller L, Koop BF, Kotzé A, Lalremruata A, Leese F, Li C, Liew WY, Martinelli S, Matthews EA, Medlin LK, Messmer AM, Meyer EI, Monteiro M, Moyer GR, Nelson RJ, Nguyen TTT, Omoto C, Ono J, Pavinato VAC, Pearcy M, Pinheiro JB, Power LD, Rawat A, Reusch TBH, Sanderson D, Sannier J, Sathe S, Sheridan CK, Smulders MJM, Sukganah A, Takayama K, Tamura M, Tateishi Y, Vanhaecke D, Vu NV, Wickneswari R, Williams AS, Wimp GM, Witte V, Zucchi MI (2011) Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2010-30 September 2010. *Molecular ecology resources* 11(1):219–222. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02944.x
- Aiewsakun P, Katzourakis A (2015) Endogenous viruses: Connecting recent and ancient viral evolution. *Virology* 479-480:26–37. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.011
- Anderson H, Nilsen L, Tømmervik H, Karlsen S, Nagai S, Cooper E (2016) Using Ordinary Digital Cameras in Place of Near-Infrared Sensors to Derive Vegetation Indices for Phenology Studies of High Arctic Vegetation. *Remote Sensing* 8(10):847. doi: 10.3390/rs8100847
- Anonymus (2024) EPPO Global Database. Verfügbar online: <https://gd.eppo.int/taxon/RRV000/categorization> [Zugriff: 15. Januar 2025]
- Atlas Z, Özgüven Mehmet Metin, Yanar Y (2018) Determination of Sugar Beet Leaf Spot Disease Level (*Cercospora Beticola* Sacc.) with Image Processing Technique by Using Drone. *CIACR* 5(3). doi: 10.32474/CIACR.2018.05.000214
- Augustin L (2019) Untersuchungen zum Eschentriebsterben: Einzelbaumbestimmung mit Hilfe von multispektralen Daten und Vergleich von spektraler Signatur und Boniturdaten. Unveröffentlichte Masterarbeit an der Katholischen Universität Eichstätt-Ingolstadt
- Bai X, Rivera-Vega L, Mamidala P, Bonello P, Herms DA, Mittapalli O (2011) Transcriptomic signatures of ash (*Fraxinus* spp.) phloem. *PloS one* 6(1):e16368. doi: 10.1371/journal.pone.0016368
- Barbedo J (2019) A Review on the Use of Unmanned Aerial Vehicles and Imaging Sensors for Monitoring and Assessing Plant Stresses. *Drones* 3(2):40. doi: 10.3390/drones3020040
- Baxter E, Cooke LR, Spaans F, Grant IR, McCracken AR (2023) The introduction of *Hymenoscyphus fraxineus* to Northern Ireland and the subsequent development of ash dieback. *Forest Pathology* 53(1). doi: 10.1111/efp.12789
- Beatty GE, Brown JA, Cassidy EM, Finlay CMV, McKendrick L, Montgomery WI, Reid N, Tosh DG, Provan J (2015) Lack of genetic structure and evidence for long-distance dispersal in ash (*Fraxinus excelsior*) populations under threat from an emergent fungal pathogen: implications for restorative planting. *Tree Genetics & Genomes* 11(3). doi: 10.1007/s11295-015-0879-5
- Bejerman N, Dietzgen R, Debat H (2023) Novel Tri-Segmented Rhabdoviruses: A Data Mining Expedition Unveils the Cryptic Diversity of Cytorhabdoviruses. *Viruses* 15(12). doi: 10.3390/v15122402
- Bengtsson SBK, Barklund P, Brömssen C von, Stenlid J (2014) Seasonal pattern of lesion development in diseased *Fraxinus excelsior* infected by *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *PloS one* 9(4):e76429. doi: 10.1371/journal.pone.0076429
- Böhm JW, Zübert C, Kahlenberg G, Jochner-Oette S, Kube M (2024) Load of the ash dieback pathogen *hymenoscyphus fraxineus* differs in soil. *J Plant Dis Prot* 131(5):1399–1410. doi: 10.1007/s41348-024-00970-6
- Bos L (1977) Symptoms of virus diseases in plants, Wageningen
- Bragard C, Baptista P, Chatzivassiliou E, Di Serio F, Gonthier P, Jaques Miret JA, Justesen AF, MacLeod A, Magnusson CS, Milonas P, Navas-Cortes JA, Parnell S, Potting R, Reignault PL, Stefani E, Thulke H-H, van der Werf W, Vicent Civera A, Yuen J, Zappalà L, Dehnen-Schmutz K, Migheli Q, Vloutoglou I, Streissl F, Chiumenti M, Rubino L (2022) Pest categorisation of High Plains wheat mosaic virus. *EFSA journal. European Food Safety Authority* 20(5):e07302. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7302
- Bratsch SA, Lockhart BE, Mollov DS, Tisserat NA (2018) Partial characterization of two new viruses in ash belonging to the families *Partitiviridae* and *Caulimoviridae*. *Acta Hort.*(1191):89–96. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1191.13
- Buchner L, Eisen A-K, Jochner-Oette S (2024) Effects of ash dieback on leaf physiology and leaf morphology of *Fraxinus excelsior* L. *Trees* 38(5):1205–1221. doi: 10.1007/s00468-024-02546-1
- Buchner L, Eisen A-K, Jochner-Oette S (2025) Identification of damage severity in *Fraxinus excelsior* L. trees caused by ash dieback using multisensory and multitemporal UAV imagery. *Forest Ecology and Management* 585:122660. doi: 10.1016/j.foreco.2025.122660

- Büttner C, Landgraf M, Fernandez Colino HL, Barga S von, Bandte M (2023) Chapter 3 - Virus diseases of forest and urban trees. In: Asiegbu FO, Kovalchuk A (eds) Forest Microbiology, vol 3. Academic Press, pp 61–97
- Chandelier A, André F, Laurent F (2010) Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real time PCR. Forest Pathology 40(2):87–95. doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00610.x
- Corti M, Cavalli D, Cabassi G, Vigoni A, Degano L, Marino Gallina P (2019) Application of a low-cost camera on a UAV to estimate maize nitrogen-related variables. Precision Agric 20(4):675–696. doi: 10.1007/s11119-018-9609-y
- Dobrowolska D, Hein S, Oosterbaan A, Wagner S, Clark J, Skovsgaard JP (2011) A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. Forestry 84(2):133–148. doi: 10.1093/forestry/cpr001
- Doyle J (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt GM (ed) Molecular Techniques in Taxonomy. Springer Berlin / Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 283–293
- Eisen A-K, Buchner L, Fussi B, Jochner-Oette S (2024) Does ash dieback affect the reproductive ecology of *Fraxinus excelsior* L.? J. For. Res. 35(1). doi: 10.1007/s11676-023-01670-x
- Enderle R, Fussi B, Lenz HD, Langer G, Nagel R, Metzler B (2017) Ash dieback in Germany: research on disease development, resistance and management options. In: Vasaitis R, Enderle R (eds) Dieback of European Ash (*Fraxinus* spp.) – Consequences and Guidelines for Sustainable Management, pp 89–105
- Enderle R, Peters F, Nakou A, Metzler B (2013) Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. Eur J Forest Res 132(5-6):865–876. doi: 10.1007/s10342-013-0717-y
- Enderle R, Stenlid J, Vasaitis R (2019) An overview of ash (*Fraxinus* spp.) and the ash dieback disease in Europe. CABI Reviews:1–12. doi: 10.1079/PAVSNR201914025
- EPPO (2013) PM 7/117 (1) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. EPPO Bulletin 43(3):449–461. doi: 10.1111/epp.12061
- Falkenberg NR, Piccinni G, Cothren JT, Leskovar DI, Rush CM (2007) Remote sensing of biotic and abiotic stress for irrigation management of cotton. Agricultural Water Management 87(1):23–31. doi: 10.1016/j.agwat.2006.05.021
- Fones HN, Mardon C, Gurr SJ (2016) A role for the asexual spores in infection of *Fraxinus excelsior* by the ash-dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus*. Scientific reports 6:34638. doi: 10.1038/srep34638
- Fussi B (2020) So hat die Esche eine Chance! LWF Aktuell(3):58–59
- Fussi B, Konnert M (2014) Genetic analysis of European common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations affected by ash dieback. Silvae Genetica 63(1-6):198–212. doi: 10.1515/sg-2014-0026
- Garnsey SM, Moreno P (2010) Citrus tristeza diseases - a worldwide perspective. In: Karasev AV, Hilf ME (eds) Citrus Tristeza Virus Complex and Tristeza Diseases, vol 94. APS Press, St Paul, MN, USA
- Gaskin TR, Tischendorf M, Günther I, Rehanek M, Büttner C, Barga S von (2021) Characterization of a Novel Emaravirus Affecting Ash Species (*Fraxinus* spp.) in Europe. Forests 12(11):1574. doi: 10.3390/f12111574
- Gaur RK, Sharma PH (2014) Plant Virus-Host Interaction - 1st Edition. Academic Press
- Goberville E, Hautekèete N-C, Kirby RR, Piquot Y, Luczak C, Beaugrand G (2016) Climate change and the ash dieback crisis. Scientific reports 6:35303. doi: 10.1038/srep35303
- Graham EA, Hamilton MP, Mishler BD, Rundel PW, Hansen MH (2006) Use of a Networked Digital Camera to Estimate Net CO₂ Uptake of a Desiccation-Tolerant Moss. International Journal of Plant Sciences 167(4):751–758. doi: 10.1086/503786
- Grosdidier M, loos R, Marçais B (2018) Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France? Forest Pathology 48(4). doi: 10.1111/efp.12426
- Gross A, Zaffarano PL, Duo A, Grünig CR (2012) Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Fungal Genetics and Biology 49(12):977–986. doi: 10.1016/j.fgb.2012.08.008
- Haňáčková Z, Černý K, Koukol O, Havrdová L, Zahradník D (2017) Fungal Endophytes in Ash Shoots – Diversity and Inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*. Baltic Forestry(23(1))
- Harrison BD, Murant AF (1996) Nepoviruses: Ecology and Control. In: Harrison BD (ed) The Plant Viruses. Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes. Springer, New York, NY, pp 211–228
- Hermansson A, Lindgren PE (2001) Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. Applied and environmental microbiology 67(2):972–976. doi: 10.1128/AEM.67.2.972-976.2001
- Hocheder S (2018) Untersuchungen zur Eignung der Phänologie als Resistenzindikator bei der Esche sowie fernerkundliche Methoden zur Abschätzung der Vitalität von durch *Hymenoscyphus pseudoalbidus* befallenen Eschenbeständen. Unveröffentlichte Masterarbeit an der Katholischen Universität Eichstätt-Ingolstadt

- Horrocks KJ, Seehausen ML, Down RE, Audsley N, Maggini R, Collatz J (2024) Assessing the feasibility of pre-emptive biological control against the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, an imminent biosecurity threat to Europe. *Biological Control* 198:105641. doi: 10.1016/j.biocontrol.2024.105641
- Ioos R, Kowalski T, Husson C, Holdenrieder O (2009) Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. *Eur J Plant Pathol* 125(2):329–335. doi: 10.1007/s10658-009-9471-x
- Jochner-Oette S, Rohrer T, Eisen A-K, Tönnies S, Stammel B (2021) Influence of Forest Stand Structure and Competing Understory Vegetation on Ash Regeneration—Potential Effects of Ash Dieback. *Forests* 12(2):128. doi: 10.3390/f12020128
- Johansson SBK, Vasaitis R, Ihrmark K, Barklund P, Stenlid J (2010) Detection of *Chalara fraxinea* from tissue of *Fraxinus excelsior* using species-specific ITS primers. *Forest Pathology* 40(2):111–115. doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00614.x
- Jones OR, Wang J (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular ecology resources* 10(3):551–555. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x
- Kahlenberg G, Jochner-Oette S (submitted) Can phenology and chlorophyll be used for indicating the susceptibility of common ash to ash dieback? *Tree Physiology*
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16(5):1099–1106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
- Kampen M, Lederbauer S, Mund J-P, Immitzer M (2019) UAV-Based Multispectral Data for Tree Species Classification and Tree Vitality Analysis. Dreiländertagung der DGPF, der OVG und der SGPF in Wien, Österreich – Publikationen der DGPF(28)
- Karasev AV (2000) Genetic Diversity and Evolution of Closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*(38):293–324. doi: 10.1146/annurev.phyto.38.1.293
- Klesse S, Abegg M, Hopf SE, Gossner MM, Rigling A, Queloz V (2021) Spread and Severity of Ash Dieback in Switzerland – Tree Characteristics and Landscape Features Explain Varying Mortality Probability. *Front. For. Glob. Change* 4. doi: 10.3389/ffgc.2021.645920
- Kowalchuk GA, Stephen JR, Boer W de, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JW (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and environmental microbiology* 63(4):1489–1497. doi: 10.1128/aem.63.4.1489-1497.1997
- Langer GJ, Fuchs S, Osewold J, Peters S, Schrewe F, Ridley M, Kätzel R, Bubner B, Grüner J (2022) Frax-ForFuture—research on European ash dieback in Germany. *J Plant Dis Prot* 129(6):1285–1295. doi: 10.1007/s41348-022-00670-z
- Lefort F, Brachet, Frascaria-Lacoste N, Edwards KJ, Douglas GC (1999) Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*). *Molecular Ecology* 8(6):1088–1089. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00655_8.x
- Lenfort F, Douglas GC (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann. For. Sci*(56):259–263
- Manfredini A, Malusà E, Costa C, Pallottino F, Mocali S, Pinzari F, Canfora L (2021) Current Methods, Common Practices, and Perspectives in Tracking and Monitoring Bioinoculants in Soil. *Frontiers in microbiology* 12:698491. doi: 10.3389/fmicb.2021.698491
- Massart S, Candresse T, Gil J, Lacomme C, Predajna L, Ravnikar M, Reynard J-S, Rumbou A, Saldarelli P, Škorić D, Vainio EJ, Valkonen JPT, Vanderschuren H, Varveri C, Wetzel T (2017) A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Frontiers in microbiology* 8:45. doi: 10.3389/fmicb.2017.00045
- McKinney LV, Nielsen LR, Hansen JK, Kjær ED (2011) Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. *Heredity* 106(5):788–797. doi: 10.1038/hdy.2010.119
- Murfitt J, He Y, Yang J, Mui A, Mille K de (2016) Ash Decline Assessment in Emerald Ash Borer Infested Natural Forests Using High Spatial Resolution Images. *Remote Sensing* 8(3):256. doi: 10.3390/rs8030256
- Navarro B, Loconsole G, Giampetruzzi A, Aboughanem-Sabanadzovic N, Ragozzino A, Ragozzino E, Di Serio F (2017) Identification and characterization of privet leaf blotch-associated virus, a novel *idaeovirus*. *Molecular plant pathology* 18(7):925–936. doi: 10.1111/mpp.12450
- Noakes AG, Best T, Staton ME, Koch J, Romero-Severson J (2014) Cross amplification of 15 EST-SSR markers in the genus *Fraxinus*. *Conservation Genet Resour* 6(4):969–970. doi: 10.1007/s12686-014-0260-2
- Peters S, Langer G, Kätzel R (eds) (2021) Eschentriebsterben. Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen, 1. Auflage. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR), Gülzow-Prüzen

- Rehanek M, Al Kubrusli R, Köpke K, Barga S von, Büttner C (2024) Detection of Viruses in Special Stands of Common Ash Reveals Insights into the Virome of *Fraxinus excelsior*. *Forests* 15(8):1379. doi: 10.3390/f15081379
- Rehanek M, Karlin DG, Bandte M, Al Kubrusli R, Nourinejad Zarghani S, Candresse T, Büttner C, Barga S von (2022) The Complex World of Emaraviruses—Challenges, Insights, and Prospects. *Forests* 13(11):1868. doi: 10.3390/f13111868
- Richardson AD (2019) Tracking seasonal rhythms of plants in diverse ecosystems with digital camera imagery. *The New phytologist* 222(4):1742–1750. doi: 10.1111/nph.15591
- Rozas J, Rozas R (1995) DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data. *Cabios*(11(6)):621–625
- Rumbou A, Candresse T, Marais A, Svanella-Dumas L, Landgraf M, Barga S von, Büttner C (2020) Unravelling the virome in birch: RNA-Seq reveals a complex of known and novel viruses. *PLoS one* 15(6):e0221834. doi: 10.1371/journal.pone.0221834
- Rumbou A, Vainio EJ, Büttner C (2021) Towards the Forest Virome: High-Throughput Sequencing Drastically Expands Our Understanding on Virosphere in Temperate Forest Ecosystems. *Microorganisms* 9(8). doi: 10.3390/microorganisms9081730
- Schoelz J, Adhab M (2020) Caulimoviruses (Caulimoviridae). In: Schoelz J, Adhab M (eds) Reference Module in Life Sciences. Elsevier
- Seidel H, Šeho M, Fussi B (2025) Hope for ash conservation and propagation—single individuals can be highly resistant to an invasive pathogen. *J Plant Dis Prot* 132(1). doi: 10.1007/s41348-024-01034-5
- Smigaj M, Gaulton R, Barr SL, Suárez JC (2015) UAV-borne thermal imaging for forest health monitoring: Detection of disease-induced canopy temperature increase. *Int. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spatial Inf. Sci.* XL-3/W3:349–354. doi: 10.5194/isprsarchives-XL-3-W3-349-2015
- Sollars ESA, Harper AL, Kelly LJ, Sambles CM, Ramirez-Gonzalez RH, Swarbreck D, Kaithakottil G, Cooper ED, Uauy C, Havlickova L, Worswick G, Studholme DJ, Zohren J, Salmon DL, Clavijo BJ, Li Y, He Z, Fellgett A, McKinney LV, Nielsen LR, Douglas GC, Kjær ED, Downie JA, Boshier D, Lee S, Clark J, Grant M, Bancroft I, Caccamo M, Buggs RJA (2017) Genome sequence and genetic diversity of European ash trees. *Nature* 541(7636):212–216. doi: 10.1038/nature20786
- Stoll M, Schultz HR, Baecker G, Berkelmann-Loehnertz B (2008) Early pathogen detection under different water status and the assessment of spray application in vineyards through the use of thermal imagery. *Precision Agric* 9(6):407–417. doi: 10.1007/s11119-008-9084-y
- Takahashi H, Fukuhara T, Kitazawa H, Kormelink R (2019) Virus Latency and the Impact on Plants. *Frontiers in microbiology* 10:2764. doi: 10.3389/fmicb.2019.02764
- Timmermann V, Børja I, Hietala AM, Kirisits T, Solheim H (2011) Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *EPPO Bulletin* 41(1):14–20. doi: 10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x
- Wang H, Qi J, Xiao D, Wang Z, Tian K (2017) A re-evaluation of dilution for eliminating PCR inhibition in soil DNA samples. *Soil Biology and Biochemistry* 106:109–118. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.12.011
- Waser L, Küchler M, Jütte K, Stampfer T (2014) Evaluating the Potential of WorldView-2 Data to Classify Tree Species and Different Levels of Ash Mortality. *Remote Sensing* 6(5):4515–4545. doi: 10.3390/rs6054515
- Zhang J, Huang Y, Pu R, Gonzalez-Moreno P, Yuan L, Wu K, Huang W (2019) Monitoring plant diseases and pests through remote sensing technology: A review. *Computers and Electronics in Agriculture* 165:104943. doi: 10.1016/j.compag.2019.104943
- Zheng H, Cheng T, Li D, Zhou X, Yao X, Tian Y, Cao W, Zhu Y (2018) Evaluation of RGB, Color-Infrared and Multispectral Images Acquired from Unmanned Aerial Systems for the Estimation of Nitrogen Accumulation in Rice. *Remote Sensing* 10(6):824. doi: 10.3390/rs10060824