

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben 4 FraxPath (Phytopathologie)

Thema: **Erhalt der Gemeinen Esche (FraxForFuture)
Verbundvorhaben 4: Phytopathologie (FraxPath)**

Zuwendungsempfänger:

**Teilvorhaben 1: Dr. Gitta Langer,
Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt**

**Teilvorhaben 2: Dr. Rasmus Enderle,
Julius Kühn-Institut**

**Teilvorhaben 3: Dr. Jörg Grüner,
Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg**

**Teilvorhaben 4: Prof. Dr. Ewald Langer,
Universität Kassel**

**Teilvorhaben 5: Prof. Dr. Michael Kube,
Universität Hohenheim**

**Teilvorhaben 6: Prof. Dr. Michael Steinert,
Technische Universität Braunschweig**

**Teilvorhaben 7: PD Dr. Cornelia Heinze,
Universität Hamburg**

**Teilvorhaben 8: Prof. Dr. Gabi Krczal,
RLP Agrosience GmbH**

**Teilvorhaben 9: Dr. Andreas Ulrich,
Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung e. V.**

Förderkennzeichen:

Teilvorhaben 1: 2219WK22A4	(TV4.1 FraxCollar)
Teilvorhaben 2: 2219WK22B4	(TV4.2 FraxVir)
Teilvorhaben 3: 2219WK22C4	(TV4.3 FraxDendHist)
Teilvorhaben 4: 2219WK22D4	(TV4.4 FraxRhizo)
Teilvorhaben 5: 2219WK22E4	(TV4.5 FraxHfra-Interaktion)
Teilvorhaben 6: 2219WK22F4	(TV4.6 FraxSek)
Teilvorhaben 7: 2219WK22G4	(TV4.7 FraxVirHyp)
Teilvorhaben 8: 2219WK22H4	(TV4.8 FraxRNAi)
Teilvorhaben 9: 2219WK22I4	(TV4.9 FraxProMic2)

Laufzeit: **01.07.2020 bis 31.12.2023, teilweise verlängert bis zum 31.05.2024**

Monat der Erstellung: **05/2024**

Datum der Veröffentlichung: **27.09.2024**



Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und nukleare Sicherheit

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 und nukleare Sicherheit (BMU) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger für den Waldklimafonds unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

I. Ziele.....	5
1. Aufgabenstellung.....	5
TV4.1.....	6
TV4.2.....	9
TV4.3.....	9
TV4.4.....	9
TV4.5.....	9
TV4.6.....	11
TV4.7.....	13
TV4.8.....	13
TV4.9.....	13
2. Stand der Technik	15
3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	20
II. Ergebnisse	23
1. Erzielte Ergebnisse.....	23
TV4.1.....	23
TV4.2.....	40
TV4.3.....	44
TV4.4.....	48
TV4.5.....	51
TV4.6.....	54
TV4.7.....	56
TV4.8.....	62
TV4.9.....	64
2. Verwertung	82
TV4.1.....	82
TV4.2.....	85
TV4.3.....	85
TV4.4.....	86
TV4.5.....	86
TV4.6.....	87
TV4.7.....	87
TV4.8.....	87
TV4.9.....	87
3. Erkenntnisse von Dritten	89
TV4.1.....	89
TV4.2.....	89
TV4.7.....	90

TV4.8.....	90
TV4.9.....	90
4. Veröffentlichungen.....	91
TV4.1.....	91
TV4.2.....	93
TV4.3.....	94
TV4.4.....	94
TV4.5.....	95
TV4.6.....	95
TV4.7.....	95
TV4.8.....	96
TV4.9.....	96
Zitierte Literatur	97
ANHANG	107
Teilvorhaben 4.1.....	107
Teilvorhaben 4.2.....	111
Teilvorhaben 4.3.....	112
Teilvorhaben 4.4.....	114
Teilvorhaben 4.5.....	115
Teilvorhaben 4.6.....	117
Teilvorhaben 4.7.....	118
Teilvorhaben 4.8.....	121
Teilvorhaben 4.9.....	122

I. Ziele

1. Aufgabenstellung

Der ursprüngliche Planzeitraum des Verbundprojekterstantrags FraxPath (01.04.2020 bis 31.03.2023) im Rahmen des Demonstrationsprojekts FraxForFuture hatte sich aufgrund des späteren Bewilligungszeitpunktes verschoben. Die neue Gesamtlauzeit für die neun verschiedenen Teilvorhaben von FraxPath startete ab dem 01.07.2020 und verzögerte sich bedingt durch die COVID-19-Pandemie (erschwerte Bedingungen bei den Einstellungsverfahren, spätere Startzeiten der Teilvorhaben, durch die Verschiebung des Projektstarts ungünstige Witterungsbedingungen außerhalb der Vegetationsperiode, verspätete Festlegung der Intensivbeobachtungsflächen, teilweise Betretungsverbote in den Laboren, keine Erlaubnis für Dienststreifen, Liefer-schwierigkeiten bei Verbrauchsmaterial und Geräten etc.). Hinzu kamen Schwierigkeiten bei der Isolation des Schaderregers *Hymenoscyphus fraxineus* aufgrund der für den Pilz nicht optimalen Witterungsbedingungen in den Jahren 2018 bis 2022. Eine Laufzeitverlängerung bis teilweise zum 31.05.2024 erfolgte sachkostenneutral, überwiegend jedoch nicht personalkostenneutral in den einzelnen Teilvorhaben des Verbundprojekts. Weitere individuelle Abweichungen in den einzelnen Teilvorhaben sind in Kapitel 6 der Erfolgskontrollberichte aufgeführt.

Grundsätzlich war das Verbundvorhaben FraxPath interdisziplinär aufgebaut und verfolgte verschiedene, vernetzte, parallel laufende Forschungsansätze zur Entwicklung potentiellen, nicht chemischen Bekämpfungsmaßnahmen gegen das Eschentriebsterben (Abb. 1). Basierend auf weitestgehend gemeinsamer Probenahme in vom Eschentriebsterben betroffenen Eschenbeständen wurden die Arbeitspakete des Verbundprojekts durchgeführt. Zum Beispiel wurden von TV4.1 gewonnene Proben oder isolierte Pilzstämme an andere Verbundpartner zur weiteren Bearbeitung in den unterschiedlichen Forschungsansätzen weitergeleitet. Insbesondere die Zusammenarbeit von TV4.2 und TV4.5 führte zur Identifikation eines Referenz-Pathogenstamms von *H. fraxineus*.

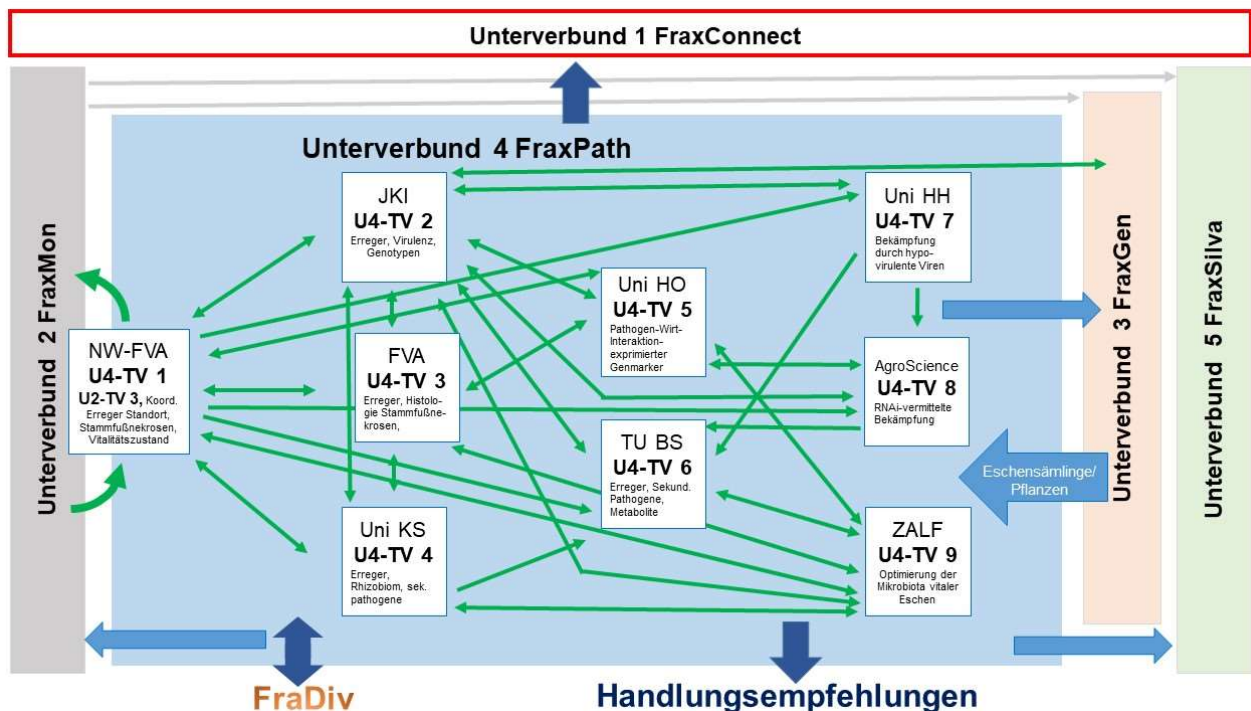


Abbildung 1: Projektstruktur und Vernetzung der Unterverbände (U) und der Teilvorhaben (TV) FraxPath (Unterverband 4) im Demonstrationsprojekt Erhalt der Gemeinen Esche (FraxForFuture); ergänzte Grafik aus dem Projektantrag.

TV4.1*Koordination und Wissenstransfer*

Eine Hauptaufgabe des Teilvorhabens FraxPath 4.1 war die Koordination des Verbundvorhabens FraxPath mit neun verschiedenen Vorhabenspartnern unterschiedlicher institutioneller Zugehörigkeit, wie forstlichen Versuchsanstalten, Universitäten und anderen Forschungseinrichtungen. Koordiniert durch TV4.1 wurden die erforderlichen Zwischenberichte zeitgerecht eingereicht. Trotz teilweise erschwelter Bedingungen während der COVID-19-Pandemie fand durch Präsenz- und Online-Veranstaltungen ein vertrauensvoller, intensiver, zielführender Austausch zwischen den neun Teilvorhaben im Verbundvorhaben FraxPath und innerhalb des Demonstrationsprojekts FraxForFuture mit seinen fünf Verbundvorhaben FraxConnect (1), FraxMon (2), FraxGen (3), FraxPath (4) und FraxSilva (5) statt. TV4.1 stellt ein Schlüsselglied zu FraxMon dar, da ein Projektmitarbeiter nach Arbeitsplan verbundübergreifend in beiden Verbundprojekten tätig war. Dies umfasste die standörtliche Feinkartierung der Intensivbeobachtungsflächen und die Bereitstellung der dabei erhobenen Daten für die FraxForFuture Datenbank. Zudem wurden die Bonitur- und Geodaten zu den Intensivbeobachtungsflächen in Kooperation mit FraxMon zusammengeführt, verfügbar gemacht und ausgewertet (Fuchs et al. 2024).

Zudem hat TV4.1 das Verbundvorhaben FraxPath innerhalb von FraxForFuture, gegenüber der FNR und nach außen, insbesondere gegenüber der forstlichen Praxis vertreten. Dazu wurde zeitnah zum Projektstart eine Projektseite auf der Homepage der NW-FVA erstellt (<https://www.nw-fva.de/forschen/projekte/fraxcollar>) und der Forschungsverbund innerhalb von FraxForFuture bei der Forstpraxis sowie bei forstlichen Mitarbeitenden vorgestellt (Peters et al. 2020). Erste Ergebnisse der eigenen Forschungsarbeiten und Erkenntnisse aus FraxForFuture wurden regelmäßig im Projektzeitraum in Lehrveranstaltungen für Studierende der Forstwissenschaften und Forstwirtschaft vermittelt. Durch Lehrgänge, Schulungen, Exkursionen und Vorträge erfolgte ein Wissenstransfer an die Mitarbeitenden der Forstbetriebe, forstlichen Versuchsanstalten sowie zu Waldbesitzenden und in die Politik, in die Arboristik und an die interessierte Öffentlichkeit (Tab. 3). Der Wissenstransfer in die nationale und internationale wissenschaftliche Gemeinschaft erfolgte durch peer-reviewed Open-Access-Publikationen in einschlägigen Journalen der Pflanzenpathologie, Mykologie und Virologie (siehe Kapitel II.4). Ein erster Meilenstein zum Wissenstransfer innerhalb von FraxForFuture und zur Vorstellung des Demonstrationsvorhabens auf internationaler wissenschaftlicher Ebene war die von TV4.1 koordinierte und verbundübergreifend erstellte sogenannte Basispublikation: „FraxForFuture — research on European ash dieback in Germany“ (Langer et al. 2022). Ein weiterer Meilenstein lag bei der Initiierung eines Special Issues FraxForFuture im Journal of Plant Diseases and Protection, welche vom FraxForFuture Koordinationskreis (Demonstrationsprojektsprecher, FraxConnect und Verbundprojektleiter) beschlossen wurde. Frau Dr. Gitta Langer hat die Gasteditorenrolle in diesem Special Issue, das in 2024 erscheinen soll, übernommen. Hier sollen Hauptergebnisse des Demonstrationsprojekts FraxForFuture und neue Erkenntnisse zum Eschentriebsterben gesammelt veröffentlicht werden.

Boniturschlüssel

Dem vom BMEL-Koordinierungskreis Esche identifizierten Forschungsbedarf zur Erstellung eines bundeseinheitlichen Anspruchsschlüssels zur Ermittlung und zum Monitoring von Schäden, die durch Eschentriebsterben verursacht werden, wurde Rechnung getragen. In Zusammenarbeit mit FraxMon TV2.1 wurde vom TV4.1, basierend auf eigenen Studien und Expertise innerhalb von FraxForFuture, ein einheitlicher Boniturschlüssel hinsichtlich des Schadausmaßes des Eschentriebsterbens an Alteschen (Sommerzustand, Winterzustand) und Jungeschen erstellt. Dieser Boniturschlüssel wurde 2021 in der Allgemeinen Forstzeitschrift für Waldwirtschaft und Umweltvorsorge (AFZ-DerWald) veröffentlicht (Peters et al. 2021b) und als Broschüre und zum Download von der FNR (Peters et al. 2021a) herausgegeben. Der entwickelte, modulare Boniturschlüssel wurde von allen beteiligten Projektpartnern in FraxforFuture verwendet, um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten. Zur Absicherung einer möglichst einheitlichen und objektiven Anwendung des Schlüssels, wurde eine theoretische und praktische Boniturschulung durchgeführt. Alle Mitarbeitenden im Projekt, die Eschen auf den gemeinsamen Intensivbeobachtungsflächen bonitierten (IBF-Verantwortliche) sowie die Plusbaum-Auswählenden (FraxGen), wurden an der NW-FVA durch das TV4.1 geschult.

Mykologie

Im Teilvorhaben 4.1 (FraxCollar) wurden insgesamt 30 Probenahmen an 26 Standorten (in den Bundesländern ST, NI, HE, SN, RP, TH, NW, BW, SH) durchgeführt. Unter den 145 entnommenen Eschenproben (*Fraxinus excelsior*, Gemeine Esche) befanden sich Blätter, Zweige, Fruchtkörper, Blattspindeln, Wasserreißer und Stammfüße, die im Labor des TV4.1 bearbeitet wurden. Zusätzlich wurde Material der beprobten Eschen anderen Teilvorhaben innerhalb von FraxPath und FraxForFuture zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt. In TV4.1 wurden im Labor insgesamt 9740 mit Esche assoziierte Gewebeprobe auf Nährmedium inkubiert und die daraus auswachsenden filamentösen Pilze isoliert. Dabei kam es zu 6233 pilzlichen Auswüchsen, die 268 Morphotypen (Pilzarten) zugeordnet werden konnten. Werden nur die Stammfüße betrachtet, wurden 13 Probenahmen an zwölf Standorten durchgeführt. Von den 104 Eschenstammfußproben wurden 9390 Holzstück-

chen aus überwiegend symptomatischem Holzmaterial abgeimpft, bei denen es zu 5851 pilzlichen Auswüchsen kam. Abgesehen von eindeutigen Kontaminationen oder wenigen nicht isolierbaren bzw. nicht bestimmbar Pilzen wurden insgesamt 261 verschiedene Morphotypen (Pilzarten) ermittelt. Bezogen auf die Frequenz (Anteil der Artisolat von allen Isolaten) wurden am häufigsten die Arten *Diplodia fraxini* (18,8 %), *Hymenoscyphus fraxineus* (15,4 %), *Armillaria* spp. (13,5 %), *Trichoderma* sp. (11,3 %), *Neonectria punicea* (5,5 %), *Diaporthe* cf. *eres* (3,5 %), *Paracucurbitaria* sp. (3,3 %) und *Fusarium* cf. *lateritium* (2,8 %) aus den Eschenstammfüßen isoliert. Bezogen auf den Anteil an allen Stammfußproben mit Stammfußnekrose (95) kam *Diplodia fraxini* am häufigsten, in 79 der 95 beprobten Stammfußnekrosen vor (82 %). Ebenfalls sehr häufig mit den nekrotischen Stammfußbereichen waren *Hymenoscyphus fraxineus* (59 %), *Trichoderma* sp. (58 %), *Armillaria* spp. (58 %), *Paracucurbitaria* sp. (42 %), *Fusarium* cf. *lateritium* (41 %), *Diaporthe* cf. *eres* (40 %) und *Neonectria punicea* (35 %) assoziiert. Über die Hälfte der Morphotypen aller Stammfußproben (56,3 %) machten Einzelisolate aus. An den untersuchten Eschenstandorten war das Artenspektrum der häufig mit Stammfußnekrosen assoziierten Pilze relativ ähnlich (Peters et al. 2023). Diese Untersuchungsergebnisse lieferten einen wichtigen Beitrag zur bisher weitgehend unbekannt pilzlichen Biodiversität in Eschenholzgewebe in Deutschland. Einige Pilzarten wurden erstmals für die Gemeine Esche beschrieben, darunter auch der Erreger der Rußrindenkrankheit des Ahorns *Cryptostroma corticale* oder *Diplodia sapinea* (Erreger des Kiefern- oder Diplodia-Triebsterbens von Koniferen). Erste Pathogenitätstests mit *C. corticale* an *F. excelsior* ergaben, dass der Erreger der Rußrindenkrankheit keine Schäden an jungen, gesunden Eschen hervorruft und in den Stammfußnekrosen der an Eschentriebsterben erkrankten Eschen wahrscheinlich nur opportunistisch vorkommt (Langer et al. 2023). Zudem wurde eine neue Schlauchpilzart erstmals gefunden und für die Wissenschaft beschrieben: *Vexillomyces fraxinicola* PETERS LANGER BIEN 2022 (Tan et al. 2022).

Am Beispiel eines Eschenmischbestandes am Standort Holzminden wurden in Zusammenarbeit mit FraxGen TV3.1 die dort isolierten *H. fraxineus* Stämme aus zehn Eschen mittels Mikrosatellitenanalyse genotypisiert (Peters et al. 2024). Es wurde festgestellt, dass in fortgeschrittenen Stammfußnekrosen in der Regel mehrere Genotypen des Schaderregers beteiligt sind. Waren mehrere Multilokus-Genotypen in einer Stammfußnekrose vorhanden, so überwog in der Regel einer der Genotypen die anderen. Dies unterstützt die Annahme, dass die Primärinfektion des Stammfußes meist durch *H. fraxineus* geschieht. Eine Abhängigkeit der Genotypenzahl von dem Ausmaß der Stammfußnekrose bzw. dem Schädigungsgrad wurde allerdings nicht nachgewiesen.

Die Zusammenarbeit von TV4.1 und TV4.7 war sehr erfolgreich, da in den eschenassoziierten Pilzen, die von der NW-FVA isoliert wurden, zahlreiche, bisher unbekannte Viren entdeckt wurden (Lutz et al. 2022a; Lutz et al. 2022b; Lutz et al. 2023b; Lutz et al. 2023c). Letztere könnten potentiell auf *H. fraxineus* übertragen werden, um eine Hypovirulenz zu erreichen. Als Nebenergebnis dieser Kooperation kann auch das Resultat der Zusammenarbeit von TV4.5 und TV4.7 gewertet werden, die den *H. fraxineus*-Stamm NW-FVA 1856 stabil überexprimieren konnten und bei ihm eine gezielte Gendeletion durchführten (Lutz et al. 2023a).

Standortsfaktoren und Eschentriebsterben

Die Abhängigkeit des Eschentriebsterbens von Standortsfaktoren wurde anhand verschiedener Flächen- und Datenkollektive untersucht, um sowohl großräumige als auch kleinräumige Zusammenhänge zwischen und innerhalb von Beständen zu berücksichtigen. Dabei wurde grundsätzlich zwischen Symptomen der Krone (Kronenverlichtung, Kronenschadstufen) und Stammfußnekrosen unterschieden.

Auf den 14 Intensivbeobachtungsflächen des Gesamtverbundes wurde eine Boden-Feinkartierung inklusive Bodenanalytik durchgeführt und die Zusammenführung und Auswertung der Eschenbonituren übernommen. Auf Basis dieser erhobenen Daten entstand eine Publikation des Gesamtverbundes (Fuchs et al. 2024). Es zeigte sich, dass Eschen im Sommerzustand durchweg vitaler beurteilt werden und dass feine Unterschiede bei der strukturellen Schädigung von Eschenkronen im Winterzustand besser beurteilbar sind. Stammfußnekrosen der Stufe 2 (starke Stammfußnekrose) erwiesen sich als sehr guter Indikator für unzureichende Standortsicherheit: Das Risiko, innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2,5 Jahren umzufallen, war für eine Esche mit Stammfußnekrosenstufe 2 etwa fünfmal höher als für eine Esche ohne oder mit schwachen Stammfußnekrosen der Stufe 1. Generell waren Kronenzustand und Stammfußnekrosen hochgradig korreliert. Über den Beobachtungszeitraum verschlechterte sich der Kronenzustand der Eschen im Allgemeinen, was allerdings hauptsächlich von Mortalitätsereignissen (Kronenstufe 5) getrieben war. Der Zustand der überlebenden Eschenpopulation verbesserte sich sogar auf sechs von elf Flächen signifikant. Allgemein waren Eschen mit niedrigem Brusthöhendurchmesser (BHD) stärker betroffen als Eschen mit hohem BHD. Räumlich betrachtet war der Eschenzustand innerhalb von Beständen (sowohl Krone als auch Stammfußnekrosen) meist dort schlechter, wo die Böden hydromorphe Merkmale aufwiesen (also stau- oder grundwasserbeeinflusst waren) oder wo die Eschengrundflächendichte lokal höher war. Daraus lässt sich ableiten, dass insbesondere bei flächenhaften, kostenintensiven Wiederanbauversuchen von Eschen, die entweder durch Auslese oder Bekämpfungsverfahren toleranter gegenüber dem Erreger sind, in Zukunft Reinbestände und hydromorphe Bodenverhältnisse vermieden werden sollten. Insgesamt erklärten Standorts- und Bestandesparameter nur einen kleinen Teil der Gesamtvarianz, der weitaus größere Teil ließ sich individuellen Unterschieden zuordnen (maßstäblich Unterschiede im Geno- und Phänotyp).

Alle Daten der Waldzustandserhebung (WZE) zur Esche seit 1983 wurden aus allen Bundesländern akquiriert und gemeinsam mit Bodendaten aus der Bodenzustandserhebung im Wald (BZE) hinsichtlich des Eschentriebsterbens und Standortfaktoren ausgewertet. Auf dem Raster der Waldzustandserhebung kommt die Esche bundesweit seit 2002 auf insgesamt 243 Plots vor (209 davon mit BZE-Erhebung) und ist in Norddeutschland viel seltener als in Süddeutschland. Mortalitätsereignisse sind bei dieser dünnen Datenlage zu selten, um statistisch ausgewertet werden zu können. Deshalb wurde die Kronenverlichtung (Blattverlust in % des Kronenvolumens), der einzige in Raum und Zeit vergleichbar und regelmäßig aufgenommene Parameter, als Proxy für das Eschentriebsterben genutzt. Der Zusammenhang zwischen Kronenschadstufen nach dem Boniturschlüssel und Kronenverlichtung ist allerdings mit einem R^2 von 0.8 sehr hoch (Fuchs et al. 2024). Seit etwa 2010 stieg die Kronenverlichtung in weiten Teilen Deutschlands an, besonders früh und stark zeigten sich Schäden in Mecklenburg Vorpommern und Baden-Württemberg. Besonders erhöhte Kronenverlichtungswerte zeigten sich immer in Jahren, deren Vorjahr von hohen Niederschlagssummen im Hochsommer geprägt war. Außerdem begünstigten stau- und grundwasserbeeinflusste Böden sowie ein hoher Eschenanteil im Bestand die Kronenverlichtung. Junge Eschen waren vor Beginn des Eschentriebsterbens weniger stark verlichtet als Alteschen, zeigten aber im zeitlichen Verlauf der Krankheit eine viel schnellere Zunahme der Kronenverlichtung.

Da die Methodik der Waldzustandserhebung nicht speziell auf die Esche zugeschnitten ist, fehlen dort Daten zu Stammfußnekrosen und zu Strukturschäden in Eschenkronen. Deshalb wurde eine zusätzliche bundesweite Erhebung auf 109 WZE-/BZE-Plots mit ausreichendem Eschenvorkommen unter Anwendung des Boniturschlüssels (Peters et al. 2021a) durchgeführt. Dabei wurden pro Plot die 20 räumlich nächsten Eschen um das BZE-Bodenprofil bonitiert. Die Datengrundlage wurde durch die Einbeziehung von Inventurdaten der FraxForFuture Intensivbeobachtungsflächen des Gesamtverbundes erweitert, was in einem Gesamtdatensatz von 2440 Eschen auf 122 Flächen mündete. Zusätzlich standen für alle Flächen standortkundliche Daten aus der Bodenzustandserhebung im Wald sowie aus der Bodenbeprobung der Intensivbeobachtungsflächen zur Verfügung, um deren Einfluss auf das Eschentriebsterben und die Ausprägung von Stammfußnekrosen zu untersuchen. Insgesamt wiesen 63 % der Eschen Stammfußnekrosen auf, wobei 38 % in die Kategorie „starke Stammfußnekrosen“ fielen. Ziemlich eindeutig konnte dargestellt werden, dass Eschen, die auf hydromorphen Standorten mit Stau- oder Grundwassereinfluss, sowohl in der Krone als auch im Stammfußbereich größere Schäden aufweisen. Zusätzlich zum Einfluss des Wasserhaushalts wurde ein Einfluss des $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ -Werts im Oberboden auf den Eschenzustand festgestellt - analog zu den Ergebnissen von Turczański et al. (2019, 2021). Darüber hinaus wurde ein noch stärkerer Effekt des $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ -Werts der Humusaufgabe gefunden. In allen Fällen stand ein alkalischer pH -Wert mit stärkeren Symptomen des Eschentriebsterbens in Verbindung. Weitere Parameter wie Trophie, nutzbare Feldkapazität und klimatische Feuchte in verschiedenen zeitlichen Aggregationen wurden ebenfalls in die Auswertung einbezogen, zeigten aber allesamt nur marginalen bis keinen Einfluss auf den Gesundheitszustand der Eschen.

Bei allen Untersuchungen auf dem WZE-Raster ist der Eschenzustand stark von Bestandesunterschieden (Struktur, Alter, Genetik) und von der räumlichen Ausbreitung des Eschentriebsterbens (Epidemiologie) beeinflusst. Um den Eschenzustand innerhalb von homogenen Beständen in Abhängigkeit von kleinräumiger Variabilität des Bodens zu untersuchen, wurden fünf FraxCollar-Intensivflächen eingerichtet. Diese Flächen wurden basierend auf Forsteinrichtungsdaten lokalisiert. Dabei war entscheidend, dass der Grundflächenanteil von Eschen mit einem Brusthöhendurchmesser (BHD) zwischen sieben und 20 cm mindestens 20 % betrug und die Bestände zudem vorwiegend jünger als 60 Jahre waren. Zudem sollten die Flächen mehrere geologische Substratgruppen abdecken, die für Eschenvorkommen typisch sind (zum Beispiel Basalt, Kalkstein und Lösslehm). Klimatisch und höhenzonal sollten sich die Flächen nicht in den Extremen befinden, damit die Bodenbedingungen eine ausschlaggebende Einflussgröße darstellen. Die FraxCollar-Intensivflächen wurden insgesamt in 14 Teilflächen unterteilt, die jeweils bezüglich Bestandessituation, Ausgangssubstrat und der Lage im Relief möglichst homogen waren. Innerhalb jeder Teilflächen wurden mehrere Probekreise (10 m Radius) ausgewiesen, die jeweils entweder nur Eschen mit möglichst stark ausgeprägten Stammfußnekrosen oder mit möglichst gesunden Eschenstammfüßen enthielten. Anschließend wurde untersucht, ob sich physikalische und chemische Bodenkennwerte systematisch zwischen "besseren" und "schlechteren" Probekreisen innerhalb der Teilflächen unterscheiden. Dazu wurde im Zentrum jedes Probekreises ein Bodenprofil bis 60 cm Tiefe angelegt, morphologisch beschrieben und in jeweils vier Tiefenstufen (0-5, 5-10, 10-30 und 30-60 cm) nach der Arbeitsanleitung zur zweiten Bodenzustandserhebung im Wald (Wellbrock et al. 2006) beprobt und analysiert. Die Auswertung anhand von linearen, gemischten Modelle legte nahe, dass fast alle bodenchemischen oder bodenphysikalischen Kenngrößen sich nicht systematisch zwischen "besseren" und "schlechteren" Probekreisen unterschieden. Einzig der pH -Wert in den oberen 30 cm des Mineralbodens war signifikant niedriger in den „besseren“ Probekreisen. Dass Eschen auf weniger alkalischen Standorten vitaler sind, ist bereits in der Literatur bekannt (Turczański et al. 2019). Unsere Ergebnisse bestätigen dies nun auch für Stammfußnekrosen und kleinräumige Standortunterschiede innerhalb von Beständen.

TV4.2

Bei bisherigen Infektionsversuchen wurde festgestellt, dass sich verschiedene Isolate des Eschentriebsterben-Erregers deutlich in ihrer Virulenz unterscheiden. Im hier beschriebenen Teilprojekt wurde die Hypothese untersucht, ob diese Virulenzunterschiede im Zusammenhang mit dem Ausgangssubstrat der Isolate (Blätter, Triebe oder Xylem im Stammfußbereich), mit ihrer geographischen Herkunft oder ihrer genetischen Struktur stehen. Ziel war es auch, Einblicke in die Populationsstruktur des Krankheitserregers in Deutschland zu erlangen. Außerdem war geplant, zur Klärung der Ätiologie von Stammfußnekrosen beizutragen, deren genaue Entstehungsweise nach wie vor unbekannt ist. Zur Erreichung dieser Ziele wurden umfangreiche Infektionsversuche an Eschenklonen und Sämlingen durchgeführt. Anschließend an Versuchspflanzen entstehende Symptome wurden akribisch dokumentiert. Außerdem wurde eine Mikrosatellitenanalyse mit den gewonnenen Isolaten durchgeführt.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung potentieller biologischer Bekämpfungsoptionen durch Infektionsversuche im Gewächshaus. Diese Arbeiten fanden in enger Zusammenarbeit mit Projektpartnern statt.

Unsere Ergebnisse bestätigen die großen Unterschiede in der Virulenz von einzelnen *Hymenoscyphus fraxineus*-Stämmen und zeigen dies auch für die deutsche Population. Noch vorläufige Ergebnisse der Populationsstrukturanalyse von *H. fraxineus* für Deutschland deuten eine allmähliche Diversifizierung der Population an. Drei Möglichkeiten zur biologischen Kontrolle des Eschentriebsterbens wurden zusammen mit Projektpartnern untersucht: Prägung (priming) mit einem schwachvirulenten *H. fraxineus*-Stamm führte zu einer deutlichen Reduzierung der Nekrosenentwicklung, aber auch mit antagonistischen Endophyten ließ sich ein Effekt erzielen, während die Nutzung einer Hypovirulenz mit dem Mykovirus HfMV1 nicht aussichtsreich erscheint (Lutz et al. 2023)

TV4.3

Auf bestehenden Untersuchungsflächen der FVA und in Anbindung an Probematerial der Intensivbeobachtungsflächen haben Datierungen vorhandener Stammfußnekrosen Aufschlüsse über eine zeitliche Einordnung, auch für die Pathogenese, geliefert. Mithilfe histologischer Präparate haben mikroskopische Analysen Einblicke in die Infektionsmechanismen und den Schadensverlauf geliefert. Gewebebereiche aus Teilen der Proben der dendrochronologischen Untersuchungen und aus Infektionsversuchen haben mithilfe pathohistologischer Untersuchungen Einblicke in die Infektionsverläufe ermöglicht.

TV4.4

Es sollte das Mykobiom der Feinwurzeln sowie des Bodens von *Fraxinus excelsior* kulturbasiert und mit dem Gerät MinION von Oxford Nanopore Technologies (ONT) untersucht werden. Hierbei sollte auch geklärt werden, ob sich *Hymenoscyphus fraxineus* in Feinwurzeln oder dem Boden nachweisen lässt und somit ein weiterer Infektionsweg in Frage käme. Zusätzlich sollten potenzielle Antagonisten *in vitro* detektiert werden.

Der Arbeitsplan (AP8) gliedert sich in logisch aufeinander folgende Schritte: Isolation von Reinkulturen und DNA, Analyse der Reinkulturen und DNA, Kulturversuche, Verschneidung der Ergebnisse und Interpretation.

TV4.5

Das Teilvorhaben fokussierte sich auf die Aufklärung der Abhängigkeiten und Interaktionsprozesse von *Hymenoscyphus fraxineus* bei der Infektion unterschiedlicher Eschenarten, die auf eine Infektion entweder sensibel (*Fraxinus excelsior*) oder tolerant (*Fraxinus mandshurica*) reagieren. Ziel war es, erstmalig Einblicke in die Pathogen-Wirtinteraktion in Hinblick auf die exprimierten Virulenzfaktoren und die funktionalen Gencluster zur Verwertung der jeweilig in den Geweben bereitgestellten pflanzlichen Metabolite mit Hilfe von Transkriptionsstudien zu erlangen. Diese Erkenntnisse aus der differentiellen Genexpression sollten in der Folge grundlegende Einblicke in die beobachteten unterschiedlichen Infektionsverläufe mit lokal begrenztem Auftreten des Pathogens oder einem invasiven Verlauf ermöglichen. Die Transkriptomanalysen sollten Schlüsselgene bei der Verwertung der art- und gewebeabhängigen Metabolitkompositionen von Eschenblatt und -holz identifizieren. Die Erkenntnisse zu den Faktoren, die eine endophytische oder nekrophytische Kolonisation erst ermöglichen, werden dringend benötigt, um den Krankheitsverlauf im Detail zu erschließen.

Um diese Zielstellung zu erfüllen, sollten differentiell exprimierte Genmarker von *H. fraxineus in vitro* und *in planta* bestimmt werden, um Genmarker zu erhalten, die eine Einschätzung der Widerstandsfähigkeit von selektiertem Vermehrungsgut im Bereich der Blatt- und Stammfußnekrosen ermöglichen, aber auch um den Einfluss von Applikationen von mikrobiellen Antagonisten zur Kontrolle des Pathogens zu erfassen. Die Umsetzung gliederte sich in drei Themenbereiche. Sie umfassen die Grundlagen der wirtsabhängigen, differentiellen Genexpression, den Transfer der Genmarker in der quantitativen PCR mit reverser Transkription (RT-

qPCR) und die Anwendung der Ergebnisse auf weitere Fragestellungen in geplanter Zusammenarbeit mit anderen Teilvorhaben. Nach dem Projektstart im Juli 2020 konnte im November die Projektstelle besetzt werden und es wurde mit den grundlegenden Arbeiten zur Identifizierung von differentiell, exprimierten Genmarkern von *H. fraxineus in vitro* begonnen. Isolate wurden von den Verbundpartnern bezogen und in unterschiedlichen Nährmedien vermehrt. Zudem wurde Blattmaterial zu unterschiedlichen Eschenarten in den Hohenheimer Gärten gesammelt. Die Anzucht der *H. fraxineus* Kulturen *in vitro* gelang wie geplant mit und ohne Supplementierung durch pflanzliches Material, während sich die Synchronisierung der Anzucht in Flüssigmedien (biologische Replikate) als schwierig und langwierig erwies (Abb. 2).

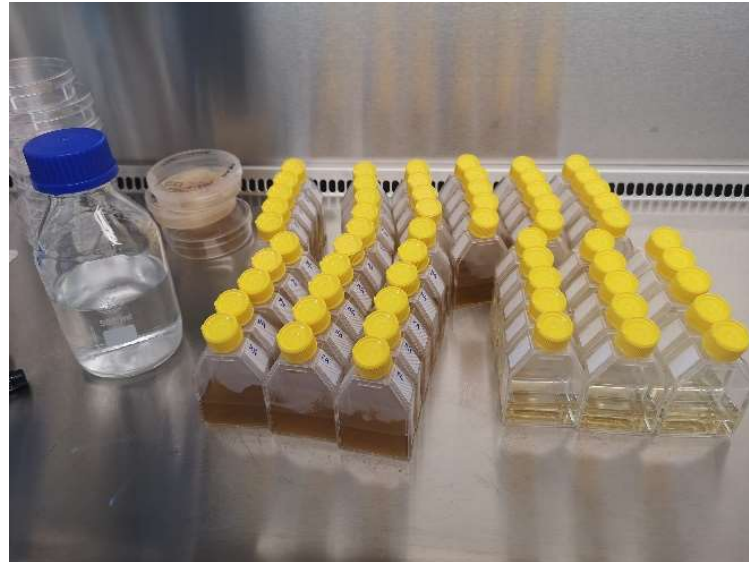


Abbildung 2: *Hymenoscyphus fraxineus*-Kulturen in Flüssigmedium mit Blattsupplement (*Fraxinus excelsior* und *F. mandshurica*) und der Kulturansatz im Malz-Hefe-Pepton Medium.

Insgesamt wurden acht Isolate kultiviert und auf ihre Verwendung evaluiert. Quantifizierungen in der qPCR durchgeführt (Chandelier et al. 2010, 2011; loos et al. 2009). Unerwartet schwierig war das Gewinnen der RNA-Template in ausreichender Quantität und Qualität. Hier wurde neben dem mechanischen Mazerieren in der Kugelmühle erst durch ein unterstützendes Durchfrieren des Mycels eine ausreichende Quantität gewonnen. Die RNA-Extraktion erfolgte im Festphasenverfahren und die Quantifizierung mit Hilfe des Fluorometers. In 2021 lagen dann die RNA-Template in ausreichender Menge vor, so dass im Anschluss die Bestimmung der Genexpression von *H. fraxineus* aus den *In-vitro*-Kulturen via RNA-Seq erfolgen konnte (Novogene, UK). Rückblickend ist anzumerken, dass die Projektarbeiten im Jahr 2020 und 2021 unter den umfangreichen und vielfältigen Auswirkungen der SARS-CoV-2 Pandemie litten. Insbesondere die Einschränkungen im Personaleinsatz und den folgenden Lieferengpässen bei den Verbrauchsmaterialien führten zu erheblichen Verzögerungen. Hinzu kamen Probleme bei der Synchronisation im Wachstum der Pilzkulturen und unerwartet langwierige notwendige Anpassungen der Protokolle zur Gewinnung hochqualitativer RNA in ausreichender Menge aus *H. fraxineus*.

Das Jahr 2022 wurde durch die umfangreichen differentiellen Transkriptomanalysen und deren Interpretation dominiert. Die bioinformatischen Analysen waren herausfordernd und die erste Veröffentlichung der ersten Studie zum Referenzgenom von *H. fraxineus* nf4 stellte ebenfalls nur bedingt Informationen zur Interpretation bereit (GenBank acc. No. GCA_911649665.1; Elfstrand et al. 2021), wodurch eigene Analysen unter Verwendung von UniProt (The Uniprot Consortium 2023) insbesondere Analysen zu den Proteinfamilien und -domänen (Mistry et al. 2021) durchgeführt wurden. Die Analysen ermöglichten die grundlegenden Einblicke in die art- und substratspezifisch regulierten Gene und deren Bedeutung für den wirtsabhängigen Metabolismus, aber auch in die Virulenzfaktoren. An diese Arbeiten knüpften die ersten Analysen zur Identifizierung von differentiell exprimierter Genmarkern von *H. fraxineus in planta* an. Hierzu wurde Pflanzgut erworben, aber auch vom Thünen-Institut für Forstgenetik in Waldsiedersdorf bereitgestellt und am JKI Braunschweig umfangreiche Infektionsexperimente an *F. excelsior* und *F. mandshurica* in 2022 begonnen. Leider waren die experimentellen Pfropfexperimente im Sommer 2022 erfolglos, weshalb im Winter des Jahres die Experimente wiederholt werden mussten. Die experimentelle Infektion der Blattspindel wurde aufgrund der geringen Erfolgsquote und zugunsten der Sprossachse aufgegeben. Parallel zu den Experimenten in 2022 wurden die bioinformatischen Analysen zur differentiellen Genexpression abgeschlossen und erste Assays zum Nachweis und Analyse der Genexpression von Genmarkern zur Untersuchung der metabolischen Aktivität und der Produktion von potentiellen Toxinen entwickelt. Deren Evaluierung wurde in 2023 fortgeführt und ein Manuskript zu

den Ergebnissen der Transkriptomstudie erstellt und zur Veröffentlichung eingereicht (Zübert et al. in der Begutachtung).

Im Juli 2023 musste die Position der wissenschaftlichen Mitarbeiterin im Projekt zur Fortführung der anspruchsvollen Arbeiten neu besetzt werden. Die Nachbesetzung gelang nur bei verringerter Wochenstundenzahl aufgrund der eingeschränkten Bewerberlage. Es gelang jedoch die entwickelten RT-qPCR Assays weiterzuentwickeln und mit den Analysen zur differentiellen Genexpression zu beginnen, die weiter fortgeführt werden.

Die Projektumsetzung profitierte von den Vorarbeiten im durch die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe geförderten Projekt Verbundvorhaben „Entwicklung eines biologischen Kontrollsystems zur Regulierung des Erregers des Eschentriebsterbens *Hymenoscyphus fraxineus*“ (FKZ: 22006116, 2: 22028616) sowie die verfügbare Genomsequenz von *H. fraxineus* nf4 (GenBank assembly accession no. GCA_911649665.1). Zahlreiche Grundlagen für die Arbeiten wurden hier bereits gelegt, die von der Kultivierung des Pathogens (Ulrich et al. 2020), dessen Nachweis in der qPCR bis zu den Infektionsexperimenten reichen (Becker et al. 2020). Von der Methodenentwicklung in diesem Projekt profitieren auch andere Teilvorhaben zum Eschentriebsterben, wie z.B. im Verbundvorhaben: Detektion, Charakterisierung und Analysen zum Auftreten von Virose und dem Eschentriebsterben in Sonderbeständen von *Fraxinus excelsior*–Ergänzungsstudie zu FraxForFuture; Teilvorhaben 3: Molekulares Monitoring von *H. fraxineus* - Akronym: FraxVir (FKZ: 2220WK40C4), in dem das Monitoring des Pathogens via qPCR aus den anspruchsvollen Boden- und Streuproben ein zentraler Bestandteil der Aufgaben ist.

TV4.6

Das Langzeitziel des Projektes ist die Entwicklung eines biologischen Bekämpfungsmittels mit endophytischen Pilzen, deren Sekundärmetaboliten in *planta Hymenoscyphus fraxineus* hemmen und somit das Eschentriebsterben verhindern. Hierzu sollten Endophyten isoliert, in Dualkultur auf antagonistischen Metaboliten geprüft, die Strukturen der Metaboliten aufgeklärt und in einem Testsystem mit Eschensämlingen auf ihre Fähigkeit Krankheitssymptome des Eschentriebsterbens zu unterbinden überprüft werden. In Kooperationen mit weiteren Verbundpartnern sollte eine Auswahl vielversprechender Endophyten in Gewächshaus- und in Freilandversuchen auf Hemmung des Eschentriebsterbens getestet werden. Darüber hinaus sollte auch der Einsatz von Hypoviren von *H. fraxineus* als biologisches Bekämpfungsmittel erforscht werden.

Biotests der Isolate, Kulturextrakte und Reinsubstanzen

Insgesamt wurden Dualkulturen mit fast 300 Endophyten durchgeführt, um die Hemmung von *Hymenoscyphus fraxineus* zu testen. Die Hälfte der Isolate schieden Metabolite aus, die das Wachstum vom *H. fraxineus* sehr gut hemmten und somit für weitere Versuche in Frage kamen. Zwölf Isolate (u.a. *Pezicula livida* P437 und *P. livida* 2483, *Pezicula* sp., *Pezicula cinnamomea*, *Diaporthe oncostoma*, *Nemania diffusa*, *Hypoxyton petriniae*, *Hypoxyton perforatum* und *Hypoxyton rubiginosum*) wurden zunächst für Strukturaufklärungen und Infektionsversuche mit den Projektpartnern (PP4.2 und PP4.9) ausgewählt.

Metabolite von *Pezicula* sp. 8999 (Demir et al. 2023) und sechs Substanzen von *Penicillium manginii* 10400 (Demir et al., eingereicht), wurden hinsichtlich ihrer antibakteriellen, antifungischen und cytotoxischen Aktivitäten untersucht. PF1140 und Vancouverone B und C von *P. manginii*, sowie CJ-17,572 und Mycorrhizin A von *Pezicula* sp. waren antibakteriell aktiv. Antifungisch waren PF1140, CJ-17,572, Cryptosporioptide C und Mycorrhizin A, wobei PF1140 und CJ-17,572 besonders aktiv waren. In einem Plattendiffusionsassay hemmten PF 1140 und CJ-17,572 *H. fraxineus* (PF1140 mehr als die Kontrolle Nystatin. In einem Phytotoxizitätstest mit Eschenblättern, verursachten Kulturextrakte von *P. manginii*, *Pezicula* sp., *H. fraxineus* RH03-T2-B1-1 (Stamm 7) und *H. fraxineus* RH03-T7-B5-2 (Stamm 13) sowie die Reinsubstanzen Citreoviridine, Penidiamide, PF1140, Vancouverone A, B, and C Nekrosen. Auffallend war, dass das virulentere Isolat *H. fraxineus* 7 deutlich ausgeprägtere Nekrosen auf den Blättern verursachte als der weniger virulente Stamm. Das unterschiedliche Sekundärmetabolitenprofil der beiden Stämme könnte dafür verantwortlich sein. Beide Stämme produzierten unter unseren Kulturbedingungen das antifungische Metabolit Viridin als auch die phytotoxische Metaboliten Viridiol und Hyfraxinsäure. Jedoch war die Konzentration von Hyfraxinsäure in den Kulturextrakten von *H. fraxineus* 7 deutlich höher als in denen von *H. fraxineus* 13, was der Unterschied in Virulenz erklären könnte (Ridley et al., in Vorbereitung).

Strukturen von acht Metaboliten aus *Pezicula* sp.8999 wurden aufgeklärt, nämlich Cryptosporioptides A, B und C, Mycorrhizin A und CJ-17,572 und ein bisher unbekanntes PKS-NRPS-Hybrid. Diese Ergebnisse wurden inzwischen veröffentlicht (Demir et al. 2023). Aus *Pezicula livida* P437 wurde auch das Metabolit Mycorrhizin A isoliert. Aus *H. rubiginosum* 9969 war bereits als das aktive Prinzip Phomopsidin aufgeklärt wurden (Halecker et al. 2020). Aus *H. fraxineus* wurden die Strukturen von Viridin, Viridiol und Hyfraxinsäure aufgeklärt. Weitere Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um zu klären, ob der Unterschied in der Konzentration der Hyfraxinsäure für die unterschiedliche Virulenz verantwortlich ist.

Der Metabolit CJ-17,572 wurde im Biotest als das gegen *H. fraxineus* wirksame Prinzip des Stammes 8999

identifiziert. Weiterhin wurde die bislang unbekannte Stereokonfiguration der Verbindung CJ-17,572 über eine Reihe von Experimenten bestimmt. Nach Derivatisierung mittels Diazomethan konnte die Auswertung des ROESY-NMR-Spektrums die relative Stereochemie des Decalinsystems zugeordnet werden. Durch Tautomerie verursachte Signalverbreiterungen hatten dies zuvor verhindert. Anschließend lieferte die Messung des CD-Spektrums der Verbindung die absolute Stereokonfiguration von CJ-17,572. Dieser Metabolit sowie Mycorrhizin A werden auch von *P. cinnamomea* P434 produziert. Leider müssen *Pezizula* sp. 8999, *P. cinnamomea* P434 und *P. livida* P437 aufgrund der Produktion von Mykotoxinen, sowie dem ebenfalls isolierten Mycorrhizin A, von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Ausgewählte endophytischen Isolate wurden taxonomisch anhand der Morphologie sowie molekularbiologisch klassifiziert, z.T. in Kooperation mit dem Projektpartner PP4.1 und der DSMZ. Alle Pilze mit denen wir eingehend arbeiteten wurden in Kultursammlungen hinterlegt.

Infektionsversuche, um geeignete Kandidaten für die biologische Bekämpfung des Eschentriebsterbens zu finden

Um Endophyten zu finden, die aufgrund ihrer antagonistischen Metaboliten das Eschentriebsterbens verhindern, müssen die ausgewählten Kandidaten in Infektionsversuchen überprüft werden. Die ausgewählten Endophyten wurden in axenischen Eschensämlingen und in jungen Pflanzen alleine und zusammen mit *H. fraxineus* inokuliert.

Inokulation von axenischen Sämlingen. Zunächst wurden 63 Endophyten einzeln in axenische Sämlinge inokuliert, um auszuschließen, dass sie latent pathogen sind. Da die Virulenz stark zwischen den einzelnen Isolaten von *H. fraxineus* variiert, wurden auch sie in axenisch kultivierten Eschensämlinge inokuliert, um den Grad ihrer Virulenz festzustellen. Damit erkannt werden konnte, ob die Endophyten einen Schutz vor Symptomen des Eschentriebsterbens bieten, wurden 28 Dualinokulationen mit den vielversprechendsten Endophyten und *H. fraxineus* durchgeführt. Hierzu wurden die *H. fraxineus* Stämme HF-RID-OCT20-2, *H. fraxineus* 7 und *H. fraxineus* 13 verwendet. Besonders vielversprechende Endophyten waren *Pezizula livida* P437, *Pezizula livida* 2483, *Pezizula cinnamomea* P434, *Pezizula* sp. 8999, *Penicillium manginii* 10400, *Diaporthe oncostoma* 10605, *Nemania diffusa* 10622, *Hypoxylon petrinae*, *Hypoxylon perforatum* STMA und *Hypoxylon rubiginosum* 9969. Weiterhin von Interesse sind die noch nicht klassifizierten Endophyten 10641, 10649c, 10722 und 9227.

Axenische Eschensämlinge wurden auch in Seramis kultiviert, da dieses Blähtonmedium der Erde ähnlicher ist als das sonst verwendete Agarmedium. Da die Gefäße größer sind, können die Pflänzchen länger nach der Inokulation bis zur Bonitur wachsen.

Sechs Endophyten (*Pezizula livida* P437, *Pezizula* sp. 8999, *Diaporthe oncostoma* 10605, *Nemania diffusa* 10622, *Hypoxylon perforatum* STMA 11042 und *Hypoxylon rubiginosum* 9969) wurden zusammen mit *H. fraxineus* in einem Gewächshausversuch in Zusammenarbeit mit PP4.2 JKI inokuliert. Alle diese Endophyten haben die Entwicklung der Symptomatik des Eschentriebsterbens verzögert und lieferten somit vielversprechende Ergebnisse, die unbedingt wiederholt werden müssten.

In einem Freilandversuch in Zusammenarbeit mit PP4.9 ZALF wurden junge Eschenpflanzen mit den Endophyten *H. rubiginosum* 9969 und *P. livida* P437 zusammen mit *H. fraxineus*, sowie mit dem bakteriellen Endophyt *Luteimonas fraxinea* inokuliert, um zu erkennen, ob Infektion mit dem bakteriellen und dem pilzlichen Endophyten zusammen eine synergistische Hemmung des Pathogens bewirken. Durch ungünstige klimatische Bedingungen, entstanden leider auch in den Kontrollpflanzen keine Krankheitssymptomen, sodass dieser Versuch auch unbedingt wiederholt werden müsste.

Bekämpfung des Eschentriebsterbens mit Hilfe von hypovirulenten Viren

Hypoviren, d.h. Viren, die der Virulenz des pilzlichen Wirtes herabsetzen, könnten eine Methode der biologischen Bekämpfung des Eschentriebsterbens werden. Diese Methode wird bereits beim „Chestnut Blight“ eingesetzt. In einer Zusammenarbeit mit PP4.7 UHH wurde *H. fraxineus* 1856 (dessen Virulenz vorab von uns bestätigt wurde), mit unterschiedlichen Viren, die dem Pathogen Hypovirulenz verleihen sollten, transfiziert und anschließend in axenischen Eschensämlinge inokuliert. Einige der mit Viren transfizierten *H. fraxineus* Isolate haben die Symptomatik des Eschentriebsterbens in den inokulierten Pflänzchen reduziert bzw. eliminiert und somit deutet sich eine Hypovirulenz des transfizierten *H. fraxineus* Isolate an. Einer der Viren entstammte *Hymenoscyphus albidus*, eine avirulente Schwester-Art von *H. fraxineus*, die wir dem Kooperationspartner zur Verfügung gestellt hatten. Dieser Versuch in Kooperation mit dem Partner an der UHH müsste dringend wiederholt werden, woraus sich höchstwahrscheinlich weitere Versuche anschließen würden.

Planung und Ablauf des Vorhabens

Aufgrund der Corona-Pandemie und hierdurch bedingte Betretungsverbote in den Laboren, mangelnde Möglichkeiten der direkten Zusammenarbeit von Mitarbeitern und Kooperationspartnern in den Laboren, Liefer-schwierigkeiten bei Verbrauchsmaterial und Erkrankung von Mitarbeiterinnen kam es zu Verzögerungen, die

nicht vollständig kompensiert werden konnten. Da sich darüber hinaus Testphasen von behandelten Pflanzen nicht beliebig verkürzen lassen, können Langzeitwirkungen von protektiven Endophyten nur durch eine Laufzeitverlängerung ausgewertet werden. Wir analysieren derzeit noch endophytische Pilzisolat, die den Erreger des Eschentriebsterbens unter Laborbedingungen und *in planta* inhibieren. Für den geplanten Praxistransfer, entsprechende Publikationen und eine spätere Zulassung als biologische Bekämpfungsmaßnahme müssen noch weitere aktive Metaboliten identifiziert und eine mögliche Mykotoxinproduktion ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung beantragt. Während der Laufzeitverlängerung sollen zusätzlich zu den bereits publizierten und in Vorbereitung befindlichen Manuskripten weitere Veröffentlichungen fertiggestellt werden.

TV4.7

Die Züchtung von toleranten oder gar resistenten Eschen beansprucht viel Zeit. Deswegen muss für die Zwischenzeit eine Lösung gefunden werden, die genetischen Ressourcen für einen langfristigen Züchtungserfolg zu erhalten. Ein schnelles und wirksames System wäre die Anwendung von chemischen Fungiziden. Fungizide eignen sich aber im empfindlichen System Waldbau durch ihre unspezifische Wirkweise kaum. Ihr Gebrauch im Ökosystem Wald ist äußerst begrenzt und nicht praktikabel. Dies ist der Grund, dass ökologisch vertretbare Alternativen entwickelt werden müssen, und diese Alternativen können vielfältig sein. Neben der Anwendung von bakteriellen und pilzlichen Antagonisten oder exogen applizierter RNA zur Induktion von *gene silencing*, kann die Infektiosität des Erregers auch mit Hilfe von Virusinfektionen reduziert werden, ein Ansatz, der heute schon erfolgreich zur Bekämpfung des Kastanienrindenkrebses eingesetzt wird und als virusinduzierte Hypovirulenz bezeichnet wird. Da in *H. fraxineus* bisher keine solchen Hypovirulenz verursachenden Viren im Erreger selbst gefunden worden sind, müssen geeignete Viren von anderen Pilzen verwendet werden, und das System muss etabliert werden. Die Nutzung von artfremden Viren hat hier ein hohes Potential. Durch ihre spezielle vektorlose Ausbreitung sind Pilzviren extrem gut an ihren Wirt angepasst. Dies hat in den meisten Fällen zur Folge, dass beide, Wirt und Virus, sich in einer friedlichen Koexistenz befinden und die Infektion keinerlei phänotypische Auswirkung hat. Wird das Virus aber in einen neuen Wirt artifizell eingebracht, sind hier Virus und Wirt nicht angepasst und die Infektion kann zu einer Verringerung der Infektiosität des Wirtes führen. Hierfür gibt es in der Literatur mehrere Beispiele. Um ein Virus zu finden, was genau dies macht, mussten (i) ein *high-output screening* von Pilzisolaten für die Präsenz von geeigneten Viren implementiert (ii) eine biologische Datenbank dieser Isolate aufgebaut und gepflegt und die Viren charakterisiert sowie (iii) ein Protokoll für die künstliche Transfektion entwickelt und (iv) die transfizierten Stämme auf ihre Eignung zur Reduktion der Virulenz (Hypovirulenz) gezeigt werden.

TV4.8

RNA Interferenz –vermittelte Bekämpfung von *Hymenoscyphus fraxineus*

Es sollen dsRNA-Moleküle designed werden, die über Sequenzhomologie lebensnotwendige Gene von *H. fraxineus* stilllegen, und damit die Infektion zum Stillstand bringen. Aus den Transkriptomdaten, die von uns selbst erzeugt, bzw. die von Konsortialpartnern bereitgestellt werden, können die Sequenzen lebensnotwendiger Gene von *H. fraxineus* identifiziert werden. Diese dsRNA-Moleküle sollen mit der von uns entwickelten Stamminjektion in infizierte Eschensämlinge, die im Rahmen des Verbundes zur Verfügung gestellt werden, eingebracht und ihre Wirksamkeit überprüft werden

TV4.9

Zur Bekämpfung des Eschentriebsterbens erfolgt derzeit die Beobachtung und Auslese symptomfreier Einzelbäume zum Aufbau von Samenplantagen mit toleranten Genotypen. Eine sinnvolle und möglicherweise synergistisch wirkende Ergänzung dieser Maßnahmen besteht in der biologischen Kontrolle der Erkrankung durch mikrobielle Antagonisten, die den Schaderreger direkt hemmen oder durch Konkurrenz unterdrücken. In einem vorhergehenden FNR-Projekt (Frax-ProMic) konnten spezifische Bakterien- und Pilzgruppen im Mikrobiom widerstandsfähiger Eschen nachgewiesen werden. Isolate dieser Taxa stellen erfolgsversprechende Kandidaten zur Ausprägung einer Kolonisierungsresistenz dar. Darüber hinaus wurden *in vitro* antagonistische Isolate mit deutlich wachstumshemmenden Effekten gegenüber *H. fraxineus* identifiziert. Nach der *in planta* Prüfung unter Gewächshausbedingungen wurden wirksame antagonistische Isolate und mikrobielle Konsortien als aussichtsreiche Kandidaten für die biologische Kontrolle zur Verfügung gestellt.

Ziel des Projektes war es, unter Nutzung dieses Materials das Mikrobiom von Eschen unter Freilandbedingungen so zu beeinflussen, dass die Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Pathogen erhöht wird. Durch die Verwendung selektierter widerstandsfähiger Eschen-Genotypen (Zusammenarbeit mit dem Verbund FraxGen) sollte die Wirkung über synergistische Effekte optimiert werden. Nach der Entwicklung stammspezifischer real-time PCR-Systeme sollte die erfolgreiche und langfristige Etablierung der Inokulationsstämmen überprüft und

ihre Wirkung gegenüber dem Pathogen in Abhängigkeit vom Pflanzengenotyp evaluiert werden. Hierzu waren Inokulationsversuche im Freiland geplant, die über mehr als eine Vegetationsperiode und an zwei Standorten erfolgen sollten. Neben der Bonitur der Pflanzen und der Überprüfung der Etablierung der Inokulationsstämme wurde die Infektion mit *H. fraxineus* quantitativ erfasst und die Auswirkung auf das Mikrobiom der Eschen untersucht.

2. Stand der Technik

Das Eschensterben, das durch den Ascomyceten *Hymenoscyphus fraxineus* verursacht wird, hat zu einem extremen Rückgang der Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior*) in Europa mit einem Verlust von bis zu 85 % geführt (Coker et al. 2019). *H. fraxineus* infiziert Eschenblätter durch über die Luft verbreitete Ascosporen, besiedelt den Blattstiel und wächst weiter im Xylem, was zur Nekrose des umliegenden Gewebes und dem charakteristischen Absterben von Ästen führt (Gross et al. 2014). Nach der Abszission entsteht auf den infizierten Blattstielen der Chalara-Anamorph, der Sporen freisetzt, die ein Ascogonium befruchten und im Sommer neue Apothecien bilden, die infektiöse Ascosporen freisetzen (Gross et al. 2012). Darüber hinaus wird die Krankheit mit Stammfußnekrosen in Verbindung gebracht, bei denen die Primärinfektion mit *H. fraxineus* die Eschen für sekundäre Pilzinfektionen schwächt, was zu einer erhöhten Sterblichkeit und einem hohen Risiko des Umsturzes führt (Peters et al. 2023). Der aus Ostasien stammende Pilz wurde erstmals in den frühen 1990er Jahren in symptomatischen Eschen im Nordwesten Polens nachgewiesen (Przybył 2002; Kowalski 2006), aber neuere Erkenntnisse aus älteren Herbariumsproben lassen auf eine Einschleppung mindestens 14 Jahre früher schließen (Agan et al. 2023). Der Pilz ist inzwischen in ganz Europa weit verbreitet (Enderle et al. 2019) und hat Nordspanien und Süditalien erreicht (Stroheker et al. 2021; Migliorini et al. 2022), womit er sich mit dem gesamten heimischen Lebensraum der Esche überschneidet (Beck et al. 2016). Bislang gibt es keine wirksamen Pflanzenschutzmaßnahmen, um eine Infektion zu stoppen oder einen vorbeugenden Schutz zu gewährleisten.

TV4.1

Der invasive Schlauchpilz (Ascomycota) *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowal.) Baral et al. (Syn.: *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, Nebenfruchtform: *Chalara fraxinea*) wurde als Erreger des Eschentriebsterbens der Gemeinen Esche identifiziert. Dieser Pilz stammt ursprünglich aus Ostasien und wurde vermutlich unabsichtlich, ein oder zwei Jahrzehnte vor dem im Jahre 1992 erstmals dokumentierten Auftreten von Symptomen des Eschentriebsterbens, nach Europa eingeführt (Enderle 2023). In Asien lebt dieser Pilz endophytisch, wahrscheinlich phasenweise parasitisch und allenfalls schwach virulent in den Blättern der dort heimischen Eschenarten *Fraxinus mandshurica* und *F. chinensis*. Seine Fruchtkörper bildet er saprophytisch an Eschenblattspindeln. Sie werden in der Regel von Mai bis September auf mindestens vorjährigen Eschenblattstielen in der Bodenstreu gebildet. Diese Fruchtkörper produzieren unzählige Ascosporen, die sich über den Wind, zum Teil über sehr weite Distanzen verbreiten und die Blätter in den Kronen der Eschen infizieren (Gross et al. 2012). Hier verursacht der Pilz Blattnekrosen und führt häufig zu einem frühzeitigen Blattfall. Über die Blattstiele kann der Pilz bis in die Triebe vordringen und sie lokal zum Absterben bringen (Haňáčková et al. 2017b). Durch die jährlich neuerfolgenden Infektionen kommt es zu einem sukzessiven Zurücksterben der Kronen, was letztlich den Tod des Baumes verursachen kann.

Zusätzlich besiedelt der Pilz auch häufig den Stammfuß der Eschen. Hier kann es zu ausgedehnten Nekrosen und nachfolgend zu starken Holzverfärbungen und -fäulen kommen, wobei auch andere Pilzarten wie der Hallimasch (*Armillaria* spp.) eine schadensverstärkende Rolle spielen (Enderle et al. 2017b; Langer 2017). Es gab starke Indizien, dass *H. fraxineus* ein primärer Verursacher der Stammfußnekrosen Schäden ist. In Baden-Württemberg waren 2015 etwa ein Viertel aller Eschen von Stammfußnekrosen betroffen (Enderle et al. 2018), in einzelnen Beständen liegt der Befallsgrad bei über 90 %. Die Ätiologie von Stammfußnekrosen war jedoch zu Projektbeginn noch ungewiss und der Infektionsweg nicht völlig geklärt. Es wurde vermutet, dass Infektionen mit *H. fraxineus* prinzipiell über Lentizellen erfolgen können und vermutlich hauptsächlich im Bereich der Rhizosphäre (Wurzeln und Wurzelanläufe) erfolgen (Meyn et al. 2019; Nemesio-Gorritz et al. 2019). Stammfußnekrosen an Eschen sind nicht nur ein wesentlicher Mortalitätsfaktor im Schadgeschehen des Eschentriebsterbens, sie verursachen bei betroffenen Bäumen auch große Risiken hinsichtlich der Verkehrs- und Arbeitssicherheit. Stammfußnekrosen treten räumlich stark differenziert auf und es gibt deutliche Hinweise auf einen Einfluss von Standortfaktoren, wobei der Wasserhaushalt eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Husson et al. 2012; Chandelier et al. 2016; Marcais et al. 2016; Skovsgaard et al. 2017; Enderle et al. 2019). Für die Schadintensität in den Eschenkronen scheinen neben dem Wasserhaushalt auch pH-Wert und der Gehalt an organischer Substanz im Oberboden ausschlaggebend zu sein (Turczański et al. 2019).

Zur Isolation der mit Stammfußnekrosen assoziierten Pilze wurde grundlegend nach den Methoden von Langer (2017), Bußkamp (2018) und Bußkamp et al. (2020) vorgegangen. Die Bestimmung der isolierten Pilze erfolgte nach Langer (2017), Lee und Langer (2012) und Oertel (2003). Für die Bestimmung der forstpathogenen Pilze und Erkrankungen wurde zusätzlich unter anderem die folgende Literatur verwendet: Booth (1971), Arx (1981), Gerlach and Nirenberg (1982), Breitenbach und Kränzlin (1984), Ju et al. (1998), Verkley (1999), Butin (2011) und Samson et al. (2019). Daneben wurde Primärliteratur zu den einzelnen Arten verwendet. In der Regel folgen die verwendeten Artnamen dem Index Fungorum (www.indexfungorum.org). Für die DNA-gestützte Identifikation wurden, zuvor im hauseigenen Labor der NW-FVA bearbeitete Proben durch Eurofins Scientific Laboratory (Ebersberg, Germany) sequenziert und anschließend mithilfe des Programms

BioEdit (Hall 1999) einer Qualitätskontrolle unterzogen. Die erzeugten Sequenzen wurden an die Pilzdatenbank GenBank des NCBI übermittelt und der BLAST-Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; Altschul et al. (1997)) zur Bestätigung des Pilztaxons verwendet. Repräsentative Stämme der isolierten Pilzarten wurden dauerhaft in der Stammsammlung der NW-FVA hinterlegt.

Die Aussagekraft von Datenbankvergleichen der ITS DNA-Region (als sogenannter "Universal Barcode") mittels NCBI GenBank ist für eine Reihe von Pilztaxa stark eingeschränkt. Die Gründe hierfür liegen in der Unvollständigkeit der Datenbank, falsch identifizierte Datenbankeinträge sowie taxonabhängige intra- und interspezifischer Variabilität der ITS DNA-Region (Raja et al. 2017; Meiklejohn et al. 2019). Aus diesem Grund wurde zum Zwecke genauer Identifizierung oder genereller systematischer Einordnung für spezifische Pilzgruppen weitere DNA-Regionen sequenziert und für tiefergehende Verwandtschaftsanalysen (phylogenetische Single-Gen- und Multi-Gen-Analysen) genutzt. In diesen Fällen wurde sich spezifischen Algorithmen bedient (MAFFT zur Alignmenterstellung, RAxML und Bayesian Inference zur phylogenetischen Analyse), die in das genetische Analyseprogramm Geneious implementiert sind (Kearse et al. 2012).

Bei den Arbeiten zum Zusammenhang zwischen Eschentriebsterben und Standortfaktoren wurden verschiedene Datengrundlagen und Quellen genutzt. Die Daten der Waldzustandserhebung basieren in erster Linie auf den europaweit harmonisierten Anleitungen zur Erfassung des Kronenzustandes von Waldbäumen (ICP Forests 2016) und wurden von den Versuchsanstalten bzw. Landesforstbetrieben aller Bundesländer akquiriert. Die Daten der zweiten Bodenzustandserhebung im Wald stammen vom Johann Heinrich von Thünen-Institut für Waldökosysteme aus Eberswalde (Höhle et al. 2018). Für Erhebung weiterer Bodendaten wurden die gängigen, bundesweit harmonisierten Werke zur Kartierung (Ad-hoc-Arbeitsgruppe Boden, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe 2005) und zur Bodenbeprobung (Wellbrock et al. 2006) genutzt. Zur forstlichen Charakterisierung von Standortseinheiten wurde auf das Niedersächsische Rahmenschema zur Standortsbewertung zurückgegriffen (Forstplanungsamt Niedersachsen 2006). Bei der Flächensuche und -auswahl wurden die Forsteinrichtungsdaten der Länder Niedersachsen, Hessen und Sachsen-Anhalt der jeweiligen Landesforstbetriebe genutzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software R (R Core Team 2023) und basierte überwiegend auf den Packages mgcv, lme4 (Bates et al. 2015; Wood 2017). Speziell die Auswertung der Kronenverlichtungsdaten der WZE baut auf mehreren Arbeiten zur Raum-Zeit-Modellierung von Kronenzustands-Zeitreihen auf (Augustin et al. 2009; Eickenscheidt et al. 2019).

TV4.2

Der wissenschaftliche Stand zum Eschentriebsterben ist in Enderle et al. 2019 zusammengefasst. Es wurde bereits früh festgestellt, dass einzelne Isolate von *H. fraxineus* in ihrer Erscheinungsform und Lebensweise sehr unterschiedlich sein können (Kowalski und Bartnik 2010, Junker et al. 2017). Erste Untersuchungen zur Erfassung der Virulenz von *H. fraxineus* wurden durchgeführt, wobei sich zeigte, dass die Virulenz stark zwischen einzelnen Isolaten variierte (Lygis et al. 2017). Im Projekt wurden Mikrosatellitenprimer verwendet, die in früheren Studien entwickelt wurden (Bengtsson et al. 2012, Gross et al. 2012, Gherghel et al. 2013). Zudem kamen zum Nachweis von Infektionen die artspezifischen Primer von Johansson et al. (2010) zum Einsatz. Frühere Analysen zur Populationsstruktur von *H. fraxineus* in Europa zeigten eine einheitliche Populationsstruktur mit nur schwachen geographischen Mustern in Europa (Bengtsson et al. 2012, Gross et al. 2014, Nguyen et al. 2016). Bei der Erstellung von Sporensuspensionen in diesem Projekt wurde sich an den Methoden orientiert, die von Schlegel et al. (2016) und Mansfield et al. (2018) publiziert wurden.

TV4.3

Neben den allgegenwärtigen Symptomen des Eschentriebsterbens im Kronenbereich treten nunmehr auch Stammfußnekrosen an Eschen in Erscheinung, die den Krankheitsverlauf gravierend beeinflussen können. In bisherigen Untersuchungen ließ sich der Erreger des Eschentriebsterbens auch aus nekrotischen Bereichen im Holz am Stammfuß isolieren. Unklarheiten bestehen aber auch weiterhin über das Zustandekommen von Infektionen der untersten Stammbereiche. Der Hauptinfektionsweg erfolgt über die Blattspreite durch Ascosporen. Da eine sich entwickelnde Fäule in Bereichen der Wurzellanläufe, neben Problemen für den Baum selbst, auch ein hohes Risiko in der Bewirtschaftung von solchermaßen betroffenen Beständen darstellt ist es nötig, Kenntnisse über die Ätiologie und im weiteren Verlauf auch über die Pathogenese zu gewinnen. Hier sind möglicherweise bei Infektionsvorgängen über Lenticelle, Wunde und Wurzel Hinweise auf unterschiedliche Resistenzmechanismen im Vergleich zu Blattinfektionen vorzufinden.

TV4.4

In der Mykologie wurden morphologische Methoden zur Artbestimmung angewandt, welche in der Regel sehr zeitaufwändig sind und Fruchtkörper voraussetzen. Das Aufkommen von Nukleinsäure-Sequenzierungstech-

nologien hat die Nutzung molekularer Methoden zur Speziesidentifizierung durch vergleichende DNA-Sequenzanalyse ermöglicht (Seifert 2009). Bei Pilzen wird meist die ITS-Region (internally transcribed spacer) als Standard-Barcode genutzt (Schoch et al. 2012). Als Barcoding wird die Untersuchung von gewissen Markersequenzen und deren Vergleich zu Referenzsequenzen zur Artbestimmung bezeichnet. Wenn Proben mit mehreren vorhandenen Arten untersucht werden, spricht man von Metabarcoding (Valentini et al. 2009).

In diesem Projekt sollte das Metabarcoding von Pilzen mit dem Gerät Oxford Nanopore MinION etabliert werden. Bei der Nanoporesequenzierungstechnologie wird ein DNA-Molekül von einem Motorprotein durch ein Nanoporenprotein transportiert. Dieses ist in eine künstliche Plasmamembran eingebettet. Durch die angelegte elektrische Spannung zwischen beiden Seiten dieser Membran findet ein Ionenstrom statt, welcher durch die spezifischen Nukleotide in der Pore charakteristisch verändert wird. Durch Messung dieser Veränderung lässt sich die Nukleotidabfolge ermitteln (Lin et al. 2021). Der MinION ist eine kleine und kostengünstige Plattform zur Sequenzierung von DNA und RNA. Ein Vorteil der Nanoporesequenzierung ist die Leselänge im Vergleich zu früheren Technologien. Diese ermöglicht die Sequenzierung der gesamten ITS-Region und dadurch eine bessere Erfassung der Pilzdiversität (Tedesoo et al. 2022). Ein Nachteil dieser Technologie ist die relativ hohe Fehlerrate. Deswegen muss der Prozess des Clusterings angewendet werden, bei dem Reads mit einer definierten Sequenzidentität zusammengefasst werden. Im Anschluss erfolgt die Bildung einer Konsensussequenz. In der vorhandenen Literatur zu MinION-Sequenzierungsprojekten wurden Werte ab 80% Sequenzidentität für das Clustering genutzt (Voorhuijzen-Harink et al. 2019; Davidov et al. 2020). Aufgrund der geringen Größe kann der MinION bei Forschungsexkursionen vor Ort genutzt werden (Chang et al. 2020). Durch die geringen Anschaffungskosten bietet diese Methode Forschern Zugang zur Durchführung molekularer Studien, denen die Nutzung anderer Sequenzierungstechnologien aufgrund finanzieller Limitierungen nicht möglich ist (Pomerantz et al. 2022).

TV4.5

Die Experimente und Analysen bauen unter anderem auf verschiedenen Studien zum Pathogen auf. Hervorzuheben sind die Analysen zum substratabhängigen Wachstum. Hier wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass mit *F. excelsior* ergänzte Medien ein verbessertes Wachstum von *H. fraxineus* ermöglichen (Carrari et al. 2015). In den im Teilvorhaben folgenden Transkriptomanalysen zur Identifizierung der differentiell regulierten Gene war die im Vorfeld erfolgte Bereitstellung der Genomsequenz von *H. fraxineus* in den Datenbanken essentiell und dessen komparative Analyse (Elfstrand et al. 2021). Weiterhin wurde auf vorliegende Studien zu diversen Toxinen aufgebaut. Gliotoxin nimmt hier eine Sonderstellung ein, welches in anderen Ascomyceten bereits ausgiebig in Hinblick auf seine Kodierung/Gencluster und dessen Bedeutung untersucht wurde (Scharf et al. 2010, 2012; Schrettl et al. 2010; Wang et al. 2014).

TV4.6

Um den Einfluss der Infektion und der Besiedlung von einzelnen pilzlichen Isolate auf Eschenpflanzen zu testen, haben wir die Methode der axenischen Kultur entwickelt. Die Stratifizierung wird umgangen nach einer modifizierten Methode von Raquin et al. (2002) in dem zunächst die Perikarpe entfernt werden mussten, um anschließend durch mehrere Schritte oberflächensterilisiert zu werden. Die Samen werden auf H_0 zur Keimung aufgelegt und die Sämlinge auf H_{10} in Baby Food Gläser angezogen (siehe auch Junker et al. 2014).

In Zusammenarbeit mit UHH PP4.7, haben wir axenische Sämlinge mit GFP-transformiertem *H. fraxineus* infiziert (Lutz et al. 2023a), wodurch die Besiedlung des Eschensämlings erfolgreich mikroskopisch verfolgt werden konnte. Aus einem *Hymenoscyphus albidus* Isolat, der dem UHH zugesandt wurde, wurde ein Virus isoliert. Jener Virus und auch andere Viren, die in *H. fraxineus* transfiziert wurden, scheinen sich in Inokulationsversuche mit axenischen Sämlinge als Hypoviren zu erweisen (Lutz et al. 2023b).

Vorarbeiten zur Inokulation eines Baums mit einem Endophyten (*Hypoxylon rubiginosum*) wurde zunächst auf Holzstäben erfolgreich in einer Zusammenarbeit mit der Lüth Korte GmbH erprobt.

TV4.7

Viren werden als ultimative Parasiten angesehen, die die Populationen ihrer Wirte im Gleichgewicht halten. Aufgrund ihres biologischen Potentials werden sie in verschiedenen Bereichen bereits als *biological control agents* (BCAs) eingesetzt (Wagemans et al. 2022). Eins der ersten Beispiele ist die Kontrolle von Lepidoptera durch Baculoviren. Bis heute sind etwa 35 Baculoviren für verschiedene Anwendungen erhältlich (Sun 2015). Ein anderes Beispiel ist der Einsatz von Phagen für die Kontrolle bakterieller Erreger. Seit 2005 hat die *US Environmental Protection Agency* vier verschiedene Phagencocktails gegen Pseudomonaden und Xanthomonaden zugelassen, um verschiedene Nachtschattengewächse vor diesen bakteriellen Infektionen zu schützen.

Wenn ein Virus die Virulenz eines Pilzes herabsetzt, wird dieses als Hypovirulenz bezeichnet. Hypovirulenz ist ein seltenes biologisches Phänomen und wird oft von einer veränderten Morphologie, einem reduzierten Wachstum und einer verminderten Sporulation begleitet.

Im Waldbau ist der Einsatz von Viren zur Bekämpfung von Pilzkrankheiten, also virusinduzierte Hypovirulenz, ebenfalls möglich. Das *Cryphonectria parasitica* hypovirus 1 (CPH1) wird für die Kontrolle des Kastanienrinnekrebses, das durch den Ascomyceten *Cryphonectria parasitica* verursacht wird, eingesetzt. Die ersten Versuche starteten in den 1970-er Jahren in Frankreich, und das System ist nunmehr seit über 20 Jahren in Europa überaus erfolgreich (Rigling and Prospero 2018). Bei Virusbefall wächst das Myzel stark vermindert und ist nicht in der Lage, in die inneren Schichten der Rinde einzudringen. In der Praxis wird hypovirulentes, virushaltiges Pilzmyzel auf die Befallsstellen appliziert. Die Hyphen der beiden Stämme bilden Verbindungen (Anastomosen) aus und das Virus wird über diese Zytoplasmabrücke auf den infektiösen Stamm übertragen. Die Krebsgeschwüre heilen ab und der Pilz kann sich nicht weiter ausbreiten. Es konnte sogar eine Etablierung des CPH1 in natürlichen Populationen nachgewiesen werden (Hoegger et al. 2000).

Schoebel et al. (2014) haben bei über 200 Proben aus verschiedenen Regionen der Schweiz und aus Litauen sowie Probenmaterial aus Japan, Polen und der Schweiz nach hypovirulenzauslösenden Viren in *Hymenoscyphus fraxineus* gesucht. In 90 % der Schweizer Proben, bei zwei von drei japanischen Proben und allen drei deutschen Proben wurde das *H. fraxineus* mitovirus 1 (HfMV1) gefunden. Bei der Probennahme wurde jedoch nicht explizit beschrieben, ob der zugehörige Baum sichtbare Schäden aufwies oder nicht. Mitoviren an sich können aber Hypovirulenz auslösen. So bildet *Botrytis cinerea* keine Infektionsstrukturen aus, wenn es vom *Botrytis cinerea* mitovirus 1 (BcMV1) befallen ist (Wu et al. 2010). In den letzten Jahren wurden vermehrt Viren beschrieben, die bei phytopathogenen Pilzen eine Hypovirulenz auslösen (Ghabrial und Suzuki 2009). Da für die Bekämpfung von *Hymenoscyphus fraxineus* kein BCA vorliegt, muss dieses gefunden, in den Erreger eingebracht und seine Wirksamkeit getestet werden.

TV4.8

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein wesentlicher Weg für die Entwicklung neuer Pflanzenschutzstrategien. RNAi ist ein vielschichtiger Regulationsmechanismus, der in fast allen eukaryontischen Organismen vorkommt und gemeinsame Funktionen bei der Regulierung endogener Gene, der Sicherung der Genomstabilität durch das Silencing von Transposons und repetitiven Elementen und der Verteidigung gegen eindringende Nukleinsäuren hat (Lax et al. 2020). In Pilzen ist RNAi auch an der Pathogenese beteiligt (Gaffar et al. 2019). Der mechanistische Kern von RNAi ist bei allen Organismen konserviert, aber die regulatorischen Details haben sich auf einer großen evolutionären Skala deutlich auseinanderentwickelt. RNAi wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) initiiert, die von endogenen (z. B., MIR-Gene, Tandem-Repeats, Antisense-Transkripte) oder fremden Quellen (z. B. Virusreplikation, Transgene) stammt (Torres-Martínez und Ruiz-Vázquez 2017). dsRNA wird durch DICER-ähnliche Endonukleasen (DCL), die je nach Organismus und DCL-Variante zwischen 21 und 25 nm lang sind, in small interfering RNA (siRNA) gespalten. siRNAs werden in ARGONAUTE-Proteine (AGO) eingebaut, und verschiedene Effektorproteine werden rekrutiert, um regulatorische Komplexe zu bilden, wie den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) oder den RNA-induzierten transkriptionalen Silencing-Komplex (RITS). In Pilzen und anderen Organismen wurde eine wachsende Zahl verschiedener siRNA-Klassen beschrieben, was die Vielfalt der Regulationsmechanismen erleichtert (Lax et al. 2020). Gen-Silencing wird post-transkriptionell (PTGS) durch Translationsblockade oder Abbau des Ziel-Transkripts (RISC) oder transkriptionell (TGS) durch Induktion von DNA-Methylierung und/oder Heterochromatinbildung am Zielort (RITS) erreicht (Chang et al. 2012). Bei beiden Wegen wird die Zielerkennung durch die Sequenzhomologie der AGO-inkorporierten siRNA vermittelt. In Pflanzen wird das Silencing-Signal durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RDR) verstärkt, die aus bestimmten einzelsträngigen RNAs (z. B. abweichenden Transkripten oder Spaltprodukten) dsRNA synthetisiert, was zu einer positiven Rückkopplungsschleife und der Bildung sekundärer siRNA führt. Homologe der pflanzlichen RDRs sind auch in Pilzen zu finden, aber ihre Rolle bei RNAi variiert zwischen den Pilzarten. Die Funktion der RDRs im basalen Pilz *Mucor circinelloides* ist mit der in Pflanzen vergleichbar, da sie das Silencing-Signal verstärken, aber die Bildung sekundärer siRNA wurde in filamentösen Pilzen wie *Neurospora crassa*, *Fusarium asiaticum* oder *Verticillium dahlia* nicht dokumentiert (Torres-Martínez und Ruiz-Vázquez 2017; Mann et al. 2023). In *N. crassa* und anderen Fadenpilzen sind RDRs an der Reaktion auf DNA-Schäden und Tandem-Repeat-Silencing beteiligt, bei dem dsRNA aus abweichenden Transkripten erzeugt wird, und darüber hinaus vermitteln RDRs die Genomstabilität durch Silencing ungepaarter DNA in der Meiose.

Vor Beginn des Projektes war nicht bekannt, ob *H. fraxineus* über einen funktionellen RNAi Pathway/Mechanismus verfügt.

TV4.9

Pflanzenkrankheiten, die durch Mikroorganismen verursacht werden, sind eine große Bedrohung für die land- und forstwirtschaftlichen Ökosysteme und die Produktion (Wang et al. 2021). Der klassische Ansatz zur Bekämpfung dieser Krankheiten sind Pestizide. Der Einsatz von Pestiziden führt zu schwerwiegenden Umweltproblemen, da die Umwelt mit schädlichen Xenobiotika kontaminiert wird. Darüber hinaus ist die Anwendung von Pestiziden in Waldökosystemen aufgrund ihrer möglichen Akkumulation und der Komplexität des Ökosystems sowie der daraus resultierenden Schäden an Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen nur in wenigen Ausnahmefällen denkbar und möglich (Kaczyński et al. 2021). Der Einsatz von Mikroorganismen als biocontrol agents (BCA) kann ein nachhaltigerer Weg zur Unterdrückung eines Pathogens und/oder zur Stärkung der Pflanzengesundheit sein (Raymaekers et al. 2020). Neue Ansätze konzentrieren sich auch auf die "Optimierung" des pflanzlichen Mikrobioms und führen zum "Microbiome Engineering" (Berg et al. 2020; Syed Ab Rahman et al. 2018). Die eingesetzten BCAs sind eng mit dem Stoffwechsel ihrer Wirte verbunden (Jeyarajan and Nakkeeran 2000) und zeigen positive Effekte auf die Pflanzengesundheit (Syed Ab Rahman et al. 2018) sowie antagonistische Wirkungen gegen Pathogene (Mitter et al. 2017; Müller and Behrendt 2021).

Von BCA ausgeschiedene Pflanzenhormone können den Stoffwechsel der Pflanzen aktivieren, ihre Fähigkeit zur Selbstverteidigung durch Aktivierung des Immunsystems steigern (Rashid and Chung 2017; Romera et al. 2019; Vannier et al. 2019) und so eine induzierte systemische Resistenz (ISR) ermöglichen (Pieterse et al. 2014). Als weitere indirekte Wirkung können BCA zu einer Veränderung des pflanzlichen Mikrobioms führen, was eine Verbesserung der Pflanzengesundheit bewirken kann (Berg et al. 2021). BCA können auch direkt mit dem Pathogen als Antagonisten interagieren (Ongena et al. 2007). Solche Interaktionen beinhalten die Produktion von Sekundärmetaboliten, meist Antibiotika (Moëne-Loccoz et al. 2015). Darüber hinaus konkurrieren Mikroorganismen (Kommensalen und Krankheitserreger) um Ressourcen und Raum, die begrenzt sind. Dies kann zu einem positiven Effekt für die Pflanze führen, da der Erreger möglicherweise nicht mit den ansässigen Mikroorganismen konkurrieren kann, so dass die ansässigen Mikroorganismen eine Kolonisationsresistenz („colonisation resistance“) bilden (McLaren and Callahan 2020).

Die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Krankheitserreger werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst, darunter abiotische und biotische Umweltfaktoren, die die Attraktivität eines Wirts für bestimmte Schädlinge verändern kann (Brink 1962; Kearsley and Whitham 1989; MacDonald 2008; Stoffel and Bollschweiler 2008). Ein entscheidender biotischer Faktor bei den Wirt-Pathogen-Interaktionen sind die Interaktionen mit antagonistischen Mikroorganismen. Ihre Biokontrollaktivitäten, insbesondere die einzelner Arten und Stämme des Mikrobioms, haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen und positive Auswirkungen auf die allgemeine Pflanzenvitalität gezeigt (Syed Ab Rahman et al. 2018; Compant et al. 2019; Müller and Behrendt 2021). Das Wissen über die Pflanzenvitalität erstreckt sich jedoch nicht darauf, ob der geimpfte Bakterienstamm die direkte Ursache für die zunehmende Gesundheit ist, ob der Stamm noch persistent ist und wie häufig er vorkommt.

Der Einfluss von Krankheitserregern und insbesondere ihre Ursachen und Folgen sind in der Forst- und Landwirtschaft sowie in der Wissenschaft von großer Bedeutung. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, ihr Auftreten und ihre Bekämpfung zu verstehen, um die mitunter recht schwerwiegenden Auswirkungen auf Ökosysteme und Pflanzen zu minimieren. In diesem Zusammenhang ist die Forstwirtschaft mit vielen Krankheiten konfrontiert, z. B. *Phytophthora quercina*, die einen Rückgang von *Quercus robur* verursacht (Jung et al. 2000), oder die durch *Ophiostoma* verursachte Holländische Ulmenkrankheit, die zu einer weltweiten Dezimierung der Ulmenpopulation führte (Brasier 1991; Harwood et al. 2011). Da das Eschentriebsterben als eine große Bedrohung für *F. excelsior* erkannt wurde, wurden mehrere Forschungsstrategien zur Behandlung dieser Krankheit entwickelt. Einer der Schwerpunkte lag dabei auf dem pflanzlichen Mikrobiom. Die meisten diesbezüglichen Studien konzentrierten sich auf die Pilzgemeinschaften der Blätter und Triebe (Unterseher et al. 2007; Davydenko et al. 2013; Kosawang et al. 2018; Schlegel et al. 2018; Becker et al. 2020) und fanden saisonale, standortspezifische und vertikale Veränderungen (Scholtysik et al. 2013; Cross et al. 2017; Haňáčková et al. 2017). Einige der Pilzisolat zeigen die Fähigkeit zur biologischen Suppression durch antimykotische Sekundärmetabolite und antagonistische Fähigkeiten gegen *H. fraxineus* (Junker 2013; Schulz et al. 2015; Schlegel et al. 2016; Haňáčková et al. 2017; Kosawang et al. 2018). Für den bakteriellen Teil des Eschenmikrobioms wurde ein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des Mikrobioms und dem Infektionsstatus von *H. fraxineus* festgestellt (Griffiths et al. 2019; Ulrich et al. 2020). Es wurde auch gezeigt, dass das Mikrobiom toleranter Eschen mehrere Taxa enthält, die Kandidaten für die Biokontrolle darstellen, wie die hier getesteten Stämme D4P002 und C2P003, die bereits einen positiven Effekt auf die Vitalität unter *H. fraxineus*-Infektion nachweisen konnten (Becker et al. 2022). Um die Resistenz von Eschen unter verschiedenen Umweltbedingungen nachzuweisen, kann die Überwachung der Persistenz des Inokulationsstammes wichtige Informationen liefern.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

TV4.1

Zusammenarbeit mit anderen Verbänden von FraxForFuture

Neben dem gemeinsam mit FraxMon erarbeiteten Boniturschlüssel (Peters et al. 2021a; Peters et al. 2021b) wurden mehrere Boniturschulungen und gemeinsame Flächenbegutachtungen mit allen anderen Verbänden durchgeführt. Alle Arbeiten auf den Intensivbeobachtungsflächen und auf dem WZE-Raster wurden in enger Abstimmung mit FraxMon durchgeführt, dabei war ein wissenschaftlicher Mitarbeiter von TV 4.1 explizit verbundübergreifend tätig und in FraxMon bei mehreren Arbeitspaketen beteiligt. Die standorts- und bodenkundlichen Erhebungen auf den Intensivbeobachtungsflächen wurden jeweils in Kooperation mit den Flächenverantwortlichen aus dem Projekt durchgeführt, aufbereitet und zentral über die Projektdatenbank (entwickelt von FraxConnect) allen Teilvorhaben von FraxForFuture zur Verfügung gestellt. Damit haben alle Teilvorhaben, die auf den Intensivbeobachtungsflächen arbeiten, Zugriff auf einheitliche Basisdaten zu den Untersuchungsflächen. Diese Daten kommen auch anderen Forschungsarbeiten auf den Intensivbeobachtungsflächen (FraxVir, FraxRecovery) zugute. Dies gilt ebenso für die von TV4.1 für die Datenbank zusammengeführten Bonitur und Geodaten zu den Intensivbeobachtungsflächen. Dabei wurden insbesondere die Geodaten mit den Fernerkundungs-Teilprojekten von FraxMon abgestimmt.

Außerdem wurden diverse Eschenproben, Pilzstämme und erhobene Daten projektintern in FraxForFuture geteilt. Der Fokus lag dabei insbesondere auf den anderen Teilvorhaben von FraxPath, aber auch mit Teilvorhaben der anderen Unterverbände erfolgte dieser Austausch. Die Ergebnisse weiterer Zusammenarbeit mündeten in 27 gemeinsamen bereits veröffentlichten und sechs weiteren geplanten Publikationen im Demonstrationsprojekt (siehe Kapitel II.4).

Zusammenarbeit mit Projektexternen

Zu den projektexternen Wissenschaftlern gehören unter anderem auch Mitarbeitende des Projekts FraDiv. Mit den Bearbeitenden des Projekts zur Biodiversität in den Wäldern Schleswig-Holsteins erfolgte ein stetiger Informations- und Materialaustausch und ein Abgleich des methodischen Vorgehens. Zum Beispiel wurden gemeinsame Exkursionen und Probenahmen vorgenommen. Eschenproben des FraDiv Projekts wurden im Labor der NW-FVA hinsichtlich ihrer assoziierten Pilze und Absterbeursachen untersucht. Gitta Langer nahm zudem regelmäßig an den Sitzungen der projektbegleitenden Arbeitsgruppe FraDiv teil.

Ohne die Zusammenarbeit mit diversen Forstämtern/ Forstbetrieben/ Waldbesitzenden, wäre eine so umfangreiche Probenahme und -bearbeitung sowie die Bonituren in diesem Ausmaß nicht möglich gewesen. Die ausgewählten Untersuchungsflächen (FraxCollar-Intensivflächen, Intensivbeobachtungsflächen, WZE-Punkte etc.) erstreckten sich über ganz Deutschland. Besonders stark wurde dabei mit den niedersächsischen Landesforsten/ Forstamt Neuhaus/ Revier Burgberg, der Forstabteilung des Landesverbandes Lippe (NRW)/ Revier Nassesand, dem Landesforstbetrieb Sachsen-Anhalt/ Forstbetrieb Ostharz/ Revier Huy und Revier Hakel sowie dem Forstbetrieb Süd/ Revier Rothenschirmbach zusammengearbeitet.

TV4.2

Es fand eine intensive Zusammenarbeit mit verschiedenen Projektpartnern im Rahmen des FraxForFuture-Verbandes statt (siehe 2.1 Erzielte Ergebnisse). Besonders hervorzuheben sind die TU Braunschweig und das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Das Thünen-Institut für Forstgenetik (Projektpartner aus FraxGen) stellte Versuchspflanzen zur Verfügung und generierte die Mikrosatellitendaten in enger Abstimmung mit dem JKI. Es bestand darüber hinaus ein Austausch zur Eidgenössischen Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft.

TV4.3

Für dendrochronologische Untersuchungen wurden durch TV4.1 (Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt) und TV2.1 (Landesbetrieb Forst Brandenburg) Stammscheiben zur Verfügung gestellt. Für Inokulationsversuche wurden Eschensämlinge aus TV3.3 (Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg) verwendet und mit *H. fraxineus*-Stämmen, die zuvor durch TV4.2 (Julius Kühn-Institut) auf ihre Virulenz getestet wurden, inokuliert. Ein Protokoll, das ebenfalls von TV4.2 erarbeitet wurde, ermöglichte eine projektweit einheitliche Durchführung von Inokulationsversuchen. Für TV3.3 wurde Inokulationsmaterial für Resistenztests vermehrt und bereitgestellt. Darüber hinaus bestand ein enger Austausch zu Durchführung und Ergebnis der Inokulationsversuche. Vier Isolate von *H. fraxineus* wurden TV4.2 für Virulenztest zur Verfügung gestellt. Eschenmikrobohrkerne wurden für TV4.8 (RLP Agrosience GmbH) hergestellt. Mit TV2.7 (Hoch-

schule für nachhaltige Entwicklung Eberswalde) bestand ein wiederholter Austausch zu histologischen Methoden und Ergebnissen. Zudem wurden, mit *H. fraxineus* und *A. gallica* beimpfte, Eschenmikrobohrkerne an TV2.7 geliefert, zur Anfertigung histologischer Präparate und mikroskopischen Auswertung. Die Flächeneinrichtung der beiden baden-württembergischen IB-Flächen „Weisweil“ und „Plattenwald“ erfolgte in Zusammenarbeit mit anderen, an der FVA verorteten, Teilvorhaben von FraxForFuture. Die Alteschenbonituren auf den baden-württembergischen IB-Flächen „Weisweil“ und „Plattenwald“ wurden zweimal jährlich gemeinsam mit TV3.3 durchgeführt. Um eine projektweit einheitliche Bonitur zu gewährleisten wurde der projektintern erarbeitete Boniturschlüssel verwendet. Darüber hinaus wurde an einer Winterboniturschulung in Göttingen unter der Leitung von TV4.1 im Herbst 2021 teilgenommen. Eine weitere Boniturschulung für alle Bonitierenden wurde, gemeinsam mit FraxConnect und TV 3.3, geplant und in Freiburg unter der Leitung von Stefan Meining (Büro für Umweltüberwachung) im Sommer 2022 durchgeführt. Zur Auswertung der Boniturdaten wurde an einem Treffen in Göttingen teilgenommen. Eine gemeinsame Publikation der Boniturergebnisse wurde im Dezember 2023 durch Erstautor Sebastian Fuchs (TV2.3, Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt) beim Journal of Plant Diseases and Protection eingereicht. Zudem wurde aktiv an Projekttreffen teilgenommen. Darunter an einer Online-Vortragsreihe im Herbst 2021, einem Projekttreffen in Kassel im Mai 2022 und der Abschlussveranstaltung in Göttingen im September 2023.

TV4.4

Landesforstbetrieb Sachsen-Anhalt und Niedersächsische Landesforsten wurden bezüglich Standortdaten für die Flächen ST2, ST3, NI2 und NI3 kontaktiert und stellten diese zur Verfügung.

TV4.5

Das Teilvorhaben arbeitete im Unterverbund mit den folgenden Teilvorhaben zusammen:

- 4.1: Dr. Gitta Langer, Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (Isolate),
- 4.2: Dr. Rasmus Enderle, Julius-Kühn Institut (experimentelle Infektion und Eschenkultur),
- 4.8: Prof. Dr. Gabi Krczal, RLP Agrosience GmbH (Kultivierung) und
- 4.9: Dr. Andreas Ulrich, Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung e. V. (Kultivierung)

sowie mit den Unterverbänden FraxGen (Pflanzgut) und FraxMon (Diagnostik, Prof. Dr. Susanne Jochner-Oette, Katholische Universität Eichstätt-Ingolstadt). Synergien ergaben sich zudem durch die Teilnahme am Verbundvorhaben FraxVir (s.o. FKZ 2220WK40C4). In diesem Verbund konnte wesentlich auf bereits etablierte Methoden aufgebaut werden. Auf weitere Kooperationen konnte aufgrund der Kompetenzbündelungen in den Verbundvorhaben verzichtet werden.

TV4.6

Infektionsversuche mit ausgewählten Endophyten wurden in einem Gewächshaus an 2-jährigen Eschen in Zusammenarbeit mit PP4.2 JKI durchgeführt. Alle inokulierten Endophyten verringerten die Ausprägung der Symptomatik des Eschentriebsterbens (siehe Kapitel I.1 *Infektionsversuche, um geeignete Kandidaten für die biologische Bekämpfung des Eschentriebsterbens zu finden*).

In der Zusammenarbeit mit PP4.7 UHH testen wir mit Viren transvektierten *H. fraxineus* auf Hypovirulenz in dem wir sie auf herabgesetzte Virulenz nach Inokulation in axenisch kultivierten Eschensämlinge untersuchen. Weiterhin haben wir ein mit GFP transformierte *H. fraxineus* Isolat in den axenisch kultivierten Sämlinge inokuliert, womit der Erfolg der Transformation mikroskopisch sich bestätigen ließ.

In einer Zusammenarbeit mit PP4.9 ZALF wurden in einem Freilandversuch der Einfluss einer Dualinokulation eines endophytischen Bakteriums und eines endophytischen Pilzes erprobt. Leider haben die klimatischen Bedingungen verhindert, dass die Inokulation mit *H. fraxineus* erfolgreich war.

In Zusammenarbeit mit der Lüth Korte GmbH, deren Ziel es ist, Bäume mit Pilzen bewachsenen Holznägel zu inokulieren wurden zwei unsere Endophyten auf Holznägel inokuliert. Beide bewachsen bereits solche Holznägel sehr gut und wachsen weiter auch nach mehr monatiger Lagerung im Kühlschrank bzw. nach Lagerung in einer Gefrieranlage.

TV4.7

Im Rahmen des Projektes wurde ein Aufruf bei der Deutschen Gesellschaft für Mykologie gestartet, um virusverdächtiges Pilzmaterial zu erhalten (*citizen science*). Mit folgenden Projektpartnern des Unterprojektes Frax-Path wurde zusammengearbeitet: Der Projektpartner der NW-NVA Göttingen hat seine Lebendsammlung von Ascomyceten zur Verfügung gestellt, von denen geeignete Viren isoliert werden konnten. Ein Isolat des verwandten *Hymenoscyphus albidus* wurde aus der Sammlung der Universität Braunschweig bearbeitet. Ein zweites Isolat wurde zur Verfügung gestellt, konnte aber während der Projektlaufzeit nicht weiterbearbeitet werden. Vom JKI Braunschweig wurden *Hymenoscyphus fraxineus* Isolate auf Virus untersucht, die zuvor auf ihre Infektiosität getestet worden waren. Dem Projektpartner RLP AgroScience in Neustadt wurde das Protokoll für die Transformation des *H. fraxineus* noch vor der Publikation zur Verfügung gestellt. Während eines Gastaufenthaltes des dortigen Wissenschaftlers an der Universität Hamburg wurde das Protokoll praktisch umgesetzt und Fragen geklärt. Dem Projektpartner Universität Braunschweig wurden potenziell virusinfizierte, hypovirulente Isolate eines infektiösen *H. fraxineus* Stammes geliefert, die dort in einem Biotest auf ihre Infektiosität *in vitro* getestet wurden.

TV4.8

Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (TV4.1): Bereitstellung *Hymenoscyphus fraxineus* Isolate

Universität Hohenheim (TV4.5): Methodenaustausch

Universität Hamburg (TV4.7): Methodenaustausch zur Transformation von *Hymenoscyphus fraxineus*

TV4.9

Zum erfolgreichen Gelingen unseres Projektes trug die enge Zusammenarbeit mit den verschiedenen Partnern des Unterverbundes FraxPath bei. Dazu gehört insbesondere die Arbeitsgruppe von Gitta Langer (TV 1, NW-FVA). Generell stimmten wir unsere Versuche mit der Koordination ab. Die AG Langer unterstützte uns darüber hinaus mit infizierten Petiolen, um eine zusätzliche Infektion mit *H. fraxineus* auf den Versuchsflächen zu stimulieren. Ebenso stellte uns die AG pathogene *H. fraxineus* Stämme für unsere Untersuchungen zur Verfügung. Es erfolgte ein Austausch der Ergebnisse der *in vitro* Ko-Kultivierungstests zur antagonistischen Aktivität der Inokulationsstämme bzw. der Pathogenität der *H. fraxineus* Stämme. Mit der AG Ewald Langer (TV 4, Uni Kassel) erfolgte ein intensiver Austausch zur Analyse des Mycobioms der Esche. Mit der AG Michael Kube (TV 5, Uni Hohenheim) kooperierten wir bei der Quantifizierung des Pathogens. Zusammen mit der AG Michael Steinert (TV 6, TU Braunschweig), speziell mit Barbara Schulz, wurde ein gemeinsamer Inokulationsversuch geplant und im Thünen-Institut in Waldsiedersdorf durchgeführt. Der Versuch beinhaltete erste Ansätze zur Ko-Inokulation von pilzlichen und bakteriellen Antagonisten.

Weiterhin erfolgte eine Kooperation mit Arbeitsgruppen von FraxGen. Hier ist besonders die AG des Thünen-Instituts für Forstgenetik (Volker Schenk, Ben Bubner) hervorzuheben. Es erfolgte eine intensive Kooperation zur Auswahl von Plusbaum-Nachkommenschaften. Die AG unterstützte uns bei der Ernte von Samen und stellte uns in großem Umfang Sämlinge für unsere Versuche zur Verfügung. Darüber konnten die Gewächshausversuche im Thünen-Institut in Waldsiedersdorf durchgeführt werden. Auch die Auswahl, Etablierung und Bewirtschaftung des Freilandversuches in einem zusammenbrechenden Eschenforst in der Nähe von Briesen erfolgte mit Unterstützung der AG.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

TV4.1

AP1 und 2 Koordination Verbundvorhaben 4 (TV4.1 NW-FVA)

(AP1.1 Absprache der Arbeiten, Berichte, Probenahmen und Zulieferung zwischen den PP und mit Waldbesitzern; AP1.2 Zusammenstellung und Vernetzung der Ergebnisse mit den anderen Teilvorhaben, Synergieausschöpfung; AP1.3 Erarbeitung von Handlungsempfehlungen und Managementmaßnahmen mit den PP; AP2.1 Treffen Demonstrationsprojekt; AP2.2 Treffen Verbundvorhaben 4; AP2.3 Zwischen- und Abschlussberichte)

Der konstruktive Austausch und die Absprache im Unterverbund FraxPath verliefen aufgrund der sehr guten Kooperation aller Teilvorhaben reibungslos. Drei Zwischenberichte wurden nach Vorlage von TV4.1 erstellt und jeweils von den anderen Teilvorhaben fristgerecht zur Zusammenfassung bei TV4.1 eingereicht. Zahlreiche Probenahmen wurden erfolgreich koordiniert. Untersuchungsmaterial sowie Pilzstämme, die TV4.1 aus Esche isoliert hat, wurden anderen Teilvorhaben zur Verfügung gestellt und dort im Sinne des Arbeitsplans bearbeitet.

Durch regelmäßige Treffen des Unterverbands (online, in Präsenz, FraxForFuture Tagungen) mit Vorstellung des jeweils aktuellen Arbeitsstands wurde eine strukturierte Vernetzung im Unterverbund FraxPath gewährleistet. Dies führte zu einer maximalen Synergieausschöpfung. Ein Beispiel hierfür ist die Pilzstammlieferung an TV4.7 zur Identifikation von Viren in eschenassoziierten Pilzen, die zur Entwicklung von Hypovirulenz in *H. fraxineus* dienen können (u.a. Lutz et al. (2022a, 2022b, 2023c)). TV4.8 wurden *H. fraxineus* Stämme zur Entwicklung von RNAi-gestützter Bekämpfung bereitgestellt (Hohenwarter et al. 2024).

TV4.1 hat zu den Themen „Stammfußnekrosen“ und „Standort“ in der von FraxConnect und FraxSilva erstellten Handlungsempfehlung (Steinhart et al. 2024, in Vorbereitung) maßgeblich beigetragen. Die Praxis-Information 4 zum Eschentriebsterben (Stand: 2016-08) der NW-FVA (<https://www.nw-fva.de/veroeffentlichen/waldschutz>) befindet sich derzeit in Überarbeitung und wird nach Veröffentlichung der FraxForFuture Handlungsempfehlung den forstlichen Stakeholdern zur Verfügung gestellt.

AP3 Monitoringebene 2, Akquise und Auswertung von WZE/ BZE-Daten, Feinkartierung der Intensivbeobachtungsflächen

(Teilweise verortet in Verbundvorhaben 2 (FraxMon), Teilprojekt 1.3)

(AP3.1 Monitoring auf den Intensivmonitoringflächen; AP3.2 Auswertung, Bereitstellung und Vernetzung der Monitoringergebnisse)

Bemerkung: Die unter AP3 zusammengefassten Ergebnisse sind als Querschnittsaufgabe mit FraxMon entstanden und sind daher in Teilen auch im Abschlussbericht von FraxMon enthalten.

Auswertung der WZE-/BZE-Daten

Bei Eschenbeständen, die dem Erreger des Eschentriebsterbens (*H. fraxineus*) ausgesetzt sind, manifestieren sich die Symptome des Eschentriebsterbens über ein bis mehrere Jahre unter anderem in den strukturellen Eigenschaften der Baumkronen (abnehmende Belaubung, transparente Krone, zunehmender Totastanteil). Die WZE erfasst seit 1983 den Kronenzustand von Waldbäumen auf einem Raster über ganz Deutschland, wobei die Rasternetzweite je nach Bundesland und Region zwischen 2 x 2 und 8 x 8 km variiert. Pro Stichprobenpunkt wird ein Kollektiv von 24 Bäumen angesprochen, welches sukzessions- und mortalitätsbedingt einer gewissen Fluktuation unterliegt. Ebenso unterlag die Methodik und die Rasternetzweite der WZE historisch sehr starken Schwankungen - insbesondere in den 80er und 90er Jahren. Aus diesem Grund konnten zur Analyse der räumlich zeitlichen Ausbreitung des Eschentriebsterbens nur die Daten von 2002 bis 2020 genutzt werden. Für die Abhängigkeit von Umweltvariablen wurde nur der Zeitraum von 2010 bis 2020 genutzt, da erst seit 2010 davon auszugehen ist, dass der Erreger in allen Bundesländern präsent war (Enderle et al. 2017a).

Als einzige in Raum und Zeit vergleichbar und regelmäßig aufgenommene Variable wurde die Kronenverlichtung der WZE als Proxy für das Eschentriebsterben genutzt. Dieses Vorgehen ist valide, da auf den Intensivbeobachtungsflächen nachgewiesen werden konnte, dass zwischen Kronenschadstufen und Kronenverlichtung ein sehr enger Zusammenhang besteht (erklärte Varianz von 80%, Fuchs et al. 2024). Die Kronenverlichtung unterschätzt zwar über lange Zeiträume den tatsächlichen Fortschritt des Eschentriebsterbens, da absterbende Bäume in der WZE aus methodischen Gründen durch noch lebende Bäume derselben oder einer anderen Art ersetzt werden. Für überschaubare Zeiträume und insbesondere für kurzfristige Effekte von Jahr zu Jahr eignet sich die Kronenverlichtung jedoch gut als Proxy für das Triebsterben in Eschenkronen.

Um die Verbreitung in Raum und Zeit darzustellen wurde dem Ansatz von Eickenscheidt et al. (2019) gefolgt und ein generalisiertes additives Modell auf Plotebene mit Raum-Zeit-Glättter angepasst, wobei die Daten der Plots mit der Anzahl der dort im jeweiligen Jahr bonitierten Eschen gewichtet wurden. Dabei wurde die Software R (R Core Team 2023) mit dem Package `mgcv` (Wood 2017) genutzt.

```
Kronenverlichtung ~
s(Jahr, k = 10)+
s(Alter, k = 3)+
ti(Jahr, Alter, k = c(10,3))+
s(x-Koordinate, y-Koordinate, k = 30)+
ti(x-Koordinate, y-Koordinate, Jahr, d = c(2,1), k = c(30,10)),
weights = n_Esche,
family = gaussian(link="logit"),
method = "REML")
```

Um die Abhängigkeit der Kronenverlichtung von verschiedenen Standorts-, Bestandes- und Witterungsparametern darzustellen, wurden zunächst umfangreiche Modelle mit sehr vielen möglichen Variablen gefittet, die Schritt für Schritt auf Basis des Akaike Information Criterion rückwärts selektiert wurden. Unter verschiedenen aggregierten Witterungsparametern wurden letztlich nur die Niederschlagssummen des Vorsommers (Juli + August) im Modell belassen, da sämtliche Witterungsparameter des aktuellen Jahres keinen signifikanten Einfluss auf die Kronenverlichtung hatten und andere Vorsommer-Witterungsparameter auf Grund hoher Kovarianz nicht zeitgleich ins Modell genommen wurden:

```
Kronenverlichtung ~
Hydromorphie(ja/nein)+
s(Eschendichte, k = 5)+
s(Niederschlag_JulAug_Vorjahr, k = 7)+
te(Jahr, Alter, k = c(5,5))+
s(x-Koordinate, y-Koordinate, k = 30)+
weights = n_Esche,
family = gaussian(link="logit"),
method = "REML")
```

Die Esche ist seit dem Stichjahr 2002 nur auf 243 WZE-Plots im Probekollektiv vertreten. Dabei ist sie standortsbedingt viel seltener in Nord- und Ostdeutschland als in Süddeutschland (Abb. 3). Dadurch ist die Analyse der Eschentriebsterben-Ausbreitung erschwert und Raum-Zeit-Modelle sind gerade im Norden Deutschlands mit großen Unsicherheiten behaftet. Gut lässt sich jedoch retrospektiv die Abhängigkeit der Kronenverlichtungsentwicklung von Standort, Bestandesalter, Eschendichte und den Witterungsbedingungen im Sommer des Vorjahrs ableiten (Abb. 4).

Die ersten Anzeichen erhöhter Kronenverlichtungswerte zeigten sich nach unserer Auswertung in den späten 2000er Jahren in Mecklenburg-Vorpommern, wo der Erreger auch als erstes in Deutschland nachgewiesen wurde. Ein weiterer räumlicher Hotspot für hohe Kronenverlichtungswerte mit leichter zeitlicher Verzögerung ist der eschenreiche Süden der Bundesrepublik. Dagegen zeigten die Eschen der Mittelgebirgsschwelle bis 2020 nur moderate Kronenverlichtungswerte. Nach der Ausbreitung des Erregers über das gesamte Bundesgebiet (etwa seit 2010) erhöhte sich die Kronenverlichtung der Eschen mit einigen ausgeprägten räumlichen Hotspots und jährlichen Schwankungen (Abb. 3). Auffällig sind z. B. die starke Zunahme der Kronenverlichtung nach dem Jahr 2017, in dem der Hochsommer sehr feucht war, und der leichte Rückgang der Kronenverlichtung nach ausgeprägten Trockenjahren (z. B. 2018). Die ökologische Erklärung dafür ist die Abhängigkeit des Fruktifikations- und Sporulationserfolges des Erregers *H. fraxineus* von feuchten Bedingungen in der Laubstreu im Hochsommer. Dieser Effekt spiegelt sich auch direkt in den erklärenden Umweltvariablen: Sowohl edaphisch bedingt feuchtere Standorte (hydromorphe Böden) als auch feuchtere Witterungsbedingungen im Hochsommer des Vorjahrs (Abb. 4b und 4d) haben einen signifikant positiven Effekt auf die Kronenverlichtung. Unter den Bestandesvariablen, die im WZE-Datensatz verfügbar waren, begünstigte in erster Linie eine höhere Eschendichte (angenähert durch den Anteil von Eschen an der 24-Baum-Stichprobe) die Kronenverlichtung (Abb. 3c). Das Bestandesalter spielt auch eine wesentliche Rolle: Waren junge Eschenbestände zu Beginn des Eschentriebsterbens noch weniger stark verlichtet (wie für Laubbäume im Allgemeinen üblich), nahm ihre Verlichtung über den Zeitraum von 2011-2020 erheblich stärker zu, als bei Altbeständen über ca. 60 Jahren. Dies spiegelt sich im 2D-Effekt des Tensorprodukts aus Bestandesalter und Aufnahmejahr wieder (Abb. 4a).

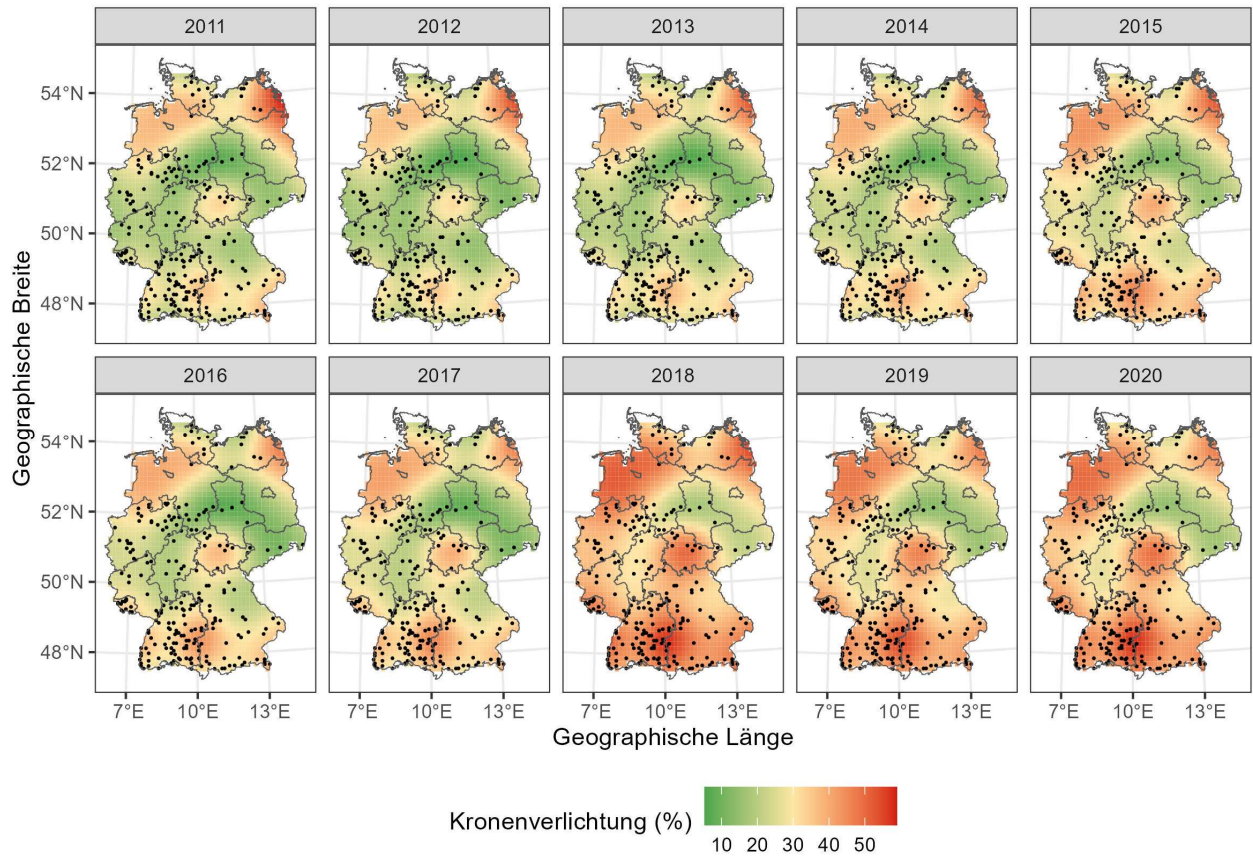


Abbildung 3: Räumlich-zeitliche Darstellung der modellierten Kronenverlichtung auf Basis der Waldzustandserhebung von 2011 bis 2020 für einen fiktiven 60-jährigen Eschenbestand. Grundlage ist ein generalisiertes additives Modell auf Plot-ebene mit Raum-Zeit-Glätter. Auffällig ist der sprunghafte Anstieg der Kronenverlichtung nach dem nassen Sommer 2017. Die schwarzen Punkte repräsentieren die WZE-Datenpunkte mit Esche. Bemerkung: Aufgrund der schlechten Datenlage in Nordwest- und Nordostdeutschland sind hier die Modellvorhersagen mit sehr großen Unsicherheiten behaftet.

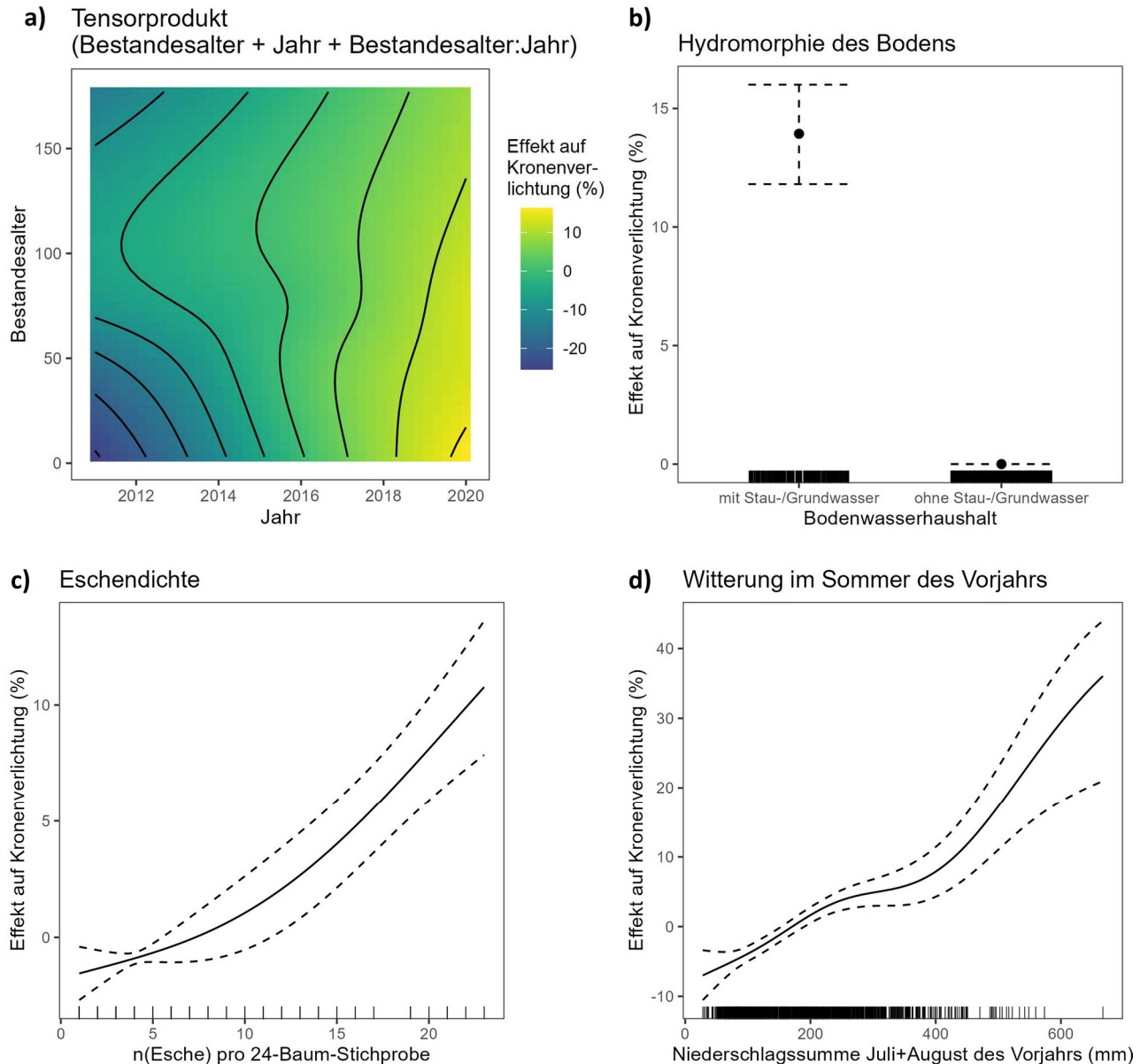


Abbildung 4: Partielle Effekte der meisterklärenden Umwelt- und Bestandesvariablen auf die Kronenverlichtung von Eschen im WZE-Kollektiv anhand eines gemischten generalisierten additiven logit-link-Modells. Alle Effektgrößen sind rücktransformiert auf Prozentpunkte der Kronenverlichtung. Die Einflüsse von a) Bestandesalter, Erhebungsjahr und ihrer Interaktion, b) Grund- und stauwasserbeeinflussten Böden, c) Eschendichte im Bestand und d) der Niederschlagssumme der Sommermonate Juli und August des Vorjahres auf die Kronenverlichtung sind dargestellt. Gestrichelte Linien repräsentieren die 95%-Konfidenzintervalle.

Neben der Kronenverlichtung wären Absterbe- oder Ausfallraten weitere interessante Parameter der WZE, die Rückschlüsse auf die Verbreitung und den Fortschritt des Eschentriebsterbens zuließen. Hier kommt allerdings die dünne Datenlage noch deutlicher zum Tragen, da Absterbeereignisse statistisch viel seltener sind als die regelmäßig erhobene Kronenverlichtung. Grundsätzlich enthält die WZE auch Daten zum Befall und zur Befallsintensität einzelner Pathogene. Allerdings sind die Aufnahmeleitlinien dazu erst im Laufe des letzten Jahrzehnts in allen Bundesländern vereinheitlicht worden. Hinzu kommt, dass sich die eindeutige Zuordnung der Symptomatik zum Erreger bei neu eingeschleppten Pathogenen (so auch bei *H. fraxineus*) erst im Laufe der Jahre klärt und damit auch erst mit Verzögerung bundesweit einheitlich angesprochen werden kann.

Monitoring auf den Intensivbeobachtungsflächen

Für den Gesamtverbund hat TV4.1 die standörtliche Feinkartierung, die Bodenbeprobung und -analytik und das Zusammenstellen der entsprechenden Daten für alle 14 Intensivbeobachtungsflächen übernommen. Diese Arbeiten sind als Schnittstellenaufgabe zu FraxMon (Teilprojekt 1.3) durchgeführt worden. Dabei wurde auf allen Intensivbeobachtungsflächen ein Bodenprofil angelegt, bodenmorphologisch nach KA5 (Ad-hoc-Arbeitsgruppe Boden, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe 2005) beschrieben und bis 2 m Tiefe in sieben Tiefenstufen nach der Anleitung zur zweiten Bodenzustandserhebung im Wald (Wellbrock et al.

2006) beprobt. Davon ausgehend wurde jede Intensivbeobachtungsflächen mit je 10-12 Bodenbohrungen flächig feinkartiert und in mehrere Teilflächen mit vergleichbaren Eigenschaften hinsichtlich Bodenwasserhaushalt, Trophie und Substratlagerung untergliedert. Alle dabei entstandenen Daten wurden aufbereitet und über die FraxForFuture-Datenbank (betreut durch FraxConnect) dem Gesamtverbund zur Verfügung gestellt. Die Daten wurden außerdem genutzt um Zusammenhänge zwischen Eschenzustand und kleinräumigen Standortsunterschieden zu analysieren.

Zur Bonitur der Eschen auf den Intensivbeobachtungsflächen hat TV4.1 mit FraxMon gemeinsam den Boniturschlüssel „Eschentriebsterben – Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen“ (Peters et al. 2021a) entwickelt. Eine der Intensivbeobachtungsflächen (ST1, Huy) wurde darüber hinaus dauerhaft betreut und halbjährlich bonitiert. Eine projektinterne Einweisung in die Bonitur (Boniturworkshop) wurde durchgeführt. Die erhobenen Daten der Intensivbeobachtungsflächen im Zeitraum von Anfang 2021 bis Ende 2023 wurden zusammengeführt, statistisch ausgewertet und mündeten in einer verbundübergreifenden Publikation („Ash dieback assessments on intensive monitoring plots in Germany: Influence of stand, site and time on disease progression“, Fuchs et al.). In dieser wurde zum ersten Mal die Bonitur von Eschen mit dem neuen Boniturschlüssel bei geschulter und systematischer Anwendung überprüft und ausgewertet. Es zeigte sich, dass Eschen im Sommerzustand durchweg vitaler beurteilt werden und dass feine Unterschiede bei der strukturellen Schädigung von Eschenkronen im Winterzustand besser beurteilbar sind. Stammfußnekrosen der Stufe 2 (starke Stammfußnekrosen) erwiesen sich als sehr guter Indikator für unzureichende Standsicherheit: Das Risiko innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2,5 Jahren umzufallen, war für eine Esche mit Stammfußnekrosenstufe 2 etwa fünfmal höher als für eine Esche ohne oder mit schwachen Stammfußnekrosen der Stufe 1. Generell waren Kronenzustand und Stammfußnekrosen hochgradig korreliert.

Über den Beobachtungszeitraum verschlechterte sich der Kronenzustand der Eschen im Allgemeinen, was allerdings hauptsächlich von Mortalitätsereignissen (Kronenstufe 5) getrieben war. Der Zustand der überlebenden Eschenpopulation verbesserte sich hingegen auf sechs von elf Flächen signifikant. Dies könnte man entweder auf einen gewissen Ausleseprozess zurückführen, da die stark geschädigten Eschen mit höherer Wahrscheinlichkeit aus der lebenden Population ausscheiden. Alternativ wären die in Deutschland relativ heißen und trockenen Sommer 2021 und 2022 ein Erklärungsansatz für verbesserte Kronenzustände. Allgemein waren Eschen mit niedrigem Brusthöhendurchmesser (BHD) stärker betroffen als Eschen mit hohem BHD. Räumlich betrachtet war der Eschenzustand innerhalb von Beständen (sowohl Krone als auch Stammfußnekrosen) immer dort schlechter, wo die Böden hydromorphe Merkmale aufwiesen (also stau- oder grundwasserbeeinflusst waren) oder wo die Eschengrundflächendichte lokal höher war. Daraus lässt sich ableiten, dass insbesondere bei flächenhaften, kostenintensiven Wiederanbauversuchen von Eschen, die entweder durch Auslese oder Bekämpfungsverfahren toleranter gegenüber dem Erreger sind, in Zukunft Reinbestände und hydromorphe Bodenverhältnisse vermieden werden sollten.

Insgesamt erklärten die aufgenommenen Standorts- und Bestandesparameter, sowie grundlegende Einzelbaumeigenschaften (BHD, lokale Eschendichte) zusammen mit den zufälligen Effekten auf Flächenlevel nur einen einstelligen Prozentsatz der beobachteten Gesamtvarianz im Eschenzustand. Der zufällige Effekt auf Einzelbaumebene hingegen erklärte nahezu 50 % der Gesamtvarianz. Dies bedeutet, dass Unterschiede zwischen Eschenindividuen, die nicht direkt mit dem BHD zusammenhängen, einen Großteil der Anfälligkeit gegenüber dem Eschentriebsterben erklären. Dies sind vermutlich individuelle Unterschiede in der genetischen Ausstattung und der phänotypischen Plastizität. Bestandes- und Standortparameter sowohl klein- als auch großräumig haben dagegen nur eine untergeordnete Vorhersagekraft für die Symptomatik des Eschentriebsterbens.

Für eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse des Monitorings auf den Intensivmonitoringflächen mit Grafiken und Tabellen sei auf die in Begutachtung befindliche Publikation verwiesen (Fuchs et al.).

AP4 Quantifizierung des Einflusses von Standortfaktoren auf Stammfußnekrosen (TV4.1 NW-FVA)

(AP4.1 Lokalisierung und Auswahl geeigneter Untersuchungsstranekte unter den Intensiv-Monitoringflächen und WZE-/ BZE-Punkten; AP4.2 Kartierung und Ausmaß von Stammfußnekrosen auf den Untersuchungsflächen; AP4.3 Fällung und Probenahme- und Probenkoordination; Verteilung; AP4.4 Vegetationskundliche Aufnahmen entlang der Transekte; AP4.5 Bodenanalyse entlang der Transekte; AP4.6 Standortanalyse und Ableiten von Schwellenwerten, Erstellen von Risikokarten)

Bundesweite Eschenbonitur auf Rasterpunkten der Wald- bzw. Bodenzustandserhebung

Bundesweit wurden von insgesamt 209 begutachteten Flächen der Waldzustandserhebung, zu denen auch Daten aus der Bodenzustandserhebung im Wald vorliegen (8 x 8 km Raster), 109 ausreichend eschenreiche Standorte ausgewählt. Auf diesem Kollektiv wurden die jeweils 20 nächstgelegenen Eschen (> 10 cm Stamm-anlaufdurchmesser) um das BZE-Bodenprofil gemäß dem Boniturschlüssel von Peters et al. (2021a) in den Jahren 2021-2023 bonitiert. Der Datensatz wurde durch die Einbeziehung der Inventurdaten der Intensivbeobachtungsflächen erweitert. Hierbei wurden die Bonituren der 20 räumlich nächstgelegenen Eschen zum Bodenprofil berücksichtigt. Insgesamt wurden 2440 Eschen auf 122 Flächen ausgewertet. Außerdem liefert

die mit der Begutachtung einhergehende Bereisung von Eschenbeständen über das ganze Bundesgebiet auch einen guten Eindruck vom Fortschritt des Eschentriebsterbens in den einzelnen Regionen.

Von den analysierten Eschen waren zum Zeitpunkt der Aufnahme keine Eschenkrone mehr frei von Symptomen des Eschentriebsterbens (Stufe 0). 64% der Eschen wiesen mittelstarke Schäden durch das Eschentriebsterben auf und wurden den Kronenschadstufen 2 oder 3 zugeordnet. 11% aller bonitierten, stehenden Eschen waren bereits abgestorben (Kronenstufe 5; Abb. 5 links). Von den bundesweit untersuchten Eschen hatten insgesamt 63 % Stammfußnekrosen (25% Stammfußnekrosenklasse 1 „schwach“ und 38 % Stammfußnekrosenklasse 2 „stark“; Abb. 5 rechts).

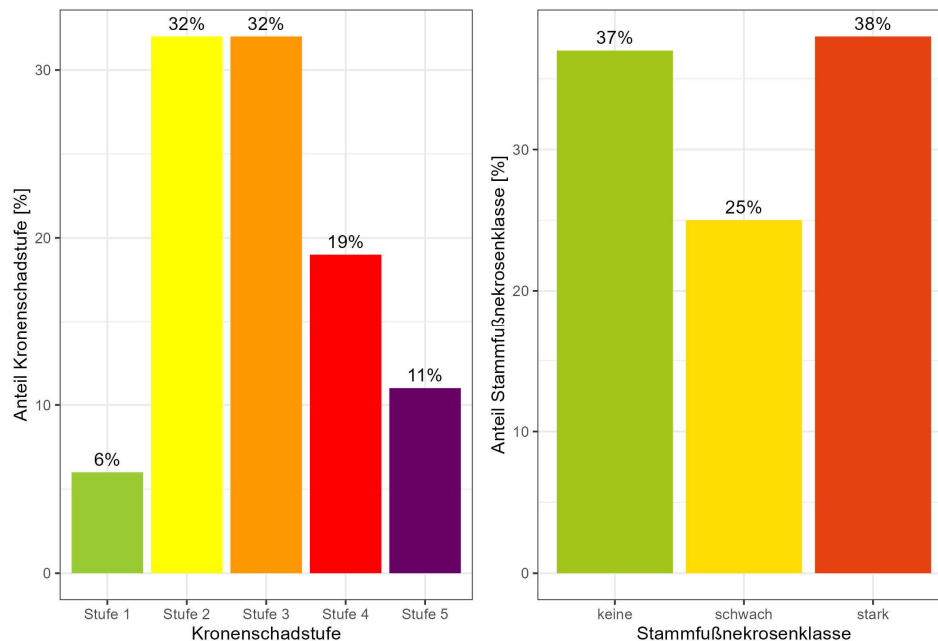


Abbildung 5: Anteile der Kronenschadstufen (von 1 „erste Symptome“ bis 5 „abgestorben“) und Stammfußnekrosenklassen der 2440 Eschen, die bundesweit auf dem Raster der Wald- und Bodenzustandserhebung mit dem Boniturschlüssel nach Peters et al. (2021a) bonitiert wurden.

Die Erfahrungen aus der bundesweiten Begutachtung des Eschenzustandes decken sich mit Auswertung der WZE-/BZE-Daten zur räumlichen Ausbreitung des Eschentriebsterbens (siehe Auswertung WZE/BZE). Im mitteleuropäischen Raum, insbesondere im Bereich der Mittelgebirgsschwelle, wurde im Vergleich zum nördlichen und südlichen Teil Deutschlands tendenziell ein besserer Eschenzustand festgestellt. Dies spiegelte sich nicht nur im diagnostizierten Eschenzustand wieder, sondern auch in den subjektiven Erfahrungen und den Gesprächen mit Revierleitenden bei der Bereisung der jeweiligen Regionen. In Mecklenburg-Vorpommern und Schleswig-Holstein waren viele Eschenbestände schon vollständig zusammengebrochen oder geräumt und es gab kaum noch Eschen-Stangenhölzer. Dies hängt augenscheinlich damit zusammen, dass hier die flächendeckende Verbreitung von *H. fraxineus* schon zu Beginn der 2000er Jahre stattfand, während der Rest der Bundesrepublik erst später betroffen war. Auch die oftmals extrem stark ausgeprägten Stammfußnekrosen an Alteschen ließen darauf schließen, dass hier die Symptome am Stammfuß schon früher als in anderen Bundesländern aufgetreten sind und somit mehr Zeit für den Schadensfortschritt hatten. Insbesondere in Südniedersachsen, Nordhessen, Sachsen-Anhalt waren die meisten Eschenbestände am Stammfuß und in der Krone noch einigermaßen intakt - zumindest wenn es sich nicht um reine Stangenhölzer handelte. Im eschenreicheren Süden von Deutschland war die Schadensfortschritt wiederum allgemein größer und die flächendeckende Nutzung von Eschen (zur Vermeidung von Wertholzverlust) ausgeprägter. Auch wenn hier der Erreger erst 2008/2009 offiziell nachgewiesen wurde, trug vermutlich der höhere Eschenanteil in Wäldern und die geringeren Distanzen zwischen Eschenbeständen zur schnellen Ausbreitung und zum höheren Sporulationserfolg von *H. fraxineus* bei. Der Eschenverlust hätte hier häufiger zu hohen finanziellen Einbußen für Waldbesitzende geführt, dies trug somit vermutlich zur erhöhten vorzeitigen Nutzung bei.

Der allgemeine Eindruck der begutachteten Bestände bestätigte, dass Eschen sowohl aufgrund ihrer ökologischen Nische als auch durch waldbauliche Maßnahmen oft lokal nur sehr begrenzt in Kleingruppen auf azonalen Standorten stocken. Dies waren entweder besonders trocken-flachgründige Kalkstein-Kuppenlagen, lichtbegünstigte Wegrandlagen oder durch Stau-, Grund- oder Hangzugwasser geprägte Mulden, Hangfüße und Auen. Insbesondere Eschenvorkommen auf letzteren, edaphisch feucht- bis nassen Standorten, waren häufig stärker vom Eschentriebsterben in der Krone und von Stammfußnekrosen betroffen. Diese Beobachtung

wurde zuletzt auch regelmäßig in anderen Untersuchungen nachgewiesen (Marcais et al. 2016; Skovsgaard et al. 2017; Enderle et al. 2019; Klesse et al. 2021; Turczański et al. 2021; Grün et al. 2023).

Eine umfassende Auswertung der Verschneidung der erhobenen Daten mit den Informationen der Bodenzustandserhebung im Wald wurde durchgeführt, um standortkundlich begünstigende Bedingungen für das Eschentriebsterben herauszustellen. Eschen, die auf hydromorphen Standorten (mit Stau- oder Grundwassereinfluss) wuchsen, wiesen sowohl in der Krone als auch im Stammfußbereich größere Schäden auf (Abb. 6). Besonders auffällig war der Anteil starker Schäden auf nassen Standorten, darunter vier Niedermoore und ein stark grundwasserbeeinflusster Schatthangmuldenstandort. Auf nassen Standorten sollte jedoch der Einfluss erschwerter forstwirtschaftlicher Bedingungen berücksichtigt werden: Es ist anzunehmen, dass die Entnahme von besonders geschädigten Bäumen aufgrund des erheblichen Aufwands unterbleibt. Dadurch könnte der Anteil stark geschädigter Eschen im Vergleich zu forstwirtschaftlich stärker gepflegten Flächen noch größer erscheinen. Neben dem Einfluss des Wasserhaushalts konnte auch ein leichter Effekt des pH-Wertes im Oberboden auf den Eschenzustand festgestellt werden. Genau wie Turczański et al. (2019; 2021) schon in Polen festgestellt haben, hatte tendenziell höhere pH-Werte des Bodens (neutral bis leicht alkalisch) einen negativen Effekt auf den Kronenzustand, allerdings keinen Effekt auf Stammfußnekrosen. Im Gegensatz zu Turczański et al. (2019) war hier allerdings der Effekt des pH-Werts der Humusaufgabe stärker als der des pH-Werts des oberen Mineralbodens.

Für alle weiteren getesteten Parameter konnte kein Zusammenhang zum Eschentriebsterben nachgewiesen werden. Die Trophiestufen zeigten keinen erkennbaren Einfluss auf das Schadgeschehen. Lediglich Eschen auf Standorten der höchsten Trophiestufe "karbonat-eutroph" wiesen mit höherer Wahrscheinlichkeit verminderte Kronenschäden auf. Dies könnte auf eine generell höhere Wahrscheinlichkeit für vitalere Eschen auf besonders gut nährstoffversorgten Standorten zurückzuführen sein. Im Gegensatz zur Witterung (siehe Kapitel „Auswertung der WZE-/BZE-Daten“) hatte die klimatische Wasserbilanz in verschiedenen Aggregationszeit-räumen (30-jähriges Mittel, 30-jähriges Mittel in der Vegetationsperiode, Sommermonate fünf Jahre vor Berei-sung) keinen Effekt auf den Eschenzustand. Die nutzbare Feldkapazität (nFK, Wasserspeicherefähigkeit des Bodens bis 90 cm Tiefe) hatte ebenfalls keinen Effekt. Eine Veröffentlichung der Ergebnisse aus der bundesweiten Eschenbonitur auf WZE-/BZE-Punkten ist für das Special Issue im Journal of Plant Diseases and Protection in Vorbereitung (Grün et al. 2024, in Vorbereitung).

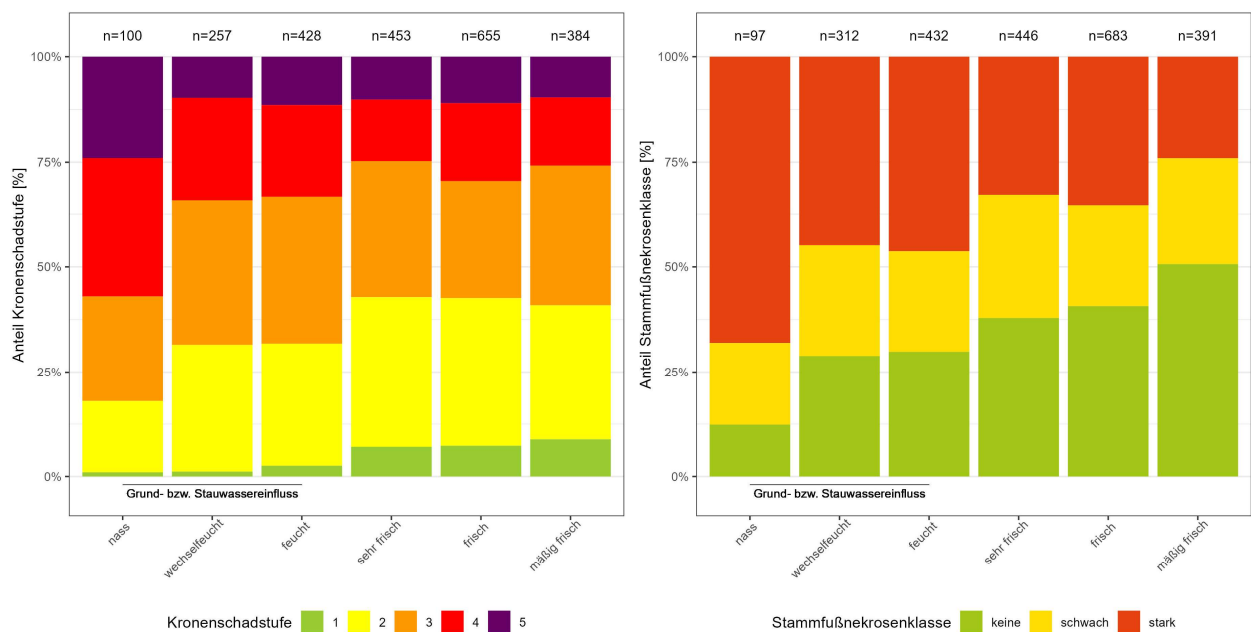


Abbildung 6: Anteile der Kronenschadstufen (von 1 „erste Symptome“ bis 5 „abgestorben“) und Stammfußnekrosenklassen je nach Geländewasserhaushaltsstufe unter den 2440 Eschen, die auf dem Raster der Wald- und Bodenzustandserhebung mit dem Boniturschlüssel nach Peters et al. (2021a) bonitiert wurden.

FraxCollar-Intensivflächen

Die FraxCollar-Intensivflächen wurden angelegt, um den Zusammenhang der Ausprägung von Stammfußnekrosen innerhalb von Beständen mit kleinräumig standörtlichen Unterschieden zu untersuchen. Außerdem wurden von diesem Flächenkollektiv Eschenstammfüße entnommen und im Labor systematisch mykologisch untersucht. Die Intensivbeobachtungsflächen, welche ursprünglich dafür vorgesehen waren, waren für diese Untersuchungen nicht geeignet. Der intensive Eingriff der Bodenprobennahme und die Entnahme von Eschenstammfüßen hätten das Eschenmonitoring auf den Intensivbeobachtungsflächen beeinträchtigt. Zudem waren

dort keine Eschen im Stangenholzalter vorhanden, welche für die mykologische Beprobung der Stammfüße aus logistischen Gründen notwendig gewesen wären. Außerdem waren die Intensivbeobachtungsflächen teilweise standörtlich und auch bezüglich des Eschenzustandes sehr homogen, was das Vorhaben erschwert hätte, kleinräumige, standortsspezifische Unterschiede zu untersuchen.

Die FraxCollar-Intensivflächen wurden basierend auf Forsteinrichtungsdaten lokalisiert. Dabei war entscheidend, dass der Grundflächenanteil von Eschen mit einem Brusthöhendurchmesser (BHD) zwischen sieben und 20 cm mindestens 20 % betrug und die Bestände zudem vorwiegend jünger als 60 Jahre waren. Zudem sollten die Flächen mehrere geologische Substratgruppen abdecken, die für Eschenvorkommen typisch sind (zum Beispiel Basalt, Kalkstein und Lösslehm). Klimatisch und höhenzonal sollten sich die Flächen nicht in den Extremen befinden, damit die Bodenbedingungen eine ausschlaggebende Einflussgröße darstellen. Dementsprechend wurden fünf Flächen in der Mitte Deutschlands entlang der Mittelgebirgsschwelle ausgewählt (Abb. 7, Tab. 1).

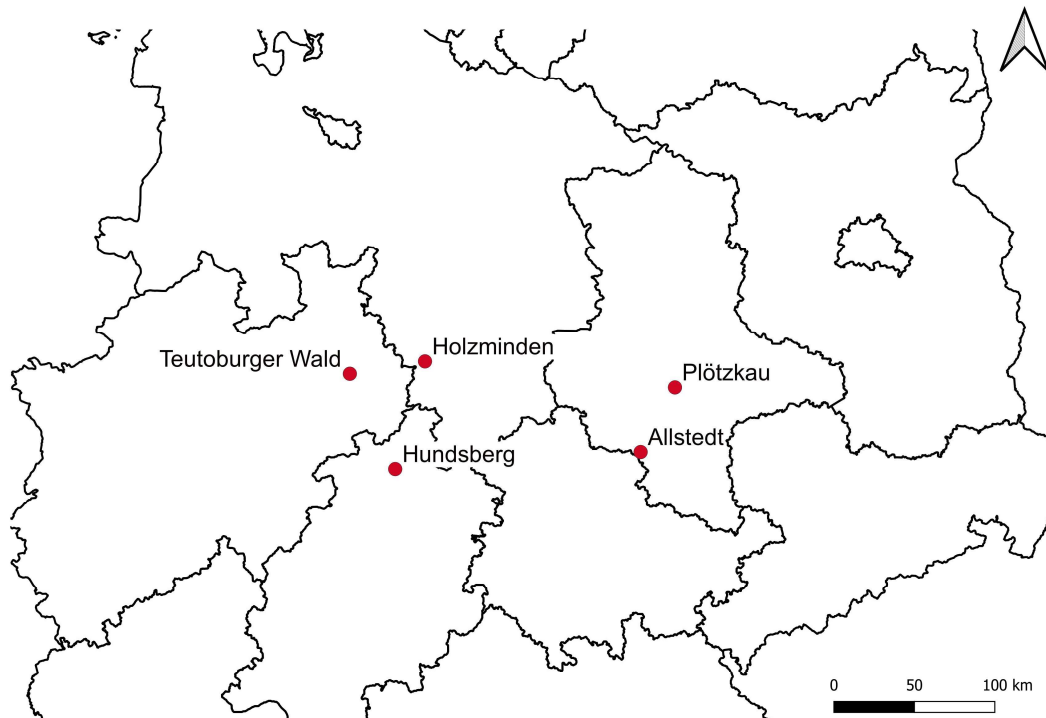


Abbildung 7: Fünf FraxCollar-Intensivflächen entlang der deutschen Mittelgebirgsschwelle (QGIS Development Team. (2022). QGIS Geographic Information System. Version 3.26.).

Die fünf Flächen wurden mit dem Bohrstock standörtlich vorkartiert und danach in insgesamt 14 Teilflächen von jeweils ca. 0.2 - 0.5 ha aufgeteilt. Die Teilflächen sollten dabei bezüglich der Bestandessituation, des Ausgangssubstrats und der Reliefposition möglichst homogen sein. Auf allen Flächen wurden sämtliche Eschen (insgesamt 2265 Bäume) vollständig mithilfe des Boniturschlüssels (Peters et al. 2021a) bonitiert. Danach wurden innerhalb der Teilflächen jeweils vier Probekreise mit 10 m Radius ausgewiesen, von denen jeweils zwei Probekreise möglichst gesunde Eschenstammfüße enthielten und jeweils zwei Probekreise möglichst viele Eschen mit fortgeschrittenen Stammfußnekrosen aufwiesen („bessere“ und „schlechtere“ Probekreise, Abb. 7 und Abb. 8). Die unterschiedliche Symptomintensität der Stammfußnekrosen zwischen den Probekreisen wurde im Anschluss mit einem gemischten ordinalen Regressionsmodell mit logistischer Linkfunktion getestet, wobei die dreistufige abhängige Variable (Stammfußnekrosen der Stufe 0, 1 und 2 nach Boniturschlüssel) von der Ausprägung des Probekreises („besser“ oder „schlechter“) hoch signifikant ($p < 0.0001$) abhing. Auf dieser Grundlage wurde nachfolgend untersucht, ob sich verschiedene physikalische und chemische Parameter des Oberbodens zwischen den „besseren“ und „schlechteren“ Probekreisen innerhalb von Teilflächen systematisch unterscheiden. Dazu wurde im Zentrum jedes Probekreises ein Bodenprofil bis 60 cm Tiefe angelegt, morphologisch beschrieben und in jeweils vier Tiefenstufen (0-5, 5-10, 10-30 und 30-60 cm) nach der Arbeitsanleitung zur zweiten Bodenzustandserhebung im Wald (Wellbrock et al. 2006) beprobt und analysiert. Pro Teilfläche wurde eines der Bodenprofile bis zu einer Tiefe von 200 cm angelegt, beschrieben und beprobt, um mögliche, oberflächlich nicht sichtbare Unterschiede oder Besonderheiten in tieferen Bodenschichten (z. B. Substratwechsel, Grundwasserstand) auszuschließen.

Tabelle 1: Grundlegende Standorts- und Bestandesinformationen der FraxCollar-Intensivflächen.

Fläche	Exposition, Neigung, Höhe über NN	Klima (Niederschlag, Temperatur; 1991-2020)	Ausgangsgestein, Substrat, Bodentypen	Bestandesalter und -struktur	Mischbaumarten	Teilflächen
Allstedt (AL)	S-SW; 4-17°; ca. 200 m	subkontinental, 550 mm; 9,3 °C	schwache Lössdecke über unterem Buntsandstein (schwach carbonatisch), Parabraunerden	Mischlaubwald Pflanzung, 31-40 Jahre	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Acer platanoides</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Tilia cordata</i>	Zwei Teilflächen (Oberhang und Mittelhang)
Holzmin-den (HM)	W; 15-25°; 230 - 280 m	subatlantisch, ca. 850 mm; 8,7 °C	Muschelkalkfließerde über oberem Buntsandstein (Röt), Rendzina, Terra-Fusca	Mischlaubwald, überwiegend Pflanzung, 35-45 Jahre, einzelne Überhälter	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Ulmus glabra</i> , <i>Tilia platyphyllos</i>	Drei Teilflächen (Oberhang, Hangverflachung und Mittelhang)
Hundsberg (HB)	O-NO; 6°-12°; 440 - 450 m	schwach subatlantisch, ca. 800 mm; 7,9 °C	Lössbeeinflusste Basaltverwitterungs-Fließerde, Braunerden, Parabraunerden	Mischlaubwald, überwiegend Pflanzung, 31-40 Jahre	<i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Fagus sylvatica</i>	Drei Teilflächen (Mittelhang, Hangverflachung und Unterhang)
Plötzkau (PL)	Flach; 0°; 79 m	subkontinental, 500 mm; 10,1 °C	150 cm mächtiger, carbonatischer Hochflutlehm über carbonatischem Terrassenkies, kaum grundwasserbeeinflusst, Außenvega	Mischlaubwald, Pflanzung, einschichtig, 39-43 Jahre	<i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Ulmus glabra</i> , <i>Quercus robur</i>	Zwei Teilflächen (leicht unterschiedlich mächtiger Hochflutlehm (130 cm vs. 180 cm))
Teutoburger Wald (TT)	S-W-N; 2° - 27°; 274 - 316 m	subatlantisch, ca. 900 mm; 9,7 °C	Lösslehm über Jura-Kalksteinverwitterung, Braunerden, Parabraunerden	Mischlaubwald Pflanzung, 40-80 Jahre	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Prunus avium</i>	Vier Teilflächen (Kolluvialer Hangfuß, Südhang, Kullinationslage, Nordoberhang)

Die bodenphysikalischen und -chemischen Parameter wurden über verschiedene Tiefenstufen aggregiert (je nach Parameter z. B. von 0-5, 0-10, 0-30 und 0-60, teilweise auch 30-60 cm; Tab. 2) und zunächst mit Boxplots als Gegenüberstellung von „besseren“ und „schlechteren“ Probekreisen visualisiert (Abb. 10 und Abb. 11). Dabei wurden nicht absolute Werte, sondern jeweils Differenzen zum Teilflächenmittel jedes Parameters betrachtet, um dem Umstand Rechnung zu tragen, dass viele Parameter sich grundsätzlich stärker zwischen Flächen oder Teilflächen als zwischen Probekreisen innerhalb von Teilflächen unterscheiden. Dabei ließ sich bereits visuell feststellen, dass viele Parameter kaum einen nennenswerten Einfluss auf die Ausprägung von Stammfußnekrosen haben. Ausschließlich der pH-Wert in verschiedenen Tiefenaggregationen unterschied sich tendenziell zwischen „besseren“ und „schlechteren“ Probekreisen. Lineare, gemischte Modelle wurden für jeden Bodenparameter angepasst, um die Unterschiede zwischen „besseren“ und „schlechteren“ Probekreisen statistisch zu prüfen. Dabei wurde die Flächen- und Teilflächenzugehörigkeit der Probekreise als genaueste, zufällige Effekte berücksichtigt, um den Unterschieden zwischen Flächen und Teilflächen Rechnung zu tragen (Tab. 2). Hier bestätigten sich die Ergebnisse insofern, dass die tendenziell „schlechteren“ und „besseren“ einzig auf den Erwartungswert des pH-Werts in den Tiefenaggregationen (00 – 05 cm, 10 – 30 cm) signifikanten Einfluss zeigten. Auf alle anderen getesteten Parameter zeigte die Unterscheidung zwischen „schlechteren“ und „besseren“ Bereichen keinen Einfluss (Tab. 2).

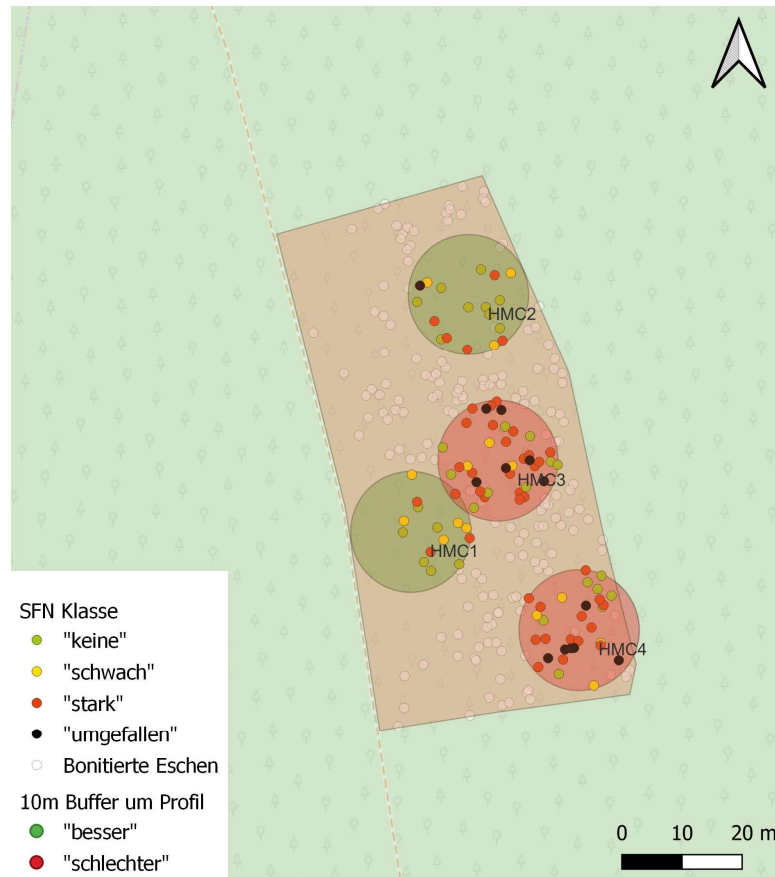


Abbildung 8: Beispiel für eine von insgesamt 14 Teilflächen der FraxCollar-Intensivflächen (hier Holzminden, Teilfläche C). Die farbigen Punkte repräsentieren Eschen in den Probekreisen (10 m Radius um die Bodenprofile) und deren Stammfußschadigungsgrad (SFN Klasse) (QGIS Geographic Information System. Version 3.26).

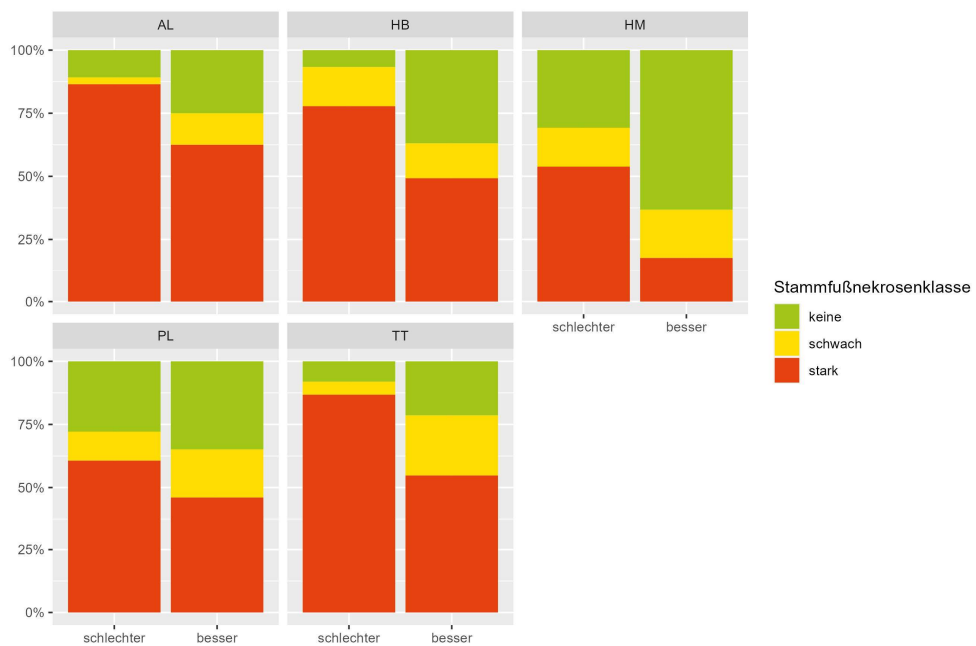


Abbildung 9: Anteile der Stammfußnekrosenklassen jeder FraxCollar-Intensivfläche (AL = Allstedt, HB = Hundsberg, HM = Holzminden, PL = Plötzkau, TT = Teutoburger Wald) aufgeteilt in Probekreise mit allgemein schlechterem und besserem Eschenzustand.

Tabelle 2: Effektgröße und -richtung von bodenphysikalischen und -chemischen Parametern basierend auf linearen, gemischten Modellen mit zufälligen Effekten für in Flächen genesteten Teilflächen. Die p-Werte, welche <0,05 sind, sind in fett dargestellt.

Kenngröße	Bodensegment [cm unter Mineral- bodenoberfläche]	geschätzte Effektgröße in der jeweiligen Einheit (Abweichung für „besser“)	p-Wert
<i>Bodenphysikalische Kenngrößen</i>			
Trockenrohdichte des Feinbodens TRDF (g/cm ³)	00 - 60	0,012	0,716
Grobbodenanteil GBA (>2mm, Vol%)	00 - 60	-2,296	0,614
nutzbare Feldkapazität nFK (mm)	00 - 60	-1,648	0,837
Sandgehalt (g/kg)	00 - 10	0,677	0,534
Sandgehalt (g/kg)	00 - 30	0,587	0,589
Sandgehalt (g/kg)	30 - 60	0,217	0,939
Schluffgehalt (g/kg)	00 - 10	0,677	0,534
Schluffgehalt (g/kg)	00 - 30	-0,432	0,777
Schluffgehalt (g/kg)	30 - 60	-2,524	0,434
Tongehalt (g/kg)	00 - 10	0,493	0,757
Tongehalt (g/kg)	00 - 30	-0,155	0,926
Tongehalt (g/kg)	30 - 60	1,943	0,382
<i>Bodenchemische Kenngrößen</i>			
Kationenaustauschkap. AK (kmol(c)/ha)	00 - 60	-35,470	0,783
Basensättigung (%)	00 - 60	-1,013	0,822
pH-Wert (H ₂ O)	30 - 60	0,4274	0,338
pH-Wert (H ₂ O)	10 - 30	-0,374	0,031
pH-Wert (H ₂ O)	05 - 10	-0,165	0,340
pH-Wert (H ₂ O)	00 - 05	-0,296	0,025
Kohlenstoffgehalt C _{org} (g/kg)	00 - 30	-1,861	0,592
Kohlenstoffgehalt C _{org} (g/kg)	00 - 10	1,870	0,642
Kohlenstoffgehalt C _{org} (g/kg)	00 - 05	4,626	0,385
C/N Verhältnis	00 - 05	0,435	0,293
C/N Verhältnis	Humusauflage	-1,813	0,174
Calciumvorrat (kg/ha)	00 - 60	-1.624,947	0,451
Kaliumvorrat (kg/ha)	00 - 60	354,735	0,432
Magnesiumvorrat (kg/ha)	00 - 60	-62,842	0,530
Phosphorvorrat (kg/ha)	00 - 60	7,526	0,982
Schwefelvorrat (kg/ha)	00 - 60	-23,530	0,798
Blei (kg/ha)	00 - 30	16,015	0,215
Kupfer (kg/ha)	00 - 30	5,963	0,620
Nickel (kg/ha)	00 - 30	8,444	0,385

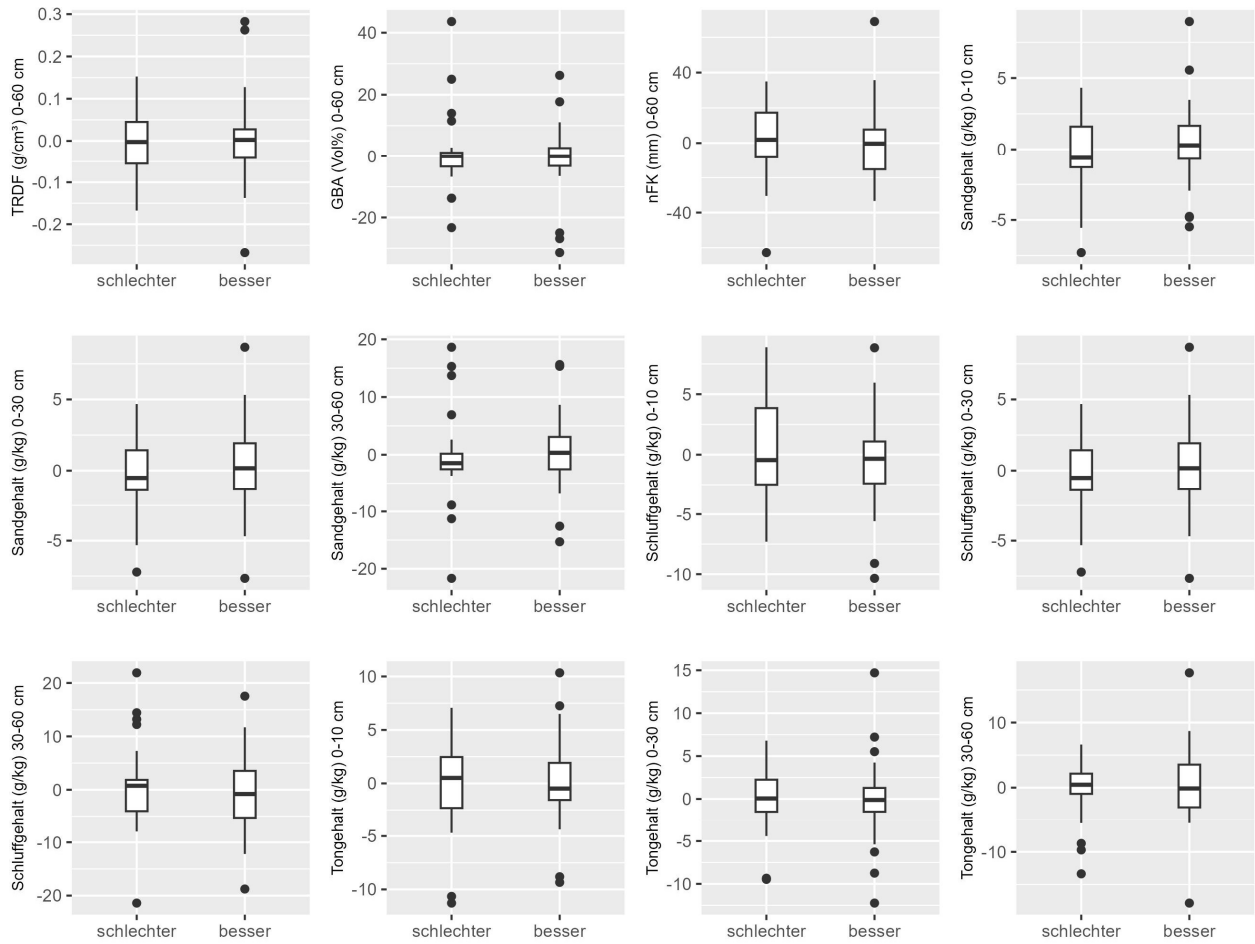


Abbildung 10: Boxplots der Differenzen der bodenphysikalischen Parameter vom jeweiligen Teilflächenmittelwert über alle Teilflächen hinweg. Die Gruppierung erfolgt nach Probekreisen mit schlechterem und besserem Eschenstammfußzustand. Für statistische Kennwerte zu der Gegenüberstellung: Siehe Tabelle 2. TRDF: Trockenrohdichte des Feinbodens, GBA: Grobbodenanteil (>2 mm), nFK: nutzbare Feldkapazität.

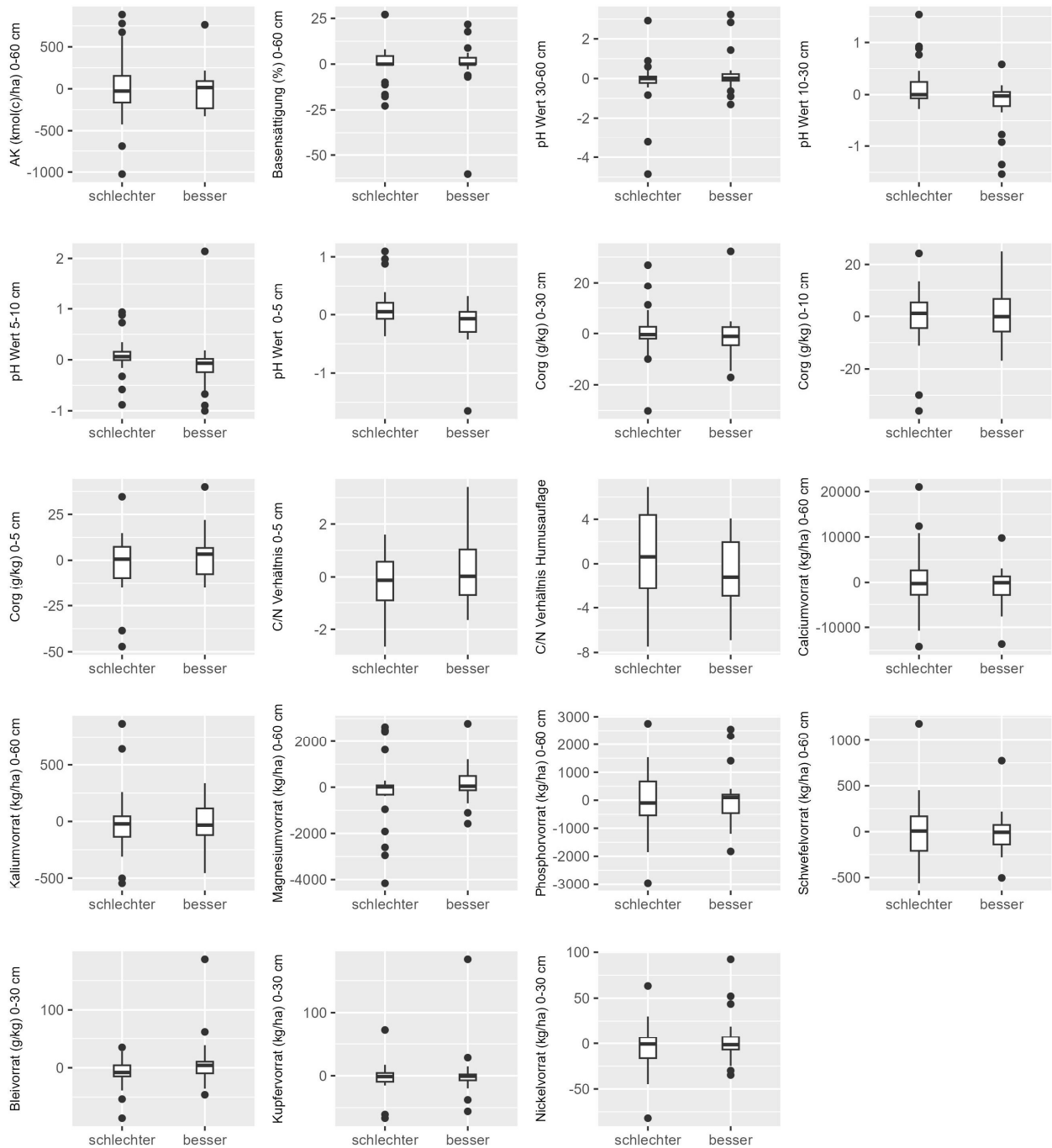


Abbildung 11: Boxplots der Differenzen der bodenchemischen Parameter vom jeweiligen Teilflächenmittelwert über alle Teilflächen hinweg. Gruppierung nach Probekreisen mit schlechterem und besserem Eschenstammfußzustand. Für statistische Kennwerte zu der Gegenüberstellung: Siehe Tabelle 2. AK: Kationenaustauschkapazität, C_{org} : organischer Kohlenstoff.

Bodenphysikalische Kenngrößen

Grundlegende bodenphysikalische Kennwerte wie die Trockenrohdichte des Feinbodens (TRD), der Grobbodenanteil (GBA, = Skelettgehalt), Schluff- und Tonfraktionen hatten keinen nennenswerten Einfluss auf Stammfußnekrosen (Tab. 2). Naheliegender wäre ein Einfluss dieser Größen auch nur mittelbar über die Fähigkeit des Bodens, Wasser zu speichern oder zu stauen und damit das Feuchtigkeitsmilieu in der Streuschicht zu beeinflussen. Dies setzt voraus, dass feuchtere Bedingungen den Fruktifikationserfolg des Pilzes und die Vitalität von Sekundärschaderregern begünstigen. Bei hohen Trockenrohdichten und Tongehalten in mittleren Tiefenstufen kann von stauenden Eigenschaften ausgegangen werden. Dagegen bedingen hohe Schluffgehalte, geringe Lagerungsdichten und geringe Grobbodenanteile eine hohe Wasserspeicherfähigkeit (nutzbare Feldkapazität nFK). Um letztere Eigenschaft gezielter abzubilden wurde aus den physikalischen Kennwerten und dem organischen Kohlenstoffgehalt nach Dehner et al. (2015) die nFK abgeleitet. Allerdings zeigte auch die nFK keine Unterschiede zwischen schlechteren und besseren Probekreisen.

Viele Studien zeigen im Allgemeinen einen Zusammenhang zwischen feuchteren Standortsbedingungen und stärkeren Symptomen am Stammfuß von Eschen (Marcais et al. 2016; Skovsgaard et al. 2017; Enderle et al. 2019; Klesse et al. 2021; Turczański et al. 2021). Deren Ergebnisse beziehen sich jedoch meist auf großräumigere Unterschiede zwischen klimatisch, relief- und hydrologiebedingten Unterschieden zwischen Standorten. In unserer Studie sollte gezielt die Frage untersucht werden, ob auch kleinräumige Unterschiede in der Wasserspeicherfähigkeit des Bodens innerhalb von Beständen eine unterschiedliche Schadentwicklung erklären können. Dies scheint nicht der Fall zu sein. Ebenso legen auch die Ergebnisse der bundesweiten Eschenbonitur auf den WZE-Flächen keinen Einfluss der nFK, sondern nur einen Einfluss von Grund- und Stauwasser nahe (siehe Kapitel AP4: „Bundesweite Eschenbonitur auf Rasterpunkten der Wald- bzw. Bodenzustandserhebung“).

Bodenchemische Kenngrößen

Die bodenchemischen Kenngrößen, die die Nährstoffausstattung von Waldböden beschreiben, zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die kleinräumigen Unterschiede der Stammfußnekrosen innerhalb der Teilflächen. Weder die Kationenaustauschkapazität, bestehend aus der Summe der austauschbaren Kationen (Calcium, Magnesium, Kalium, Natrium, Aluminium, Eisen, Mangan) und Protonen, noch die Basensättigung (Anteil basisch wirkender Kationen an der Kationenaustauschkapazität) oder die Vorräte der wichtigsten Nährstoffelemente (Calcium, Kalium, Magnesium, Stickstoff, Phosphor und Schwefel) konnten Unterschiede im Eschenzustand erklären. Auch der Vergleich der „besseren“ und „schlechteren“ Probekreise auf der Ebene der FraxCollar-Intensivflächen zeigte keinen einheitlichen Trend bezüglich der Vorräte und Anteile austauschbarer Kationen.

Turczański et al. (2019; 2021) bringen hohe pH-Werte und hohe Humusgehalte im oberen Mineralboden mit stärkerer Schädigung von Eschen in Verbindung. Bezüglich des pH-Wertes konnten wir diesen Zusammenhang bestätigen: Als einzige chemische Kenngröße waren die pH(H₂O)-Werte der oberen 30 cm des Mineralbodens signifikant höher in den stärker geschädigten Probekreisen. Eine mögliche Erklärung wäre entweder die direkt hemmende Wirkung von saureren Verhältnissen auf das Wachstum oder die Fruktifikation von *H. fraxineus* oder die indirekte Wirkung über verlangsamte Zersetzung der Blatthachis von Eschen. Eine verlangsamte Humuszersetzung scheint aber eher nicht die Ursache zu sein, da andere Parameter, die indikativ dafür wären, sich nicht zwischen schlechteren und besseren Probekreisen unterschieden (C/N-Verhältnis in der Humusaufgabe, Gehalte organischen Kohlenstoffs im oberen Mineralboden).

Die Gehalte sämtlicher Schwermetalle (exemplarisch sind hier Blei, Kupfer und Nickel dargestellt; Tab. 2) unterschieden sich nicht signifikant zwischen schlechteren und besseren Probekreisen.

Ein Fazit zum Zusammenhang zwischen Standortfaktoren und den Symptomen des Eschentriebsterbens ist am Ende des folgenden Kapitels (AP5.5: Auswertung und Vernetzung der Ergebnisse zu Stammfußnekrosen und Standortfaktoren) eingegliedert.

AP5 Ätiologie von Stammfußnekrosen sowie Diversität und Populationsstruktur von assoziierten Pilzen (TV4.1 NW-FVA)

(AP5.1 Isolation von Pilzen im Bereich der oberirdischen Stammfußnekrose; AP5.2 DNA- und morphologisch gestützte Identifikation von *H. fraxineus* und anderer assoziierter Pilzen der Stammfußnekrosen; AP5.3 Zulieferungen von Eschenproben an andere Projektpartner; AP5.4 Zulieferungen isolierter Pilzstämmen an andere Projektpartner; AP5.5 Auswertung und Vernetzung der Ergebnisse zu Stammfußnekrosen und Standortfaktoren)

Bei 30 Probenahmen an 26 Standorten in Deutschland (in den Bundesländern ST, NI, HE, SN, RP, TH, NW, BW, SH) wurden 145 verschiedene Proben von *Fraxinus excelsior* (Gemeine Esche) gewonnen. Darunter befanden sich Blätter, Zweige, Fruchtkörper, Blattspindeln, Wasserreiser und Stammfüße (104), die in TV4.1 im Labor bearbeitet wurden. Zusätzlich wurde Material der beprobten Eschen anderen Teilvorhaben innerhalb von FraxPath und von FraxForFuture für weitere Analysen zur Verfügung gestellt. Von TV4.1 wurden im Labor

insgesamt 9740 mit Esche assoziierte Gewebeprobe auf Nährmedium inkubiert und die daraus ausgewachsenen filamentösen Pilze isoliert. Dabei kam es zu 6233 pilzlichen Auswüchsen, die 268 Morphotypen (Pilzarten) zugeordnet werden konnten.

Von den 104 erworbenen Eschenstammfüßen wurden 9390 Gewebeprobe überwiegend aus symptomatischem Holz inkubiert, um die assoziierten Pilze zu ermitteln. Insgesamt wurden 5851 pilzliche Auswüchse verzeichnet und daraus 261 verschiedene Morphotypen (Pilzarten) isoliert. Der Eschentriebsterben-Erreger *H. fraxineus* wurde insgesamt 497 mal isoliert, hatte eine Frequenz (Anteil der Isololate bezogen auf alle Isolate) von 15,4 % und kam in 56 von 104 Eschenstammfüßen (davon waren neun allerdings Referenzproben ohne nekrotisches Gewebe) vor. Am Beispiel eines Eschenmischbestandes am Standort Holzminden (Niedersachsen) wurden in Zusammenarbeit mit FraxGen TV3.1 die dort isolierten *H. fraxineus* Stämme aus zehn Eschen mittels Mikrosatellitenanalyse genotypisiert (Peters et al. 2024). Es wurde festgestellt, dass in fortgeschrittenen Stammfußnekrosen in der Regel mehrere Genotypen des Schaderregers beteiligt sind. In den zehn untersuchten Stammfußnekrosen befanden sich insgesamt 26 unterschiedliche Multilokus-Genotypen des Eschentriebsterben-Erregers. Waren mehrere Multilokus-Genotypen in einer Stammfußnekrose vorhanden, so dominierte in der Regel einer der Genotypen. Dies unterstützt die Annahme, dass die Primärinfektion des Stammfußes meist durch *H. fraxineus* geschieht. Eine Abhängigkeit der Anzahl von verschiedenen Multilokus-Genotypen von der Größe der Stammfußnekrose bzw. dem Schädigungsgrad konnte nicht festgestellt werden.

Aus den Stammfußnekrosen (Abb. 12) wurden hauptsächlich Ascomycota (77,8% bei 162 Morphotypen aus 58 Eschenstammfüßen, seltener Basidiomycota mit 22,2% isoliert, Peters et al. (2023)). Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Untersuchungen (Enderle et al. 2017b; Langer 2017; Meyn et al. 2019). Neben *H. fraxineus* kamen, bezogen auf die Frequenz, am häufigsten folgende Arten vor: *Diplodia fraxini* (18,8 %), *Armillaria* spp. (13,5 %), *Trichoderma* sp. (11,3 %), *Neonectria punicea* (5,5 %), *Diaporthe* cf. *eres* (3,5 %), *Paracucurbitaria* sp. (3,3 %) und *Fusarium* cf. *lateritium* (2,8 %). Über die Hälfte der Morphotypen (56,3 %) machten Einzelisolate aus. Bezogen auf den Anteil an allen Stammfußproben mit Stammfußnekrose (n = 95) kam *Diplodia fraxini* am häufigsten, in 82 % der beprobten Stammfußnekrosen vor. Folgende Pilzarten waren ebenfalls sehr häufig mit den nekrotischen Stammfußbereichen assoziiert: *Hymenoscyphus fraxineus* (59 %), *Trichoderma* sp. (58 %), *Armillaria* spp. (58 %), *Paracucurbitaria* sp. (42 %), *Fusarium* cf. *lateritium* (41 %), *Diaporthe* cf. *eres* (40 %) und *Neonectria punicea* (35 %). Literaturauswertungen und eigene Beobachtungen lassen darauf schließen, dass *Diplodia fraxini* und Hallimasch-Arten (*Armillaria* spp.) den Schadensfortschritt einer Stammfußnekrose verstärken. Dabei ist *D. fraxini* vor dem Eschentriebsterben nicht als häufiger Schaderreger von Eschenholz in Erscheinung getreten (Kowalski et al. 2016). Die festgestellten Hallimasch-Arten, hauptsächlich *Armillaria gallica* und *A. cepistipes*, seltener *A. mellea*, haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Reduktion der Stand- und Verkehrssicherheit. Neben diesen Holzfäuleerregern wurden weitere Holzfäulepilze in den Stammfußnekrosen festgestellt, die ebenfalls die Stand- und Verkehrssicherheit beeinträchtigen. Dazu gehörten zum Beispiel Weißfäulepilze wie: *Coprinellus micaceus*, *C. disseminatus*, *Trametes versicolor* und *Bjerkandera adusta* (siehe Peters et al. (2023) und Peters et al. (2024)). Zudem wurden einige Pilzarten erstmals für Gemeine Esche beschrieben (siehe Peters et al. (2023) und Peters et al. (2024)), zum Beispiel *Cryptostroma corticale* (Erreger der Rußrindenkrankheit des Ahorns) oder *Diplodia sapinea* (Erreger des Kiefern- oder Diplodia-Triebsterbens von Koniferen). Der erstmals an Esche festgestellte Schaderreger *C. corticale* ist als Opportunist an geschädigten Eschen im Zuge des Eschentriebsterbens einzustufen, da er in ersten Pathogenitätstests an *F. excelsior* zu keinen Schäden führte (Langer et al. 2023). Außerdem wurde im Rahmen der Untersuchungen *Vexillomyces fraxinicola* PETERS LANGER BIEN 2022, eine neue Schlauchpilzart, erstmals entdeckt und neu beschrieben (Tan et al. 2022).

Sowohl frisch im Projekt isolierte *H. fraxineus* Stämme, als auch entsprechende Stämme der NW-FVA Stammsammlung wurden anderen Teilvorhaben zur Verfügung gestellt. Unter anderem erhielt TV4.4 eine sogenannte Mock-Community mit eschenassoziierten Pilzen zur Eichung der MinION Oxford Nanopore Plattform für ein „Next Generation Sequencing“ von Eschenfeinwurzeln. Diese Mock-Community umfasste repräsentative, häufig in Eschenstammfüßen vorkommende Pilze. TV4.6 wurden Stämme für Pathogenitätstests zur Ermittlung eines Pathogen-Referenzstamms zur Verfügung gestellt. TV4.7 untersuchte eschenassoziierte Pilze der NW-FVA Stammsammlung zur Identifikation von Viren, die zur Entwicklung von Hypovirulenz in *H. fraxineus* dienen können (Lutz et al. 2022b; Lutz et al. 2022a; Lutz et al. 2023, Lutz et al. Preprints 2023). TV4.8 verwendete den *H. fraxineus* Stamm NW-FVA 1856 zum *in-silico* Nachweis des Vorhandenseins eines funktionellen RNA-Interferenz-Signalwegs im Eschentriebsterben-Erreger, zur Vorbereitung einer RNAi-gestützten Bekämpfung (Hohenwarter et al. 2024, in review).

Die Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Standort/Bestand und dem Schadgeschehen auf verschiedenen Flächenkollektiven mit unterschiedlich ausgerichtetem Fokus lassen einige Schlüsse zu: Grundsätzlich wird nur ein kleiner Teil der beobachteten Varianz des Eschentriebsterbens von Standorts- und Bestandesunterschieden erklärt. Zu den wenigen Parametern, die eindeutig die Symptomatik verstärken, gehören dabei Grund- und Stauwassereinfluss, hohe pH-Werte des Oberbodens und der Laubstreu, lokale Eschen-dichte und ein geringes Alter oder ein geringer BHD von Eschen. Dies gilt in den meisten Fällen gleichermaßen für Kronenzustand und Stammfußnekrosen, da die beiden Symptome weitgehend korreliert sind. Zeitlich betrachtet hat die Witterung des Vorjahres einen großen Einfluss auf die Kronenverlichtung im jeweiligen Jahr, wobei feuchte Bedingungen im Hochsommer des Vorjahres die Verlichtung stark beschleunigten. Außerdem verschlechterte sich in den vergangenen Jahren der durchschnittliche Eschenzustand in Deutschland weiterhin.

Auf großräumiger Ebene sind die Haupteinflussfaktoren, neben dem Standort, vermutlich Unterschiede in der Dauer und Intensität des epidemiologischen Geschehens, genetische Unterschiede zwischen Eschenpopulationen und Unterschiede in der Virulenz zwischen Populationen des Erregers. Kleinräumig sind die beobachteten Unterschiede zwischen einzelnen Eschen zwar groß - lassen sich allerdings kaum mit kleinräumiger Standortvariabilität begründen, sondern eher mit individuellen Unterschieden hinsichtlich Genetik und phänotypischer Plastizität der Eschen. Dafür spricht auch der bei fast allen Bonituren gewonnene subjektive Eindruck, dass stark und kaum geschädigte Eschen eher selten räumlich gruppiert im Bestand vorkommen, sondern relativ gleichmäßig durchmischt sind. Risikoabschätzungen für die Befallsintensität des Eschentriebsterbens, die auf rein standörtlichen Gegebenheiten basieren (z. B. Risikokarten), sind aus diesen Gründen kaum sinnvoll.

TV4.2**AP6.1 Virulenztests, Auswahl virulenter und weniger aggressiver *H. fraxineus*-Stämme für die Verwendung in anderen TVs (TV4.2 JKI)**

Es wurden in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern 4.1 und 4.3 162 neue Stämme von *H. fraxineus* gewonnen. Diese wurden aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial (Blattstiele, Zweige, Stammfußnekrosen, Fruchtkörper) von den verschiedenen Untersuchungsflächen des Verbundes isoliert. In Vorversuchen wurde im ersten Projektjahr die Virulenz der zunächst verfügbaren frischen Stämme erfasst, damit den Projektpartnern entsprechende Daten zur Verfügung gestellt werden konnten. Auf dieser Basis wurde in einer durch das JKI koordinierten verbundweiten Abstimmung der Stamm 7 als Referenzstamm festgelegt, welcher auch unter der ID 116307 in die öffentliche Sammlung des Leibniz Institutes DSMZ aufgenommen wurde.

Die Virulenz von 120 der gewonnenen Stämme wurde in einem großangelegten Infektionsversuch (1080 Einzelinokulationen) über 8 Wochen getestet und bestimmt. Es zeigte sich eine große Variation in der Virulenz der Stämme, da 41 % keinerlei Symptome hervorriefen und 58 % schwere Symptome einschließlich Mortalität an zumindest einem Teil der Versuchspflanzen erzeugten (Abb. 14). Nur bei einem Stamm führten die Infektionen zwar zu eindeutigen Symptomen, aber nicht zu Mortalität innerhalb des Untersuchungszeitraums, weshalb dieser Stamm als schwach virulent klassifiziert wurde. Bei einem weiteren Stamm waren nicht genug Wiederholungen auswertbar, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Es wurde in einer ersten Analyse kein statistischer Zusammenhang zwischen der Virulenz und der geographischen Herkunft oder der Art des Ausgangsmaterials (Blattstiel, Fruchtkörper, Zweig, Stammfuß) festgestellt, jedoch soll die Auswertung unter Einbeziehung weiterer erklärender Variablen noch vertieft werden.

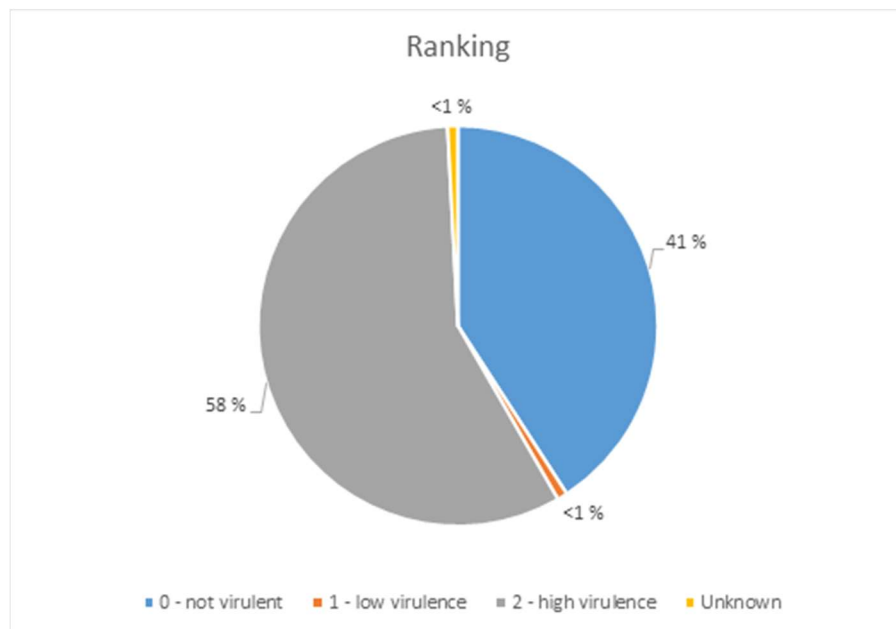


Abbildung 14: Verteilung der Virulenz von 120 Isolaten auf Basis von 894 auswertbaren Inokulationen (siehe Text für Erklärungen)

Es wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, um Wissen darüber zu generieren, welchen Einfluss Aspekte des Versuchsaufbaus bei Infektionsversuchen auf die Symptomentstehung und damit auf die vermeintliche Virulenz von *H. fraxineus*-Stämmen hat (Nebenergebnisse von AP6.1). Beim experimentellen Vergleich von zwei Infektionsmethoden, nämlich mittels Wundinokulation am Stamm und Wundinokulation am Blattstiel, wurde festgestellt, dass bei Infektionsversuchen mit Wundinokulationen am Stamm deutlich größere Nekrosen entstanden und somit eine Überschätzung der tatsächlichen Virulenz möglich ist (Abb. 15). Es zeigte sich außerdem, dass bereits die Art des Nährmediums (hier: Malzextrakt-Agar (MEA) im Vergleich zu Malzextrakt-Agar mit Eschenblättern (AMEA)), auf dem der jeweilige Stamm vor Inokulation kultiviert wurde, zu unterschiedlicher Symptomausprägung führen kann. Es bestätigte sich darüber hinaus, dass alte Stämme, die sich bereits seit über fünf Jahren in Kultur befinden, bei Inokulation in Sämlinge nur noch in seltenen Fällen über eine Pathogenität verfügen. Unsere im Projekt erhobenen Daten zeigen an, dass dieser Virulenzverlust deutlich verringert und vielleicht sogar unterbunden werden kann, indem lebende Wirtspflanzen mit den Erregerstämmen inokuliert werden, und die Stämme erst einige Wochen später durch Reisolierung aus den so infizierten Pflanzen wiedergewonnen werden.

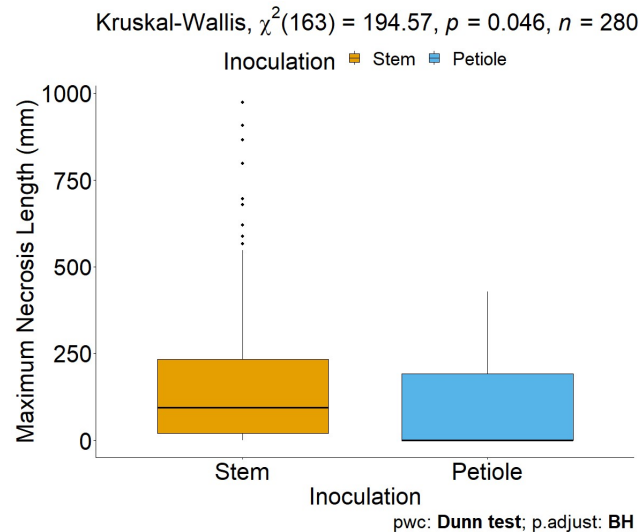


Abbildung 15: Nekrosenlänge 12 Wochen nach Wundinokulation am Stamm (links) und am Blattstiel (rechts).

AP6.2 Mikrosatellitenanalyse (Populationstruktur) mit ausgewählten Stämmen unterschiedlicher Virulenz, Herkunft und Ausgangssubstrat (TV4.2 JKI)

In Zusammenarbeit mit dem Thünen-Institut wurden die 162 gewonnenen Stämme für eine Analyse der genetischen Populationsstruktur in Deutschland verwendet. Insgesamt 20 Mikrosatelliten-Loci wurden betrachtet. Wie bereits bei früheren populationsgenetischen Untersuchungen wurden in den überwiegenden Fällen zwei Allele pro Locus festgestellt, wenige waren jedoch monomorph oder es traten zusätzliche Allele auf (Tab. 3), die möglicherweise eine allmähliche genetische Diversifizierung der Population anzeigen.

Tabelle 3: Seltene und private Allele bei im Projekt aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial gewonnenen *H. fraxineus*-Stämmen. Die Anzahl der Beobachtungen und die relative Häufigkeit (%) werden angezeigt.

Ausgangsmaterial	Locus	Allele (bp)	Motiv	Erwartete Größe der Allele [bp]	Beobachtungen	Relative Häufigkeit
Zweigprobe	H09	284	(GGT)7	280-300	2	0,034
Zweigprobe	H19	248	(TCA)8	246-250	2	0,033
Stammfußnekrose	H03	212	(AG)21	179-208	1	0,019
Stammfußnekrose	H06	152	(AG)2AT(AG)12	143-160	1	0,019
Stammfußnekrose	H22	257	(T)11	242 - 246	2	0,037
Stammfußnekrose	H07	161	(GAA)7	164-170	1	0,019
Stammfußnekrose	H10	107	(CTC)10	111-117	1	0,019

Die statistischen Analysen hinsichtlich möglicher Zusammenhänge zwischen der Mikrosatellitensignatur und der geographischen Herkunft oder der Art des Ausgangsmaterials (Blattstiel, Fruchtkörper, Zweig, Stammfuß) der Stämme sind zum Zeitpunkt des Projektendes noch nicht vollständig abgeschlossen. Es deutet sich aber an, dass entsprechende Zusammenhänge in den Daten nachweisbar sind. Die Analysen werden weitergeführt und eine anschließende Publikation ist geplant.

AP6.3 Zulieferungen von Pilzstämmen an andere Projektpartner (TV4.2 JKI)

Subkulturen verschiedener gewonnenen Stämme wurden nach Bedarf produziert und an Verbundpartner für Resistenztests und andere Forschungstätigkeiten verschickt. Insgesamt wurden weit mehr als 300 Subkulturen versendet.

AP6.4 Infektionsversuche am Wurzelansatz zur Klärung der Ätiologie von Stammfußnekrosen (TV4.2 JKI)

Zwei getopfte Versuchspflanzen wurden mit einer infektiösen Askosporensuspension jeweils auf der Oberseite eines Fiederblattes, an verwundeter Rinde am Stamm (1 cm langer Skalpellschnitt bis ins Kambium) und einer Lentizelle am Stammfuß inokuliert (Abb. 16). Die Sporenmenge je Inokulationsstelle betrug ca. 60 Sporen. Sechs Monate nach Inokulation waren keinerlei Symptome an den Versuchspflanzen feststellbar. Ein Nachweis, dass *H. fraxineus* der primäre Verursacher von Stammfußnekrosen ist, konnte somit nicht erbracht werden. Eine Ausweitung dieser Versuchstätigkeiten wäre notwendig, jedoch stellte sich das Erstellen einer kontaminationsfreien Sporensuspension mit hinreichender Sporenmenge als äußerst aufwendig und fehleranfällig heraus, sodass dies im Rahmen der gegebenen Projektzeit nicht mehr realisiert werden konnte.

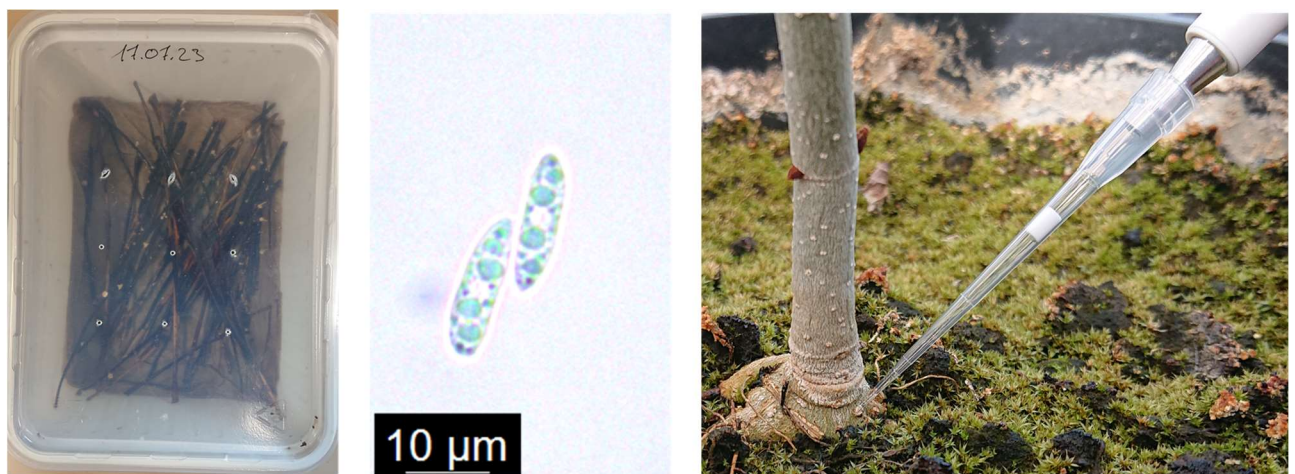


Abbildung 16: In einer Feuchtechamber auf Eschenblattstielen angezogene Fruchtkörper (links) wurden zur Erstellung einer Askosporensuspension (Mitte) verwendet, die mit einer Mikropipette zur Inokulation der Versuchspflanzen genutzt wurde (rechts: Inokulation einer Lentizelle am Stammfuß).

AP6.5 Infektionsversuche und Phytotoxizitätstests in Zusammenarbeit mit anderen Projektpartnern (TV4.2 JKI)

Weitere Infektionsversuche im Gewächshaus wurden in Zusammenarbeit mit Verbundpartnern durchgeführt. Im Rahmen der Kooperation mit der TU Braunschweig wurde getestet, ob eine Vorinfektion mit einem schwach virulenten Stamm die Nekrosenausbreitung bei einer Infektion mit einem virulenten Stamm beeinflussen kann. Ein solcher Prägungseffekt (engl.: priming) wurde tatsächlich festgestellt, im Durchschnitt war die Nekrosenlänge 12 Wochen nach Inokulation mit dem virulenten Stamm weniger als halb so groß wie bei den nicht vorinfizierten Versuchspflanzen (Abb. 17).

Es wurde außerdem getestet, welchen Einfluss eine Vorinfektion mit sechs durch die TU Braunschweig bereitgestellten und selektierten Endophyten (*Hypoxyton rubiginosum*, *Hypoxyton perforatum*, *Pezizula ericae*, *Pezizula livida*, *Diaporthe oncostoma*, *Nemania diffusa*) auf die Krankheitsentwicklung hat. Mit Endophyten vorinfizierte Versuchspflanzen wiesen nach Inokulation mit dem Referenzstamm von *H. fraxineus* durchschnittlich ein tendenziell reduziertes oder verzögertes Nekrosenwachstum auf (Abb. 18), wobei dieser Unterschied nur bei den Kombinationen von *H. perforatum* und *D. oncostoma* mit einem weniger virulenten *H. fraxineus*-Stamm (S_13) auch statistisch signifikant war.

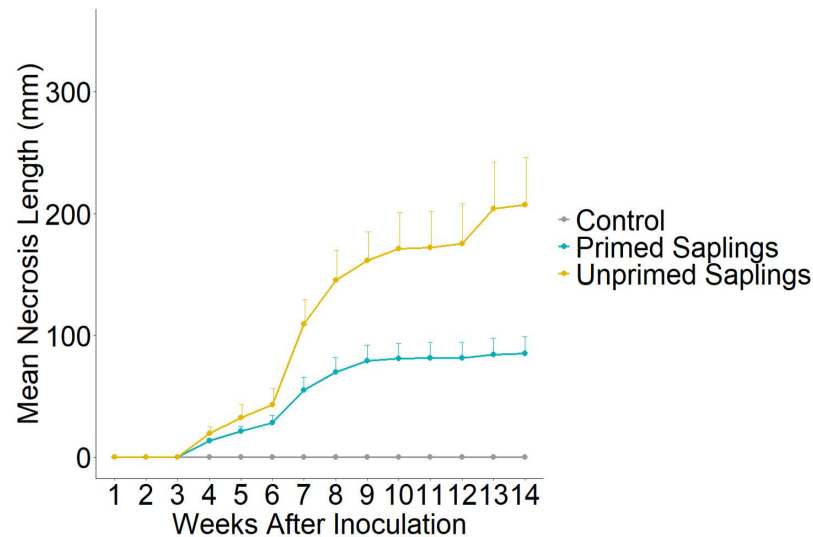


Abbildung 17: Entwicklung der durchschnittlichen Nekrosenlänge [+ Standardfehler] über einen Zeitraum von 14 Wochen nach Inokulation mit dem virulenten Referenzstamm 7. Die Nekrosenlänge unterschied sich ab Woche 7 signifikant (Mann-Witney Test, $P < 0.0001$) zwischen unbehandelten Pflanzen (unprimed saplings) und solchen, die vorab mit einem nur schwach virulenten Stamm infiziert wurden (primed saplings).

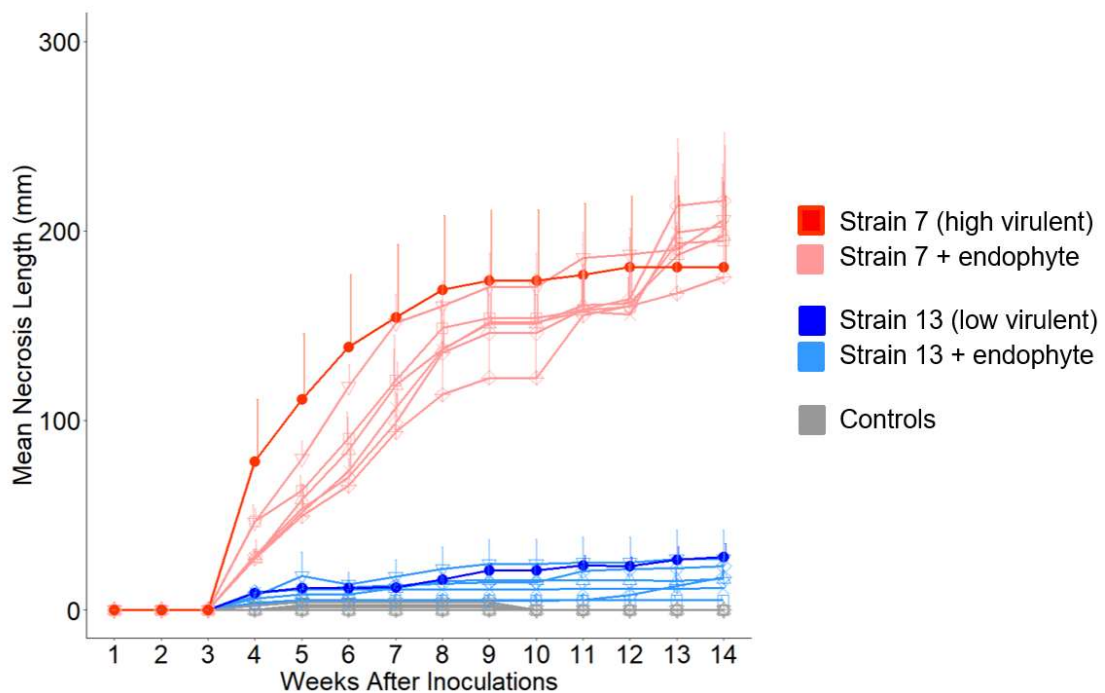


Abbildung 18: Durchschnittliche Nekrosenlänge (+ Standardfehler) nach Einzelinokulation mit den zwei unterschiedlich virulenten *H. fraxineus*-Stämmen 7 und 13 und nach Inokulation dieser Stämme nach Vorinfektion mit sechs verschiedenen Endophyten. Inokulationen mit sterilem Nährmedium sind grau dargestellt. Mit Endophyten vorinfizierte Pflanzen wiesen im Durchschnitt ein tendenziell reduziertes oder verzögertes Nekrosenwachstum auf.

Im Rahmen der Kooperation mit der Universität Hamburg wurde in einem weiteren Infektionsversuch festgestellt, dass sich die Virulenz von *H. fraxineus*-Stämmen, die mit dem HfMV1-Virus infiziert sind, statistisch nicht von HfMV1-negativen Stämmen unterscheidet. Damit bestätigt sich, dass eine Hypovirulenz mit diesem Virus nicht zur biologischen Kontrolle geeignet ist (Lutz et al. 2023).

Für transkriptomanalytische Untersuchungen des Pilzes durch den Projektpartner Universität Hohenheim wurden im JKI-Gewächshaus 24 *Fraxinus manshurica*, sieben *F. ornus* und 90 *F. excelsior*-Sämlinge mit dem Referenzstamm von *H. fraxineus* infiziert und symptomatische Gewebeproben erzeugt. Darüber hinaus wurden für weiterführende Untersuchungen jeweils 18 und zehn symptomatische *F. excelsior*-Proben, die am JKI mit dem Referenzstamm infiziert wurden, an die Projektpartner Hochschule für nachhaltige Entwicklung Eberswalde und Humboldt-Universität Berlin versendet.

TV4.3**AP7 Histologische Untersuchungen (SEM, Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie) zur Klärung des Infektionsweges von *H. fraxineus*, der Chronologie und des Schadensverlaufs bei Stammfußnekrosen und anderer Gewebetypen (TV4.3 FVA)****AP7.1 Erkenntnisse über das Zustandekommen von Nekrosen an unterschiedlichen Infektionsloci (TV4.3 FVA)**

25 Mikroböhrkerne wurden aus natürlich entstandenen Stammfußnekrosen entnommen, histologische Präparate angefertigt und mikroskopisch analysiert. Aus Eschen-Stammfußnekrosen lassen sich jedoch oftmals eine Vielzahl unterschiedlicher Pilzarten isolieren (Peters et al. 2023), sodass die, in unterschiedlichen Gewebetypen gefundenen, Pilzhyphen nicht eindeutig *H. fraxineus* zugeordnet und somit keine Rückschlüsse auf dessen Infektionsmechanismen gezogen werden konnten. Aus diesem Grund wurden nachfolgend *in vitro* und *in vivo* Inokulationsversuche durchgeführt.

In vitro-Inokulationsversuche

Unter sterilen Bedingungen wurden Eschen-Mikroböhrkerne mit *H. fraxinus* oder, der ebenfalls häufig aus Stammfußnekrosen isolierten Pilzart, *Armillaria gallica* für 21 Tage bei Raumtemperatur inokuliert. Anschließend wurden histologische Präparate angefertigt und mikroskopisch analysiert. Abbildung 19 zeigt mikroskopische Aufnahmen eines inokulierten Eschen-Mikroböhrkerns: Neben einer deutlichen Besiedelung der Rindenoberfläche mit Hyphen von *H. fraxineus*, konnten auch im Rindengewebe Pilzhyphen gefunden werden, die sowohl in den Zellen als auch durch die Zellwände hindurch wuchsen. Eine Besiedelung des Holzgewebes konnte nicht festgestellt werden. Durch die *in vitro*-Inokulationen konnte ein guter Eindruck der Hyphenstruktur von *H. fraxineus* gewonnen werden.

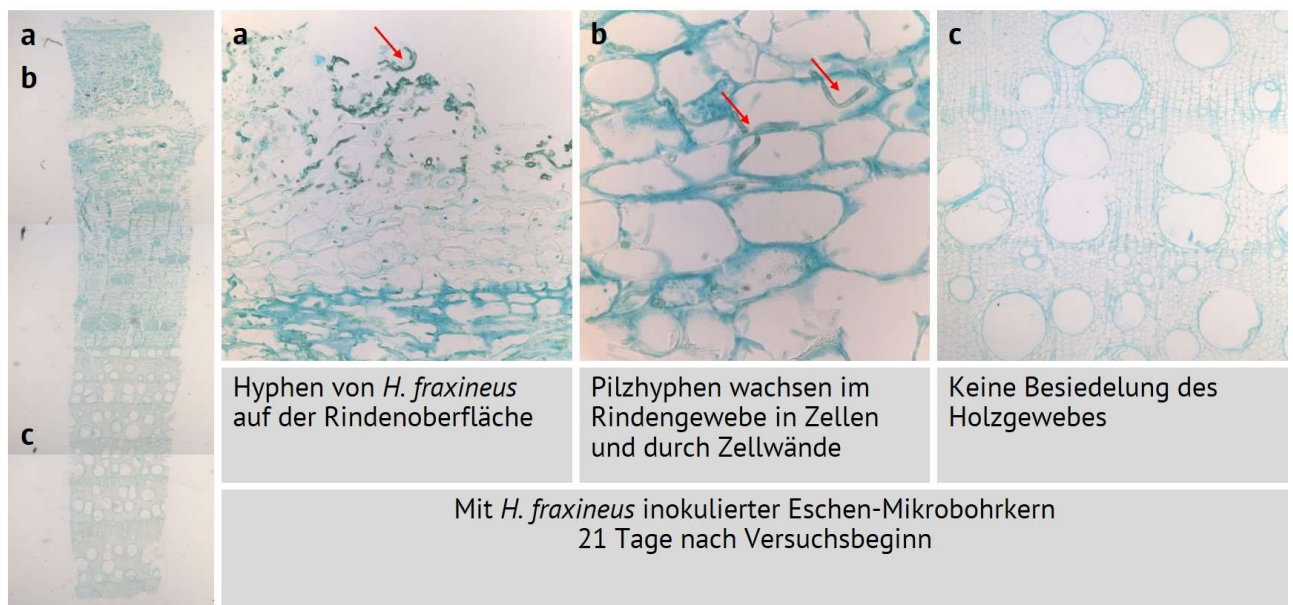


Abbildung 19: Exemplarische mikroskopische Aufnahmen eines Eschen-Mikroböhrkerns im Querschnitt. Inokuliert wurde für 21 Tage mit *H. fraxineus*. Sichtbar ist die Besiedelung der Rindenoberfläche und des Rindengewebes mit Pilzhyphen.

In vivo-Inokulationsversuche

Zur Untersuchung des Infektionsablaufs von *H. fraxineus* unter naturnäheren Umständen und des Zusammenwirkens von *H. fraxineus* und *A. gallica* bei der Infektion von Eschen am Stammfuß, wurden *in vivo*-Inokulationsversuche durchgeführt.

Versuch 1 (Sommer 2022)

Der Inokulationsversuch wurde an 160 2-jährigen Eschensämlingen durchgeführt. Inokuliert wurde in acht verschiedenen Varianten mit zwei unterschiedlich virulenten Stämmen von *H. fraxineus* und einem Stamm von *A. gallica*. Die Versuchsdauer betrug 90 Tage. Die Nekrosenentwicklung wurde in drei Stufen wöchentlich aufgenommen. Die tendenziell schnellste und stärkste Nekrosenentwicklung konnte an Eschensämlingen beobachtet werden, die zuerst mit *H. fraxineus* und in einem zeitlichen Versatz von drei Wochen zusätzlich mit *A. gallica* inokuliert wurden (Abb. 20). Insgesamt konnte jedoch nur eine schwache und kleinräumige Entwicklung von Nekrosen/Verbraunungen beobachtet werden.

Um den Inokulationserfolg zu überprüfen, wurden aus jeder Versuchspflanze Reisolationen vorgenommen. Weder *H. fraxineus* noch *A. gallica* konnte jedoch aus dem Gewebe reisoliert werden. Zusätzlich wurden aus den Versuchspflanzen histologische Präparate angefertigt und mikroskopisch analysiert. In den histologischen Präparaten konnte keine Besiedelung des Eschengewebes durch Pilzhyphen festgestellt werden (Abb. 20 und 21).

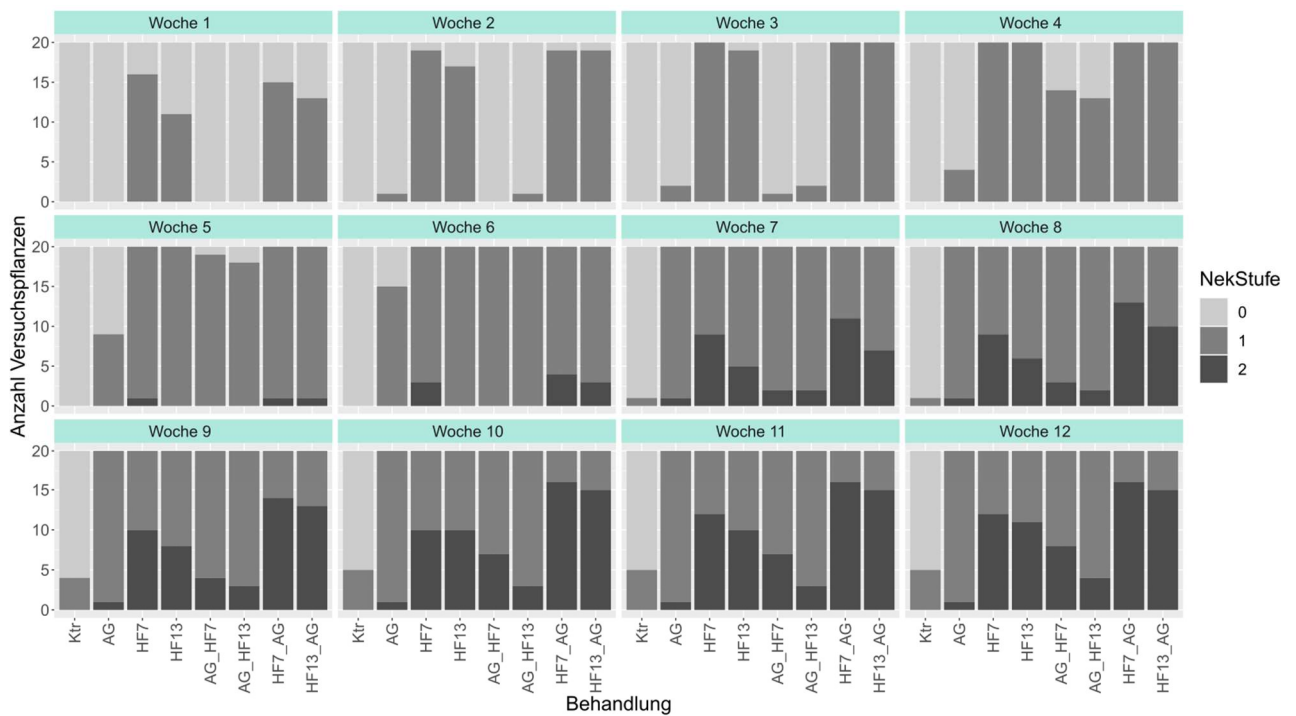


Abbildung 20: Anzahl der Versuchspflanzen je Nekrosenstufe (0: keine Nekrotisierung, 1: Verbrennung/Nekrotisierung des Inokulationsbereichs, 2: Verbrennung/Nekrotisierung größer als der Inokulationsbereich) pro Woche und Inokulationsvariante.

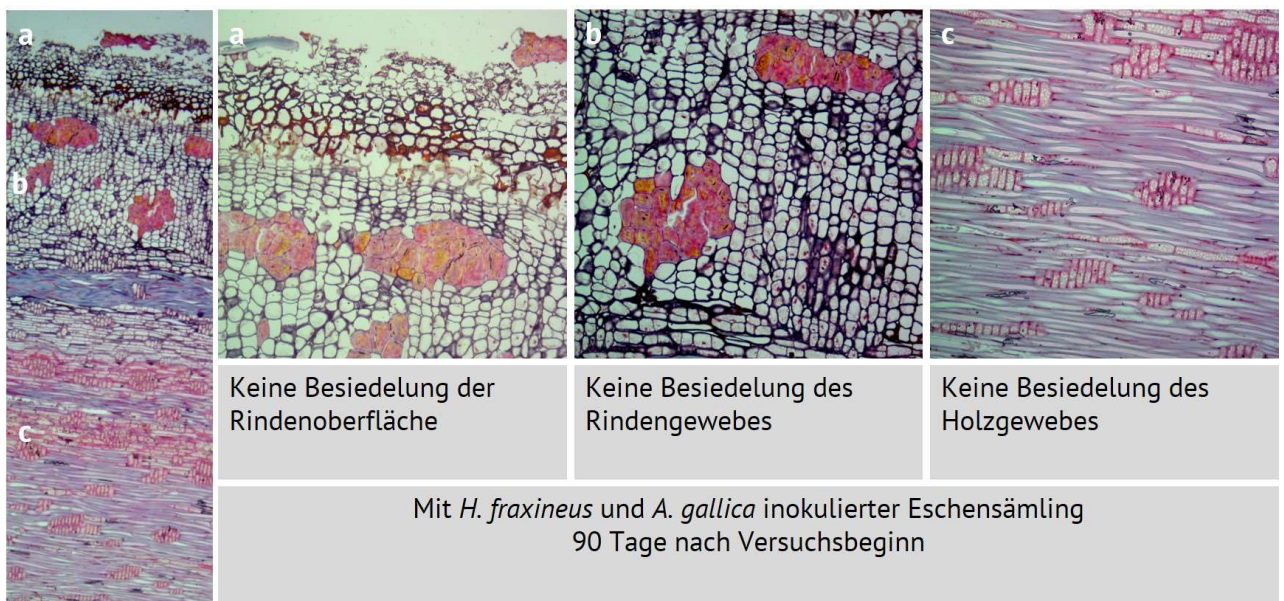


Abbildung 21: Exemplarische mikroskopische Aufnahmen eines histologischen Präparats einer Probe aus einem Eschen-Sämling im Radialschnitt. Inokuliert wurde für 90 Tage mit *H. fraxineus* und für 69 Tage mit *A. gallica*. Es ist keine Besiedelung der Rindenoberfläche und des Rindengewebes mit Pilzhyphen erkennbar.

Versuch 2 (Frühjahr 2023)

Der Inokulationsversuch wurde an 50 3-jährigen Eschensämlingen durchgeführt. Inokuliert wurde in fünf verschiedenen Varianten mit einem Stamm von *H. fraxineus* und einem Stamm von *A. gallica*. Die Versuchsdauer betrug 90 Tage. Die Nekrosenentwicklung wurde in drei Stufen wöchentlich aufgenommen. Die tendenziell stärkste Nekrosenentwicklung konnte, anders als bei der Versuchsdurchführung im Sommer, an Eschensämlingen beobachtet werden, die zuerst mit *A. gallica* und in einem zeitlichen Versatz von drei Wochen zusätzlich mit *H. fraxineus* inokuliert wurden. Insgesamt konnte jedoch nur eine schwache, kleinräumige Entwicklung von Nekrosen/Verbraunungen beobachtet werden (siehe Abbildung 22). Um den Inokulationserfolg zu überprüfen wurden aus jeder Versuchspflanze Reisolationen vorgenommen. Eine Reisolation von *H. fraxineus* oder *A. gallica* war jedoch nicht erfolgreich.

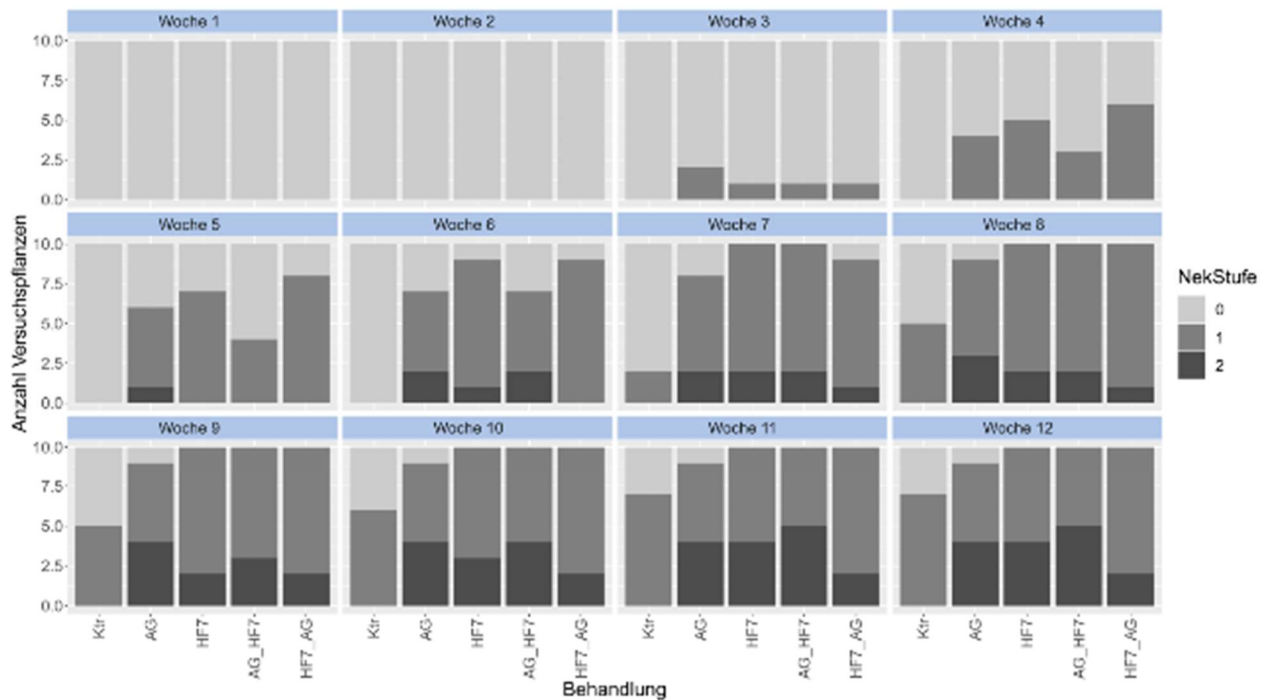


Abbildung 22: Anzahl der Versuchspflanzen je Nekrosenstufe (0: keine Nekrotisierung, 1: Verbraunung/Nekrotisierung des Inokulationsbereichs, 2: Verbraunung/Nekrotisierung größer als der Inokulationsbereich) pro Woche und Inokulationsvariante.

Die nicht-erfolgreiche Reisolation von *H. fraxineus* und *A. gallica* und die fehlende Besiedelung des Eschengewebes durch Pilzhyphen deuten darauf hin, dass die Infektion der Versuchspflanzen nicht erfolgreich war. Temperatur und Alter der Versuchspflanzen konnten als Ursache hierfür ausgeschlossen werden, da der Versuch bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurde und Inokulationen bei gleichaltrigen Versuchspflanzen im Kronenraum durch Projektpartner:innen erfolgreich waren. Somit könnte die nicht-erfolgreiche Infektion ein Hinweis darauf sein, dass eine Vorschwächung des Baums, durch Infektionen im Kronenraum, für eine erfolgreiche Infektion des Stammfußes notwendig ist.

AP7.2 Dendrochronologische Einordnung von Stammfußnekrosen durch Jahrringanalysen (TV4.3 FVA)

Zur dendrochronologischen Datierung von Stammfußnekrosen wurde, in Anlehnung an Enderle et al. (2017), eine Methodik ausgearbeitet. Diese ermöglicht die Aufnahme komplexer Schäden, u.a. mit mehrjähriger Entwicklungsdauer und Überwallungen. Datiert wurden das Baumalter, die Entstehungsjahre der Schadstellen, Überwallungen/Überwallungsversuche und der Zeitpunkt der letalen Schädigung des Kambiums. Insgesamt wurden 79 Eschen-Stammscheiben von zehn über Deutschland verteilten Versuchsflächen dendrochronologisch ausgewertet. Dabei wurden 700 Schadstellen in 314 Schadclustern datiert.

Es konnte ein vermehrtes Auftreten und ein deutlicher jährlicher Anstieg von Stammfußnekrosen ab 2010 (Abb. 23) und somit in einem zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten des Eschentriebsterbens in Deutschland, festgestellt werden. 39 % der Schäden dehnten sich über mehrere Jahre zu einem Schadcluster, mit mehr als einer Schadstelle, aus (ausgeklammert wurden hierbei Schäden, die sich, aufgrund ihres Entstehungszeitpunktes nahe am Zeitpunkt der Fällung, nicht ausbreiten konnten). 54 % der Schadcluster wiesen Überwallungen oder Überwallungsversuche auf. Das zeigt ein hohes Potential von Eschen, Abwehrreaktionen, erbringen zu können. Die letale Schädigung des Kambiums trat bei 88 % der Schäden während der Vegetationsruhe auf.

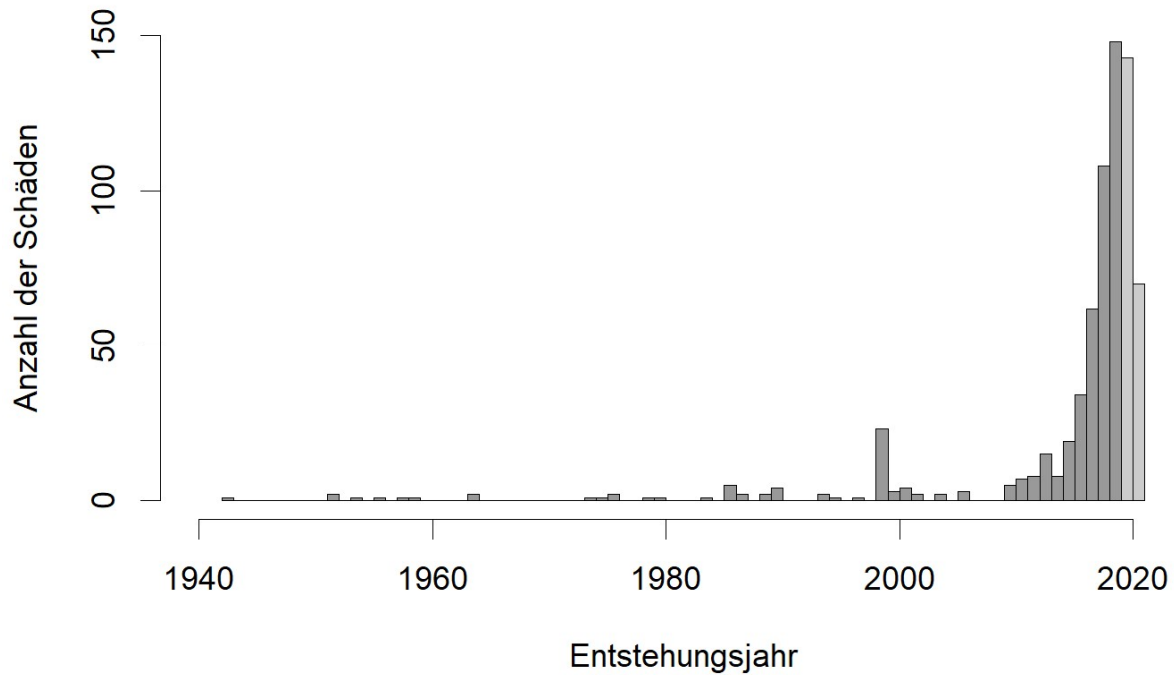


Abbildung 23: Anzahl an nekrotischen Schadstellen nach ihrem Entstehungsjahr. Ab 2010 zeigt sich ein deutlicher jährlicher Anstieg von Stammfußnekrosen an *F. excelsior*.

Alteschenbonitur

Auf den Intensivbeobachtungsflächen BW1 „Plattenwald“ und BW2 „Weisweil“ wurde zweimal jährlich eine Bonitur der Alteschen durchgeführt und die Daten allen Projektpartner:innen zur Verfügung gestellt. An einem Treffen zur Auswertung der projektweit erhobenen Boniturdaten wurde teilgenommen und an einer Publikation der Daten mitgewirkt.

Erreichte Nebenergebnisse

Zwei Intensivbeobachtungsflächen (BW1 „Plattenwald“ und BW2 „Weisweil“) für Baden-Württemberg wurden ausgewählt und eingerichtet. Die Flächenverantwortlichkeit für beide Flächen umfasste neben regelmäßigen Zaunkontrollen u.a. auch die Kommunikation zwischen Projektpartner:innen und Revierförstern sowie Flächenbegehungen mit Projektpartner:innen.

TV4.4**AP8.1 Isolation von *H. fraxineus* und anderer assoziierter Pilze aus der Rhizosphäre und aus Bodenproben (TV4.4 UKS)**

Insgesamt wurden 89 Eschenbäume beprobt und die oberflächensterilisierten Feinwurzeln kulturbasiert auf ihr Mykobiom untersucht. Diese stammten von insgesamt elf Standorten. Den IB-Flächen HE1_Schotten, NI1_Mollenfelde, SN2_Bienhof und ST1_Huy, sowie den FraxCollar-Flächen NI2_Rhüden, NI3_Holzminden, NW1_Schlangen, ST2_Allstedt, ST3_Plötzkau und TH2_Schwansee. Zusätzlich wurden 52 Eschen-Jungpflanzen aus reziproken Verpflanzungen von FraDiv untersucht.

Für die Standorte HE1, NI1, NI3, NW1, SN2, ST1 und die Jungpflanzen von FraDiv erfolgte zusätzlich eine next generation sequencing (NGS) Analyse mittels dem ONT MinION. Dabei wurden jeweils gepoolte Bodenproben, unsterilisierte und oberflächensterilisierte Feinwurzelproben untersucht. Für die gepoolte SH1 (FraDiv) Bodenprobe wurden 65, für die Feinwurzelproben 75 Jungeschen verwendet und für die verbleibenden Flächen bestanden die gepoolten Proben jeweils aus acht Bäumen.

AP8.2 DNA- und morphologisch gestützte Identifikation von *H. fraxineus* und anderer assoziierter Pilze der Rhizosphäre (TV4.4 UKS)

Hymenoscyphus fraxineus konnte nicht aus den Feinwurzeln oder Bodenproben isoliert werden; lediglich aus Stark- und Grobwurzeln, diese wurden allerdings nur bei den Standorten TH2 und NI2 probeweise untersucht.

Durch den kulturbasierten Ansatz ließen sich etwa 64 unterschiedliche Pilzgattungen ermitteln. Wobei 36 davon jeweils nur von einem Standort isoliert wurden. Vertreter von neun Gattungen konnten wenigstens von fünf Standorten isoliert werden. *Ilyonectria* wurde an allen elf Standorten isoliert, *Diaporthe* und *Trichoderma* jeweils an neun, *Cadophora* und *Pezicula* an acht, *Dactylonectria* und *Nemania* an sieben, *Camposporium* an sechs und *Coprinellus* an fünf. Es dominierten dabei die Ascomycota, während die Basidiomycota vereinzelt Isolate darstellten.

Die NGS-basierte Analyse lieferte insgesamt 333 unterschiedliche Gattungen. In den Bodenproben gehörten *Saitozyma*, *Solicoccozyma*, *Mortierella*, *Apiotrichum*, *Penicillium*, *Podila*, *Sebacina*, *Trichoderma*, *Keithomyces*, *Coprinellus* und *Phallus* zu den häufigsten Gattungen. Bei den Jungpflanzen konnte *Russula* mit einer hohen relativen Abundanz nachgewiesen werden, *Clavulinopsis* bei HE1 und *Melanogaster* bei ST1. Bei den unsterilisierten Feinwurzeln sind *Mycena*, *Mycenella*, *Ilyonectria*, *Leptodontidium*, *Cladophialophora*, *Saitozyma*, *Keithomyces*, *Solicoccozyma*, *Sebacina*, *Dendrophoma* und *Mortierella* häufig. *Delicatula* und *Trechispora* wurden vor allem bei NW1 mit hoher Abundanz detektiert und *Mycetinis* kam bei SN2 vor. Bei den sterilisierten Wurzelproben dominierten *Mycena*, *Mycenella*, *Glomus*, *Mycetinis*, *Leptodontidium*, *Pezicula*, *Cladophialophora*, *Delicatula*, *Teratosphaeria*, *Berkeleyomyces*, *Dendrophoma*, *Chalara*, *Keithomyces* und *Atractospora*. Wobei *Mycetinis* nur bei SN2 vorkam. Insgesamt konnten elf unterschiedliche Gattungen der Glomeromycota nachgewiesen werden. Die Alpha-Diversität war in den Bodenproben am höchsten und in den sterilisierten Wurzelproben am geringsten. Die Beta-Diversität zeigte eine deutliche Aufteilung der Proben nach untersuchtem Kompartiment, sowie eine geringere Streuung innerhalb der Bodenproben und eine größere innerhalb der Wurzelproben. Alle Ergebnisse hängen jedoch zum Teil von den verwendeten Parametern ab.

Im Zuge dieses Arbeitspaketes erfolgten vier studentische Abschlussarbeiten:

Marz J, Schmagold A (2021) „Isolation und Barcoding von Pilzen in der Rhizosphäre der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*)“, Bachelorarbeit

Bolde L (2021) „Kulturbasierte Untersuchung der Rhizosphärenpilze der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*) und Vergleich mit NGS-ermittelten Daten“, Bachelorarbeit

Wagener P (2023) „ITS-Metabarcoding von Pilzen mit einem MinION DNA-Sequencer“, Bachelorarbeit

Griem E (2023) „Diversitätsstudie zur mykologischen Zusammensetzung der Feinwurzeln und des Wurzelraums von Eschen in Deutschland mittels MinION“, Masterarbeit

AP8.3 Genotypisierung von *H. fraxineus*-Isolaten der Rhizosphäre mittels Mikrosatelliten-Fragmentanalyse (TV4.4 UKS)

Dieses Arbeitspaket entfiel, da *H. fraxineus* nicht isoliert werden konnte.

AP8.4 Antagonistenversuche in vitro mit isolierten Rhizosphären-Pilzen gegen *H. fraxineus* (TV4.4 UKS)

Alle verwendeten *H. fraxineus* Stämme stammten vom projektinternen Partner im Julius-Kühn-Institut (JKI).

28 Isolate, unter anderem auch *Hypoxyylon rubiginosum*, wurden in vitro auf ihre antagonistische Aktivität gegenüber vier Stämmen von *H. fraxineus*, RH03-T2-B5-1 und RH03-T7-B5-2 (schwach virulent) sowie RH03-T2-B1-1 und RH03-T5-B1-1 (stark virulent), getestet. Bei Stamm RH03-T5-B1-1 konnten keine Antagonisten gefunden werden, da die Selbstinhibition nicht angewachsen ist.

Bei RH03-T2-B5-1 zeigten 43% der verwendeten Isolate eine Hemmwirkung, wobei zwei Isolate von *Trichoderma*, ein Isolat von *Podila* und ein Isolat von *Pezizula* die höchsten Hemmwirkungen aufwiesen. Bei RH03-T7-B5-2 zeigten 23% der verwendeten Isolate eine hemmende Wirkung, wobei hier wieder drei *Trichoderma*-Isolate (zwei vom zuvor genannten Stamm) die größte Hemmwirkung aufwiesen. Bei dem Stamm RH03-T2-B1-1 zeigten 27 Isolate eine Hemmwirkung, mit der höchsten Hemmwirkung bei *Trichoderma*, *Mortierella/Podila*, *Ilyonectria* und *Diaporthe*.

Außerdem wurden 50 Isolate von den Jungeschen gegen die zwei stark virulenten *H. fraxineus* Stämme in vitro getestet, dabei zeigten 36 Isolate eine Hemmwirkung und 49 keine. Die höchsten Hemmwirkungen erzielten unter anderem *Ilyonectria/Dactylonectria*, *Trichoderma*, *Plectosphaerella*, *Colletotrichum*, *Nemania* und *Nigrospora oryzae*, alle an Stamm RH03-T2-B1-1.

Diese Untersuchungen erfolgten in Form von zwei studentischen Abschlussarbeiten:

Riedel J (2022) „Antagonisten-Tests gegen *Hymenoscyphus fraxineus* den Erreger des Eschentriebsterbens an *Fraxinus excelsior*“, Bachelorarbeit

Döring M (2022) „Potenzielle Antagonisten gegen *Hymenoscyphus fraxineus*, den Erreger des Eschentriebsterbens“, Wissenschaftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien im Fach Biologie

AP8.5 Korrelation der Biodiversität der Rhizosphäre-Pilze mit abiotischen Parametern (TV4.4 UKS)

Die IBF wurden erst im Laufe des Projektes vollständig ermittelt. Die Entnahme von Feinwurzeln hat sich leider als extrem aufwändig erwiesen, weswegen nur drei IBF in der Nähe beprobt wurden und auf die Flächen/Bäume von FraxCollar (die sowieso gefällt wurden) ausgewichen wurde. Dadurch konnte die Probenahme nicht in dem Maße erfolgen, wie diese für solche Untersuchungen notwendig wäre. An dieser Stelle sei auch anzumerken, dass etwaige Flächenparameter vorab bekannt sein sollten, um eine vernünftige und koordinierte Probenahme zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang wäre eine deutschlandweite Datenbank mit entsprechenden forstlichen Aufnahmen und abiotischen/biotischen Grunddaten begrüßenswert, welche auch vereinheitlicht und leicht zugänglich sein sollte.

AP8.6 Charakterisierung und Einschätzung der forstlichen Relevanz (TV4.4 UKS)

Bei *Ilyonectria*- und *Dactylonectria*-Arten handelt es sich meist selbst um Phytopathogene (Vitale et al. 2011; Denton und Denton 2014; Sanchez et al. 2019). *Ilyonectria*-Arten wurden ebenfalls beim Eschentriebsterben aus Stammfußnekrosen isoliert (Langer 2017). Ebenso wurden *Diaporthe/Phomopsis*-Arten aus Stammfußnekrosen isoliert (Langer 2017) und treten unter anderem als Pathogene an der Sojapflanze auf (Hosseini et al. 2020).

Die Gattung *Nigrospora* kann phytopathogen, saprobisch und endophytisch sein und weist ein großes Potential bei der Produktion von bioaktiven Sekundärmetaboliten auf. *N. oryzae* ist als Pflanzenpathogen bekannt und führt beispielsweise zu Flusenfäule, Stengelfäule und Blattflecken (Hao et al. 2020).

Mortierella/Podila-Arten kommen im Pflanzengewebe, der Rhizosphäre und im Erdboden vor. Sie verhelfen Pflanzen zu einer verbesserten Nährstoffaufnahme, zur Anregung der Synthese von Phytohormonen, und unterstützen nützliche Mikroorganismen (Ozimek und Hanaka 2021). So sondern *Mortierella*-Arten bestimmte lytische Enzyme ab, wodurch Nährstoffe freigesetzt werden, welche wichtig für den Aufbau und Erhalt von Zellwänden von Pilzen und Pflanzen sind. Dadurch wird die Pflanze unterstützt und kann so resistenter gegen Pathogene werden. Bei *Alternaria brassicae* konnte *Mortierella hyaliana* eine Wachstumshemmung induzieren (Ozimek und Hanaka 2021).

Die Gattung *Trichoderma* ist bekannt für ihr antagonistisches Potential gegenüber verschiedenen Pilzen und den förderlichen Einfluss auf Pflanzen. Ein Grund für das antagonistische Potential liegt hierbei in dem schnellen Wachstum sowie der Ausschüttung von sekundären Metaboliten. Zudem soll *Trichoderma* das Abwehrsystem von Pflanzen stärken und deren Wachstum fördern (Verma et al. 2007; Bailey et al. 2008; Kowalski und Bilański 2021). Dababat et al. (2006) konnten zeigen, dass durch die Anwesenheit von *Trichoderma viride* an der Tomate, die Sterblichkeit von *Meloidogyne incognita* (Wurzelgallen-Nematoden), gesteigert werden konnte. Okigbo und Ikediugwu (2000) konnten durch in-vitro und in-vivo Analysen zeigen, dass *Trichoderma* an der Yamswurzel die Lagerfäule verhindern oder zumindest verringern kann. Calistru et al. (1997) zeigten, dass *Trichoderma* spp. lytische Enzyme freisetzt, welche das Wachstum von *Aspergillus flavus* und *Fusarium moniliforme* hemmen.

Hypoxylon rubiginosum soll über Ausscheidung von Sekundärmetaboliten einer der möglichen Antagonisten gegen *H. fraxineus* sein (Schlegel et al. 2016; Kosawang et al. 2018; Halecker et al. 2020; Pourmoghaddam et al. 2020), zeigte jedoch in unseren in vitro Antagonistentests kein antagonistisches Potential.

Leptodontidium, *Exophiala*, *Cladophialophora* und *Pezicula* sind wurzellosoziierte Pilze, die zu den den „dark septate endophyte“ (DSE) gehören und sowohl als Parasiten als auch Symbionten auftreten (Jumpponen 2001). Vertreter dieser Gruppe können den Schutz von Pflanzen gegenüber abiotischem und biotischem Stress erhöhen (Mandyam und Jumpponen 2005; Likar und Regvar 2013).

Harder et al. (2023) fanden an neun von zehn untersuchten Pflanzenarten *Mycena*, wodurch sie schlussfolgerten, dass *Mycena*-Arten "opportunistisch-generalistische Pflanzenwurzelinvasoren" sein können, da die Wurzeln keine Anzeichen von Schäden zeigten. Thoen et al. (2020) wiesen die In-vitro-Besiedlung der Wurzeln von *Betula pendula* durch *Mycena*-Arten nach. Zudem ist die Besiedlung von *Vaccinium corymbosum* und Brassicaceae-Arten bekannt (Grelet et al. 2017; Glynou et al. 2018). Grelet et al. (2017) konnten eine positive Wirkung von *Mycena galopus* auf das Wachstum von *Vaccinium corymbosum* feststellen.

Das Fehlen von *H. fraxineus* in den Feinwurzeln und Bodenproben legt nahe, dass bodenbürtige Infektionen eher auszuschließen sind. Es handelt sich, wenn dann um oberflächennahe Infektionen. Hierbei sollte jedoch darauf verwiesen werden, dass *H. fraxineus* sehr langsam in Kultur anwächst und somit eine Isolation erschwert wird. Auch die Analyse durch das next generation sequencing mittels ONT MinION brachte keinen Nachweis. Es wurden zwar OTUs zu *Hymenoscyphus* zugeordnet, jedoch nicht zu *Hymenoscyphus fraxineus*. Eine mögliche Erklärung ist, dass diese Technologie mit den im Projekt verwendeten Flow Cells und Kits relativ ungenaue Sequenzen liefert. Es wurde daher mit einer Cluster-Identität von 85% gearbeitet, wodurch die erstellten Konsensussequenzen im Grunde mehrere Spezies vereinen könnten. Andere veröffentlichte Studien konnten *H. fraxineus* in Bodenproben und Wurzeln nachweisen (Schumacher et al. 2010; Bakys et al. 2022). Die NGS-Proben wurden neben dem Primerpaar ITS1F und ITS4 auch mit *Hymenoscyphus fraxineus* spezifischen Primern amplifiziert und eindeutige PCR-Produkte zur Sanger-Sequenzierung verschickt, hierbei zeigten sich jedoch Übereinstimmungen mit *Fraxinus*-DNA. Es zeigte sich zudem im Labor, dass die Amplifikation von *H. fraxineus* mit ITS1F und ITS4 nicht immer erfolgreich ist und es wurden Kreuzungstests mit insgesamt zwei Primerpaaren durchgeführt, wobei die Kombination von ITS1catta und ITS4 die besten Ergebnisse lieferte.

AP8.7 Zulieferung von Pilzstämmen an andere Projektpartner (TV4.4 UKS)

Es wurden einzelne *H. fraxineus* Isolate an das JKI versandt. Da alle Projektpartner zeitgleich anfangen mussten, die Arbeiten mancher Gruppen allerdings auf der Vorarbeit anderer aufbauten, wurden Kulturen aus Sammlungen von Projektpartnern an entsprechende Forschungsvorhaben verschickt, damit diese ohne Zeitverlust ihre Arbeit aufnehmen konnten. Dadurch bestand an unseren Kulturen dann kein Bedarf mehr. Es wäre sinnvoll den zeitgleichen Start von Projekten zu überdenken, vor allem wenn es sich um Verbundvorhaben handelt, wo einzelne Forschungsarbeiten auf der Vorarbeit anderer beruhen.

AP8.8 Auswertung und Vernetzung der Ergebnisse (TV4.4 UKS)

Zwischenergebnisse wurden regelmäßig bei projektinternen Meetings vorgestellt. Der Abgleich der Isolate aus den Feinwurzeln mit der Studie von Peters et al. (2023) zu Stammfußnekrosen brachte insgesamt 16 Übereinstimmungen (*Biscogniauxia nummularia* OP023156.1, *Cadophora melinii* OP023156.1, Chaetomiaceae sp. OP023303.1, *Clonostachys* sp. OP023174.1, *Coprinellus disseminatus* OP023177.1, *Coprinellus mica-ceus* OP023189.1, *Coprinellus* sp. OP023221.1, *Diaporthe* sp. OP023155.1, *Fusarium* sp. OP023275.1, *Hypoxylon fragiforme* OP023192.1, *Hypoxylon rubiginosum* OP023190.1, *Ilyonectria* sp. OP023255.1, *Ilyonectria* sp. OP023252.1, *Juxtiphoma eupyrena* OP023280.1, *Nemania serpens* OP023201.1, *Scytalidium lignicola* OP023242.1).

Die durch das JKI auf ihre Pathogenität getesteten *H. fraxineus*-Isolate wurden in unseren Antagonisten-Tests verwendet.

Die gewonnenen Daten von Jungeschichten wurden FraDiv zur Verfügung gestellt.

TV4.5**AP9.1 Identifizierung von differentiell exprimierter Genmarkern von *H. fraxineus* in vitro (TV4.5 UHO)**

Übergeordnetes Ziel des Teilvorhabens ist die Identifikation von Genmarkern an deren Expression sich ein gutes Wachstum in Anwesenheit vom Substrat eines sensiblen Wirts ablesen lässt und/oder die Virulenzfaktoren verstärkt exprimiert werden. Bei toleranten Wirten wird eine gegenteilige Reaktion erwartet. Da nur unzureichende Erkenntnisse zum zentralen Metabolismus oder den Virulenzfaktoren vorlagen, wurde die substratabhängige Genexpression im substratabhängigen Vergleich in Transkriptionsstudien erfasst und die differentiell exprimierten Gene analysiert (Zübert et al. in der Begutachtung). Ihre Eignung als differentiell-exprimierte Genmarker in infizierten Wirten schloss sich an, während die geplanten Experimente zur praktischen Anwendung in Freilandpflanzungen in Kooperation mit den anderen Teilvorhaben in der Projektlaufzeit nicht mehr beginnen konnten.

Die Kultivierung von *H. fraxineus*-Isolaten erfolgte in festem und flüssigem Maltose-Hefe-Pepton-Medium (MYP) mit Zusätzen (*F. mandshurica* und *F. fraxineus*) und ohne Zusatz. Ein überraschendes Nebenergebnis waren Anzuchten in mit *Fraxinus ornus* (Blumenesche) supplementierten Medien, die extrem schwach bis erfolglos im Wachstum blieben. Das mit *F. excelsior* ergänzte Medium (EX) übertraf im Wachstum stets die anderen Optionen. Darüber hinaus ergab die Nukleinsäureextraktion von *H. fraxineus*-Mycel, das auf festem Medium kultiviert wurde, vergleichbar geringe Mengen. Es wurden mehrere etablierte Protokolle für die RNA-Extraktion angewandt. Die Mehrheit der Protokolle, z.B. Trizol-Extraktion, resultierte überraschend in geringen Quantitäten und Qualitäten. Lediglich die Festphasenextraktion mit dem RNA-Extraktions-Kit eines Anbieters (Invitac) war erfolgreich. Es wurde zusätzlich deutlich, dass die Mazeration des Myzels in jedem Fall ein besonders kritischer Schritt bei *H. fraxineus*-Kulturen ist. Die besten Ergebnisse wurden durch Einfrieren und Auftauen in Kombination mit einer Mazeration mit Zirkonia-Beads in einer Kugelmühle erzielt. Für die RNA-Seq Experimente wurde die RNA in der PCR und qPCR in der Gelelektrophorese und in der fluorometrischen Messung geprüft, um RNA-Proben Serien von hoher Qualität und ausreichender Quantität zu wählen. Die RNA-Seq(uenzierung) im *paired-end* Ansatz von Illumina (Novogen) ergab >89 Millionen Reads für Isolat 1511, das auf MYP als Kontrolle gewachsen war. Für Medien, die mit Pflanzenmaterial von *F. excelsior* (EX) angereichert waren, wurden >93 Mio. und für *F. mandshurica* (MA) >87 Mio. Reads erhalten. Das Isolat 1431 ergab >39 Mio. für MYP, 36.384.148 für EX und >40 Mio. Reads für MA. Über 92 % der Reads konnten dem *H. fraxineus*-Genom zugeordnet werden.

Die Analyse zur Differentiellen Genexpression (DEG) wurde durchgeführt, um Veränderungen im Transkriptom von *H. fraxineus* zwischen dem Wachstum auf Medien, die mit Blättern von anfälligen (EX) und toleranten Eschenarten (MA) angereichert waren, festzustellen und wirtsspezifisch exprimierte Gene zu identifizieren. Der Vergleich mit Kontrollmedien (MYP) ermöglichte eine Bewertung des Tropismus und des Einflusses von Blattmaterial.

Bei Stamm 1431 wurden während des Wachstums in EX-Medium im Vergleich zur MYP-Kontrolle insges. 1.777 Gene unterschiedlich exprimiert. Im Vergleich zu dem MA-Medium gibt es 126 DEGs, von denen 95 Gene hochreguliert und 31 herunterreguliert sind. Zwischen dem Wachstum auf MA- und den MYP-Medium gibt es 1.783 DEGs.

Bei Stamm 1511 gibt es 1.837 DEGs zwischen dem Wachstum auf EX- und MYP-Medium. Es gibt 1.273 DEGs zwischen den Kulturen in EX- und MA-Medium, wobei 483 Gene hochreguliert und 790 herunterreguliert sind. Der Vergleich von Transkripten aus dem Wachstum in EX- und MYP-Medium resultiert in 812 DEGs. Es ist offensichtlich, dass sich die Isolate in den DEGs unterscheiden.

Wir stellten die Hypothese auf, dass die Besiedlung von *H. fraxineus* auf dem sensiblen Wirt *F. excelsior* aufgrund der günstigen Zusammensetzung der Pflanzenmetabolite mit einem besseren Wachstum verbunden sein könnte. Dies fördert die Pathogenität und spiegelt sich in Veränderungen des Genexpressionsprofils im Vergleich zur Besiedlung von *F. mandshurica* wider. Daher wurde die differentielle Genexpression von *H. fraxineus* zwischen dem Wachstum in EX- und MYP-Medium verglichen, um den Tropismus und den Einfluss von Blattmaterial zu bewerten. Der Vergleich zwischen den beiden ergänzten Medien (EX und MA) ergab die wirtsspezifischen DEGs. Der Vergleich wurde für die beiden Stämme 1431 und 1511 durchgeführt. Zusätzlich wurden für beide Stämme die gemeinsamen hochregulierten Gene zwischen EX vs. MYP und EX vs. MA untersucht.

Insgesamt 916 Gene des Isolats 1431 wurden in FE-Medium im Vergleich zur MYP-Kontrolle signifikant hochreguliert und 95 im FE-Medium im Vergleich zum MA. Der Vergleich von FE- mit der MYP-Kontrolle und MA-Medium ergab 54 sich überschneidende Gene, von denen 22 Gene als Proteine mit unbekannter Funktion annotiert sind. Beim Isolat 1511 sind 875 Gene in EX im Vergleich zu MYP hochreguliert und 483 Gene in EX im Vergleich zu MA. Es gibt 244 sich überschneidende Gene zwischen den beiden in EX hochregulierten Gensätzen. Die Analyse dieser beiden gemeinsamen hochregulierten Gendatensätze ergab jedoch keine gemeinsam hochregulierten Gene zwischen den Isolaten.

Unter den hochregulierten Genen im Isolat 1431 befinden sich viele Gene, die zu den mitochondrialen Enzymen der oxidativen Phosphorylierung gehören, wie die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, die Ubichinol-Cytochrom-C-Oxidoreduktase oder der Cytochrom-Bc1-Komplex, die Cytochrom-C-Oxidase und die ATP-Synthase. Viele der hochregulierten Gene sind Untereinheiten des NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Atmungskomplexes. Dieser Komplex I ist der größte der Atmungskette und die wichtigste Eintrittsstelle für Elektronen. Für das einzige Protein des Komplexes III, Cytochrom b, liegt eine Hochregulierung vor. Außerdem werden zwei vorhergesagte Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V) des F₀-Teils, ATP6/ Untereinheit A und ATP9/ Untereinheit c, die vom mitochondrialen Genom kodiert werden, hochreguliert.

In beiden Isolaten gibt es mehrere hochregulierte Gene, die wie in anderen Ascomyceten vermutlich an der Toxinproduktion beteiligt sind. So zeigen von den Transkripten des Isolats 1511 abgeleitete Aminosäuresequenzen in der Analyse Übereinstimmungen mit der Thioredoxin-Reduktase GliT von *Neosartorya fumigata* (*Aspergillus fumigatus*). Ein weiteres hochreguliertes Gen im Isolat 1431 besitzt eine Domäne der Major Facilitator Superfamily und zeigt Übereinstimmungen mit dem Major Facilitator Gliotoxin-Efflux-Transporter GliA von *N. fumigata*, aber auch mit dem für die Effluxpumpe kodierenden Gen *affT* von *A. parasiticus*. In *A. fumigatus* ist GliT an der Biosynthese des Epipolythiodioxopiperazin (ETP)-Gliotoxins beteiligt und katalysiert den Verschluss der Disulfidbindung des Dithiol-Gliotoxins zum fertigen Gliotoxin (Scharf et al. 2010; Schrettl et al. 2010). Es spielt auch eine wichtige Rolle beim Selbstschutz, da seine Deletion zu einer Störung der Gliotoxinfreisetzung und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber exogenem Gliotoxin führt. Wie das mutmaßliche Homolog in *H. fraxineus* besitzt es eine Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase-Domäne. Gliotoxin wird anschließend durch GliA ausgeleitet (Wang et al. 2014). Gliotoxin ist der bekannteste Vertreter der Klasse der ETPs und hat nachweislich immunsuppressive Eigenschaften (Ye et al. 2021). Das vollständige Gencluster für die Biosynthese von Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus* umfasst eine zweimodulige nicht-ribosomale Peptidsynthase (*gliP*), eine Glutathion-S-Transferase (*gliG*) und ein hypothetisches Protein (*gliK*) (pot. Glutamacyclotransferase), eine Dipeptidase (*gliJ*), eine 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure-Synthase (*gliI*), eine Thioredoxin-Reduktase (*gliT*), eine O-Methyl-Transferase (*gliM*), eine Methyl-Transferase (*gliN*), Cytochrom P450-Monooxygenasen (*gliC* und *gliF*), Major Facilitator Transporter (*gliA*), ein Zinkfinger-Transkriptionsregulator (*gliZ*) (Gardiner und Howlett 2005) sowie *gliH*, ein unbekanntes Protein neben dem Gliotoxin-Cluster (Schrettl et al. 2010). Die detaillierte Funktion der Proteine wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Scharf et al. 2012; Dolan et al. 2015; Scharf et al. 2016; Downes et al. 2023). Für die Proteine, die als Teil des Gliotoxin-Biosynthesewegs beschrieben wurden, wurde nach putativen Homologen in *H. fraxineus* gesucht. Auf der Grundlage der Ähnlichkeit und der Domänenstruktur wurde für alle Proteine, mit Ausnahme von *gliH*, ein mutmaßliches Homologes gefunden. Diese Übereinstimmungen schließen auch den Transkriptionsfaktor *rgIT* von *A. fumigatus* ein (Ries et al. 2020).

Zudem finden sich unter den hochregulierten Genen zwei für das Isolat 1431 und drei für 1511, die den Genclustern der Pilzmetaboliten Aflatoxin (*A. parasiticus*) und Hypothemycin (*Hypomyces subiculosus*) ähnlich sind. In 1431 werden Hinweise auf die Cytochrom P450 Monooxygenase Hpm1 von *H. subiculosus* (*Nectria subiculosa*) gefunden, die Bestandteile des Genclusters sind, der die Biosynthese von Hypothemycin vermittelt. Im Vergleich zum Aflatoxin-Cluster von *A. parasiticus* zeigt es Übereinstimmungen mit der Averantin-Hydroxylase, einer Cytochrom-P450-Monooxygenase (AflG). Das zweite hochregulierte Gen im Stamm 1431 kodiert für eine O-Methyltransferase-Domäne. Verglichen mit dem Hypothemycin-Gencluster von *H. subiculosus* zeigt es Übereinstimmungen mit der O-Methyltransferase Hpm5 und im Vergleich zum Aflatoxin-Cluster von *A. parasiticus* zu einer Demethylsterigmatocystin-6-O-Methyltransferase. Im Isolat 1511 gibt es zwei weitere hochregulierte Gene, die für eine O-Methyltransferase-Domäne kodieren sowie eine Norsolorinsäure-Ketoreduktase und eine potentielle Assoziation zum Aflatoxin-Clusters zeigen, aber nicht zum Hypothemycin-Cluster von *H. subiculosus*. Abgesehen von den hochregulierten Genen gibt es weitere Gene im Genom von *H. fraxineus*, die Ähnlichkeiten mit Genen des Aflatoxin-Biosynthese-Clusters von *A. parasiticus* und des Hypothemycin-Biosynthese-Clusters von *H. subiculosus* aufweisen.

Im Isolat 1511 gibt es weitere hochregulierte Gene, die Ähnlichkeiten zu Genen anderer bekannter Toxincluster aufweisen. Zwei hochregulierte Gene, *dep3* und *dep4*, zeigen Übereinstimmungen mit Genen für die Depudecin-Synthese (DEP-Cluster) in *Alternaria brassicicola* (Wight et al. 2009). Depudecin ist ein Polyketid, das als Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor wirkt (Kwon et al. 1998) und zur Virulenz von *A. brassicicola* beiträgt (Wight et al. 2009). Dieser Cluster besteht aus sechs Genen, darunter vier Gene, die wahrscheinlich für Enzyme kodieren, die die Synthese von Sekundärmetaboliten katalysieren, ein Gen, das für einen MFS-Transporter kodiert, und ein Gen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Neben *dep3* und *dep5* wurden Transkripte mit Übereinstimmungen zu *dep1*, *dep2*, *dep5* und *dep6* identifiziert.

Wir stellten auch die Hypothese auf, dass bessere Wachstumsbedingungen in einem anfälligen Wirt wie *F. excelsior* mit der höheren Expression von Genen für Pathogenität in *H. fraxineus* einhergehen. Um Gene mit einem hohen Potenzial für eine Beteiligung an der Pathogenität zu identifizieren, wurden die hochregulierten DEGs während des Wachstums in EX- und MA-Medium der Isolate 1431 und 1511 in der Gegenüberstellung analysiert. Der Vergleich von 95 hochregulierten Genen in EX im Vergleich zu MA für das Isolat 1431 und 483 hochregulierten Genen in EX im Vergleich zu MA für das Isolat 1511 ergab einen überlappenden Satz von vier Genen. Diese vier Gene zeigen in beiden Stämmen, die in EX angezogen wurden, im Vergleich zu MA eine höhere Transkriptionsrate.

Das erste gemeinsame Gen ist eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase, die zuvor aufgrund der Übereinstimmungen zu *vidF* von *Nodulisporium* spp. *vir7* des Viridiol-Biosynthese-Genclusters zugeordnet wurde (Elfstrand et al. 2021; Wang et al. 2018). Es wurde gezeigt, dass VidF zusammen mit VidP (Esterase) und VidH (Dehydrogenase) an der Biosynthese von Demethoxyviridin (Furanosteroid) beteiligt ist, indem es die Spaltung der Pregnan-Seitenkette (C17–C20) katalysiert.

Ein weiteres Gen kodiert für ein Signalpeptid-tragendes Protein unbekannter Funktion, das eine Neprosindomäne kodiert, die erstmals in Kannenpflanzen als Peptidase in der Verdauungsflüssigkeit beschrieben wurde (Lee et al. 2016).

Identifiziert wurde auch ein Gen, welches ein Protein mit Übereinstimmungen zur FAD-abhängigen Monooxygenase DEP4 von *F. langsethiae* zeigt. Es verfügt über eine Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase-Domäne und auch das DEP4-Protein von *F. langsethiae* gehört zur Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase-Familie.

Das letzte Gen im gemeinsamen Datensatz ist die Thioredoxinreduktase *gliT*, welches bereits bei hochregulierten Genen des Isolats 1511 beschrieben wurde.

AP9.2 Identifizierung von differentiell exprimierter Genmarkern von *H. fraxineus* in planta (TV4.5 UHO)

Über 130 Eschen wurden zwei Mal am JKI in Braunschweig (Teilvorhaben 4.2) in 2022 mit Mycel durch Pfropfung Infektionsexperimenten unterzogen. Die erste Infektion im Sommer blieb erfolglos, während der zweite Versuch erfolgreich verlief. Das infizierte Sprossmaterial von *F. mandshurica* und *F. excelsior* wurde entnommen und Gesamt-RNA extrahiert, der DNA-Hintergrund mittel DNase-Verdau eliminiert, die RNA stabilisiert und die Konzentration mit dem Fluorometer bestimmt. TaqMan Assays wurden für die potentieller Genmarker (*hymA*, *hymC*, *vir7*, *gliT*, *vbs*) und für *elongation factor 1 alpha* (*eEf1α*; Kontrolle) designt und zunächst mit Material aus dem kultivierten Pathogens evaluiert. Die Assays für das Wachstum/interne Kontrolle (*eEf1α*) und Virulenz (*gliT*) bewährten sich. Die interne Kontrolle konnte in ersten Tests bei 74/80 Proben erfolgreich amplifiziert werden. Der Virulenzmarker *gliT* konnte nur noch bei 19/74 Proben im Triplikate mit einem $C_t < 35$ nachgewiesen werden. Die Analyse der weiteren Genmarker im Pflanzenmaterial dauert an.

AP9.3 Evaluierung der Expression von Genmarkern in selektiertem sensiblem und widerstandsfähigem Vermehrungsgut im Bereich der Blatt- und Stammfußnekrosen (TV4.5 UHO)

AP9.4 Transkriptomanalysen zum Einfluss von Applikationen zur Kontrolle des Pathogens *in vitro* (TV4.5 UHO)

Die Unterarbeitspakete konnten in der Projektlaufzeit nicht mehr bearbeitet werden.

TV4.6**AP10.1 Sekundärmetabolite von *H. fraxineus* und seiner Antagonisten: Biotests der Isolate und Rein-substanzen (TV4.6 TUBS)**

Etwa 300 endophytische Pilze wurden isoliert und auf Hemmung von *H. fraxineus* in Dualkultur untersucht. Antagonistische Isolate wurden in axenisch angezogenen Eschensämlinge inokuliert und auf Hemmung von *H. fraxineus* überprüft.

Acht Metabolite von *Penicillium manginii* 10400 und *Pezicula* sp. 8999 wurden hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivitäten getestet. Drei der getesteten Metabolite von *P. manginii* 10400 und zwei von *Pezicula* sp. 8999 hemmten bakterielle Testorganismen; ein Metabolit von *P. manginii* 10400 und drei von *Pezicula* sp. 8999 wirkten antifungisch. CJ-17,572 von *Pezicula* sp. 8999 und *P. cinnamomea* P434 und PF 1140 von *P. manginii* 10400 hemmten *H. fraxineus*. Aus *Pezicula livida* P437 wurde auch der Metabolit Mycorrhizin A isoliert. Für die Auswahl von Endophyten, die anhand ihrer Hemmung von *H. fraxineus* als geeignet erschienen, wurden im weiteren Projektverlauf die Strukturaufklärungen erfolgreich durchgeführt (siehe AP10.3).

Durch Inokulation von Endophyten in axenischen Eschensämlingen wurden Endophyten nicht nur für die Strukturaufklärungen, sondern auch für Infektionen von Gewächshaus- und Freiland-Eschen ausgewählt. Der Versuch im Gewächshaus in dem sechs Endophyten in 2-jährige Eschen inokuliert wurden, lieferte positive Ergebnisse bezüglich der Inhibierung der Symptome des Eschentriebsterbens (Kooperation PP4.2). In einem Freilandversuch (Kooperation PP4.9), in dem untersucht werden sollte, ob endophytische Pilze und ein endophytisches Bakterium synergistisch die Entwicklung des Eschentriebsterbens hemmten, gab es durch die trockenen klimatischen Bedingungen keine Ergebnisse. Ein mit dem *gfp*-Gen transformierter *H. fraxineus* wurde nach der Besiedlung des Pathogens erfolgreich in den infizierten Eschensämlingen dargestellt (Kooperation PP4.7).

In Kooperation mit der UHH wurde *H. fraxineus* mit Viren transfiziert. Nach Inokulation der transfizierten *H. fraxineus* in axenischen Eschensämlinge wurde die Symptomatik des Eschentriebsterbens verringert, was auf Hypovirulenz hindeutet (Kooperation PP4.7). In Kooperation mit PP4.7 UHH wurde darüber hinaus ein mit GFP transformierter *H. fraxineus*-Stamm in axenischen Sämlinge inokuliert, um den Erfolg der Transformation mikroskopisch zu bestätigen.

AP10.2 Taxonomische Identifizierung der pilzlichen Isolate (Morphologie, ITS-Sequenzen, Marker) (TV4.6 TUBS)

Im Rahmen unserer Arbeiten konnten zahlreiche vielversprechende Isolate gewonnen werden, die das Pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* sehr effektiv hemmen. Diese sehr robusten inhibitorischen Effekte wurden in Laborversuchen sowohl *in vitro* als auch *in planta* beobachtet. Aus diesem Grund wurde die pilzlichen Isolate anhand von morphologischen Kriterien, ITS-Sequenzen und genetischen Markern identifiziert. Von der bisherigen Auswahl von zwölf Endophyten, die für Strukturaufklärungen und Infektionsversuche ausgewählt wurden, wurden neun anhand von Morphologie und molekularbiologischen Ergebnissen klassifiziert: *Pezicula* sp. 8999, *Pezicula livida* P437, *Pezicula cinnamomea* P434, *Hypoxyton rubiginosum* 9969, *Hypoxyton perforatum* MUC11042, *Hypoxyton petriniae* STMA 03026, *Diaporthe oncostoma* 10605, *Nemania diffusa* 10622 und *Muriformistrickeria rubi* 10641. Alle Pilzisolat mit denen in diesem Projekt intensiver geforscht wurde, wurden in Kultursammlungen hinterlegt. Die Identifizierung von pilzlichen Isolaten erwies sich als hilfreich für den Ausschuss von redundanten Sekundärmetaboliten, der Evaluierung der Naturstoffe hinsichtlich ihres Mykotoxinpotentials und der Prognose hinsichtlich des Persistenzvermögens wirksamer Sekundärstoffproduzenten.

AP10.3 Strukturaufklärung der Metaboliten aus aktiven Kulturextrakten und Ausschluss von Mykotoxin-Produzenten (TV4.6 TUBS)

Für eine Auswahl der effektivsten Endophyten wurden die Strukturen der Sekundärmetaboliten aufgeklärt und auf antifungische, antibakterielle, cytotoxische und phytotoxische Eigenschaften überprüft. Darüber hinaus wurden Analysen durchgeführt, um Mykotoxine auszuschließen. Aus *H. fraxineus* wurden die Strukturen von Viridin, Viridiol und Hyfraxinsäure aufgeklärt. Phytotoxisch wirkten Kulturextrakte von *H. fraxineus*, *P. manginii* und *Pezicula* sp. sowie die Reinsubstanzen Citreoviridine, Penidiamide, PF1140, Vancouverone A, B, and C und Viridiol in einem Blattsegmenttest. Von vier Endophyten, *Pezicula* sp. 8999, *Pezicula cinnamomea* P434, *Pezicula livida* P437, und *Penicillium manginii* 10400, die die Esche asymptomatisch besiedelten, wurden die aktiven Prinzipien, die *H. fraxineus* hemmen, aufgeklärt: CJ-17,572 von *Pezicula* sp. 8999 und *P. cinnamomea* P434 und PF 1140 von *P. manginii* 10400. Von *Pezicula* sp. 8999 wurden insgesamt die Strukturen von sechs Metaboliten aufgeklärt, wovon eine Struktur, ein NRPS-PKS Hybrid, neu ist. Zwei der acht Metaboliten von *P. manginii* 10400 waren bisher unbekannt. Leider produzieren *Pezicula* sp. 8999 und *P. manginii* 10400 Mykotoxine und die Isolate der Gattung *Pezicula* das zytotoxische Mycorrhizin A und kommen somit als biologisches Bekämpfungsmittel nicht in Frage. Ebenfalls wurden von zwei Stämme von *H. fraxineus* die Strukturen der antifungischen und phytotoxische Metaboliten aufgeklärt.

AP10.4 Biotechnologische Optimierung der Produktion von aktiven Metaboliten (TV4.6 TUBS)

Nachdem die Strukturen von 14 Metaboliten aus vier Endophyten und zwei Isolaten von *H. fraxineus* aufgeklärt werden konnten, wurde nach der Bestätigung ihrer antifungischen und antibakteriellen Aktivität mit der biotechnologischen Optimierung der Produktion der aktiven Metabolite begonnen. Hierfür wurden die Produktionsmedien und die Metabolit-Quantifizierung optimiert. Für die Weiterführung dieser Arbeiten und die Vorbereitung des Praxistransfers wurde eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung beantragt.

TV4.7

Die Arbeiten sind in drei Hauptpunkte untergliedert. Zunächst mussten potenziell für die Infektion von *H. fraxineus* geeignete Viren gefunden und charakterisiert werden. Parallel dazu wurde ein Protokoll für die Transformation und Transfektion von *Hymenoscyphus fraxineus* entwickelt. Im letzten Schritt wurden die Ergebnisse der ersten beiden Arbeitspakete zusammengeführt, der Stamm von *H. fraxineus* mit Viren infiziert und auf mögliche Hypovirulenz getestet. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Projektes anhand der Arbeitspakete detailliert beschrieben.

AP11 Bekämpfung des Eschentriebsterbens mit Hilfe von hypovirulenten Viren durch Behandlung von Eschensämlingen zur Förderung von Resistenzen und Toleranzen o./u. zum direkten Einsatz als Antagonisten (TV4.7 UHH)

AP11.1 Beschaffung von Probenmaterial von *H. fraxineus* und von Arten innerhalb der Ordnung der Helotiales (TV4.7 UHH)

Ursprünglich war beabsichtigt, Viren aus heimischen Basidiomyceten zu isolieren. Der Hintergrund dafür war, dass es bei diesen Missbildungen gibt, die auf eine Virusinfektion hindeuten. Hierfür wurde bei der Deutschen Gesellschaft für Mykologie (DGfM) ein Aufruf gestartet, Pilze mit offensichtlichen Missbildungen zu sammeln und zur Verfügung zu stellen (Abb. 24).

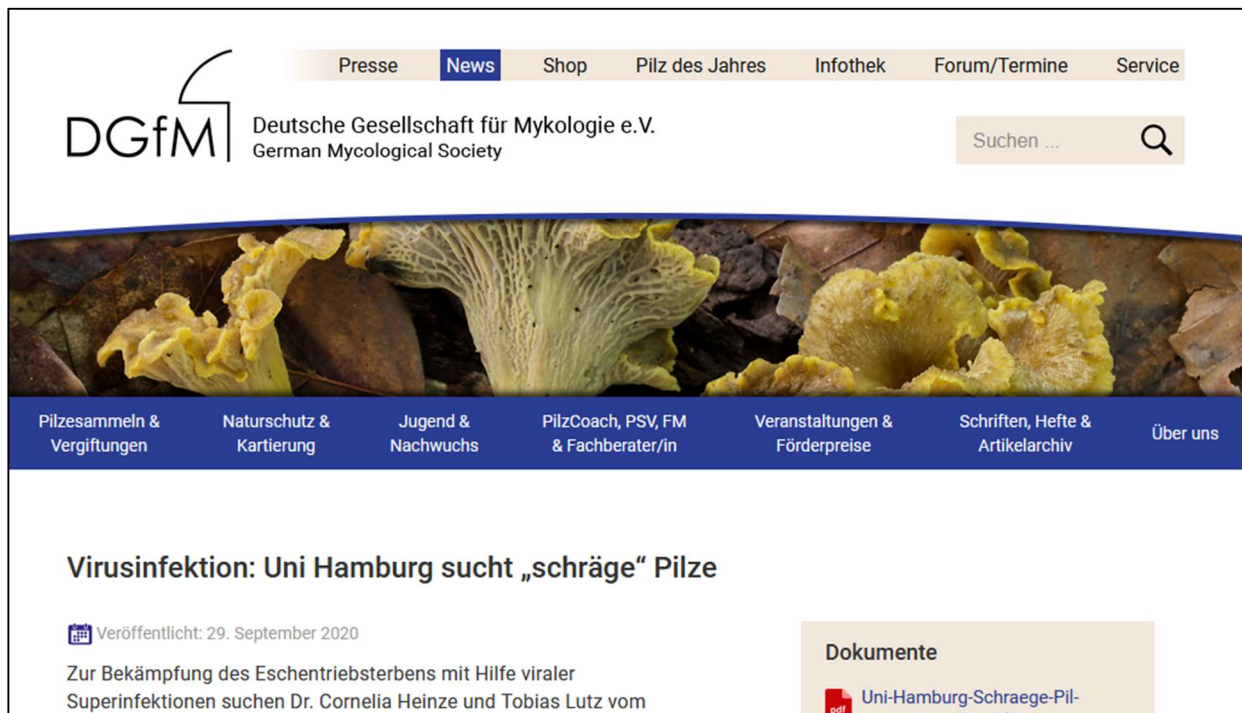


Abbildung 24: Screenshot des Sammelaufrufs Virusinfektion: Uni Hamburg sucht „schräge“ Pilze vom September 2020

Ein Nebeneffekt bei dem Aufruf war, das Verfahren der virusinduzierten Hypovirulenz einer breiteren Öffentlichkeit bekannt zu machen, denn Virusinfektionen sind in der Bevölkerung – zurecht und vor allem durch die Coronapandemie - negativ belegt. Eine Aufklärung von interessierten Laien, wie sie in der DGfM organisiert sind, ist als Multiplikator für eine spätere Akzeptanz bei den Anbauern und in der Bevölkerung nicht zu unterschätzen. Hierzu wurde dem Aufruf eine kurze und für Laien verständliche Erklärung hinzugefügt. Der fachliche Hintergrund der Aktion war, dass zuvor schon von mehreren solcher Hutpilze Viren isoliert werden konnten und auch von angebauten Pilzen Virusinfektionen bekannt sind (Abb. 25). Im Laufe des Herbstes 2020 erhielten wir aufgrund des Aufrufes etwa 50 Fruchtkörper mit Wuchsanomalien.



Abbildung 25: Hutpilze mit Wuchsanomalien. Links: *Clitocybe odora* (Dufftrichterling) mit dem *Clitocybe odora* mitovirus 1 (Heinze 2012). Rechts: *Russula lepida* (Harter Zinnoberäubling) mit unbekanntem Virus.

Die Bearbeitung dieser Pilze gestaltete sich aus mehreren Gründen als schwierig. Durch den zuweilen längeren Postweg (während der Pandemie) waren einige dieser Exemplare verwest und damit nicht mehr zu gebrauchen. Weitere Exemplare waren Mykorrhizapilze, die für eine *in vitro* Vermehrung komplexe Nährmedien erfordern. Die Möglichkeit der Vermehrung war wichtig, da für die spätere Charakterisierung und die Isolierung viraler Strukturen eine größere Menge an Myzel benötigt werden würde. Bei der Kultivierung von Mykorrhizapilzen waren wir nur in wenigen Fällen erfolgreich. Auch bei Arten, die eine saprophytische Lebensweise hatten, war durch die unsterile Entnahme aus der Natur eine Inkulturnahme durch ausgeprägte Kontaminationen sehr schwierig. Dazu kam, dass weder von den etwa 50 eingesendeten Fruchtkörpern direkt noch von den angelegten Kulturen eine Virusinfektion nachgewiesen werden konnte.

Im gewerblichen Pilzanbau sind Virusinfektionen zuweilen für die Vermarktung problematisch, sind aber, genauso wie Pflanzenviren, für den Verzehr unbedenklich. Da die Symptome teilweise bei einer Infektion sehr gering sind, sind solche virusinfizierten Pilze durchaus im Supermarkt zu erwerben. Pilze aus dem Anbau sind darüber hinaus in der Regel simpel zu kultivieren und haben weniger bakterielle und pilzliche Kontaminationen. Aus einem *Pleurotus eryngii* (Austernseitling) aus dem Supermarkt konnten wir tatsächlich isometrische Partikel reinigen und mit einer Sequenzierung als das Oyster mushroom spherical virus (OMSV) bestimmen. In der axenischen Kultur wurde jedoch das Virus verloren und konnte deswegen nicht weiter berücksichtigt werden.

Da die Suche nach virusinfizierten Basidiomyceten und deren Kultivierung erfolglos war, wurde auf Ascomyceten der Lebenssammlung der NW-FVA Göttingen (Dr. Gitta Langer) zurückgegriffen. Die Bearbeitung von Pilzen aus der Sammlung hatte vielfältige Vorteile. Die Pilze lagen in einer Reinkultur vor und wurden bereits mehrfach subkultiviert. Das bedeutet, dass bei Auffinden eines Virus sich dieses auch in weiteren Subkulturen wahrscheinlich stabil weitervermehrt. Die jeweilige Art und damit die Anzuchtbedingungen waren zudem bekannt. Insgesamt wurden 244 Ascomyceten aus der Sammlung bearbeitet. Darüber hinaus wurden 34 *H. fraxineus* Isolate (JKI Braunschweig) mit bekannter Pathogenität untersucht. Ein weiteres Isolat wurde von der Universität BS (M. Steinert, B. Schulz) zur Verfügung gestellt. Dies war deswegen interessant, da es sich um den nächsten Verwandten zu *H. fraxineus*, dem *H. albidus*, handelte. Diese Art ist von *H. fraxineus* mittlerweile fast komplett verdrängt.

Von den 34 *H. fraxineus* Isolaten (JKI Braunschweig) wurde in 23 das Hymenoscyphus albidus mitovirus 1 (HaMV1) nachgewiesen. Ein Abgleich mit den Daten des JKI bezüglich ihrer Pathogenität ergab keine Korrelation von Virusinfektion und einer Reduktion der Pathogenität.

Molekulare Absicherung der Arten

Die Spezies der Isolate von 1.2 der NW-FVA, in denen Virus nachgewiesen worden war, waren in der Regel bekannt. Für Publikationen wurden die Spezies trotzdem molekular mittels Sequenzierung der ITS-Region abgesichert. Die Methode ist für die Speziesermittlung bei Pilzen üblich. Wenn die Speziesabsicherung mit einem Vergleich der ITS-Region nicht eindeutig möglich war, wurden weitere einschlägige Sequenzen analysiert. Dies war entweder in Hamburg selbst oder bei komplexerer Analyse in der AG Langer (Dr. Steffen Bien) erfolgreich. Das Isolat *H. albidus* von der Universität Braunschweig wurde ursprünglich 2009 in der Schweiz gesammelt und von Queloz et al. (2011) publiziert. Die Herkunft als *H. albidus* wurde dennoch mittels ITS-Sequenzierung abgesichert.

AP11.2 Anzucht und Vermehrung des Materials aus AP3-11.1 (TV4.7 UHH)

Alle 244 Ascomyceten aus der Sammlung der NW-FVA und das Isolat von *H. albidus* (AP1.1) wurden in der Regel auf Eschenblattmedium oder den jeweils optimalen Nährboden in Petrischalen vermehrt. Es wurden an

der Universität Hamburg nur solche Isolate kryokonserviert, in denen Virus nachgewiesen wurde und die weiterbearbeitet wurden. Die *H. fraxineus* Isolate des JKI BS wurden für die Versuche vermehrt und nicht weiter gesichert. Alle Isolate sind in der NW-FVA, der Universität BS und im JKI vorhanden.

AP11.3 Überprüfung auf Virusinfektion und ggf. Isolierung von viralen Strukturen (TV4.7 UHH)

Die meisten Viren, die in Pilzen und Pflanzen gefunden werden, kodieren ihre Gene auf einzelsträngiger RNA (ssRNA Viren) oder doppelsträngiger RNA (dsRNA-Viren). Da auch die ssRNA Viren eine Phase mit dsRNA in ihrem Replikationszyklus haben, ist es eine gängige Methode in der Pflanzen- und Pilzvirologie, eine solche dsRNA zu isolieren und damit eine Virusinfektion nachzuweisen. Zwar ist in Organismen dsRNA auch immer vorhanden, jedoch ist diese mit maximal 50 Nukleotidpaaren sehr viel kleiner als die dsRNA einer Virusinfektion mit mindestens 1.500 Nukleotidpaaren. Isolierte virale dsRNA ist in einer Agarosegelelektrophorese gut darstellbar und damit der Nachweis nach Isolierung simpel. Es gibt verschiedene Protokolle der Isolierung, die aber alle eine größere Menge an Ausgangsmaterial benötigen, aufwändig sind oder/und mit organischen Lösungsmitteln arbeiten. Eine Zahl von nahezu 250 Proben konnte mit diesen Methoden nicht bearbeitet werden. Der kommerziell erhältliche dsRNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam-Si, South Korea) war zwar je Probe kostenintensiv, zeigte aber sehr gute Ergebnisse auch bei kleinen Mengen an Probenmaterial (Abb. 26).

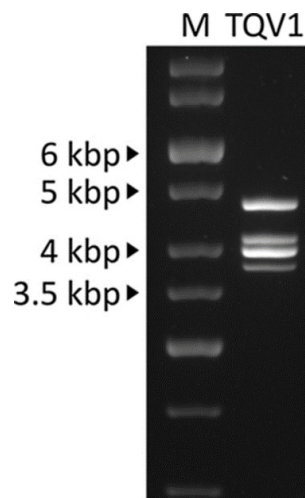


Abbildung 26: Beispiel des Nachweises der vier dsRNA Segmente des von uns neu beschriebenen *Thelonectria quadriviruses 1* (mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese nach Isolierung mit dem dsRNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology)). TQV1= virale dsRNA Banden, M=Längenstandard mit ausgewählten Bandengrößen in kbp.

Bevor alle Proben bearbeitet werden konnten, war der Kit der Firma iNtRON nicht mehr lieferbar. Eine Nachfrage ergab den Grund: Die Mykoviropologie ist ein sehr spezielles Forschungsgebiet und die Produktion damit nicht rentabel. Da die sehr gute Performance des Kits nicht durch herkömmliche Methoden zu ersetzen war, wurden verschiedene Kits für die RNA- und DNA-Isolierung von Pflanzen (und Pilzen) getestet und für die eigene Anwendung adaptiert. Zu unserer Überraschung lieferten verschiedene Kits für die Isolierung genomischer DNA von Pflanzen mit kleinen Adaptionen sehr gute Ergebnisse. Die Vorteile von diesen Kits waren zudem der Wegfall der Arbeiten mit organischen Lösungsmitteln sowie der deutlich geringere Preis je Probe im Vergleich zum Kit der Firma iNtRON. Die Ergebnisse wurden in einem internationalen Journal publiziert und sind sowohl für Pflanzenvirologen als auch für Mykoviropologen interessant.

In etwa zehn der untersuchten Proben der Sammlung der NW-FVA Göttingen und dem *H. albidus*-Isolat der Universität Braunschweig wurde dsRNA eindeutig nachgewiesen. Bei weiteren Proben der Sammlung waren die Ergebnisse zweideutig. Diese Proben wurden nicht weiterbearbeitet.

Einige Mykoviren liegen als nackte dsRNA in der Zelle vor, die sich für eine spätere Transfektion von *H. fraxineus* nicht eignet. Vielmehr sind nur solche Viren geeignet, die durch das Verpacken in eine Proteinhülle Partikelstrukturen (Abb. 27, links) ausbilden. Deswegen wurden die Proben (Tab. 4), in denen virale dsRNA nachgewiesen worden war (1.3), auf das Vorhandensein viraler Partikel getestet. Dafür wurde das Myzel zunächst auf Nährmedium vermehrt, geerntet und daraus virale Partikel über verschiedene Schritte der Ultrazentrifugation isoliert.

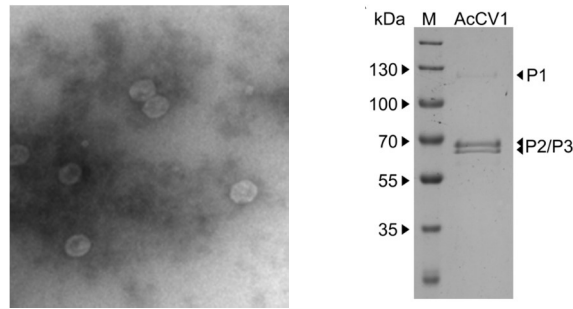


Abbildung 27: Nachweis von Viruspartikeln (Links) Im Elektronenmikroskop. Typische isometrische Partikel von Pilzviren von *Aspergillus cibarius chrysovirus 1*. Elektronenmikroskopische Aufnahme nach Kontrastierung mit 2 % (w/v) Uranylacetat. (Rechts) In der Proteingelelektrophorese. Proteinmuster des *Aspergillus cibarius chrysovirus 1*. AcCV1=*Aspergillus cibarius chrysovirus 1* Partikel, M=Molekulargewichtsstandard mit Banden in kDa. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE in 12.5 % Polyacrylamid aufgetrennt und mit Coomassie Brillantblau gefärbt.

Zum schnellen Testen auf das Vorhandensein von Viruspartikeln war die Elektronenmikroskopie die geeignetste Methode. Aufgrund der Pandemie konnte allerdings nicht immer auf diese Serviceleistung des Instituts zurückgegriffen werden. Eine Alternative war der Nachweis der Hüllproteine mit Hilfe einer Proteingelelektrophorese und anschließender Färbung der Banden (Abb. 27, rechts). Das virale Genom wurde aus den Partikeln isoliert und für eine vorläufige Einordnung des Virus daraus cDNA synthetisiert, mit PCR vermehrt und kloniert. Einige dieser Klone wurden sequenziert. Mit Hilfe dieser Sequenzen in Kombination mit der Kenntnis der Anzahl der vorhandenen dsRNA-Segmente konnte das jeweils isolierte Virus vorläufig eingruppiert werden. Anfangs war nicht klar, welche Methode der Sequenzierung, nach Sanger oder über *next generation sequencing* (NGS), schneller zum Erfolg führt. Elma Japic kam im Rahmen ihrer Masterarbeit zur Erkenntnis, dass das NGS der Sequenzierung nach Sanger sowohl im Aufwand als auch in den Kosten überlegen war. Alle weiteren Proben wurden deswegen mittels NGS charakterisiert. Nur zur Vervollständigung wurde die Sequenzierung nach Sanger herangezogen, was in der Virologie eine gängige Vorgehensweise ist. Alle detektierten Virusinfektionen waren bisher nicht bekannt und wurden teilweise als Erstbeschreibungen veröffentlicht. Uns lagen also Viruspartikel vor, die für die Transfektion geeignet waren.

Tabelle 4: Herkunft von charakterisierten Isolaten und darin gefundene/neu beschriebene Viren

Herkunft	Virus
<i>H. albidus</i>	Hymenoscyphus albidus victorivirus 1 (HaVV1)*
NW-FVA 1901	Thelonectria quadrvirus 1 (TQV1)*
NW-FVA 1829	Ilyonectria crassa alternavirus 1 (IcAV1)*
NW-FVA 2572	Fusarium solani alternavirus 1 (FsAV1)*
NW-FVA 2590	Aspergillus cibarius chrysovirus 1 (AcCV1)*
NW-FVA 1581	Diplodia fraxini fusagravirus 1 (DfFV1)*
NW-FVA 1701	Diplodia fraxini partitivirus 1 (DfPV1*) + DfFV1
NW-FVA 5852	Komplex aus drei Viren
NW-FVA 3187	Hadakavirus, unvollständig sequenziert
NW-FVA 1313	Unbekannt, interessante Strukturen
NW-FVA 1568	unbekannt
NW-FVA 1765	Fusagravirus

*= im Rahmen des Projektes publiziert

AP11.4 Optimierung der Transfektion von *H. fraxineus* mit dem *Hymenoscyphus fraxineus* Mitovirus 1 (HfMV1) und mit dem *Fusarium graminearum* virus China-9 (FgV-ch9) (TV4.7 UHH)

Ein Isolat von *H. fraxineus* musste zur Erzeugung von Hypovirulenz mit den in AP1 gefundenen Viren infiziert werden. Mit der Etablierung der Infektion war die Chance gegeben, ein hypovirulentes Isolat zu erhalten, was als BCA in der Praxis eingesetzt werden könnte. Ein Protokoll für die artübergreifende Infektion von *H. fraxineus* existierte bisher nicht. Die beiden gängigen Varianten, die Protoplastentransfektion mittels PEG und die Protoplastenfusion, beruhen beide auf der Herstellung von zellwandlosen Zellen (Protoplasten) und deren

Regeneration zu vollständigem Myzel. Zunächst wurde das Protokoll zur Generierung von Protoplasten und ihrer Regeneration entwickelt. Dies erforderte das Austesten geeigneter Enzyme zum Zellwandverdau, die Einstellung der Bedingungen zur Lebensfähigkeit sowie die Regeneration der Protoplasten zu einem Myzel unter verschiedenen Bedingungen. In Abbildung 28 ist die Regeneration bei unterschiedlichen pH-Werten als Beispiel gezeigt. Eine Schwierigkeit war hierbei, die Protoplasten zu konzentrieren. Aufgrund ihrer Winzigkeit ließen sie sich nicht wie die Protoplasten anderer Pilze sedimentieren. Als flotierende Protoplasten konnten sie allerdings gut konzentriert werden. Für die stabile Transformation, die parallel „on top“ etabliert wurde, mussten geeignete Antibiotika und ihre optimalen Konzentrationen ermittelt werden.

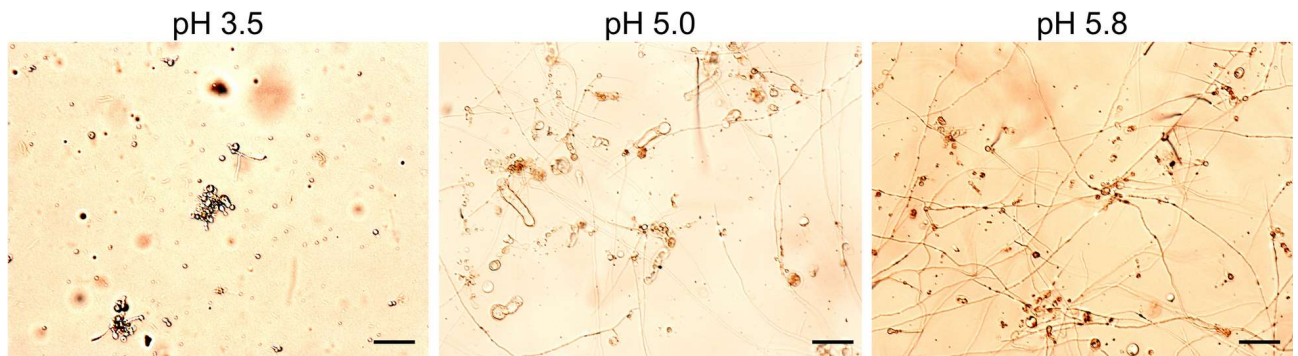


Abbildung 28: Auskeimen von Protoplasten zu Myzel nach vier Tagen unter verschiedenen pH-Wert Bedingungen. Die Protoplasten keimen bei pH3.5 nicht, bei pH 5.0 teilweise und bei pH 5.8 fast alle. Maßstab=100 µM.

Nach der Etablierung der Protoplastierung und der Regeneration der Zellen zu Myzel wurde zunächst die Methode der stabilen Transformation etabliert. Da wir nicht davon ausgehen konnten, dass alle Viren, die uns zur Verfügung standen, in *H. fraxineus* replizieren, war eine stabile Transformation besser kontrollierbar als eine Infektion mit Viren. Die Transformation wurde zunächst nach einer etablierten Methode mittels PEG und dem Einbringen des Reportergens mCherry getestet, und es wurden Konstrukte verwendet, die zuvor zur Transformation von *Fusarium graminearum* verwendet wurden. Die Transformation war direkt erfolgreich. Weitere Mutanten mit der Expression des Reportergens GFP wurden etabliert. Diese Reportergen-exprimierenden Mutanten sind für die Untersuchung der Biologie des Erregers wertvoll, und es konnte mit ihnen Myzel in Wurzelspitzen von *in vitro*-infizierten Eschensämlingen detektiert werden (Abb. 29). Die Mutanten und das Protokoll wurden den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus konnte eine gezielte Genabschaltung mit dieser Methode gezeigt werden, was ebenfalls für die Untersuchung der Biologie des Erregers auf molekularer Ebene hilfreich ist. Das Protokoll wurde publiziert.

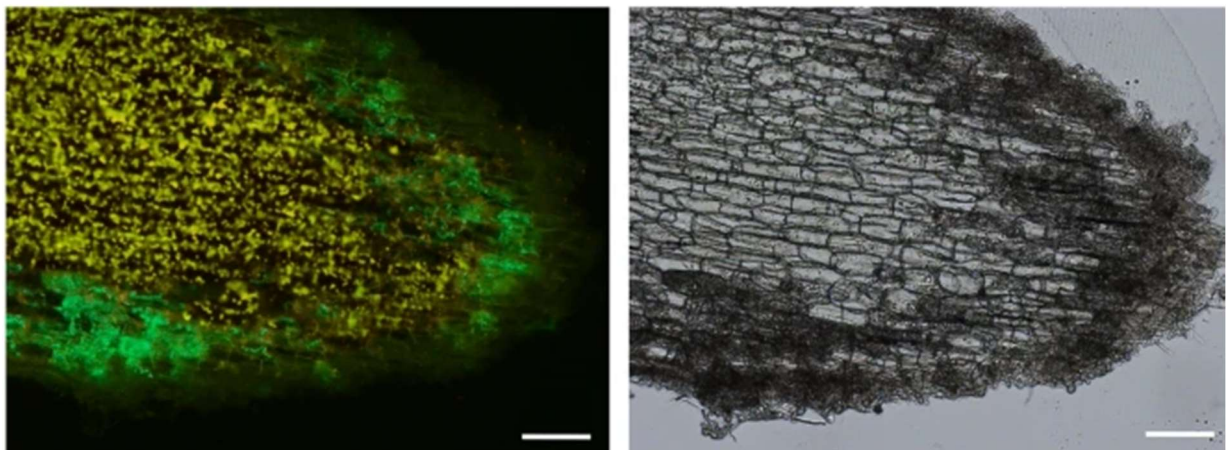


Abbildung 29: Wurzelspitzen von Eschensämlingen sechs Wochen nach Inokulation in 40 µM Schnitten im Hellfeld (rechts) und unter GFP Anregung (links). Die gelbe Färbung ist Hintergrundfluoreszenz, die grüne Färbung GFP-exprimierendes Myzel. Maßstab= 50 µM.

AP11.5 Transfektion von Viren, die aus *H. fraxineus* und verwandten heimischen Arten isoliert wurden (TV4.7 UHH)

Für die Transfektion wurden der Viruskomplex aus dem Isolat NW-FVA 5852, das HaVV1 aus *H. albidus* (beide Tabelle 1) und das in der Arbeitsgruppe etablierte hypovirulente FgV-ch9 Chrysovirus aus *Fusarium graminearum* verwendet. Nach der Regeneration wurde solches Myzel gesichert, was einen vom nicht-infizierten Myzel abweichenden Phänotypen aufwies.

Nachweis der Infektion

Myzel der drei Transfektionen wurde subkultiviert und das Virus mit Hilfe der RT-PCR auf molekularer Ebene nach Isolierung von dsRNA nachgewiesen. Ein Nachweis von dsRNA mit Hilfe der Gelelektrophorese gelang nicht, da wahrscheinlich der Virustiter zu gering war.

AP11.6 Testung der transferierten (AP3-11.5) Isolate auf mögliche Hypovirulenz (TV4.7 UHH)

Die transfizierten Subkulturen wurden auf ihren Phänotyp untersucht. Alle Kulturen wiesen auf Nährmedium einen verringerten Wuchs auf, was auf eine Hypovirulenz deutet (Abb. 30, oben). In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner der Universität Braunschweig wurden alle drei Transfektionen im Biotest auf ihre Virulenz getestet. Hier konnte bei allen Proben eine verminderte Virulenz im Vergleich zum virusfreien Myzel beobachtet werden. Ein Beispiel eines Biotests mit Myzel, infiziert mit HaVV1 (Abb. 30, unten).

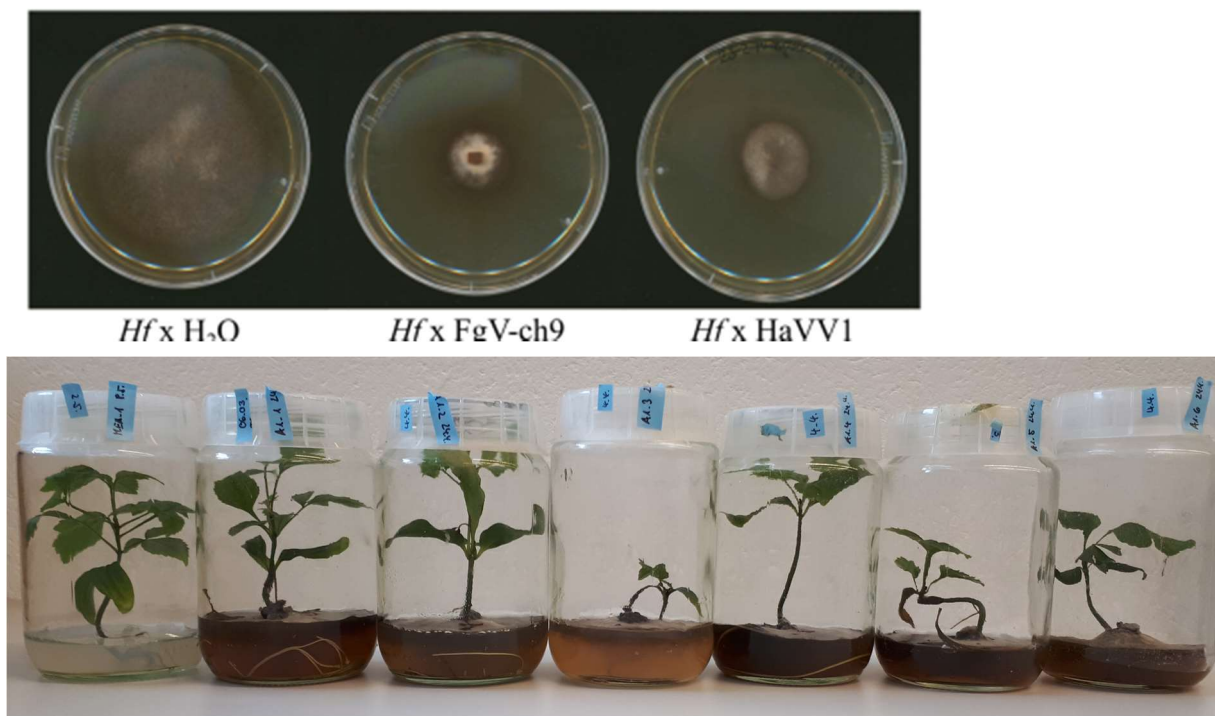


Abbildung 30: Beispiele von Phänotypen virusinfizierter *H. fraxineus* und ihr Verhalten im Biotest auf Eschensämlingen. Oben: Die Kulturen mit Virusinfektionen von FgV-ch9 und HaVV1 zeigen einen stark verminderten Wuchs gegenüber der Kultur, die mit Wasser zur Kontrolle behandelt wurde. Unten: Beispiel eines Biotests mit Myzel, infiziert mit HaVV1. Das linke Glas zeigt die nicht infizierte Negativkontrolle (Biotest und Bild von B. Schulz, Universität Braunschweig).

AP11.7 Transkriptomanalysen von hypovirulenten Isolaten und Auswahl von Targets für die RNAi (TV4.7 UHH)

Für die Transkriptomanalysen von hypovirulenten Isolaten hätten die Biotests wiederholt werden müssen. Nur dann hätte sichergestellt werden können, dass die Daten solide und damit die Transkriptomanalysen aussagekräftig sind.

TV4.8**AP12.1 Transkriptomanalysen zur Verifizierung eines RNAi Pathways in *H. fraxineus* (TV 4.8 AgrSc)**

Die *in-silico*-Analyse der RNAi-Gene zeigte, dass in *H. fraxineus* homologe Proteine zu den wichtigsten Enzymen des RNAi-Wegs vorhanden sind. Wir identifizierten sechs ARGONAUTE-ähnliche (AGO) Proteine, zwei DICER-ähnliche (DCL) Proteine und zusätzlich vier RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RDRs).

AP12.2 und AP12.3 Bioinformatische Analyse der Transkriptomdaten zur Auswahl von *H. fraxineus* Target-Genen und Produktion der korrespondierenden dsRNAs (TV 4.8 AgrSc)

Als Zielgene wurden die potentiell essentiellen Gene RNA-Polymerase II Untereinheit B (RPB) und Cytochrome P450 Lanosterol C-14 α -Demethylase Gene (CYP51) in *H. fraxineus* ausgewählt. Der RNA-Polymerase II Komplex transkribiert die mRNA eines Gens vom Genom. CYP51 ist Bestandteil der Zellmembran und ein Target verschiedener azolhaltiger Fungizide. Eine Polyketid Synthase wurde als phenotypischen Marker ausgewählt. PKS ist ein Schlüsselenzym des Melaninsynthesewegs und das Ausschalten des Gens erzeugt vermutlich einen Albino-ähnlichen Phenotyp in *H. fraxineus*. AP12.2 wurde entsprechend dem Zeitplan abgeschlossen.

Die Herstellung der Doppelstrang-RNA mit Haarnadel-Struktur (Inverted-Repeat, IR) war nicht erfolgreich. Als Vorlage-DNA diente hier ein Plasmid, das den T7-Promotor trägt mit der nachfolgenden Sequenz: Zielgenabschnitt in „sense“ Ausrichtung, einer Platzhaltersequenz (Spacer) die nicht in *H. fraxineus* vorkommt und der Zielgenabschnitt in „antisense“ Ausrichtung. Durch die Intramolekulare Zusammenlagerung der beiden komplementären Abschnitte entstehen der doppelsträngige Stamm und die einzelsträngige Schleife. Die *in vitro*-synthetisierte RNA war zu kurz und lag hauptsächlich als Einzelstrang vor. Die Struktur wurde durch den Abbau (Verdau) der RNA mit einer einzelstrangspezifischen RNase überprüft. Vermutlich wurde das Transkript durch zurückfallen frühzeitig terminiert oder die T7-Polymerase wurde dadurch von der Vorlage-DNA abgelöst. Daher wurde eine weitere Methode zur Herstellung von dsRNA erprobt. Es erfolgte eine Anpassung der RNA-Synthesestrategie auf ein PCR-Produkt mit zwei gegenläufigen T7-Promotoren. Die Sense- und Antisense-Stränge wurden separat synthetisiert und anschließend zusammengelagert. Die resultierenden RNAs entsprachen der erwarteten Größe und lagen hauptsächlich als Doppelstrang-Struktur vor. Dadurch wurde AP12.3 mit etwa zwei Monaten Verzögerung abgeschlossen.

AP12.4 Applikation der dsRNAs auf *H. fraxineus* und Überprüfung der Wirksamkeit der dsRNAs durch Nachweis von siRNAs mittels sRNAseq von *H. fraxineus* Material (TV 4.8 AgrSc)

Die Applikation der Target-dsRNA auf *H. fraxineus* *in vitro* Kulturen zeigt nicht den zu erwartenden Phänotyp nach Stilllegen des Zielgens. Die Gründe dafür sind zunächst noch unklar (siehe folgenden Paragraphen). Um die Frage nach der Aufnahme von extern applizierter RNA durch *H. fraxineus* zu umgehen, erfolgte im Weiteren die stabile Transformation des Pilzes mit einem Inverted-Repeat (IR)-Konstrukt. Die stabile Expression einer PKS-IR RNA in *H. fraxineus* führte zu einem Albino-ähnlichen Phänotyp. Interessanterweise wurde das PKS-Transkript trotz des Auftretens des zu erwartenden Phänotyps nach einem erfolgreichen „Silencing“ nicht reduziert. Die Sequenzierung der AGO-gebundenen siRNA (TraPR-Kit, Lexogen GmbH) bestätigt die korrekte Prozessierung des Inverted-Repeats, jedoch weisen die vorhandenen siRNA lediglich Sequenzhomologien für den Bereich des Inverted-Repeat auf. Es hat also keine Amplifizierung des Silencing Signals stattgefunden und möglicherweise hat ein bisher unbekannter Suppressor die Bildung von sekundären siRNAs verhindert. Es wurde ein GFP-Reportergen-Konstrukt in das Genom von *H. fraxineus* eingefügt (Kooperation mit Projektpartner Dr. Cornelia Heinze, Uni Hamburg). Es stellte sich heraus, dass das Konstrukt ungeeignet für die Experimente ist. Die GFP-Reportergen Expression wurde von einem Kupfer-supprimierten Promotor aus *Fusarium* gesteuert. Zum einen sollte dies eine einfache Überwachung des Silencing-Signals ermöglichen, da bei erfolgreichem Silencing die Fluoreszenz verringert wird und dies mit einem UV-Mikroskop beobachtet werden kann. Zum anderen wurde damit die Induzierbarkeit des Promotors überprüft. Nach der Zugabe des Kupferchelators Bathocuproindisulfonsäure setzte die Expression des Reportergens zeitverzögert ein, mit einem Maximum nach ca. 8-12h und fiel danach stetig ab. Dieses Zeitfenster war zu kurz um das Silencing des GFP eindeutig zu bewerten. Aus anderen Pilz- und Pflanzenarten war bekannt, dass dies frühestens 48h nach der Zugabe einer dsRNA und bei dauerhafter Reportergenexpression möglich wurde. Ein weiteres Problem dieses Konstruktes war, dass die Expression des Reportergens durch den Suppressor Kupfer nicht vollständig unterdrückt wurde. Ein Konstrukt zur dauerhaften GFP-Reportergenexpression wird zurzeit in *H. fraxineus* transformiert. Dies vereinfacht die Überwachung des Silencing-Phänotyps deutlich und ermöglicht die Untersuchungen zur Funktionsaufklärung des potentiellen Suppressors des RNAi-Mechanismus.

Für die stabile Transformation von *H. fraxineus* mit IR-Konstrukten ist die Steuerung der Expression über ein induzierbaren Promotor sehr wichtig, da das Ausschalten der Targetgene CYP51 und RPB vermutlich letal wäre. Dies stellt ein Problem für die erfolgreiche Regeneration der Protoplasten nach der Transformation dar. Es wurde im Weiteren ein Tetracyclin-induzierbares Konstrukt (pVG2.2 Tet-ON, Dr. Vera Meyer, TU Berlin)

beschafft, dessen Eigenschaften in *Aspergillus niger* sehr gut charakterisiert wurden und den o.g. Anforderungen entspricht. Dieses Konstrukt besteht aus zwei Regulatorischen Einheiten. Die erste Einheit exprimiert dauerhaft einen inaktiven Transkriptionsfaktor, der durch Tetracyclin aktiviert werden kann. Der aktive Transkriptionsfaktor steuert die Expression der zweiten Einheit, die das Zielgen (Inverted-Repeats oder GFP-Reporter) enthält. Zurzeit werden die Sequenzen der Inverted-Repeats und eines Markergens (Antibiotikaresistenz zur Positivselektion) in das Tet-On Konstrukt eingefügt. Anschließend werden die verifizierten Konstrukte in *H. fraxineus* transformiert. Dadurch verzögert sich das Erreichen von AP12.4 (in vitro Wirksamkeitsnachweis) und folgende APs um sechs bis neun Monate.

AP12.5 Stammapplikation der RNA-Moleküle aus AP3 in *H. fraxineus*-infiziert Eschensämmlinge und Überprüfung der Wirksamkeit durch Nachweis von siRNAs mittels sRNA-seq von *H. fraxineus* infizierten Eschensämmlingen (TV 4.8 AgrSc)

Die Stammapplikationsmethode wurde an 4–6-jährige Eschensämmlinge mit einer dsRNA ohne Sequenzhomologie getestet. Die Applizierte dsRNA konnte schon nach 24 Stunden in den Blättern, mittels Northernblot Analyse nachgewiesen werden. Die Methode ist somit sehr gut geeignet eine dsRNA kurzfristig (z. B. bei einem hohen Infektionsdruck) und effektiv in die Blätter zu transportieren, um potenziellen Schutz vor eintreffenden *H. fraxineus* Sporen zu bieten.

Bei externer Applikation zeigt die dsRNA keinen Einfluss auf das Wachstum von *H. fraxineus*. Nach stabiler Transformation eines IR-Konstrukts in *H. fraxineus* konnte die Prozessierung von dsRNA in siRNAs und die Einlagerung derselben in AGO nachgewiesen werden. Ein Abbau der Ziel mRNA erfolgte nicht. Es wurde festgestellt, dass das Silencing des PKS durch die Inhibierung der Translation hervorgerufen wird. Der Abbau der Ziel-mRNA sowie das Ausbreiten des Silencingssignals werden vermutlich durch einen unbekanntes Suppressor verhindert.

AP12.6 Wirksamkeitsstudien unter natürlichen oder naturnahen Bedingungen (Stammapplikation oder Sprühverfahren) und Dokumentation des Krankheitsverlaufs (TV 4.8 AgrSc)

Da festgestellt wurde, dass der RNAi Pathway in *H. fraxineus* vorhanden ist, dsRNAs auch in siRNAs prozessiert und diese in AGO eingelagert werden, aber das Silencing des Zielgens wahrscheinlich durch einen Suppressor unterdrückt wird, ist die Durchführung dieses APs nicht sinnvoll, bevor die Wirkungsweise des potentiellen Suppressors aufgeklärt ist.

AP12.7 Test verschiedener Herstellungsverfahren von dsRNA, mittels Überprüfung der Wirksamkeit der hergestellten dsRNAs wie in AP 4,5 beschrieben (TV 4.8 AgrSc)

Ein Herstellungsverfahren für dsRNA konnte etabliert werden (RNA-Synthese basierend auf einem PCR-Produkt mit gegenläufigen Promotoren), des Weiteren gilt für AP12.7 dasselbe wie für AP12.6

TV4.9**AP13.1 Entwicklung stammspezifischer real-time PCR-Systeme zum Nachweis der Etablierungsfähigkeit und zur Quantifizierung der Persistenz der Inokulationsstämme (TV4.9 ZALF)****AP13.1.1 Design stammspezifischer Primer und Sonden basierend auf der Genom-Sequenzierung der zu prüfenden Stämme (TV4.9 ZALF)**

Die stammspezifischen qPCR-Nachweissysteme haben wir ab Oktober 2020 anhand eines eigenen Workflows entwickelt, der hauptsächlich auf der Open-Source-Software Neptune (Marinier et al. 2017) basiert (Burghard et al. 2023). Der komplette Workflow ist auf GitHub zur Verfügung gestellt (Wende 2023). Die wichtigsten Schritte unseres Arbeitsablaufs sind in Abbildung 31 dargestellt. Um stammspezifische Sequenzfragmente zu finden, erstellten wir zunächst eine Datenbank mit allen Genomsequenzen der Familie, zu der der jeweilige Stamm gehört, der *Xanthomonadaceae* für den Stamm D4P002 (465 Genome), der *Alcaligenaceae* für den Stamm B3P038 (322 Genome) und der *Aurantimonadaceae* für den Stamm C2P003 (148 Genome). Weiterhin wurden die Genome der Stämme D4P002, C2P003 und B3P038 sequenziert (Becker et al. 2022; Ulrich et al. 2022; Behrendt et al. 2024). Alle Referenz-Genome wurden aus der NCBI-Datenbank abgerufen. Im nächsten Schritt verwendeten wir die Software Neptune ver. 1.2.5 (Marinier et al. 2017). Diese Software identifiziert normalerweise genomische Loci, die im vom Benutzer festgelegten Zielgenom vorhanden sind, die aber in den Referenzgenomen fehlen. Daher haben wir das Zielgenom (Einschlussgruppe) von D4P002, B3P038 oder C2P003 mit der entsprechenden Genomdatenbank (Ausschlussgruppe) verglichen, um spezifische Sequenzfragmente des Genoms zu finden, die nur im Zielgenom vorhanden sind. Anschließend wurde die Einzigartigkeit der identifizierten Genomfragmente durch eine Nukleotid-BLAST-Suche mit der gesamten NCBI Nukleotid-Datenbank bestätigt. Schließlich wurden die eindeutigen und damit stammspezifischen Sequenzen verwendet, um die Primer-Sonden-Systeme mit OligoArchitect™ (Sigma-Aldrich Co. LLC. 2014) für die zweistufige PCR mit einer doppelt markierten Sonde zu entwerfen. In einem letzten Schritt wurden die gefundenen Primer- und Sondensequenzen erneut durch eine Nukleotid-BLAST-Suche als einzigartig bestätigt, um zunächst *in situ* die Möglichkeit des Nachweises eines Nicht-Zielorganismus auszuschließen.

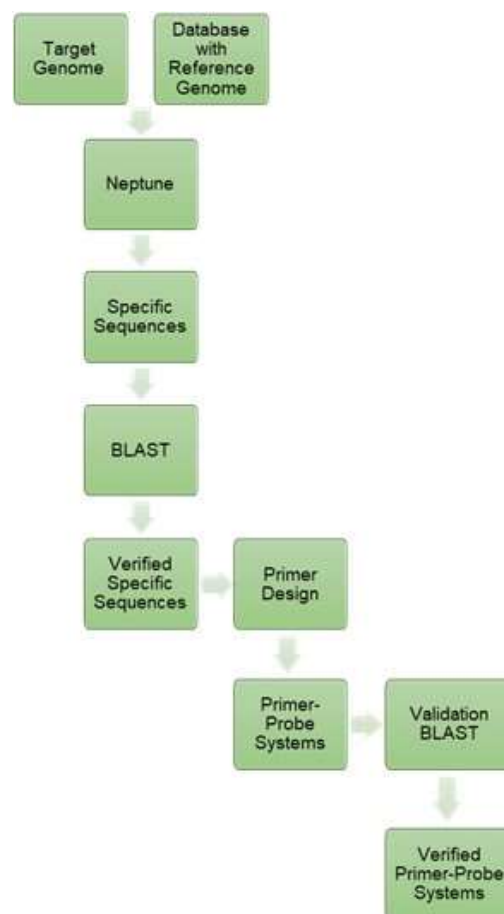


Abbildung 31: Arbeitsablauf, der die Suche nach stammspezifischen Sequenzen und das Design der qPCR-Assays beschreibt. Der Arbeitsablauf besteht aus folgenden Schritten: i) Aufbau einer Datenbank bestehend aus zum Zielgenom eng verwandter Referenzgenome, ii) Identifizierung potenzieller stammspezifischer Sequenzen des Zielgenoms im Vergleich zu den Referenzgenomen mithilfe von Neptune, iii) Bestätigung der Einzigartigkeit der Kandidatensequenzen mithilfe von BLAST mit der nt-Datenbank und iv) Primerdesign gefolgt von einem zusätzlichen BLAST-Validierungsschritt.

Beim Vergleich des Genoms von *Luteimonas fraxinea* D4P002 mit den Referenzgenomen aus der Familie der *Xanthomonadaceae* konnten 16 hochspezifische Sequenzfragmente im Genom von D4P002 festgestellt werden. Der von Neptune ermittelte Konfidenzwert reichte von 0,9990 bis 0,9684. Die am höchsten eingestufte Sequenz hatte eine Länge von 2739 bp. Die BLAST-Suche dieser Sequenz mit der NCBI nt-Datenbank bestätigte, dass es keine Sequenzen mit signifikanter Ähnlichkeit gab. Diese spezifische Sequenz für D4P002 wurde für das Primer-Probe-Design ausgewählt. Für *Aureimonas altamirensis* C2P003 wurden 223 spezifische Sequenzen mit einem Score > 0,7648 gefunden, darunter 39 Sequenzen mit einem Score > 0,99. Die am höchsten bewertete Sequenz hatte einen Score von 0,9985 und eine Länge von 1724 bp. Diese Sequenz wurde für das Primer-Sonden-Design ausgewählt, da die anschließende BLAST-Suche bestätigte, dass die Sequenz ausschließlich in C2P003 vorkommt. Für *Schaurella fraxinea* B3P038 wurden 84 spezifische Sequenzfragmente im Genom gefunden. Der von Neptune ermittelte Konfidenzwert reichte von 0,9998 bis 0,7830. 33 Ergebnisse erhielten einen Wert von über 0,99. Das am höchsten eingestufte Sequenzfragment hatte eine Länge von 3689 bp und wurde für das Design des Primer-Probe-Systems verwendet.

Die Primer- und Sondensequenzen der entwickelten qPCR Assays sind in Tabelle 5 aufgeführt. Das Amplikon für den Stamm D4P002 hat eine Länge von 88 bp befindet sich an der Position 3.648.216-3.648.303 der Genomsequenz (CP089507), während das Design des C2P003-spezifischen Assays zu einem Amplikon von 180 bp führte, das sich an der Position 1.059.900-1.060.079 des Genoms von C2P003 befand (CP089311). Das Amplikon mit einer Länge von 171 bp befindet sich an Position 869,581-869,752 der Genomsequenz (GCA_030849945.1).

Tabelle 5: Beschreibung der Primer und Sonden sowie der qPCR-Assays, die für den stammspezifischen Nachweis von D4P002, C2P003 und B3P038 verwendet wurden.

	<i>L. fraxinea</i> D4P002	<i>A. altamirensis</i> C2P003	<i>S. fraxinea</i> B3P038
Forward Primer	5'-tct gcg gat acc ttt atg -3'	5'-cca agt tga aga gaa agt c-3'	5'-cgg ata agt gga tga aga-3'
Reverse Primer	5'-cga act gct cat tat tcc-3'	5'-tcg tca gaa tta aca ctc a-3'	5'-cct agc aga act tga gag-3'
Sonde	5'-cac ctc cgc tcc aac tat ctt ca-3'	5'-cct gct ctt atc tca tac gct gga a-3'	5'-agt tcc gtt cca gat tca gtc gt-3'
Amplikonlänge	88 bp	180 bp	171
Sensitivität	1 Kopie	1 Kopie	1 Kopie
Effizienz	96%	93%	84%

AP13.1.2 Etablierung der PCR-Systeme: Prüfung Sensitivität und Effizienz sowie der Spezifität (TV4.9 ZALF)

Zur Optimierung der Sensitivität und Effizienz der stammspezifischen qPCR Assays wurden die erstellten Primer-Sonden Systeme in der realtime PCR bei unterschiedlichen Bedingungen getestet. Die Reaktionsbedingungen waren 95 °C für 2 Minuten und 40 Zyklen von 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 1 Minute. Die Standardkurven wurden durch Reihenverdünnungen der genomischen DNA der jeweiligen Stämme erstellt. Die optimalen Konzentrationen für die Primer bzw. die Sonde wurden für den Stamm D4P002 mit 0,3 µM bzw. 0,1 µM ermittelt. Der optimale C2P003-Nachweis erfolgt bei einer Konzentration von 0,3 µM für die Primer und 0,25 µM für die Sonde. Für B3038 konnten 0,5 µM/0,15 µM als optimale Konzentrationen für Primer und Sonde bestimmt werden. In allen Assays konnte eine Kopie des Zielgens zuverlässig nachgewiesen werden (in zwei von drei PCR-Wiederholungen).

Die Spezifität der qPCR-Assays wurde gegen Typstämme verwandter Arten sowie gegen Bakterienstämme getestet, die aus dem Eschen-Mikrobiom isoliert wurden und zu verschiedenen Familien des Phylums *Pseudomonadota* (syn. *Proteobacteria*) gehören. In allen Tests wurden nur die die Zielstämme nachgewiesen, alle anderen Bakterien waren nicht nachweisbar.

Um die Spezifität der qPCR-Assays zu veranschaulichen, wurden die phylogenetischen Beziehungen der getesteten 25 Bakterienstämme durch 16S-rRNA-Genanalyse untersucht. Wie im Stammbaum gezeigt, haben die *L. fraxinea*-Stämme D4P002, A1P009, C4P040a und A1P058 identische Sequenzen (Abb. 32). Trotz dieser engen Verwandtschaft war durch das D4P002-Assay ein stammspezifischer Nachweis möglich, die anderen *L. fraxinea*-Stämme waren wie alle anderen getesteten Bakterien in der qPCR negativ. Eng verwandt zu *L. fraxinea* ist *L. chenhongjianii* 100111. Die Stämme bildeten zusammen mit den anderen *Luteimonas*-Arten und dem *Xanthomonas*-Stamm D3P049b einen Cluster. Der Baum grenzt die Familien *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Erwiniaceae* und *Pectobacteriaceae* sowie den zu den Betaproteobacteria gehörenden

Massilia-Stamm B2P089 deutlich von den Stämmen der Klasse Alphaproteobacteria ab. Die 16S-rRNA-Gensequenz von C2P003 weist eine Ähnlichkeit von 99,9 % mit dem Typstamm von *A. altamirensis* und dem *Aureimonas*-Stamm C2P036 auf. Alle untersuchten *Aureimonas*-Stämme lagen im Stammbaum eng zusammen und zeigten eine schwächere Beziehung zu den anderen Alphaproteobakterien.

Wie oben erwähnt war aufgrund der hohen phylogenetischen Ähnlichkeit einiger der analysierten Stämme der 16S-rRNA-basierte Stammbaum nicht in der Lage, ihre Verwandtschaftsbeziehungen vollständig abzubilden. Dementsprechend wurde eine phylogenomische Analyse der *Luteimonas*- und *Aureimonas*-Stämme mit bekannten Genomsequenzen durchgeführt (Abb. 33).

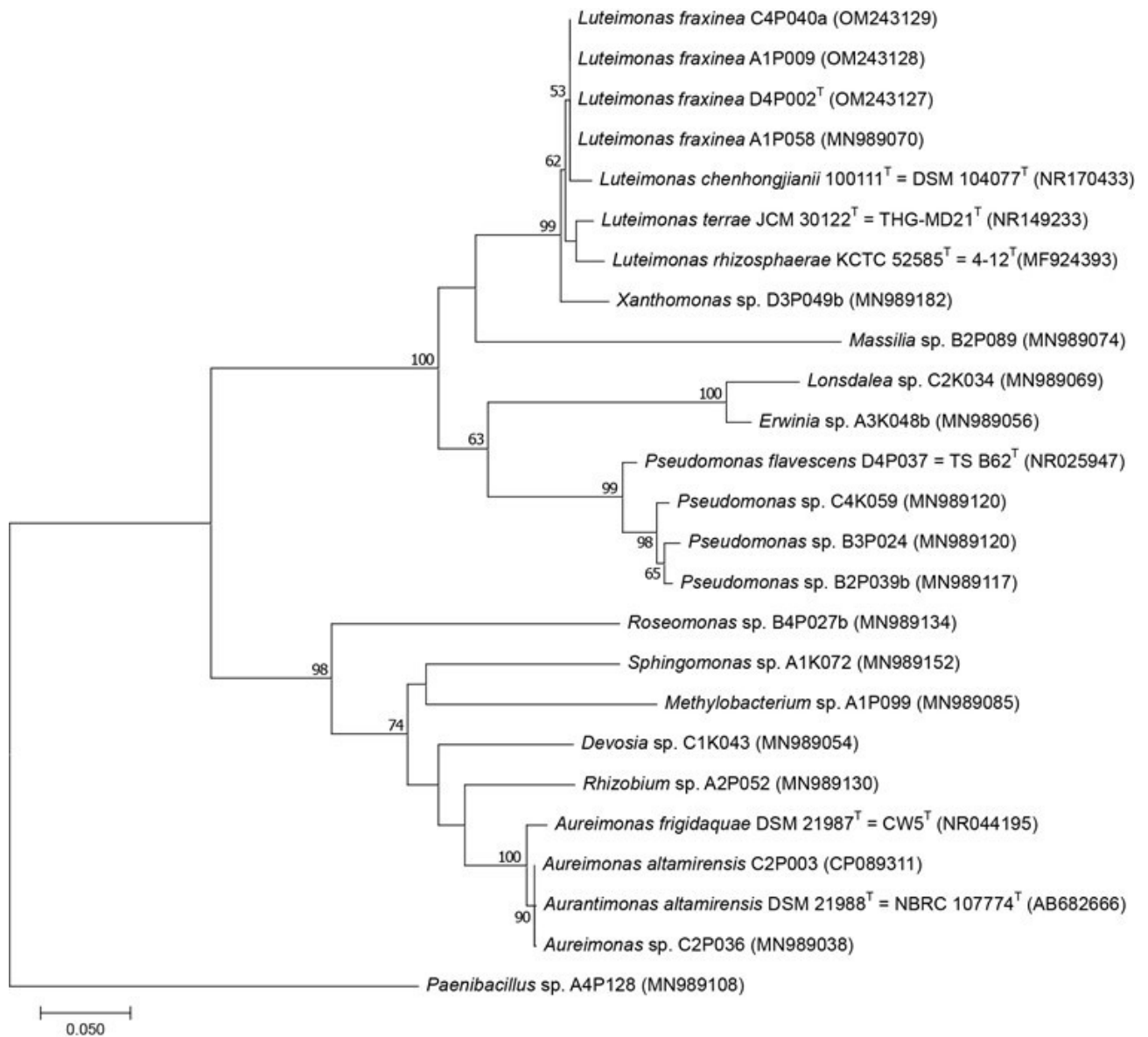


Abbildung 32: Phylogenetische Analyse, die die Positionen der Stämme D4P002 und C2P003 innerhalb von *Aureimonas* und *Luteimonas* sowie anderer verwandter Gattungen zeigt, die im Mikrobiom von Eschenblättern identifiziert wurden. Der Maximum-Likelihood-Baum basiert auf dem 16S rRNA-Gen. *Paenibacillus* sp. A4P128 wurde als outgroup verwendet. Die Zahlen an den Astknoten beziehen sich auf Bootstrap-Werte > 50%. Balken: Substitutionen pro Nukleotidstelle. Die Hinterlegungsnummern sind in Klammern angegeben.

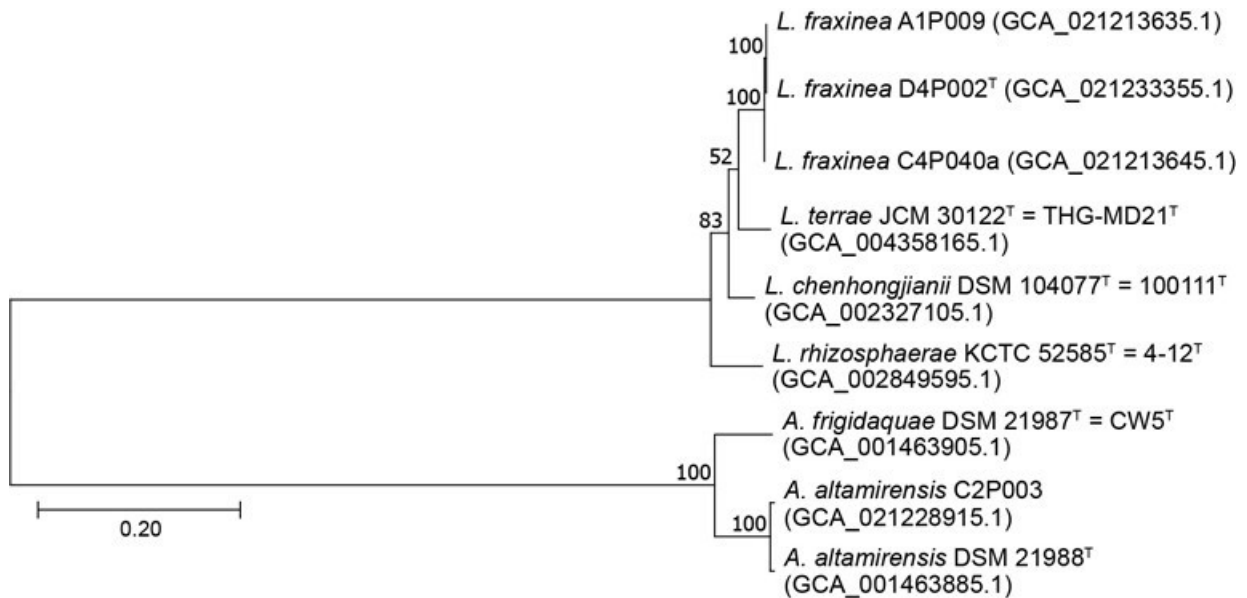


Abbildung 33: Phylogenomischer Baum, der die Positionen der Stämme D4P002 und C2P003 innerhalb der Gattungen *Aureimonas* und *Luteimonas* zeigt. Der Maximum-Likelihood-Baum basiert auf 120 Markerproteinen. Die Zahlen an den Astknoten beziehen sich auf Bootstrap-Werte > 50%. Balken: Aminosäure-Substitutionen pro Position. Die Hinterlegungsnummern sind in Klammern angegeben.

Der Baum zeigte die engste Verwandtschaft von D4P002 mit A1P009. Basierend auf den 120 analysierten Proteinen waren die Stämme mit einer Ähnlichkeit von 99,98% nahezu identisch. Das Genom von C4P040a war mit einer Ähnlichkeit von 99,84% auch eng mit dem von D4P002 verwandt. Die analysierten Proteinsequenzen von *A. altamirensis* C2P003 waren wiederum denen des Typstamms DSM21988 sehr ähnlich, mit einem Ähnlichkeitswert von 99,29%. Der nächstverwandte Stamm, *A. frigidaquae* DSM21987, wurde deutlich abgetrennt. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse die hohe Spezifität der D4P002- und C2P003-basierten qPCR-Assays. Trotz der teils geringen Unterschiede im Genom wurde kein eng verwandter Stamm oder eine andere Bakterien-Art mit dem jeweiligen System erfasst.

Zusätzlich wurden die qPCR-Assays der Stämme D4P002 und C2P003 in einem Gewächshausversuch an Eschensämlingen getestet, um zu zeigen, ob die inokulierten Stämme grundsätzlich auf bzw. in den Pflanzen quantitativ erfasst werden können. Acht Wochen nach der Inokulation konnten die Stämme D4P002 und C2P003 in den jeweiligen Pflanzen und in den verschiedenen Pflanzenorganen nachgewiesen werden (Abb. 34). In der Kontrolle hingegen war keiner der Zielstämme nachweisbar. Darüber hinaus konnten sie nicht nur in inokulierten (alten) Pflanzenteilen, sondern auch in den jungen, nicht inokulierten Pflanzenteilen nachgewiesen werden. Die statistische Analyse der Abundanzen zeigte, dass das Pflanzenorgan einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der nachgewiesenen Genkopien hatte. Der Stamm hatte einen geringeren, aber ebenfalls signifikanten Einfluss auf die Abundanz. Da auch die Interaktion der beiden Faktoren (Stamm und Pflanzenorgan) statistisch signifikant war, wurden weitere Analysen für jeden Stamm separat durchgeführt. Für den Stamm C2P003 wurden in alten Blättern signifikant mehr Genkopien gefunden als in allen anderen Pflanzenteilen ($p < 0,001$) (Abb. 34). Frische Blätter, alte Stängel und frische Stängel unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Für D4P002 wurden in alten Blättern signifikant mehr Genkopien gefunden als in frischen Blättern ($p < 0,001$) und frischen Stängeln ($p = 0,006$). Außerdem war die Abundanz von D4P002 im alten Stängel signifikant höher als in den frischen Blättern ($p < 0,001$). Die Kopienzahl von D4P002 in den alten Blättern war ebenfalls signifikant höher als die im alten Stängel, im frischen Stängel und in den frischen Blättern der C2P003-Inokulationsvariante. Im alten Stängel wurden signifikant mehr Genkopien von D4P002 als von C2P003 gefunden. Insgesamt wurden die höchsten Abundanzen in den alten beimpften Blättern beobachtet. Die Stämme waren ebenso in den alten Stängeln nachweisbar, aber mit einer nur geringfügig niedrigeren Kopienzahl konnten sie auch in den nicht inokulierten frischen Stängeln gefunden werden. Eine deutlich geringere Abundanz wurde bei den frischen Blättern festgestellt. In der Summe war die Abundanz des Stammes D4P002 tendenziell höher als die des Stammes C2P003.

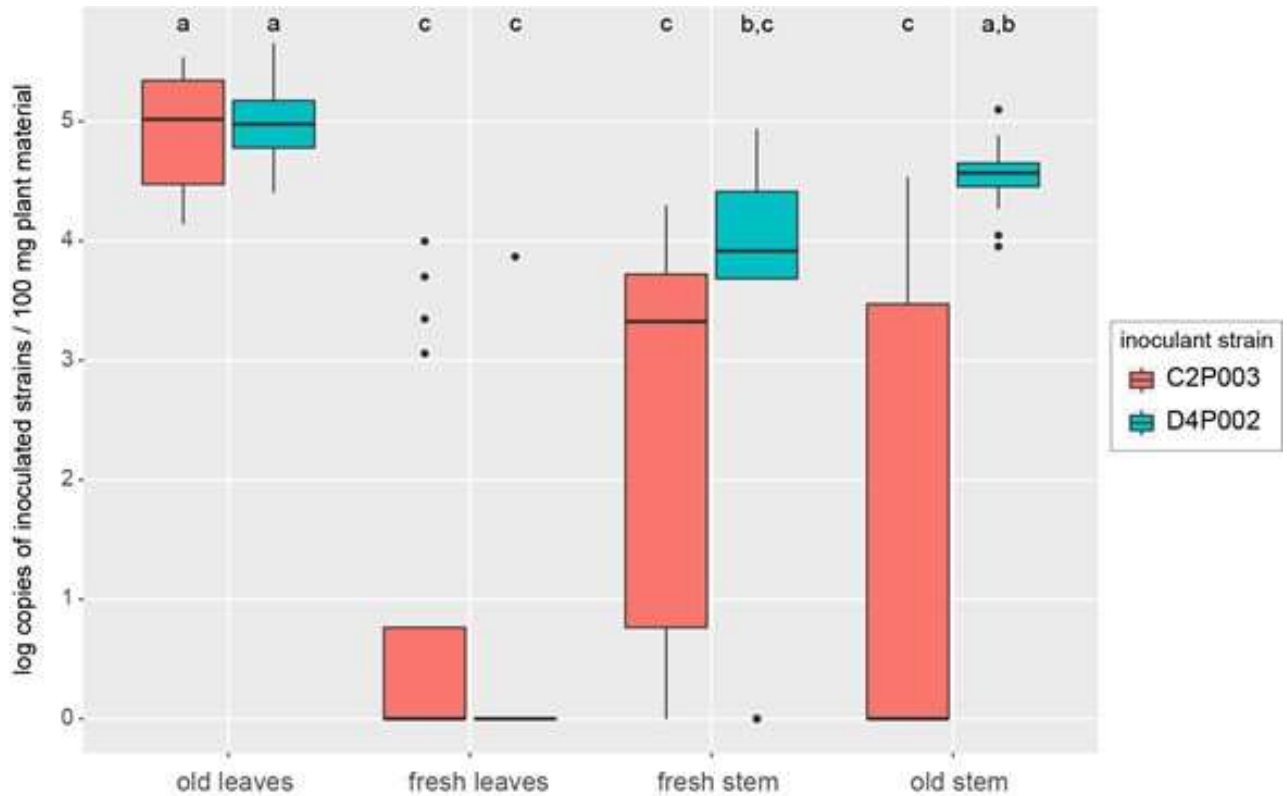


Abbildung 34: Abundanz der Stämme D4P002 und C2P003 auf jungen Eschen. Die Blätter und Stämme wurden jeweils von einem alten und einem frisch gewachsenen Pflanzenteil 8 Wochen nach der Inokulation beprobt. Alte Blätter und Stängel wurden beimpft, und frische Blätter und Stängel wuchsen nach der Beimpfung.

Zusammenfassend für das AP 13.1 konnten wir einen neuen Workflow entwickeln, mit dem es möglich ist, spezifische Regionen im Genom eines Zielorganismus zu finden und auf deren Grundlage Primer-Sonden Systeme für stammspezifische qPCR Assays zu etablieren. Für die Bakterienstämme B3P038, C2P003 und D4P002 konnte dieser Workflow erfolgreich genutzt werden. Alle Systeme waren hochsensitiv, hochspezifisch und effizient. Der stammspezifische Nachweis, bei dem auch sehr nah verwandte Stämme differenziert werden können, ermöglicht eine zielgenaue Anwendung. Im Gewächshausversuch konnte darüber hinaus auch in der Praxis die Anwendbarkeit der Technik belegt werden. Hierbei war es möglich, die Abundanz der inokulierten Bakterien bei Eschensämlingen quantitativ zu erfassen.

AP13.2 Detaillierte Analyse einzelner antagonistischer Stämme des bakteriellen Mikrobioms von *F. excelsior* (TV4.9 ZALF)

Für ein besseres Verständnis der Wirkungsweise einzelner antagonistischer Stämme wurde der Einfluss auf die Eschen-*H. fraxineus* Interaktion untersucht und ob sich entsprechende Eigenschaften auch in der genetischen Ausstattung widerspiegeln. Die Auswertung der Genomanalyse von *A. altamirensis* C2P003 wies Eigenschaften aus, die mit der Besiedelung der Wirtspflanze in Zusammenhang stehen, so konnten Gene nachgewiesen werden zur Sekretion von spezifischen Polysacchariden aber auch Proteine, die die Kolonisierung des Wirts und die Bildung eines Biofilms vermitteln. Darüber hinaus besitzt C2P003 Gene für Zellwand abbauende Enzyme, die eine Besiedelung des Interzellularen Raums ermöglichen. Eine potentiell antagonistische Aktivität von C2P003 besteht durch die Bildung antimikrobieller Substanzen, darunter Enzyme die bakterielle und pilzliche Zellwände abbauen, wie z. B. β -N-acetylglucosaminidase. Durch Antibiotikaresistenzgene hat C2P003 auch die Möglichkeit sich gegenüber bestimmten Antibiotika zu verteidigen. Die genetische Ausstattung von C2P003 erlaubt zudem eine Anpassung an osmotischen, oxidativen und durch Schwermetalle verursachten Stress (Becker et al. 2022).

Die Annotation des Genoms von *S. fraxinea* B3P038 zeigte Gene, die mit der Bakterium-Pathogen-Interaktion in Verbindung stehen. So konnten die Gene für die Biosynthese von p-Aminobenzoesäure und Phenazin nachgewiesen werden. Ebenso kann der Stamm das Polyamin Putrescin bilden. Polyamine haben eine wichtige Funktion beim Stressabbau, sowie bei der Bildung von Biofilmen und der Kolonisierung von Pflanzen (Behrendt et al. 2024).

In einem Gewächshausversuch wurden junge Eschen jeweils mit den Stämmen A4P130, C2P003 und D4P002 inokuliert. Eine Bonitur der Pflanzen hinsichtlich der Symptome des Eschentriebsterbens nach Peters et al. (2021) zeigte einen signifikant besseren Gesundheitsstatus durch alle Inokulationsstämme verglichen zur Kontrolle. Dieser Effekt hielt über einen Zeitraum von drei Vegetationsperioden an (Abb. 35).

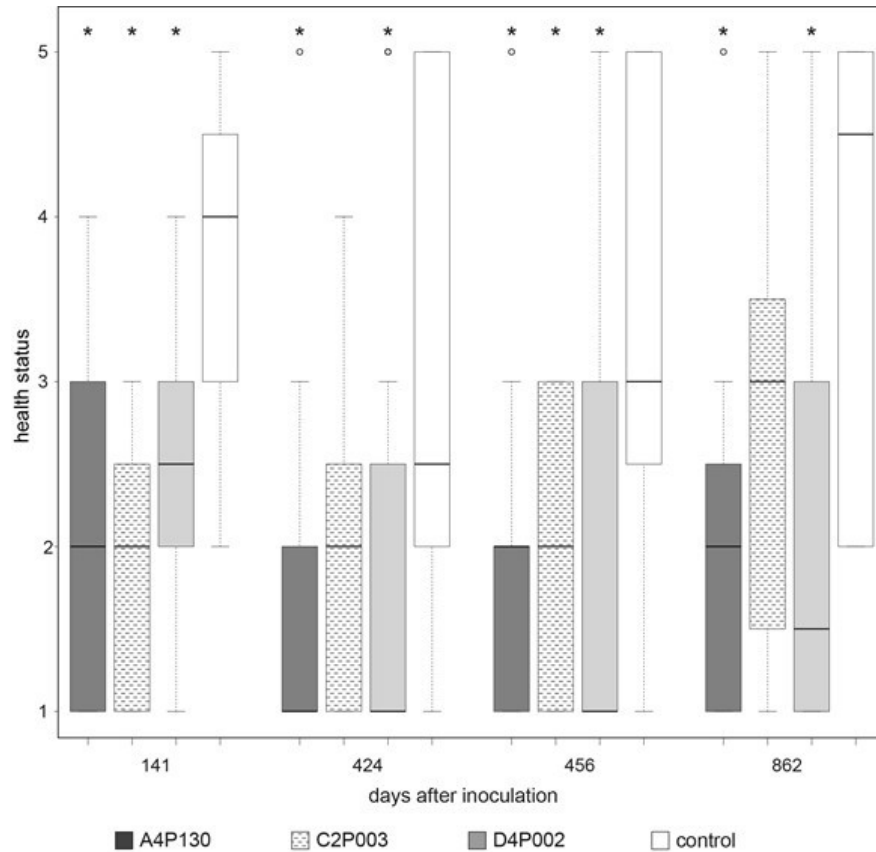


Abbildung 35: Auswirkungen der Inokulation mit *A. altamirensis* C2P003, *B. velezensis* A4P130 und *L. fraxinea* D4P002 auf den Gesundheitszustand von Eschensämlingen. Der Gesundheitszustand und die Symptome des Eschensterbens wurden wie von Peters et al. (2021) beschrieben eingeschätzt. Boniturskala: 1: gesund, 2: 10-25% Blattschäden, 3: 26-60% Blattschäden, 4: 61-99 Blattschäden, 5: abgestorbene Pflanzen. Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an ($p < 0,05$).

Zusätzlich wurden in diesem Versuch 15 Monate nach der Inokulation Blattproben von den jungen Eschen gesammelt und das Mikrobiom analysiert. Hier konnte deutlich gezeigt werden, dass die Mikrobiome von mit C2P003 und D4P002 inokulierten Pflanzen sich signifikant von der Kontrolle unterscheiden. Die mit A4P130 inokulierten Pflanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (Abb. 36). Wie schon weiter oben beschrieben, können BCAs als Antagonisten auf das Pathogen wirken und dieses über Sekundärmetaboliten, bzw. Antibiotika schädigen. Alternativ können BCAs auch über die Konkurrenz um Platz und Nährstoffe, auch Kolonisationsresistenz (colonisation resistance) auf das Pathogen wirken. A4P130 wird den Antagonisten zugeordnet, während C2P003 und D4P002 zu den „Kolonisierern“ gehören. Der Einfluss der beiden Kolonisierer auf das Mikrobiom ist aufgrund dieser Eigenschaften erklärbar. A4P130 als Antagonist ist hinsichtlich der Besiedelung der Blätter weniger konkurrenzstark und nimmt abseits dessen direkten Einfluss auf *H. fraxineus*.

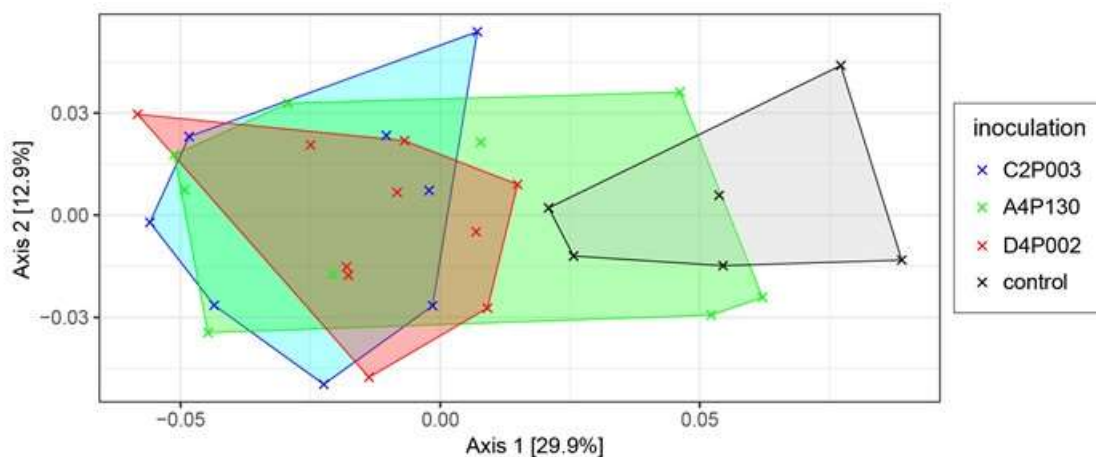


Abbildung 36: Ordinationsplot zur Visualisierung der bakteriellen Mikrobiomzusammensetzung von Eschensämlingen, die mit *A. altamirensis* C2P003, *B. velezensis* A4P130 und *L. fraxinea* D4P002 inokuliert wurden, sowie von Kontrollpflanzen. Es wurde eine Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) auf der Grundlage der gewichteten UniFrac-Distanzen durchgeführt.

AP13.3 Prüfung der antagonistischen Mikroorganismen und Konsortien an verschiedenen widerstandsfähigen *F. excelsior* Genotypen im Freilandversuch (Analyse der Performance der inokulierten Eschen und der Widerstandsfähigkeit gegenüber *H. fraxineus*, Bestimmung der Persistenz der Inokulationsstämme) (TV4.9 ZALF)

Anfang Juni 2021 wurde in einem randomisierten Versuch mit zwei Plusbaum-Nachkommenschaften (Res3, Neu1) eine Inokulation mit sechs Isolaten und vier Konsortien durchgeführt. Pro Versuchsvariante (n=22) wurden fünf Pflanzcontainer (Wiederholungen) mit jeweils zwölf Sämlingen angesetzt (n=60). Mit den aus Brandenburger Eschenbeständen gesammelten Petiolen, die 14 Tage nach der Inokulation zwischen den Sämlingen ausgelegt wurden, konnte aufgrund starker Fruchtkörperbildung ein hoher *H. fraxineus*-Infektionsdruck aufgebaut werden. Allerdings wiesen die Sämlinge in Übereinstimmung mit dem 2021 in Deutschland generell beobachteten *H. fraxineus*-Befall erst im Spätsommer, ca. zwei Wochen vor der Bonitur, vereinzelt auf *H. fraxineus*-Infektionen hindeutende Blattschäden auf. Die Probenahme und Bonitur erfolgten im September 2021. Insgesamt wurden elf Varianten auf zwei Einzelbaum-Nachkommenschaften mit je fünf Wiederholungen untersucht (n=110).

Durch die späte *H. fraxineus*-Infektion war der Schädigungsgrad der symptomatischen Einzelpflanzen mit weniger als 10 bis 25% befallener Blattfläche vergleichsweise gering. Hinzu kommt, dass es sich beim verwendeten Pflanzenmaterial um Plusbaum-Nachkommenschaften handelte, von denen eine verbesserte *H. fraxineus*-Toleranz zu erwarten war. Aufgrund der erhöhten Einzelpflanzenzahlen und der vorwiegend geringen Pflanzenschäden wurde die Bonitur im September 2021 über je zwölf Pflanzen (pro Pflanzcontainer) gemittelt und so mit fünf Wiederholungen durchgeführt. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, zeigte sich über alle Versuchsvarianten ein Trend zur Verbesserung des Gesundheitsstatus infolge der Inokulationen. Ein signifikant geringerer Anteil geschädigter Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle ergab sich für die Varianten *Schaurella fraxinea* B3P038 bei beiden Plusbaum-Nachkommenschaften sowie für *Luteimonas fraxinea* D4P002 bei Res3.

Tabelle 6: Prozentualer Anteil geschädigter Pflanzen in Eschen-Plusbaum-Nachkommenschaften 14 Wochen nach Inokulation mit potenziell antagonistischen Isolaten im Versuchsjahr 2021 (Mittelwerte und Standardabweichungen basierend auf fünf Versuchswiederholungen mit zwölf Einzelpflanzen).

Inokulationsstamm / Konsortium (Isolatemischung)		Plusbaum-Nachkommenschaften	
		Neu1	Res3
<i>Pantoea „vagans“</i> A3K039		41,7 (± 16,7)	36,7 (± 7,5)
<i>Schaurella fraxinea</i> B3P038		21,7 (± 11,2) *	11,7 (± 9,5) *
<i>Luteimonas fraxinea</i> D4P002		26,7 (± 12,4)	16,7 (± 5,9) *
<i>Bacillus velezensis</i> A4P130 ^a		41,7 (± 27,0)	30,0 (± 13,9)
<i>Pseudomonas „coleopterorum“</i> B2K013		38,3 (± 15,1)	30,0 (± 9,5)
<i>Aureimonas „altamirensis“</i> C2P003		26,7 (± 13,7)	21,7 (± 12,6)
Mix1	D4P002 + C2P003	25,0 (± 5,9)	25,0 (± 5,9)
Mix2	D4P002 + C2P003 + <i>P. flavescens</i> D4P037 + B3P038	28,3 (± 16,2)	35,0 (± 18,1)
Mix 3	<i>L. fraxinea</i> C4P040a + C2P003 + D4P037 + A4P130 + B2K013	43,3 (± 10,9)	25,0 (± 13,2)
Mix 4	D4P002 + C2P003 + D4P037 + A4P130 + <i>Papiliotrema flavescens</i> A3P071	43,3 (± 13,7)	33,3 (± 19,5)
Kontrolle		60,0 (± 22,4)	40,0 (± 10,9)

* Signifikant gegenüber Kontrolle, Kruskal-Wallis und nachfolgend Dunn's Test (p < 0.05/2).

Zusätzlich wurde der Befall 14 Wochen nach Inokulation mit einem für *H. fraxineus* spezifischem qPCR Assay quantitativ bestimmt. Hierbei wird jedoch nicht differenziert, ob es sich um noch nicht gekeimte Sporen auf den Blättern oder bereits eine aktive Infektion handelt. Wie aus Abbildung 37 ersichtlich, konnte in allen Varianten ein Befall nachgewiesen werden. Sporadisch traten hohe Werte mit 3 bis $7,2 \times 10^6$ Kopien pro 100 mg Blattmaterial auf, wobei eine starke Variabilität zu beobachten war. Beides ist durchaus typisch für eine beginnende Infektion. Die am stärksten befallenen Varianten waren die B2K013-Inokulation bei beiden Plusbaum-Nachkommenschaften. Den geringsten Befall bei Neu1 wiesen die Stämme B3P038 und C2P003 auf, bei Res3 zeigt D4P002 einen deutlich geringeren Befall als die Kontrolle. Signifikante Unterschiede wurden nur zwischen den Plusbaum-Nachkommenschaften nachgewiesen. Bei der Plusbaum-Nachkommenschaft Res3 ist der *H. fraxineus*-Befall insgesamt signifikant reduziert.

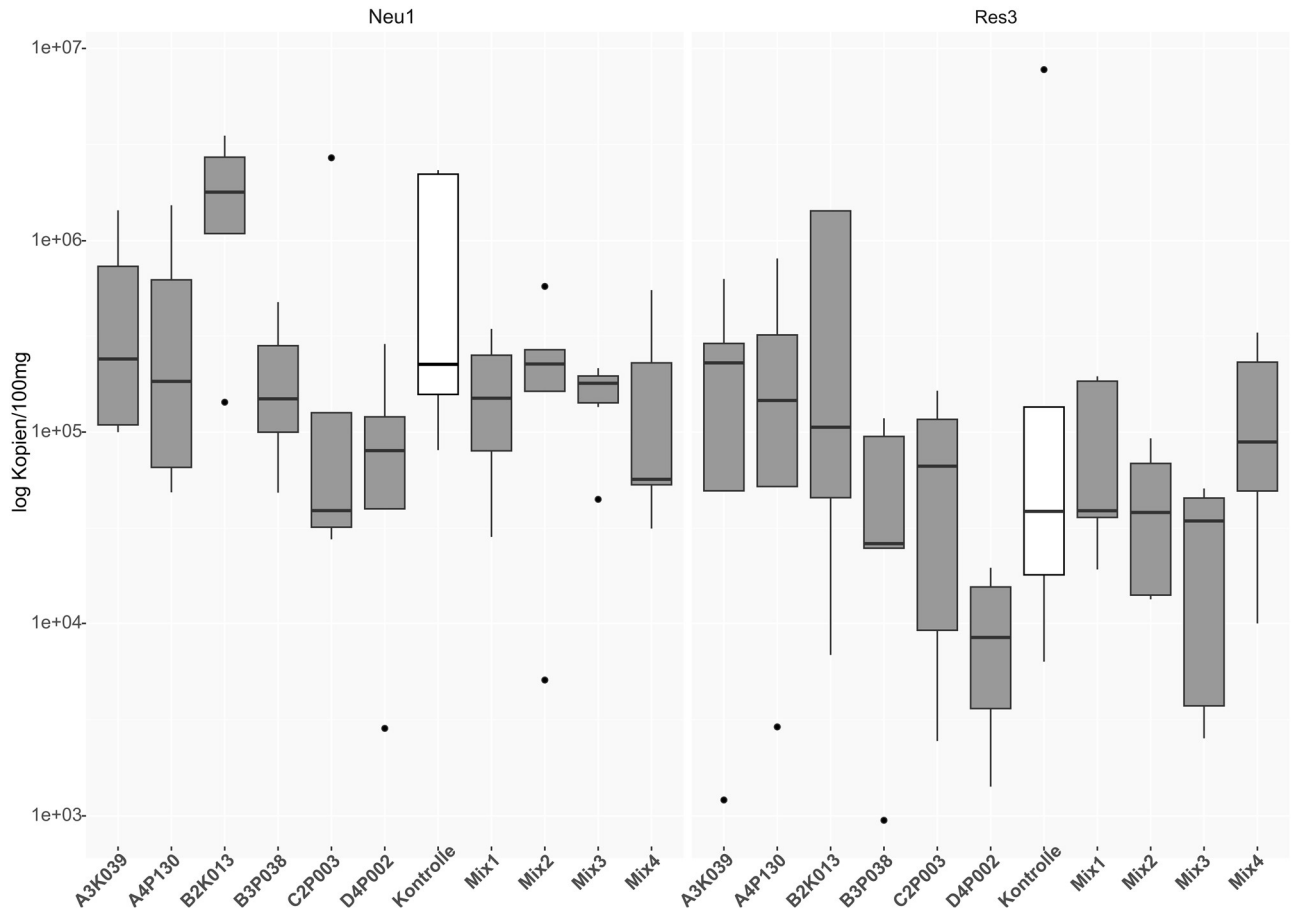


Abbildung 37: Abundanz des pathogenen Pilzes *H. fraxineus* auf bzw. in den Blättern von Eschensämlingen 14 Wochen nach Inokulation (Versuchsjahr 2021). Die Quantifizierung erfolgte über qPCR und stellt die Anzahl der Kopien der ITS rRNA Region pro 100 mg Blattmaterial dar. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

Wie *H. fraxineus* wurden auch die Inokulationsstämme 14 Wochen nach der Inokulation quantifiziert. A4P130 und D4P002 waren nicht mehr nachweisbar. C2P003 konnte in wenigen Pflanzen nachgewiesen werden. Die Kopienzahl reichte von $2,2 \times 10^3$ Kopien/100 mg bis $2,7 \times 10^4$ Kopien/100 mg.

AP13.4 Bewertung der geprüften Antagonisten und Konsortien nach ihren Wirkungen im Freiland und Auswahl der effektivsten Antagonisten und Konsortien (TV4.9 ZALF)

Neben den unter AP 13.3 erhobenen Daten war es für die Bewertung der Antagonisten und Konsortien bedeutsam auch ihre Wirkung auf das Mikrobiom der Eschensämlinge zu analysieren. Hierdurch ergibt sich ein Gesamtbild der Wirkung, incl. der Pflanze-Mikrobiom-Interaktion.

Die Analyse des bakteriellen Mikrobioms basierte auf der Amplifikation mit den Primer 799f und 1115r. Im Ergebnis der Sequenzierung (13,98 Mio. high-quality reads) ergab sich auf Phylum-Ebene eine ähnliche Zusammensetzung des Mikrobiom wie in vorangegangenen Inokulationsversuchen. Im Durchschnitt hatten die *Pseudomonadota* (syn. *Proteobacteria*) einen Anteil von 66.8% am Mikrobiom (Abb. 38). Es folgten die Phyla *Actinobacteria* mit 26.0%, sowie *Bacteroidetes* mit 3.9% und *Deinococcus-Thermus* mit 3.2%. Alle anderen Phyla hatten einen Anteil unter 0.1%. Auf Gattungsebene hatten *Methylobacterium*, *Sphingomonas* und *Klenkia* die größten Anteile (Abb. 39). Sie dominierten das Mikrobiom mit durchschnittlich 65% der gesamten Bakterien. Auf Gattungsebene deuten sich bereits Unterschiede zwischen den Varianten an, wobei aber keine grundlegenden Änderungen nachweisbar waren.

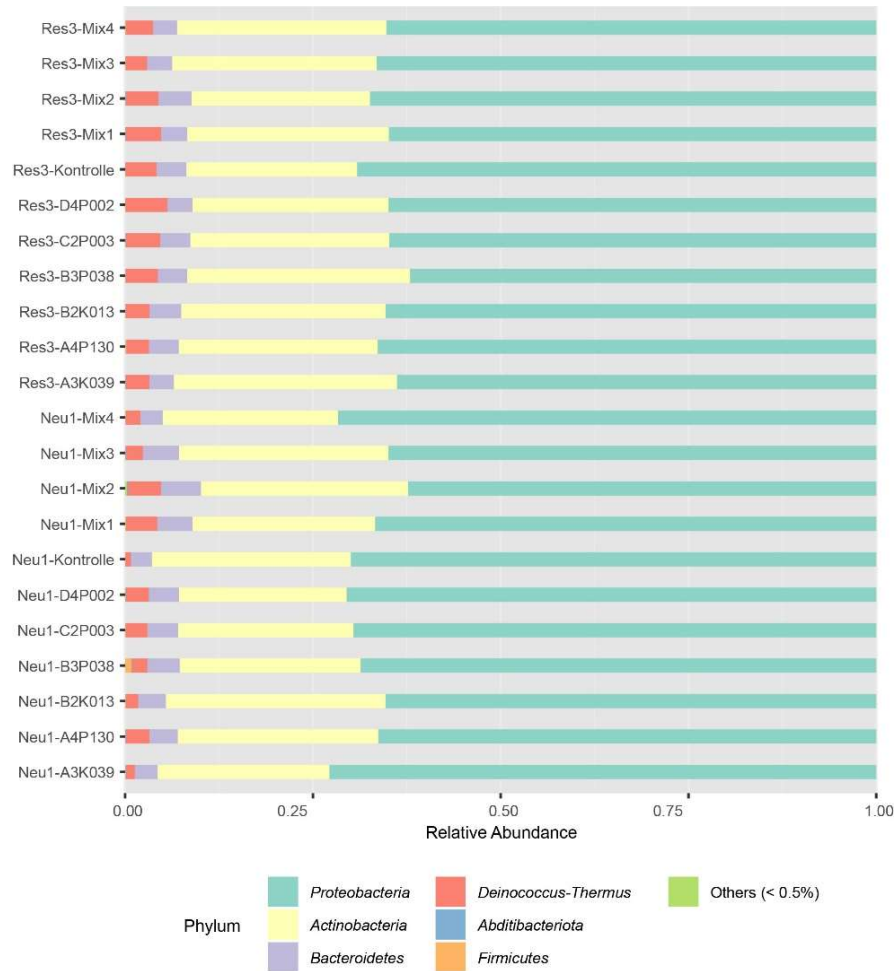


Abbildung 38: Relativer Anteil der Bakterienphyla am Mikrobiom der Eschensamlinge, aufgeteilt auf die Inokulationsvarianten. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

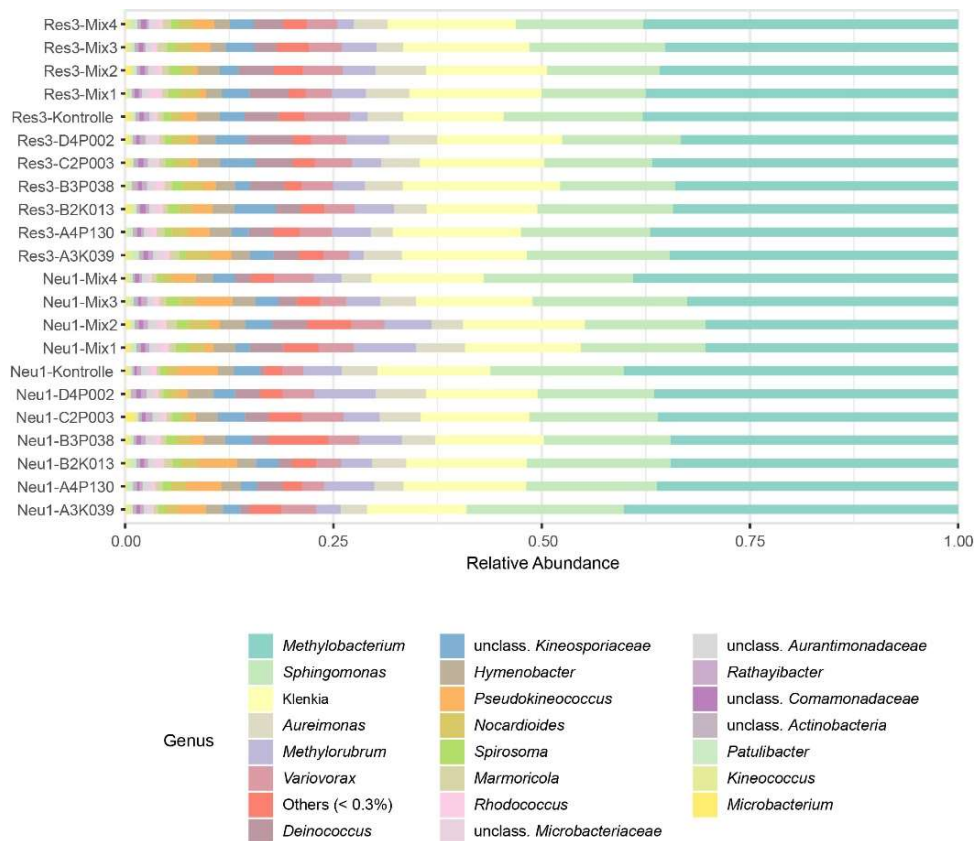


Abbildung 39: Relativer Anteil der Bakteriengattungen am Mikrobiom der Eschensamlinge, aufgeteilt auf die Inokulationsvarianten. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

In der α -Diversität wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den Varianten gefunden. Für die Analyse der β -Diversität wurde zunächst eine PERMANOVA des gesamten Datensatzes durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sowohl der Pflanzengenotyp als auch die Inokulationen einen signifikanten Einfluss auf das bakterielle Mikrobiom hatten (Tab. 7).

Tabelle 7: Relative Bedeutung der Parameter Pflanzengenotyp und Inokulation auf die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft 14 Wochen nach Inokulation bestimmt über PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance).

	Df	SumOfSqs	R ²	F	Pr(>F)
Plants	1	0.0792	0.01346	1.5840	0.016 *
Inoculations	10	0.7473	0.12707	1.4956	0.001 ***
Plants:Inoculations	10	0.5076	0.08630	1.0158	0.387
Residual	91	4.5472	0.77317		
Total	112	5.8812	1.00000		

Insgesamt wurden durch den Pflanzengenotyp und die Inokulation nur 14,1% der Variabilität im bakteriellen Mikrobiom erklärt. Dabei hat die Inokulation aber einen deutlich größeren Einfluss als der Pflanzengenotyp (R^2 um Faktor 10 erhöht). Die Interaktion von Pflanze * Inokulation ist nicht signifikant. Zur besseren Übersicht wurde dennoch der Einfluss der Inokulation getrennt für beide Plusbaum-Nachkommenschaften untersucht.

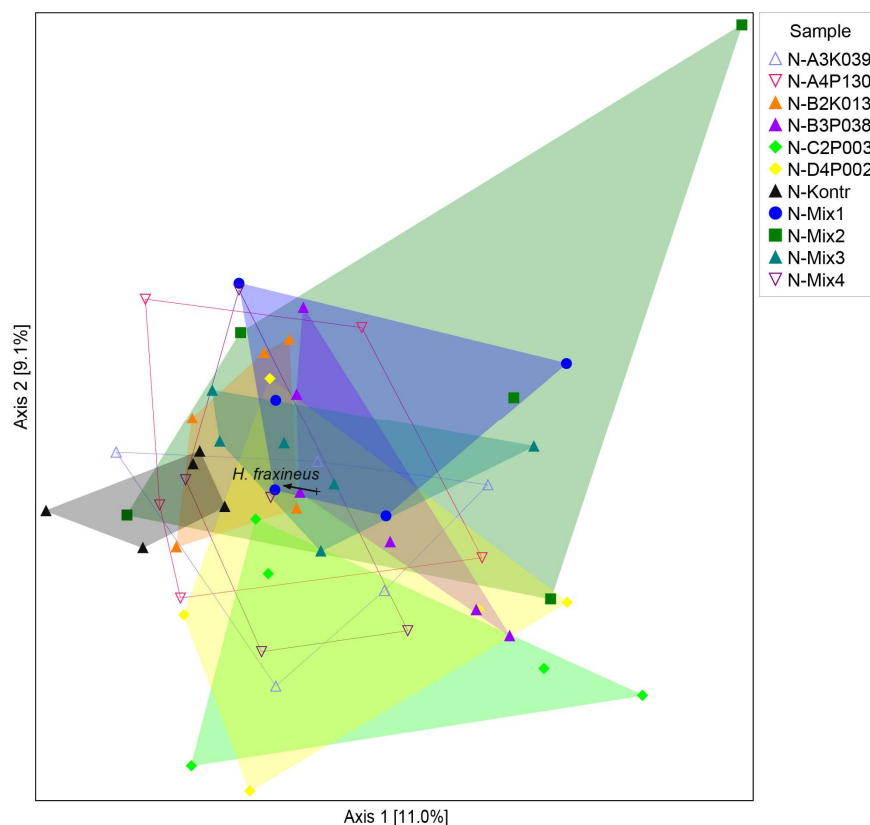


Abbildung 40: Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften von jungen Eschenpflanzen der Einzelbaum-Nachkommenschaft Neu1 inokuliert mit sechs Einzelstämmen und vier Konsortien im Vergleich zur Kontrolle. Der Ordinationsplot beruht auf einer pCoA (principle coordinate analysis) mit Bray-Curtis Distanzmatrix. Inokulationsvarianten mit signifikanten Unterschieden in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften gegenüber der Kontrolle (nach Analyse mit ANOSIM) sind als gefüllte Kreise und mit gefüllter Umrandung dargestellt. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

Die Unterschiede in der Struktur des bakteriellen Mikrobioms für die Esche Neu1 sind in Abbildung 40 dargestellt. Im Ordinationsplot werden mit den ersten beiden Achsen nur etwa 20% der Variabilität dargestellt, er zeigt trotzdem eine deutliche Differenzierung der Kontrolle von den Inokulationsvarianten *S. fraxinea* B3P038, *A. altamirensis* C2P003, *L. fraxinea* D4P002 und Mix1 (bestehend aus C2P003 und D4P002). Entsprechend ergab auch die statistische Analyse über ANOSIM signifikante Unterschiede zu diesen Inokulationsvarianten (B3P038: $R=0.37$, $p=0.005$, C2P003: $R=0.4$, $p=0.009$; D4P002: $R=0.43$, $p=0.009$ und Mix1: $R=0.42$, $p=0.007$). Trotz einer teilweisen Überlappung mit der Kontrolle im Ordinationsplot werden auch die Varianten B2K013, Mix2 und Mix3 als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ausgewiesen ($R=0.32$, $p=0.007$; $R=0.36$, $p=0.01$; $R=0.34$, $p=0.013$).

Die Zusammensetzung der Mikrobiome der inokulierten Eschensämlinge zeigt eine Korrelation mit der Stärke (Abundanz) der *H. fraxineus* Infektion. Die Richtung der *H. fraxineus* Abundanz korrespondiert hierbei mit der Abtrennung der Kontrolle von den inokulierten Varianten (entlang der Achse 1).

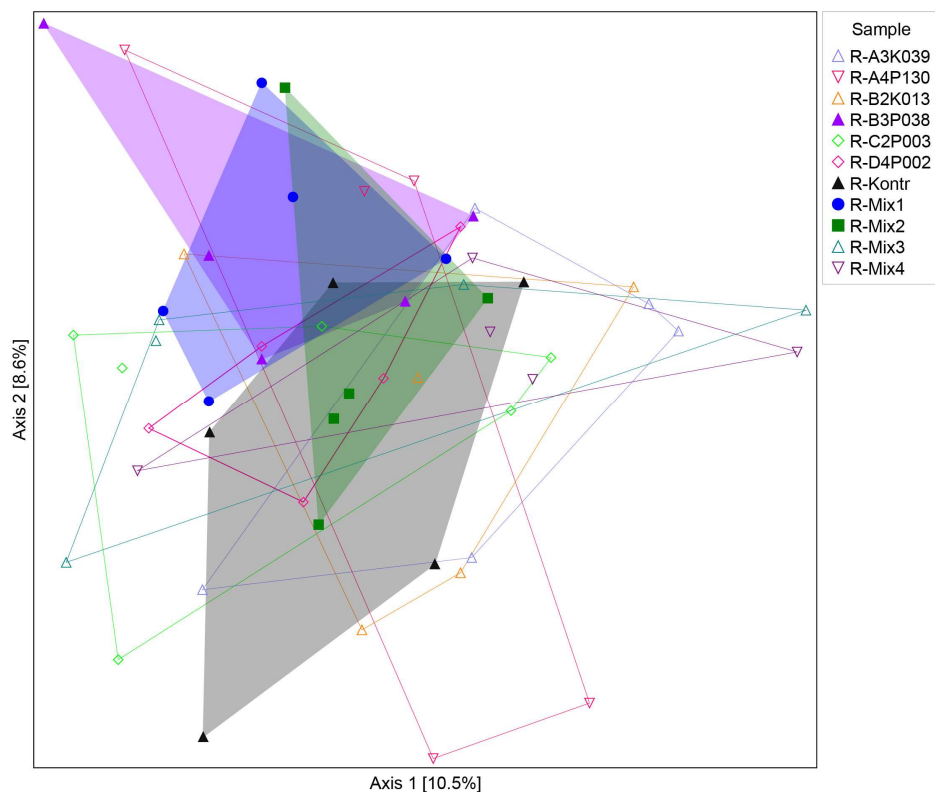


Abbildung 41: Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften von jungen Eschenpflanzen der Einzelbaum-Nachkommenschaft Res3 inokuliert mit sechs Einzelstämmen und vier Konsortien im Vergleich zur Kontrolle. Der Ordinationsplot beruht auf einer pCoA (principle coordinate analysis) mit Bray-Curtis Distanzmatrix. Inokulationsvarianten mit signifikanten Unterschieden in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften gegenüber der Kontrolle (nach Analyse mit ANOSIM) sind als gefüllte Kreise und mit gefüllter Umrandung dargestellt. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

Das Mikrobiom der Plusbaum-Nachkommenschaft Res3 wies deutlich geringe Unterschiede in der Gemeinschaftsstruktur auf. Im Ordinationsplot sind keine eindeutigen Differenzierungen erkennbar (Abb. 41). Allerdings ergab die statistische Analyse auch für Res3 signifikante Unterschiede zu drei Inokulationsvarianten. Dabei handelte es sich wiederum um B3P038 ($R=0.26$, $p=0.01$) sowie um Mix1 ($R=0.47$, $p=0.01$) und Mix2 ($R=0.31$, $p=0.03$).

Die gleichen Proben des Inokulationstests 2021 wurden auch zur Untersuchung des pilzlichen Mikrobioms (Mycobiom) verwendet. Grundlage der Untersuchung war die pilzliche ITS rRNA Region. Durch die Wahl der Primer konnte die DNA der Esche vollständig aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Die 14,4 Mio. high-quality reads wurden nahezu vollständig den pilzlichen Phyla *Ascomycota* (49,9%) und *Basidiomycota* (44,9%) zugeordnet. Etwa 5,1% der pilzlichen Sequenzen waren auf Phylum-Ebene nicht klassifizierbar (Abb. 42). Auf Gattungsebene haben eine nicht klassifizierte Gruppe der Ordnung *Tremellales*, sowie die Gattungen *Mycosphaerella* und *Protomyces* den größten Anteil (Abb. 43). Sie haben durchschnittlich einen Anteil von 26,9% am Mycobiom. Auffällig ist, dass das pilzliche Mikrobiom der Esche auf Gattungsebene deutlich diverser ist als das bakterielle Mikrobiom.

Das Pathogen *H. fraxineus* machte im Durchschnitt über alle Varianten 0,84% der pilzlichen Sequenzen aus. Die Verteilung über die Inokulationsvarianten entsprach den Ergebnissen der Quantifizierung über qPCR. In der Inokulationsvariante B2K013 der Esche Neu1 (vgl. Abb. 37) betrug der relative Anteil von *H. fraxineus* an den pilzlichen Sequenzen 4,0%. Zusammenfassend bestätigt der relative Anteil des Pathogens die Einschätzung einer beginnenden *H. fraxineus* Infektion.

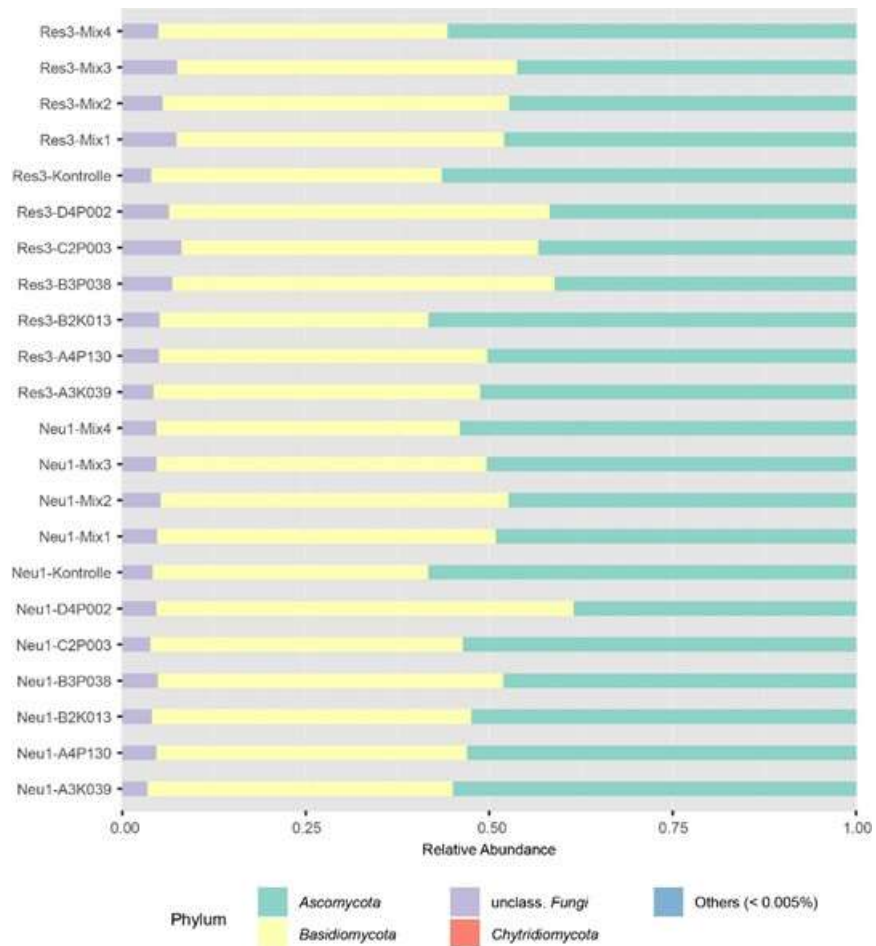


Abbildung 42: Anteil der Pilzphyla am Mycobiom der Eschensämlinge, aufgeteilt auf die Inokulationsvarianten. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

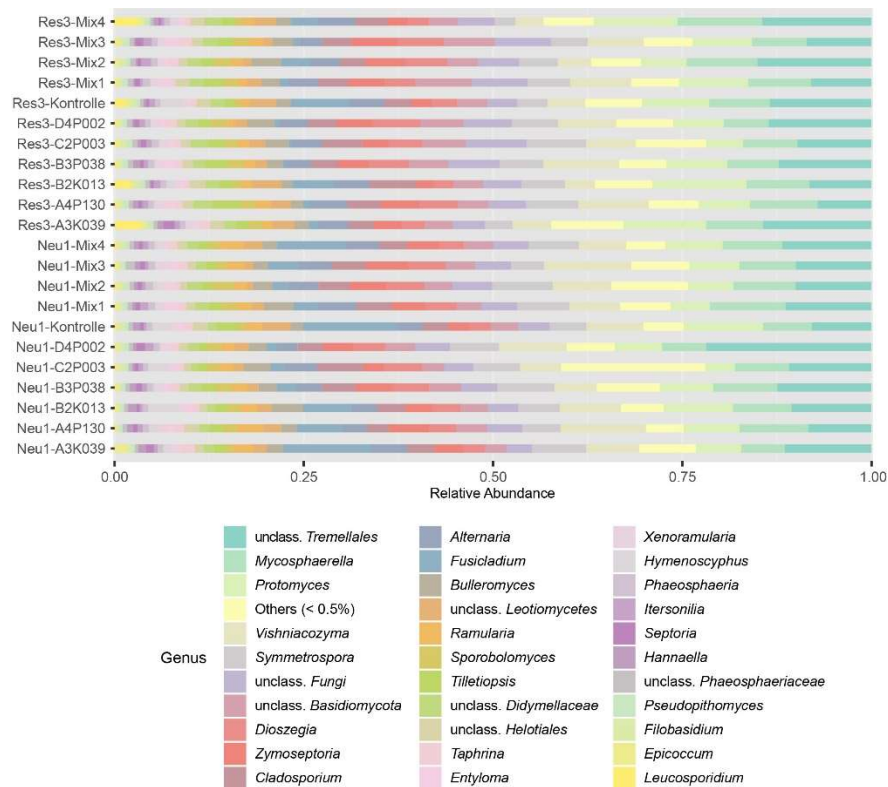


Abbildung 43: Anteil der Pilzgattungen am Mycobiom der Eschensämlinge, aufgeteilt auf die Inokulationsvarianten. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

Die Analyse der α -Diversität ergab lediglich für die Esche Res3 marginale, aber signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Die Shannon-Diversität wurde in den Inokulationsvarianten B3P038, C2P003, D4P002, Mix1 und Mix3 signifikant erhöht.

Für die Analyse der β -Diversität wurde wiederum im ersten Schritt eine PERMANOVA des gesamten Datensatzes durchgeführt. Es zeigte sich auch für das Mycobiom, dass sowohl der Pflanzengenotyp als auch die Inokulationen einen signifikanten Einfluss besitzen (Tab. 8). Insgesamt werden durch Pflanzengenotyp und Inokulation 14,8% der Variabilität des pilzlichen Mikrobioms erklärt, wobei jedoch wiederum die Inokulation deutlich mehr der Variabilität erklärt (Faktor 7), also einen deutlich größeren Einfluss ausübt als der Pflanzengenotyp. Die Interaktion von Pflanze * Inokulation ist nicht signifikant. Wie beim bakteriellen Mikrobiom wurde dennoch der Einfluss der Inokulation getrennt für beide Plusbaum-Nachkommenschaften untersucht.

Tabelle 8: Relative Bedeutung der Parameter Pflanze und Inokulation auf die Struktur der pilzlichen Gemeinschaft 14 Wochen nach Inokulation bestimmt über PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance).

	Df	SumOfSqs	R ²	F	Pr(>F)	
Plants	1	0.1807	0.01934	2.3011	0.001	***
Inoculations	10	1.2004	0.12853	1.5289	0.001	***
Plants:Inoculations	10	0.8135	0.08710	1.0361	0.211	
Residual	91	7.1450	0.76502			
Total	112	9.3396	1.00000			

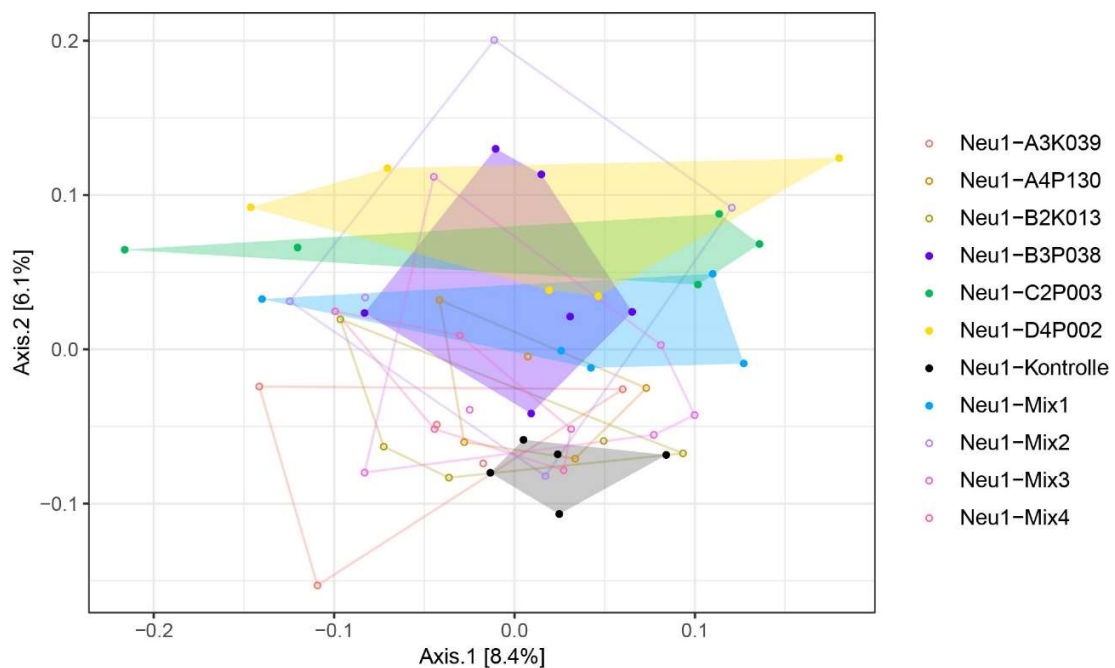


Abbildung 34: Unterschiede in der Struktur der pilzlichen Gemeinschaften von jungen Eschenpflanzen der Einzelbaum-Nachkommenschaft Neu1 inokuliert mit sechs Einzelstämmen und vier Konsortien im Vergleich zur Kontrolle. Der Ordinationsplot beruht auf einer pCoA (principle coordinate analysis) mit Bray-Curtis Distanzmatrix. Inokulationsvarianten mit signifikanten Unterschieden in der Struktur der pilzlichen Gemeinschaften gegenüber der Kontrolle (nach Analyse mit ANOSIM) sind als gefüllte Kreise und mit gefüllter Umrandung dargestellt. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

Der Ordinationsplot in Abbildung 34 visualisiert die Unterschiede im Mycobiom der verschiedenen Inokulationsvarianten für die Esche Neu1. Es ist eine deutliche Differenzierung von der Kontrolle in den Varianten D4P002, C2P003, Mix1 und B3P038 zu erkennen. Die Separierung erfolgt nahezu ausschließlich anhand der Achse 2. Übereinstimmend mit dem Plot sind diese Varianten signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. ANOSIM: D4P002: R=0.46, p=0.011; C2P003: R=0.40, p=0.01; Mix1: R=0.30, p=0.01; B3P038: R=0.31, p=0.026.

Das Mycobiom der Plusbaum-Nachkommenschaft Res3 wies ähnlich starke Unterschiede in der Gemeinschaftsstruktur auf. Im Ordinationsplot wird jedoch die höhere Heterogenität der Kontrolle deutlich (Abb. 35). Dieser Effekt ist übereinstimmend für das bakterielle und pilzliche Mikrobiom gefunden worden und scheint Einzelpflanzen-spezifisch zu sein. Klar erkennbar ist ebenso die eindeutige Separierung der Inokulationsvarianten B3P038, C2P003, D4P002, Mix1 und Mix3, die hauptsächlich entlang der Achse 1 erfolgt. Die statistische Analyse ergab genau für diese Varianten einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die ANOSIM-Werte belegen eine sehr hohe Signifikanz mit R=0.59 (p=0.011) für B3P038 und R=0.48 (p=0.012) für D4P002 sowie R=0.31 (p=0.036) für C2P003, R=0.34 (p=0.05) für Mix1 und R=0.25 (p=0.03) für Mix3.

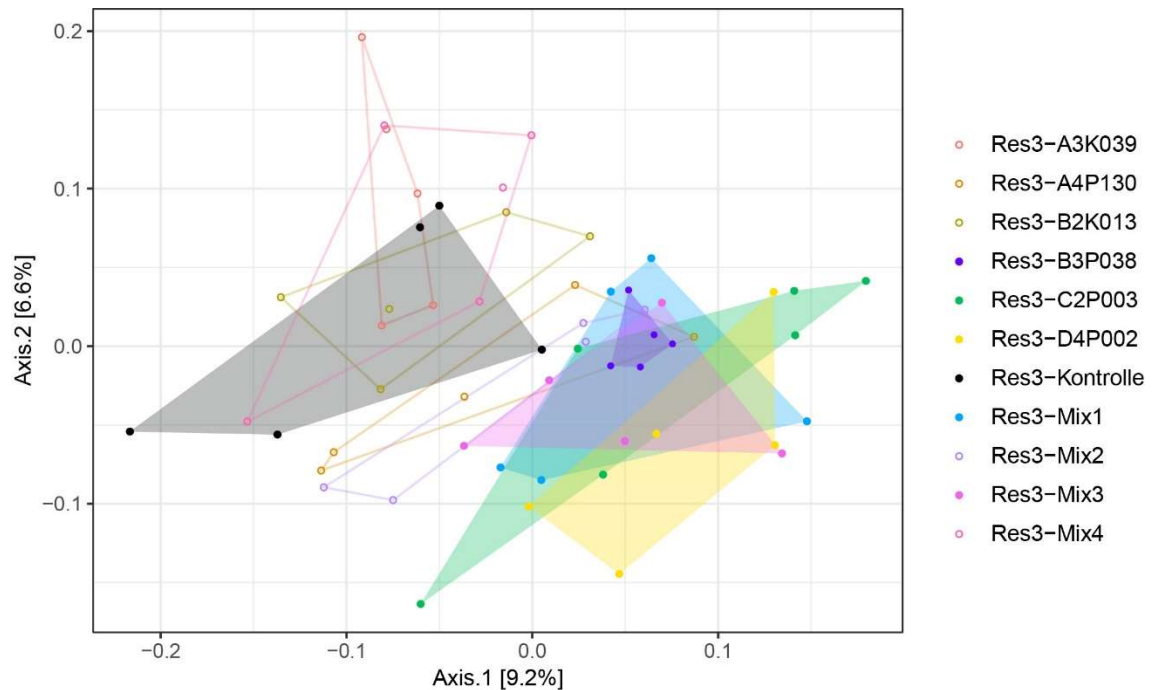


Abbildung 35: Unterschiede in der Struktur der pilzlichen Gemeinschaften von jungen Eschenpflanzen der Einzelbaum-Nachkommenschaft Res3 inokuliert mit sechs Einzelstämmen und vier Konsortien im Vergleich zur Kontrolle. Der Ordinationsplot beruht auf einer pCoA (principle coordinate analysis) mit Bray-Curtis Distanzmatrix. Inokulationsvarianten mit signifikanten Unterschieden in der Struktur der pilzlichen Gemeinschaften gegenüber der Kontrolle (nach Analyse mit ANOSIM) sind als gefüllte Kreise und mit gefüllter Umrandung dargestellt. Die Zusammensetzung der Konsortien Mix1-Mix4 ist in Tabelle 2 ausgewiesen.

Insgesamt zeigte die Analyse des Mikrobioms relativ ähnlich für die bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften eine deutliche Veränderung nach Inokulation mit den Stämmen *S. fraxinea* B3P038, *L. fraxinea* D4P002 und *A. altamirensis* C2P003 sowie mit dem Konsortium bestehend aus D4P002 und C2P003. Dies lässt vermuten, dass auch Stämme wie D4P002 und C2P003, die keine direkte antagonistische Aktivität besitzen, über Kolonisierungsresistenz oder wie hier gezeigt indirekt über die Veränderung des Eschen-Mikrobioms zur Abwehr des Pathogens beitragen.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen, konnte für die Stämme A4P130, C2P003 und D4P002 im Gewächshausversuch gezeigt werden, dass sie die Gesundheit von *F. excelsior* positiv beeinflussen. Im gleichen Versuch konnte gezeigt werden, dass C2P003 und D4P002 einen signifikanten Einfluss auf das Mikrobiom der Eschensämlinge haben.

Im Feldversuch wurde hingegen deutlich, dass mit B3P038 und D4P002 inokulierte Pflanzen eine signifikant geringere Schädigung aufwiesen. Zudem zeigten C2P003 und B3P038 in der Plusbaum-Nachkommenschaft Neu1 den geringsten *H. fraxineus* Befall, sowie D4P002 bei Res3. Es konnte keine Etablierung und Persistenz für A4P130 und D4P002 gezeigt werden. C2P003 konnte vereinzelt persistieren. Die Mikrobiomanalyse zeigte für den bakteriellen Teil eine Reihe von signifikanten Einflüssen, wiederum oft in den B3P038, C2P003, D4P002 und Mix1 Inokulationen. Das Mycobiom wurde ebenso signifikant vorrangig von B3P038, C2P003, D4P002 und Mix1 beeinflusst. Andere Inokulationsvarianten wie zum Beispiel A3K039 zeigten in allen Versuchen keinen Einfluss oder teilweise sogar negative Effekte.

Die starken Einflüsse auf Gesundheitszustand, das Mikrobiom und *H. fraxineus* Befall führten uns zu einer Selektion und gleichzeitigen Fokussierung auf die vielversprechendsten Kandidaten für eine praktische Anwendung: B3P038, C2P038, D4P002.

AP13.5 Wiederholung der Freilandprüfung an einem alternativen Standort bzw. im Jahresvergleich (TV4.9 ZALF)

Zur Überprüfung der Ergebnisse von 2021, wurde der Versuch am Standort Waldsieversdorf im Jahr 2022 wiederholt. Der Fokus wurde dabei auf die Stämme A4P130, C2P003, D4P002 und B3P038 als Isolate und deren Konsortien gelegt. Die Eschensämlinge wurden von den Pflanzcontainern im März 2022 in ein Versuchsfeld auf dem Gelände des Thünen-Instituts Waldsieversdorf ausgepflanzt. Anfang Juni 2022 wurde die Inokulation wiederholt, sowie auch die Infektion mit *H. fraxineus* durch gesammelte Petiolen. Aufgrund der starken Hitze und Trockenheit im Sommer 2022 war nur vereinzelt Befall mit *H. fraxineus* festzustellen. Die Bonitur im September 2022 wurde mithilfe des Schadindex für junge Eschen nach Peters et al. (2021) durch-

geführt. Dabei wurde jeder Esche eine Schadklasse von 0 (keine Schädigung der Blattoberfläche) bis 5 (abgestorbener Baum) zugewiesen. 53.7% der Eschen wurden der Schadklasse 1 zugeordnet. Es folgten die Schadklassen 2 mit 16.6%, 3 mit 9.79% und 4 mit 8.77%. In Schadklasse 0 fielen 7.32% der jungen Eschen. 3.83% der Eschen wiesen sehr starke Schadsymptome auf. In der folgenden Analyse konnte kein signifikanter Einfluss der Inokulationsstämme oder der Einzelbaum-Nachkommenschaft auf die Schadklassenverteilung festgestellt werden. Darüber hinaus konnten auch die inokulierten Stämme und auch der pathogene Pilz *H. fraxineus* nur vereinzelt nachgewiesen werden, wobei sich die Nachweise zumeist Nahe der Nachweisgrenze befanden. Bedingt durch die Wetterverhältnisse konnten 2022 somit keine verwertbaren Ergebnisse für die Bewertung der Antagonisten und Konsortien erzielt werden.

Anfang 2023 wurde zusätzlich eine Fläche bei Briesen (Mark) am Rande eines zusammenbrechenden Eschenbestandes ausgewählt. Dies sollte ermöglichen, die Persistenz und Wirkung der für die Inokulation ausgewählten Stämme auf einem typischen Eschenstandort zu testen. Angelegt wurde der randomisierte Versuch im März 2023 mit einer Eschen-Nachkommenschaft. Inokuliert wurden drei Isolate und zwei Konsortien (n=6). Das erste Konsortium (Mix1) setzte sich aus C2P003 und D4P002 zusammen und das zweite Konsortium aus allen Einzelisolaten B3P038, C2P003 und D4P002. Pro Versuchsvariante wurden fünf Plots mit jeweils zwölf Sämlingen gepflanzt (n=60). Die Inokulation der Eschensämlinge erfolgte Anfang Juni 2023. Die Infektion mit dem Pathogen wurde nicht durch Ausbringen von Petiolen zusätzlich stimuliert, sondern sollte unter den natürlichen Gegebenheiten des Standorts erfolgen. Im Juni, Juli, August und September 2023 wurden Blattproben genommen, um die Persistenz der Inokulationsstämme und die Abundanz des Pathogens zu überprüfen. Das weitere wurde eine Bonitur der Sämlinge im September 2023 durchgeführt.

B3P038 und C2P003 konnten jeweils zu allen Probenahmezeitpunkten sicher nachgewiesen werden (Abb. 36 und Abb. 37). Dabei etablierte sich B3P038 als Einzelisolat, sowie im Mix2. Die Abundanz lag zwischen $6.9E+03$ und $7.8E+03$ Kopien pro 100mg im Juni, zwischen $3.6E+03$ und $7.3E+04$ Kopien pro 100 mg im Juli, sowie zwischen $3.8E+03$ und $1.5E+05$ Kopien pro 100 mg im August, sowie zwischen $3.1E+03$ und $4.7E+05$ Kopien pro 100 mg im September.

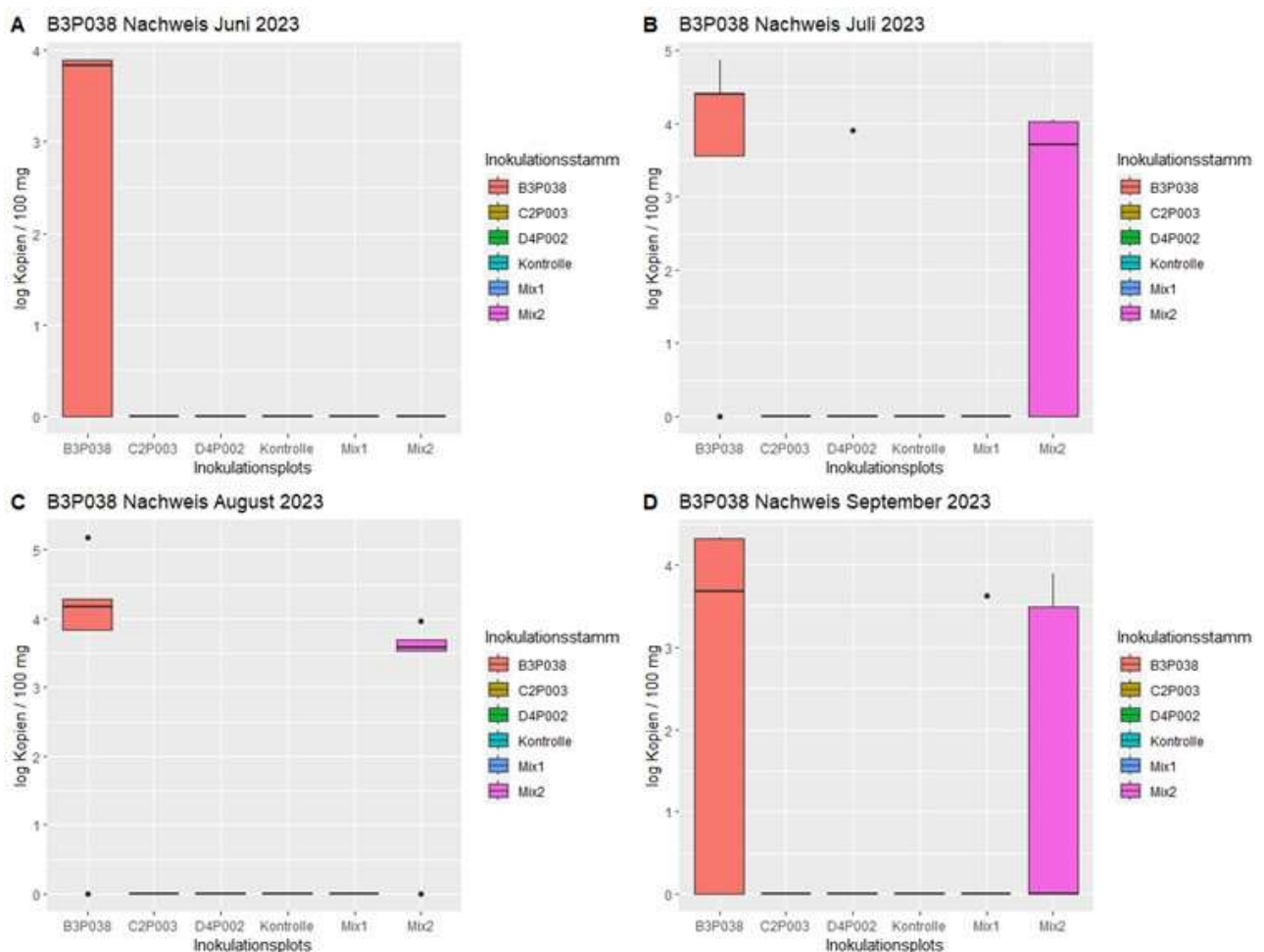


Abbildung 36: Abundanz des Stammes B3P038 auf jungen Eschen auf dem Standort Briesen (Mark). Die Blätter wurden 2, 6, 10 und 14 Wochen nach der Inokulation beprobt. Die Quantifizierung erfolgte über qPCR und stellt die Anzahl der Kopien eines single-copy Gens von B3P038 pro 100 mg Blattmaterial dar.

C2P003 etablierte sich als Einzelisolat, sowie in beiden Konsortien. Darüber hinaus konnte C2P003 auch auf Plots nachgewiesen werden, auf denen B3P038 als Einzelisolat inokuliert wurde. Dies lässt auf eine Verdriftung des Stammes bei der Inokulation bzw. während der Zeit danach schließen. Die Abundanz von C2P003 lag zwischen $5.3E+03$ und $4.6E+04$ Kopien pro 100 mg im Juni, zwischen $5.8E+03$ und $1.6E+05$ Kopien pro 100 mg im Juli, zwischen $5.1E+03$ und $1.8E+05$ Kopien pro 100 mg im August, sowie zwischen $3.1E+03$ und $2.2E+04$ Kopien pro 100mg im September.

Die Abundanzen schwanken über die Probenahmezeitpunkte mit tendenziell höheren Werten im August. Eine stetige Abnahme in der Zeit nach der Inokulation war nicht zu beobachten. Beide Stämme haben sich somit erfolgreich etabliert.

Die Abundanz von D4P002 lag unter der Nachweisgrenze, der Stamm konnte somit nicht nachgewiesen werden.

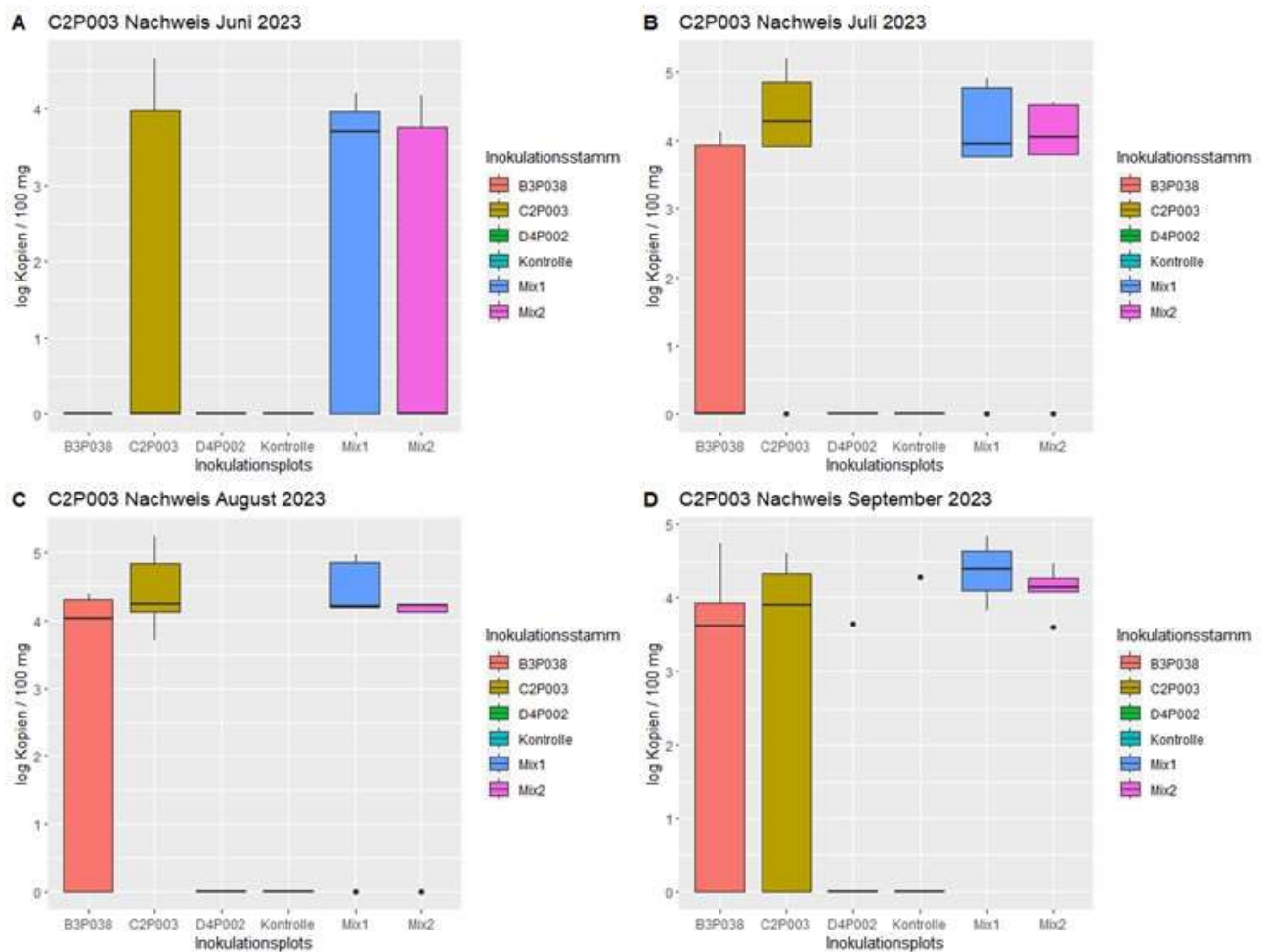


Abbildung 37: Abundanz des Stammes C2P003 auf jungen Eschen auf dem Standort Briesen (Mark). Die Blätter wurden 2, 6, 10 und 14 Wochen nach der Inokulation beprobt. Die Quantifizierung erfolgte über qPCR und stellt die Anzahl der Kopien eines single-copy Gens von C2P003 pro 100 mg Blattmaterial dar.

Die Bonitur des Eschentriebsterbens im September 2023 wurde mithilfe des Schadindex für junge Eschen nach Peters et al. (2021) durchgeführt. 33% der Eschen wurden der Schadklasse 5 zugeordnet und wiesen sehr starke Schadsymptome auf. Es folgten die Schadklassen 2 mit 19%, 4 mit 18% und 3 mit 17%. In Schadklasse 1 fielen 11% der jungen Eschen. 2% der Eschen wiesen keinerlei Schadsymptome auf. In der statistischen Analyse konnte kein signifikanter Einfluss der Inokulationsstämme auf die Schadklassenverteilung festgestellt werden (Abb. 38).

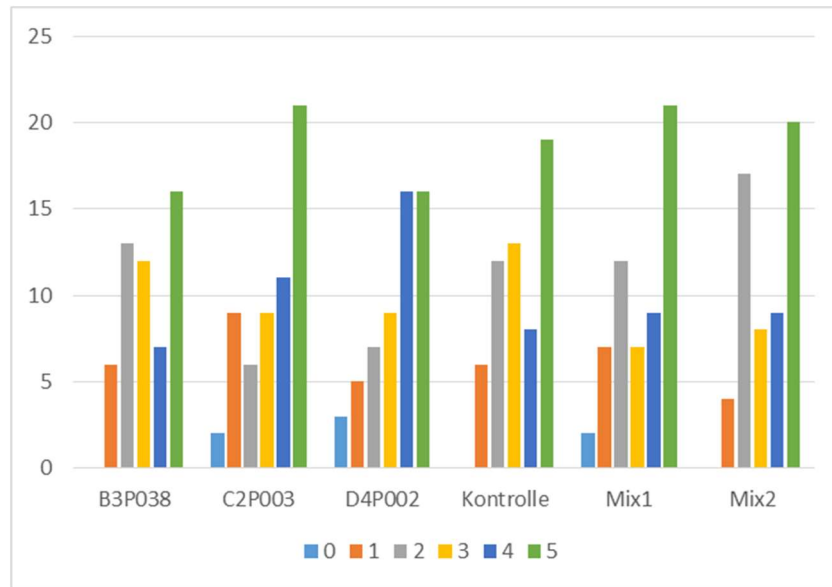


Abbildung 38: Verteilung der Schadklassen der jungen Eschen aufgeteilt auf die Inokulationsstämmen auf dem Standort Briesen (Mark) nach der Bonitur im September 2023.

Wie auch in den vorherigen Versuchen wurde zusätzlich die Abundanz des Pathogens mit einem für *H. fraxineus* spezifischem qPCR Assay quantitativ bestimmt. Hierbei wird jedoch nicht differenziert, ob es sich um noch nicht gekeimte Sporen auf den Blättern oder bereits eine aktive Infektion handelt. Die Quantifizierung erfolgte analog zu den Inokulationsstämmen. Insgesamt konnte ein Anstieg der Abundanz von *H. fraxineus* im Laufe der Vegetationsperiode festgestellt werden. Dabei traten im Juni Werte im Bereich $6.6E+03$ bis $2,2E+04$ Kopien pro 100 mg Blattmaterial auf. Im Juli konnten $1,3E+04$ bis $1E+06$ Kopien pro 100 mg nachgewiesen werden, sowie im August und September $3,2E+06$ bis $4.6E+07$ und $9.1E+06$ bis $8.5E+07$ Kopien pro 100 mg. In den Monaten Juni, Juli und September war die Kontrolle am stärksten befallen (Mittelwertvergleich).

Die Inokulationsvariante C2P003 wies im Juni, Juli und September einen signifikant geringen Befall mit *H. fraxineus* im Vergleich zur Kontrolle auf. B3P038 und Mix1 wiesen einen signifikant geringeren Befall in den Monaten Juli und September auf. Die Inokulationsvarianten D4P002 und Mix2 zeigten im September einen signifikant geringeren Befall mit *H. fraxineus*.

Auch wenn keine Auswirkung auf die Schadklassen der Eschen zu beobachten war, kann so eine signifikante Minderung der Abundanz des Pathogens durch die drei Inokulationsstämmen belegt werden (Abb. 39).

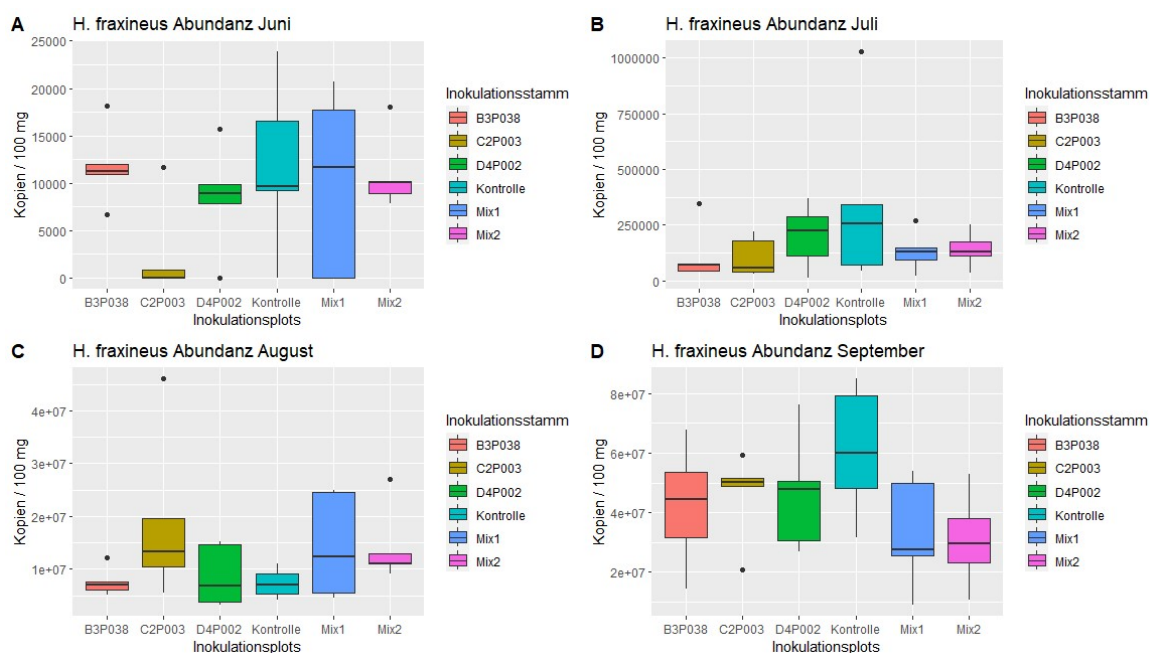


Abbildung 39: Abundanz des pathogenen Pilzes *H. fraxineus* auf bzw. in den Blättern von Eschensämlingen in den ersten vier Monaten nach der Inokulation (Versuchsjahr 2023). Die Quantifizierung erfolgte über qPCR und stellt die Anzahl der Kopien der ITS rRNA Region pro 100 mg Blattmaterial dar.

AP13.6 Abschließende Bewertung der Praxiseignung und Selektion der effektivsten Inokulationsstämme (TV4.9 ZALF)

Basierend auf den Versuchen bis Ende 2021 konnten wir drei vielversprechende Stämme für eine Weiterführung auswählen: *S. fraxinea* B3P038, *A. altamirensis* C2P003 und *L. fraxinea* D4P002. Die ebenfalls getesteten Stämme *Pantoea „vagans“* A3K039, *Pseudomonas „coleopterorum“* B2K013, *P. flavescens* D4P037, *L. fraxinea* C4P040a und *Papiliotrema flavescens* A3P071 konnten in der Anwendung nicht überzeugen und wurden nicht weiterverfolgt. *B. velleszensis* A4P130 zeigte vielversprechende Eigenschaften, kann aber aufgrund von Problemen bei der Kultivierung (Phagenbefall) nicht final bewertet werden.

Der Freilandversuch auf einem zusammenbrechenden Eschenforst im Jahr 2023 zeigte, dass sich insbesondere die Stämme B3P038 und C2P003 nach der Inokulation auf den jungen Eschen etablieren können und dort persistieren. Die Schadbonitur und die Quantifizierung zeigten ebenso einen starken Befall mit *H. fraxineus*. Besonders die Inokulation mit den Stämmen C2P003 und B3P038 führten zu einer signifikanten Minderung der Abundanz des Pathogens. Bisher konnten auf dieser Fläche jedoch keine eindeutig positiven Effekte auf die Pflanzengesundheit nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Wetter-Bedingungen zwischen den Jahren, aber auch der Standortbedingungen lässt uns den Schluss für die weitere Praxisanwendung ziehen, dass nach der Inokulation höhere Feuchtigkeit und schattige Bedingungen für die Persistenz der Stämme förderlich sind. Diese Bedingungen sind auch für das Wachstum von *H. fraxineus* förderlich. Letztlich scheinen somit die direkte Konkurrenz und Etablierungsfähigkeit entscheidend zu sein. Für eine effektive Behandlung und eine Praxisanwendung muss weiter untersucht werden, bis zu welchem Befallsdruck die inokulierten Bakterien eine hemmende Wirkung auf das Pathogen ausüben können. Insbesondere im Hinblick auf die Praxiseignung bieten sich die Stämme B3P038, C2P003 und D4P002 für die weitere Bearbeitung an.

2. Verwertung

TV4.1

Die Ergebnisse von TV4.1 wurden vor allem in Form von Postern, Vorträgen und Schulungen verwertet (Tab. 9). In Lehrveranstaltungen für Studierende der Forstwissenschaften und Forstwirtschaft sowie in Lehrgängen und Exkursionen für die Mitarbeitenden der Forstbetriebe, forstlichen Versuchsanstalten, Waldbesitzende, Arboristik, der Politik und die interessierte Öffentlichkeit erfolgte ein Wissenstransfer. Darüber hinaus wurden im Projektzeitraum 42 Waldschutzberatungen zur Esche durch das Sachgebiet Mykologie und Komplexerkrankung durchgeführt. Das erlangte Wissen und die gesammelte Erfahrung wird der Abteilung Waldschutz auch in zukünftigen Beratungsfällen von Nutzen sein. Eine weitere Verwertung der Ergebnisse geschah durch die Online Präsenz im Rahmen verschiedener Webseiten (<https://www.nw-fva.de/forschen/projekte/fraxcollar>, <https://www.fraxforfuture.de/>, <https://www.waldwissen.net/de/waldwirtschaft/schadensmanagement/pilze-und-nematoden/eschentriebsterben-vielfaeltige-symptome-im-blick-bei-der-bonitur-geschaedigter-eschen>). Die erworbene Expertise zum Eschentriebsterben wurde in den BMEL Koordinierungskreis zum Erhalt der Gemeinen Esche als Wirtschaftsbaumart, der bei der FNR und dem Kompetenz- und Informationszentrum Wald und Holz (KIWUH) angesiedelt ist, eingebracht. Zudem wurden entsprechende Kenntnisse in die Projekt begleitende Arbeitsgruppe (PAG) des Projekts: „Bedeutung des Eschentriebsterbens für die Biodiversität von Wäldern und Strategien zu ihrer Erhaltung (FraDiv)“ vermittelt.

Tabelle 9: Verwertung der Ergebnisse in Postern, Vorträgen und Schulungen aller Mitarbeitenden von TV4.1 im Projektzeitraum.

Verwertungsart	Mitarbeiter*Innen	Jahr	Veranstaltung	Titel
Poster	Jörg Grüner, Ben Bubner, Ralf Kätzel, Gitta Langer, Ralf Volker Nagel	2021	62. Deutsche Pflanzenschutztagung (DPST; als Online-Veranstaltung)	FraxForFuture Forschung zum Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart
Poster	Sandra Peters, Sebastian Fuchs, Tobias Lutz, Valentin Burghard, Linus Hohenwarter, Gitta Langer	2022	Waldklimafonds Kongress Göttingen	Der Verbund FraxPath (Phytopathologie) im Demonstrationsvorhaben FraxForFuture
Poster	Sandra Peters, Sebastian Fuchs	2022	Tag der offenen Tür NW-FVA	Stammfußfäule beim Eschentriebsterben
Poster	Tim Burzlaff, Feray Steinhart, Sebastian Fuchs, Jörg Grüner	2022	Tagung der International Union of Forest Research Organisations (IUFRO) in Lissabon	The FraxForFuture Research Network
Poster	Sebastian Fuchs, Felix Grün, Sandra Peters, Gitta Langer, Uwe Paar	2023	Abschlussveranstaltung von FraxForFuture im Rahmen der Pflanzenschutztagung 2023 in Göttingen	Eschenzustand in Abhängigkeit von Standort und Bestand
Poster	Gitta Langer, Sandra Peters, Sebastian Fuchs, Felix Grün, Annette Ihlemann, Martina Hille, Peter Gawehn, Daniel Gaunitz, Etta Starick, Holger Sennhenn-Reulen	2023	Abschlussveranstaltung von FraxForFuture im Rahmen der Pflanzenschutztagung 2023 in Göttingen	Einfluss von Standortfaktoren auf Stammfußnekrosen - Ätiologie, Diversität und Populationsstruktur von assoziierten Pilzen (FraxCollar)
Schulung	Sandra Peters, Tino Steinigen, Peter Gawehn, Gitta Langer	2021	Boniturschulung (projektintern) zum neu veröffentlichten Boniturschlüssel an der NW-FVA in Göttingen	Boniturschulung im Demonstrationsprojekt FraxForFuture

Schulung	Sandra Peters	2022	Boniturschulung (hausintern) für die Eschenbonitur in Naturwaldparzellen an der NW-FVA in Göttingen	Boniturschulung Eschtriebsterben für Abteilung E (Waldnaturschutz)
Vortrag	Gitta Langer	2020	Universität Göttingen, Seminar Aktuelle Fragen des Waldbaus	Eschtriebsterben – Ursache, Verbreitung und Handlungsempfehlungen
Vortrag	Gitta Langer	2020	Anwärter/Referendarschulung für Bundesforst und hessische Forstämter im FA Jesberg	Aktuelle Erkrankungen an Buche, Ahorn und Kiefer - Auswirkungen der Dürre und Hitze in unseren Wäldern
Vortrag	Sandra Peters, Sebastian Fuchs, Gitta Jutta Langer	2021	Forstwissenschaftliche Tagung (FowiTa; als Online-Veranstaltung)	Untersuchungen zum Eschtriebsterben: Schadböschung befallener Eschen und Einfluss von Standortfaktoren auf Stammfußnekrosen und assoziierte Pilze
Vortrag	Sandra Peters, Gitta Jutta Langer	2021	62. Deutsche Pflanzenschutztagung (DPST; als Online-Veranstaltung)	Untersuchungen zum Eschtriebsterben mit Fokus auf Stammfußnekrosen und assoziierte Pilze
Vortrag	Gitta Langer	2021	Universität Göttingen, Seminar Aktuelle Fragen des Waldbaus	Eschtriebsterben – Ursache, Verbreitung und Handlungsempfehlungen
Vortrag	Gitta Langer	2021	International Conference of the German Mycological Society “100 years DGfM”	Current forest diseases in Germany and the impact of Latent Fungal pathogens on Tree health
Vortrag	Gitta Langer	2021	Institutskolloquium der Goethe-Universität Frankfurt am Main (Online-Veranstaltung)	Auswirkungen von Dürre und Hitze in unseren Wäldern – Bedeutung pilzlicher Schaderreger
Vortrag	Gitta Langer	2022	Nationalpark Kellerwald-Edersee, Rangerschulung	Auswirkungen des Klimawandels
Vortrag	Gitta Langer	2022	Universität Göttingen, Seminar Aktuelle Fragen des Waldbaus	Eschtriebsterben – Ursache, Verbreitung und Handlungsempfehlungen
Vortrag	Gitta Langer	2022	38. Osnabrücker Baumpflege-Tagung 2022	Folgen der Hitze- und Dürrejahre 2018-2022 in unseren Wäldern – Buchen-Vitalitätsschwäche und Rußrindenerkrankung
Vortrag	Gitta Langer	2022	Tagung „Waldzukunft / Zukunftswald - Welche Zukunft hat unser Wald?“, Bad Zwesten	Auswirkungen von Klimawandel und Globalisierung auf unsere Wälder und deren Management
Vortrag	Gitta Langer	2022	Dienstbesprechung LWK FoA Südniedersachsen (Online-Veranstaltung)	Trockenstressgefährdung und aktuelle Erkrankungen Waldbäumen
Vortrag	Gitta Langer, Jörg Grüner	2022	WKf-Themennachmittag (per Videokonferenz)	Demonstrationsvorhaben FraxForFuture – Hoffnung für die Esche

Vortrag	Gitta Langer	2022	Forst-Aid, Niedersächsische Initiative: Wir stärken den Wald für die Zukunft	Buchen-Vitalitätsschwäche – assoziierte Schadfaktoren und Folgeerscheinungen
Vortrag	Gitta Langer	2022	NLF Fortbildung Waldschutzmultiplikatoren	Pilze / Komplexkrankheiten
Vortrag	Sandra Peters	2023	Forstwissenschaftliche Tagung (FoWiTa)	Eschentriebsterben – Pilze assoziiert mit Stammfußnekrosen von <i>Fraxinus excelsior</i>
Vortrag	Sandra Peters, Gitta Jutta Langer	2023	63. Deutsche Pflanzenschutztagung (DPST) an der Georg-August-Universität Göttingen	Eschentriebsterben – Pilze assoziiert mit Stammfußnekrosen von <i>Fraxinus excelsior</i>
Vortrag	Sandra Peters, Gitta Jutta Langer	2023	31. Nordische Baumtage in Rostock	Eschentriebsterben in Verbindung mit Stammfußnekrosen
Vortrag	Gitta Langer	2023	Universität Göttingen, Seminar Aktuelle Fragen des Waldbaus	Eschentriebsterben – Ursache, Verbreitung und Handlungsempfehlungen
Vortrag	Felix Grün, Sebastian Fuchs, Sandra Peters, Jan Evers, Uwe Paar, Gitta Langer	2023	Abschlussveranstaltung von FraxForFuture im Rahmen der Pflanzenschutztagung 2023 in Göttingen	Einfluss von Standortfaktoren auf das Eschentriebsterben und die Ausprägung von Stammfußnekrosen
Vortrag	Gitta Langer	2023	Statusseminar „FraxForFuture“ der FNR	Unterverbund 4: Phytopathologie (FraxPath)
Vortrag	Gitta Langer	2024	University of Göttingen Lecture (exercise) Forest Pathology	I) Current fungal and Complex diseases II) European ash dieback

Aus den Untersuchungen zur Abhängigkeit des Eschentriebsterbens von Standortfaktoren lassen sich einige Empfehlungen ableiten, unter welchen Bedingungen Eschenanbau in Zukunft am ehesten wieder gelingen kann. Dies impliziert nicht, dass es in Deutschland bestimmte Standortverhältnisse gibt, unter denen Eschen generell nicht vom Eschentriebsterben betroffen sind oder sein werden. Da aber zukünftige flächenhafte Wiederanbauversuchen von Eschen, die entweder durch Auslese oder Bekämpfungsverfahren toleranter gegenüber dem Erreger sind, kostenintensiv sein werden, sollten dabei zunächst bestimmte Bedingungen vermieden werden. Dies gilt insbesondere für Eschen-Reinbestände (oder hohe Eschenanteile in Mischung) und hydro-morphe Bodenverhältnisse - Faktoren, die wiederholt mit starker Schadsymptomatik in Verbindung stehen.

Die starke Verlangsamung des Schadfortschritts nach trocken-heißen Sommern kann als Hinweis gedeutet werden, dass der fortschreitende Klimawandel zumindest im südlichen Teil des Verbreitungsgebietes der Gemeinen Esche die Epidemiologie des Eschentriebsterbens bremsen könnte.

Die hohe Relevanz von Stammfußnekrosen der Stufe 2 für die Standsicherheit von Eschen konnte bei der Auswertung der Intensivbeobachtungsflächen-Bonituren (Fuchs et al. 2024) direkt quantifiziert werden. Diese Erkenntnis erhöht den Wert des Boniturschlüssels für die forstliche Praxis – insbesondere bei der Beurteilung der Wege- und Arbeitssicherheit. Der Boniturschlüssel (Peters et al. 2021a) kann und sollte also weiterhin zur Bonitur des Eschentriebsterbens und für das zukünftige Monitoring des Schadensfortschritts genutzt werden. Außerdem evaluiert die Publikation den Boniturschlüssel in Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Kronenschadstufen mit dem Parameter „Kronenverlichtung“ der WZE, um die Nutzung beider Instrumente zum Eschenmonitoring in Zukunft zu gewährleisten.

Bezogen auf die mykologischen Arbeitspakete, wären in Zukunft weitere Pathogenitätstest (Langer et al. 2023) und Holzfäuletests (Tropf et al. 2022) empfehlenswert, um die Funktionen der aus Eschengewebe isolierten Pilzarten zu ermitteln. Pathogenitätstest der isolierten Pilze an Eschensämlingen oder -heistern könnten dazu zu dienen, die Koch'schen Postulate (Bhunjun et al. 2021) für die nachgewiesenen Eschenpathogene zu erfüllen. Das Vermögen bzw. die Leistung Holz abzubauen bzw. zu degradieren kann durch Holzfäuletests *in*

in vitro getestet werden, da dies bei vielen der nachgewiesenen eschenassoziierten Pilze nicht bekannt ist. Ergebnisse dieser Versuche lassen Rückschlüsse auf das Risiko hinsichtlich der Verminderung von Stand- und Bruchsicherheit bzw. der Verkehrs- und Arbeitssicherheit befallener Eschen zu.

Zudem sollte zur Übersicht eine „Checkliste“ aller eschenassoziierte Pilze erstellt werden. Letztere könnte eine Referenz oder Basis für zukünftige Forschung zur Phytopathologie und Diversität von Esche darstellen. Eine Zuarbeit zur Roten Liste ist ebenfalls wünschenswert. Grundsätzlich stellen die isolierten und lebendarchivierten Pilze eine genetische Ressource und potentielle Quelle für neue Naturstoffe oder Antagonisten dar. Die entwickelte Methode zur Isolierung und Charakterisierung von holzassoziierten Pilzen kann zukünftig als Standardmethode für Kausalanalysen bei neuartig auftretenden pilzlichen oder komplexen Waldbaumerkrankungen eingesetzt werden.

TV4.2

Im Rahmen des Projekts gewonnene Daten zur Mikrosatellitensignatur und Virulenz von einer großen Anzahl von *H. fraxineus*-Stämmen aus verschiedenen Regionen ermöglichen die Analyse der Populationsstruktur des Eschentriebsterben-Erregers in Deutschland. Wenn die statistische Auswertung abgeschlossen ist, lassen sich voraussichtlich Kenntnisse zur Diversität der Population, zur Veränderung der Struktur, und möglicherweise zu Zusammenhängen mit geographischer Herkunft und Virulenz ableiten. Solche Kenntnisse sind von großem Wert für die Wissenschaft, wenn sie erforschen möchte, wie sich *H. fraxineus* als invasives und aggressives Waldpathogen nach erfolgreicher Etablierung in Europa evolutionär verändert, und wie sich dies auf das Pathosystem auswirkt. Hierdurch verstandene Prinzipien sind gegebenenfalls auch auf andere Pathosysteme und zukünftige biologische Invasionen übertragbar. Durch das Verständnis, warum sich die Virulenz der Pathogenindividuen so fundamental unterscheidet, lassen sich möglicherweise forstliche Handlungsoptionen ableiten, die zu einer Verringerung der Virulenz in der Gesamtpopulation beitragen.

Die Untersuchungen zu biologischen Bekämpfungsmöglichkeiten mit antagonistischen Endophyten und Vorinfektionen mit einem gering virulenten *H. fraxineus*-Stamm (Priming) können wegweisend für die Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels gegen das Eschentriebsterben sein. Im Versuch zeigte sich, dass eine Behandlung zumindest unter bestimmten Gewächshausbedingungen einen Effekt auf die Krankheitsentwicklung hat, wobei dieser Effekt bei den meisten Endophyten nicht stark ausgeprägt war. Daher gilt es zunächst, die Wirksamkeit und die Persistenz auch unter diversen Freilandbedingungen zu testen und zu optimieren. Sollte sich eine hinreichende Wirksamkeit auch unter natürlichen Bedingungen bestätigen, und sollten weitere Studien hinsichtlich der Risiken für Naturhaushalt und menschliche Gesundheit dem nicht entgegenstehen, könnte die Zulassung eines Wirkstoffes auf EU-Ebene angestrebt werden. Eine großflächige Bekämpfung des Eschentriebsterbens im Wald mit einem biologischen Wirkstoff würde allerdings eine entsprechende Ausbringungstechnik erfordern und ist auch unter ökonomischen Gesichtspunkten eher unwahrscheinlich. Zum jetzigen Zeitpunkt ist aber die Behandlung von auf Toleranz gezüchtetem Pflanzmaterial in der Baumschule als zusätzlicher, präventiver Schutz für die sensible Anwuchsphase in den ersten Jahren nach dem Auspflanzen im Wald ein denkbare Szenario.

Die methodischen Erkenntnisse, die im Zusammenhang mit Inokulationsversuchen und der Ermittlung der Virulenz von *H. fraxineus*-Stämmen entstanden, können für die weitere Erforschung des Eschentriebsterbens von Relevanz sein. Dabei sind insbesondere die Erkenntnisse zur Aufrechterhaltung der Virulenz in Kultur herauszuheben.

TV4.3

Wissenschaftliche Erfolgsaussichten

Die Ergebnisse der dendrochronologischen Untersuchungen können kurzfristig für die Erarbeitung eines Folgeantrags zum Thema Standfestigkeit von Eschen mit Stammfußnekrosen genutzt werden. Mittelfristig können sie für die Beratung der Forstpraxis in Hinblick auf die Entwicklungsgeschwindigkeit von Stammfußnekrosen genutzt werden. Mittel- und langfristig können die Erkenntnisse, aus *in vitro*-Inokulationen von Eschen-Mikrobohrkernen, zur Histopathologie und zur Hyphenstruktur von *H. fraxineus* in Eschengewebe, für histologische Untersuchungen verwendet werden. Die wissenschaftliche Publikation der dendrochronologischen Untersuchungen von Stammfußnekrosen ist geplant und dient der langfristigen Bereitstellung der Methodik und Ergebnisse.

Wissenschaftliche Anschlussfähigkeit

Weitere *in vivo*-Inokulationsversuche sind notwendig um die Bedeutung einer Vorschwächung des Baums im Kronenbereich für die Entstehung von Stammfußnekrosen zu untersuchen. Enge Jahrringe im äußeren Bereich der untersuchten Stammscheiben legen ein vermindertes Dickenwachstum von *F. excelsior* in Folge von Eschentriebsterben und Stammfußnekrosen nahe. Jahringmessungen könnten diese Zuwachseinbußen

quantifizieren und so zu einer besseren Einschätzung erwartbarer Zuwachsleistungen von *F. excelsior* beitragen. Untersuchungen der Standfestigkeit von Eschen mit Stammfußnekrose im Zusammenhang mit dem äußerlich sichtbaren Schadbild sind notwendig, um die Akzeptanz zu erhöhen, Eschen möglichst lange im Bestand zu belassen, bei gleichzeitig geringem Risiko für die Arbeits- und Verkehrssicherheit. Die Erhebung des Eschenzustands auf den Intensivbeobachtungsflächen sollte fortgesetzt werden um einen Eindruck der langfristigen Entwicklung von Eschenbeständen unter Einfluss des Eschentriebsterbens zu gewinnen.

Praxistransfer

Die Aktive Teilnahme an Tagungen hat erreichen können, dass die Erkenntnisse in Fachkreisen diskussionsfähig sind. Eine Bereitstellung von Ergebnissen für die Entwicklung einer Handlungsempfehlung für die Forstpraxis durch FraxConnect ist ein wichtiger Schritt, um eine zukünftige Nutzung der Esche kontrolliert gestalten zu können. Die Erkenntnisse zur Entstehung von Stammfußnekrosen können Verwendung in der Beratungen der Forstpraxis finden.

TV4.4

Unsere Ergebnisse und Befunde anderer Teilprojekte lassen sich nun praxisrelevant umsetzen. Hierzu werden in einem zu beantragenden Projekt – FraxRecovery – praxisnahe Lösungsansätze formuliert, um die Esche zukünftig zu erhalten. Der Erhalt der Esche trägt maßgeblich zur Speicherung von CO₂ bei. Bei einer Darrdichte von 670 kg/Festmeter speichert die Esche 1,3 Tonnen CO₂/Festmeter Holz. Je nach Bestandesalter und Vorratsfestmetern können 20-840 Tonnen CO₂ pro Hektar gespeichert werden (LWF 2011). Die Untersuchung des Primings von Sämlingen in großen Stückzahlen sowie die Erfolgskontrolle des Primings hinsichtlich der Förderwirkung von saprophytischen Pilzarten sind für eine zukünftige Zulassung unerlässlich. Um für eine zukünftige Zulassung verlässliche Grundlagen zu schaffen, sollten in einem neu zu beantragenden Projekt Vorversuche durchgeführt werden, die die gesamten bisher angewandte Probenpipeline (Probenahme, Inkulturnahme, NGS) für eine erfolgreiche Inokulation von Eschensämlingen prüft. Gewächshaus und Freilandversuche sollen dabei in Kooperation mit der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt durchgeführt werden.

Die Bereitstellung von selektiertem Saatgut von Plusbäumen ist Gegenstand anderer Projektgruppen. Die von uns nun detektierten Pilzarten der Laub- und Holzzeretzenden Saprophyten sind im Waldökosystem leicht zu finden, können problemlos in Reinkultur gebracht werden und haben keine parasitischen Eigenschaften wie andere aus Boden isolierte Pilzarten aus der Gruppe der Ascomycota (Schlauchpilze). Eine Anzucht dieser Saprophyten kann auch im größeren Maßstab in filamentöser Fermentation in Flüssigkultur stattfinden. Eine zukünftige Anwendung wäre deshalb wirtschaftlich leicht umsetzbar und risikolos.

Die Weiterentwicklung des NGS mit dem Oxford Nanopore MinION stellt eine sehr günstige Alternative zu anderen Sequenzierungsplattformen dar. Allerdings ist die Lesegenauigkeit noch recht fehlerbehaftet im Vergleich zum Beispiel zu Illumina oder der Sanger-Sequenzierung. Die Verwendung von Nanoporen für das Metabarcoding hat allerdings den Vorteil, dass auch sehr lange Fragmente analysiert werden können und man sich, vor allem in Bezug auf Pilze, nicht nur auf den ITS1 oder ITS2 Bereich beschränken muss, was wiederum die taxonomische Zuordnung verbessert. Ein Wurzelmonitoring auf den Erfolg eines zukünftigen Primings mit förderlichen Pilzarten kann technisch problemlos somit auch von anderen Arbeitsgruppen umgesetzt werden. Darüber hinaus kann diese Methodik auch auf das Rhizobium und andere Pflanzenteile anderer Baumarten angewandt werden. Über entsprechende Labore und ein Kontingent an Mitarbeitern ließe sich somit ein umfassendes Screening der in Deutschland vorkommenden Mikroorganismen erstellen. Dies würde einen hohen Beitrag zum Verständnis über die Rolle einzelner Mikroorganismen im Ökosystem leisten. Neben der Oxford Nanopore Technologie ermöglicht auch die PacBio-Sequenzierung längere Fragmente, geht jedoch auch mit höheren Anschaffungskosten eines Sequenzierers einher bzw. der Vergabe von Aufträgen an externe Labore.

Die erhobenen Daten werden in die projektinterne Datenbank eingefügt.

TV4.5

Methoden zur hochqualitativen RNA-Extraktion aus dem Pilzmyzel und der Eschenrinde wurden etabliert und für die Genexpressionsstudien eingesetzt. Die erzielten Ergebnisse zur differentiellen Genexpression ermöglichen zum ersten Mal Einblicke in die substratabhängige Genexpression und zeigen aktive Virulenzgene im Bereich der Toxinproduktion und damit Indikatoren für ein aktives Wachstum sowie Unterschiede zwischen sensiblen und toleranten Eschen-Arten auf. Da die Genexpression auch im experimentell infizierten Wirt möglich ist, lassen sich die Genmarker auch im Screening von Genotypen (Wachstumserfolg oder Misserfolg), dem diagnostischen Screening (Nachweis des wachsenden/metabolisch aktiven Pathogens) oder im Screening von Bodenproben als Standortfaktor einsetzen (Pathogenlast; metabolisch aktives Pathogen). Erste TaqMan-Assays wurden zu diesem Zweck entwickelt.

Die Arbeitsergebnisse des Teilvorhabens wurden in einem ersten Manuskript zusammengefasst, welches sich nun in der Begutachtung befindet. Es stellt einmalige und neuartige Einblicke zum Eschentriebsterben bzw. in die Pathogen-Wirt-Interaktion bereit. Die analysierten DEGs und ihr Potential der Anwendung als Genmarker zur Evaluierung von sensiblen Vermehrungsgut sollen ebenfalls nach dem Abschluss der Analysen der wissenschaftlichen Gemeinschaft und den Anwendern bereitgestellt werden. Der angestrebte Transfer in die Anwendung, auch im Zusammenhang mit der Evaluierung des Einsatzes von Antagonisten oder der Standortbewertung aufgrund der Pathogenlast bei Saatgutplantagen oder in Archiven, muss im Rahmen von Folgeprojekten für den Transfer in die Praxis umgesetzt werden.

TV4.6

Die Ergebnisse von TV4.6 wurden vor allem in Form von Publikationen (siehe Veröffentlichungen), Vorträgen und Postern verwertet. Für den Praxistransfer stehen darüber hinaus zehn pilzliche Endophyten und mit Hypovirulenviren transfizierte *H. fraxineus* zur Verfügung, die für Behandlung des Eschentriebsterbens ein großes Potential haben. Wichtig für den Praxistransfer ist auch, dass *gfp*-transformierte *H. fraxineus*-Stämme zur Verfügung stehen, mit denen die Besiedlung des Pathogens erfolgreich in den infizierten Eschensämlingen dargestellt werden kann. Eine erste praktische Anwendung konnte mit der LüthKkorte GmbH etabliert werden, die mit pilzlichen Endophyten bewachsene Holzstäbe einsetzt, um Eschen mit einem protektiven Endophyten zu inokulieren. Wir analysieren derzeit noch weitere endophytische Pilzisolat, die den Erreger des Eschentriebsterbens unter Laborbedingungen und *in planta* inhibieren. Für den geplanten Praxistransfer, entsprechende Publikationen und eine spätere Zulassung als biologische Bekämpfungsmaßnahme müssen noch weitere aktive Metaboliten identifiziert und eine mögliche Mykotoxinproduktion ausgeschlossen werden. Für die biologische Kontrolle des Eschentriebsterbens und zur Förderung der Infektionsresistenz sollte der praxistaugliche Einsatz von wirkungsoptimierten persistierenden protektiven pilzlichen Endophyten erarbeitet und der Einsatz von Hypoviren und immunstimulierenden Priming-Stämmen weiterentwickelt werden. Neben dem kombinierten Einsatz der biologischen Bekämpfungsmittel (Endophyten/Endophyten, Endophyten/Bakterien, Endophyten/Priming, Endophyten/Hypoviren) sollte zukünftig auch an der Vorbereitung eines Zulassungsverfahrens gearbeitet werden.

TV4.7

Im Projekt FraxVirHyp konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von hypovirulenten Viren, die von verwandten oder nicht verwandten Pilzstämmen künstlich übertragen werden konnten, grundsätzlich möglich ist. Alle Transfektionen zeigten den für Hypovirulenz typischen, reduzierten Wuchs. Im Biotest wiesen diese virusinfizierten Pilzisolat tatsächlich eine reduzierte Virulenz auf. Die Etablierung einer Methode zur stabilen Transformation, zur Markierung von *H. fraxineus* für Lebendzellmikroskopie und von gezielter Genausschaltung wird es in Zukunft erlauben, weitere Fragen der Biologie des Erregers zu beantworten.

Insgesamt wurden mit diesem Projekt die Voraussetzungen geschaffen, den Ansatz der virusinduzierten Hypovirulenz zur Bekämpfung des Eschentriebsterbens zu etablieren. Wir liefern damit einen Beitrag zur möglichen Rettung der heimischen Eschen.

Für die Anwendung in der Praxis müssen allerdings die Biotests wiederholt werden und die Frage der Art der Applikation und der Zulassung geklärt werden. Dies wäre mit geringem Aufwand und in kurzer Zeit möglich. Da die Anwendung, sobald sie etabliert ist, kostengünstig ist und keinerlei Risiken für Mensch und Umwelt darstellt, ist sie die ideale Möglichkeit, dass die Züchter Zeit für die Generierung toleranter oder resistenter Sorten gewinnen.

TV4.8

Das Ziel, eine Bekämpfungsmethode von *H. fraxineus* mittels RNAi/Applikation von RNA Molekülen zu entwickeln, konnte nicht mehr in der geplanten Projektlaufzeit erreicht werden, da die Frage des Vorliegens eine Suppressors abgeklärt werden muss. Sobald dies geschehen ist, ist die Bekämpfung von *H. fraxineus* mittels einer modifizierten RNAi Strategie immer noch erfolgversprechend.

TV4.9

Die bisherige Forschung zur Bekämpfung des Eschentriebsterbens konzentrierte sich auf das Monitoring sowie die Selektion und Vermehrung toleranter Einzelbäume. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Identifizierung von Besonderheiten im Genom gelegt, die eine Toleranz erklären können. Eine weitere Möglichkeit der Toleranzerhöhung liegt im Mikrobiom der Esche. Bisherige Untersuchungen über Kultivierung und

Sequenzierung von Markergenen haben gezeigt, dass es zwischen toleranten und anfälligen Eschen Unterschiede im Mikrobiom gibt und bestimmte Mikroorganismen u. a. der Gattungen *Luteimonas* und *Aureimonas* häufiger auf und in toleranten Eschen auftreten. Insbesondere die Stämme *Luteimonas fraxinea* D4P002, *Aureimonas altamirensis* C2P003 und *Schaurella fraxinea* B3P038 zeigten eine mindernde Wirkung auf das Eschentriebsterben unter Gewächshausbedingungen.

Die Entwicklung und folgende Etablierung eines stammspezifischen Nachweissystems auf Grundlage von Primer-Sonden-Systemen für qPCR erlaubten den erfolgreichen Nachweis der Bakterienstämme auf und in den Eschen. Im Freilandversuch konnte gezeigt werden, dass zum einen die Inokulation erfolgreich an Eschensämlingen war und zum anderen zwei der Stämme über einen längeren Zeitraum persistent blieben.

Die Aufbringung von Bakterien als biocontrol agents (BCAs) auf Pflanzen hat in den letzten Jahren ihre Wirksamkeit gegenüber Pflanzenpathogenen gezeigt. Die verwendete Methode der Inokulation von Bakterienstämmen auf Eschensämlingen zeigte, dass es möglich ist Bakterien auf junge Eschen aufzubringen sowie diese auch später nachzuweisen. Ein „Priming“ durch Bakterien hat also grundsätzlich Erfolg und kann bei jungen Eschen durchgeführt werden. Eine Kombination mit pilzlichen Antagonisten, dem Einsatz von hypovirulenten Viren und Methoden wie der RNA-Interferenz scheint in einer späteren Entwicklungsphase des Systems möglich zu sein. Die Verwendung von inokulierten Eschensämlingen in den Baumschulen bietet so eine Option, die Wiedereinführung der Esche voranzubringen und somit langfristig die Pflanzung toleranterer Eschen in natürlichen Verbreitungsgebieten zu ermöglichen.

Grundsätzlich ist jedoch die wirtschaftliche Verwendung von Bakterien und anderen Mikroorganismen als Pflanzenschutzmitteln in der Verordnung (Eg) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln geregelt. Dieses Prüfungsverfahren muss vor einer großflächigen Anwendung durchlaufen werden.

Mit der Entwicklung und Etablierung stammspezifischer Nachweissysteme für antagonistische Bakterienstämme ist es möglich, ausgewählte Bakterienstämme relativ einfach und schnell nachzuweisen. Sie können zukünftig als Modell für den Nachweis von BCAs auf anderen Baumarten dienen und so zur Bekämpfung anderer Pflanzenpathogene beitragen.

Zusätzlich kann durch den Nachweis der inokulierten Bakterien im Freiland gezeigt werden, dass eine Inokulation nicht nur unter kontrollierten Bedingungen möglich ist. Eine zukünftige Übertragung auf andere Baumarten ist auch hier möglich.

Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse sind weitere Fragen aufgekommen, die für eine zukünftige Praxisanwendung unabdingbar sind:

- 1) Überprüfung der Stabilität der Inokulationseffekte auf das Eschentriebsterben an verschiedenen Eschengenotypen und verschiedenen eschentypischen Standorten.
- 2) Erprobung weiterer Inokulationsmethoden zur Erhöhung der Persistenz der Bakterienstämme, mögliche Fokussierung auf endophytische Bakterien.
- 3) Untersuchung von Plusbaum-Nachkommenschaften auf Etablierungsfähigkeit und Persistenz antagonistischer Bakterienstämme, zur gezielten Selektion.

3. Erkenntnisse von Dritten

TV4.1

Eine europaweite Arbeit zum Eschentriebsterben auf Basis des Level I Monitoringnetzwerks von ICP Forests, zu dem auch die deutsche WZE gehört, hat während der Projektlaufzeit ähnliche Ergebnisse zur Abhängigkeit der Mortalität und Kronenverlichtung der Gemeinen Esche von Witterung und Bodenwasserhaushalt publiziert (George et al. 2022).

Weiterführende Untersuchungen von Heinzelmann et al. (2023) zu Stammfußnekrosen mit Zugversuchen geben Aufschluss zur Stabilitätsschätzung (<https://www.waldwissen.net/de/waldwirtschaft/schadensmanagement/pilze-und-nematoden/auch-der-hallimasch-setzt-den-eschen-stark-zu>).

Die Vermutung, dass mit der Untersuchung von Stammfußnekrosen weiterer Flächen noch mehr mit Esche assoziierten Pilze und vielleicht sogar neue Arten entdeckt werden, wird durch die Studie von Jiang et al. (2021) und der dort neu beschriebenen *Diaporthe* Art bestätigt.

TV4.2

Während der Durchführung des Vorhabens wurde auch bei anderen Stellen auf dem Gebiet des Vorhabens geforscht. Die publizierten Ergebnisse sind jedoch nicht unmittelbar vergleichbar mit den im Projekt generierten Erkenntnissen. Folgende Publikationen seit Projektstart sind uns auf dem Gebiet zum Zeitpunkt der Berichterstattung bekannt:

Bakys R, Bajerkevičienė G, Pliūra A (2022) Fungal communities in re-emerging *Fraxinus excelsior* sites in Lithuania and their antagonistic potential against *Hymenoscyphus fraxineus*. *Microorganisms* 10: 1940. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101940>

Barta M, Pastirčáková K, Ostrovský R, Kobza M, Horáková MK (2022) Culturable endophytic fungi in *Fraxinus excelsior* and their interactions with *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forests* 13:1098. <https://doi.org/10.3390/f13071098>

Bilański P, Kowalski T (2022) Fungal endophytes in *Fraxinus excelsior* petioles and their in vitro antagonistic potential against the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus*. *Microbiological Research* 257. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126961>

Buschbom J (2022) Genomic patterns and the evolutionary origin of an invasive fungal pathogen (*Hymenoscyphus fraxineus*) in Europe. *Basic and Applied Ecology* 59: 4-16. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2021.12.006>

Kosawang C, McKinney LV, Nielsen LR, Kjær ED (2020) Variation in aggressiveness of *Hymenoscyphus fraxineus* genotypes amid the ash dieback epidemic. *Plant Pathology* 69: 677-684. <https://doi.org/10.1111/ppa.13158>

Kowalski T, Bilański P (2021) Fungi detected in the previous year's leaf petioles of *Fraxinus excelsior* and their antagonistic potential against *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forests* 12: 1412. <https://doi.org/10.3390/f12101412>

Kowalski T, Bilański P (2022) Fungicolous fungi on pseudosclerotial plates and apothecia of *Hymenoscyphus fraxineus* and their biocontrol potential. *Microorganisms* 10: 2250. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112250>

Laubray S, Buée M, Marçais B (2023) Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen: *Hymenoscyphus fraxineus*, the ash dieback agent. *Biological Invasions* 25:2567–2582. <https://doi.org/10.1007/s10530-023-03057-9>

Nawrot-Chorabik K, Marcol-Rumak N, Latowski, D (2021) Investigation of the biocontrol potential of two ash endophytes against *Hymenoscyphus fraxineus* using in vitro plant–fungus dual cultures. *Forests* 12:1750. <https://doi.org/10.3390/f12121750>

Rafiqi M, Kosawang C, Peers JA et al. (2023) Endophytic fungi related to the ash dieback causal agent encode signatures of pathogenicity on European ash. *IMA Fungus* 14:10. <https://doi.org/10.1186/s43008-023-00115-8>

Striganavičiūtė G, Žiauka J, Sirgedaitė-Šėžienė V, Vaitiekūnaitė D (2021) Priming of resistance-related phenolics: A study of plant-associated bacteria and *Hymenoscyphus fraxineus*. *Microorganisms* 9:2504. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122504>

TV4.7

Im Dezember 2023 ist publiziert worden, dass das in Asien gefundene *Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 2 möglicherweise als BCA geeignet ist:

Shamsi W, Mittelstrass J, Ulrich S, Kondo H, Rigling D, Prospero S (2023) Possible biological control of ash dieback using the mycoparasite *Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 2. *Phytopathology*®. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-23-0346-KC>

TV4.8

Wissenschaftliche Publikation zu einem potentiellen Suppressor des RNAi-Mechanismus:

Kowalik K, Shimada Y, Flury V et al. (2015) The Paf1 complex represses small-RNA-mediated epigenetic gene silencing. *Nature* 520, 248–252. <https://doi.org/10.1038/nature14337>

TV4.9

Obwohl die Erkenntnisse Dritter aktuell im Stand der Technik bereits Berücksichtigung finden, soll hier auf einige neuere Publikationen näher eingegangen werden.

Kaczyński et al. (2021) zeigten mit ihrer Studie, dass aufgrund des hohen Einsatzes von Pestiziden in der Landwirtschaft sich diese in typischen Waldtieren (Rehe und Wildschweine) anreichern. Besonders Mittel wie DDE-p,p' und DDD-p,p' zeigen karzinogene Eigenschaften, welche durch Konsum sich auch im menschlichen Organismus anreichern könnten. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Forschung und Anwendung von BCAs, um zu einer Reduktion des Einsatzes von Pestiziden zu kommen.

In der Studie von Berg et al. (2021) wird ein Überblick gegeben, wie die Pflanze und das Pflanzenmikrobiom auf Bakterieninokulationen reagieren. Dabei konnten sie sechs Typen der Veränderung beschreiben und verweisen auf vorübergehende Veränderungen direkt nach der Inokulation und wie diese sich über die Zeit stabilisieren können. In diesem Zusammenhang wird die Mikrobiom-Anpassung als neue und effiziente Art und Weise der mikrobiellen Inokulation ausgewiesen.

Müller and Behrendt (2021) zeigen in ihrem Review das Potential von Pseudomonaden als BCAs. Sie verweisen auf die Vorteile von Inokulation ausgewählter Stämme auf Feldpflanzen und betonen die Vorteile der Inokulation von Konsortien gegenüber Einzelisolaten.

Berg G, Kusstatscher, P, Abdelfattah, A, Cernava, T, & Smalla, K (2021) Microbiome modulation - toward a better understanding of plant microbiome response to microbial inoculants. [Review]. *Front Microbiol*, 12, 650610, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.650610>.

Kaczyński P, Łozowicka, B, Perkowski, M, Zoń, W, Hryenko, I, Rutkowska, E, & Skibko, Z (2021) Impact of broad-spectrum pesticides used in the agricultural and forestry sector on the pesticide profile in wild boar, roe deer and deer and risk assessment for venison consumers. *Sci Total Environ*, 784, 147215, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147215>.

Müller T, & Behrendt, U (2021) Exploiting the biocontrol potential of plant-associated pseudomonads – A step towards pesticide-free agriculture? *Biological control : theory and applications in pest management*, 155, 104538, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104538>.

4. Veröffentlichungen

TV4.1

geplante Veröffentlichungen

Fuchs S (geplant für 2024) Ash dieback disease progression in dependence of time, space, site, stand and weather based on defoliation data from the German level I forest monitoring.

Grün F (geplant für 2024) Ash dieback and basal lesions assessment on German ICP Forest plots (level 1): Influence of site specific parameters.

Hohenwarter L, Hanke A, Haderer B, Bassler A, **Langer GJ**, Krczal G (2024, in review) Functional RNA Interference in *Hymenoscyphus fraxineus*: Hairpin RNA-Induced Gene Silencing Of A Polyketide Synthase-like Gene. *Journal of Plant Diseases and Protection*

Lutz T, Bien S, **Langer GJ**, Heinze C (Preprints 2023) Transcapsidation and Polysomal Encapsulation as Putative Strategies for the Genome Protection of the Novel *Diplodia fraxini* Fusagravivirus 1 (DfFV1). <https://doi.org/10.20944/preprints202307.0901.v1>

erfolgte Veröffentlichungen

Fuchs S, Häuser H, **Peters S**, Knauf L, Rentschler F, Kahlenberg G, Kätzel R, **Langer GJ** (2024) Ash dieback assessments on intensive monitoring plots in Germany: Influence of time, stand and site on disease progression. *J Plant Dis Prot*. <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00889-y>

Fuchs S, **Peters S**, Beckschäfer P, Osewold J, Fey C, **Langer G**, Nagel R-V, Höltken AM (2023) FraxForFuture: Ein Verbundprojekt zum Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Ministerium für Wirtschaft, Tourismus, Landwirtschaft und Forsten des Landes Sachsen-Anhalt (Hrsg.), *Waldzustandsbericht 2023 für Sachsen-Anhalt*. S. 37–39. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10027000>

Fuchs S, **Peters S**, Beckschäfer P, Osewold J, Fey C, **Langer G**, Nagel R-V, Höltken AM (2023) FraxForFuture: Ein Verbundprojekt zum Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Ministerium für Landwirtschaft, ländliche Räume, Europa und Verbraucherschutz des Landes Schleswig-Holstein (Hrsg.), *Waldzustandsbericht 2023 für Schleswig-Holstein*. S. 37–39. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8412978>

Fuchs S, **Peters S**, Beckschäfer P, Osewold J, Fey C, **Langer G**, Nagel R-V, Höltken AM (2023) FraxForFuture: Ein Verbundprojekt zum Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), *Waldzustandsbericht 2023 für Hessen*. S. 41–43. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8431068>

Fuchs S, **Peters S**, Beckschäfer P, Osewold J, Fey C, **Langer G**, Nagel R-V, Höltken AM (2023) FraxForFuture: Ein Verbundprojekt zum Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), *Waldzustandsbericht 2023 für Niedersachsen*. S. 37–39. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10083078>

Grün F, **Peters S**, **Fuchs S**, **Evers J**, **Paar U**, **Langer G** (2023) Einfluss von Standortfaktoren auf das Eschentriebsterben und die Ausprägung von Stammfußnekrosen. In: Steinhart F, Tim Burzlaff, Hartebrödt C (eds) *FraxForFuture - Erhalt der gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*) als Wirtschaftsbaumart: Tagungsband im Rahmen der 63. Deutschen Pflanzenschutztagung am 27.09.2023 in Göttingen*. Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg, Freiburg, S. 15–18

Langer GJ, **Fuchs S**, Osewold J, **Peters S**, Schrewe F, Ridley M, Kätzel R, Bubner B, Grüner J (2022) FraxForFuture — research on European ash dieback in Germany. *J Plant Dis Prot* 129:1285–1295. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00670-z>

Langer GJ, **Peters S**, Bußkamp J, Bien S (2023) *Cryptostroma corticale* and fungal endophytes associated with *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. *J Plant Dis Prot*. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00750-8>

Lutz T, Japić E, Bien S, **Langer GJ**, Heinze C (2022a) Characterization of a novel alphavirus infecting the fungal pathogen *Fusarium solani*. *Virus Research* 317:198817. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198817>

Lutz T, **Langer G**, Heinze C (2022b) Complete genome sequence of a new quadrivirus infecting a member of the genus *Thelonectria*. *Arch Virol* 167(2):691–694. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05353-y>

- Lutz T, **Langer G**, Heinze C (2023a) Complete genome sequence of a novel alternavirus infecting the fungus *Ilyonectria crassa*. Arch Virol 168(2):34. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05652-y>
- Lutz T, **Langer GJ**, Heinze C (2023b) A virus from *Aspergillus cibarius* with features of alpha- and betachrysovirus. Virus Genes. <https://doi.org/10.1007/s11262-023-02043-6>
- Peters S**, Bußkamp J, **Langer GJ** (2020) Projekt FraxCollar in FraxForFuture „Untersuchungen zum Eschentriebsterben mit Fokus auf den Stammsfußnekrosen erkrankter Bäume“. ImDialog - Mitarbeiterzeitschrift HessenForst (4/2020):8–10
- Peters S**, **Fuchs S**, Bien S, Bußkamp J, **Langer GJ**, Langer EJ (2023) Fungi associated with stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. Mycol Progress 22:52. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01897-2>
- Peters S**, **Langer G**, Kätzel R (2021a) Eschentriebsterben - Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen. Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Gülzow-Prüzen
- Peters S**, **Langer G**, Kätzel R (2021b) Bonitur geschädigter Eschen im Kontext des Eschentriebsterbens. AFZ - DerWald 76:28–31
- Peters S**, Gruschwitz N, Bien S, **Fuchs S**, Bubner B, Blunk V, **Langer GJ**, Langer EJ (2024) The fungal predominance in stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* — a study on *Hymenoscyphus fraxineus* multilocus genotypes. J Plant Dis Prot. <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00912-2>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P, Graw I (2021) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2021 für Hessen. S. 23–26. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5569092>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P, Graw I (2021) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2021 für Niedersachsen. S. 23–26. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5636049>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P, Graw I (2021) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Ministerium für Wirtschaft, Tourismus, Landwirtschaft und Forsten des Landes Sachsen-Anhalt (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2021 für Sachsen-Anhalt. S. 23–26. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5588439>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P, Graw I (2022) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2022 für Hessen. S. 24–26. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7194136> [
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P, Graw I (2022) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Ministerium für Wirtschaft, Tourismus, Landwirtschaft und Forsten des Landes Sachsen-Anhalt (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2022 für Sachsen-Anhalt. S. 26–28. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7152785>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P, Graw I (2022) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2022 für Niedersachsen. S. 23–25. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7303445>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P (2023) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2023 für Niedersachsen. S. 23–26. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10083014>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P (2023) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Ministerium für Wirtschaft, Tourismus, Landwirtschaft und Forsten des Landes Sachsen-Anhalt (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2023 für Sachsen-Anhalt. S. 23–26. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10026881>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P (2023) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Ministerium für Landwirtschaft, ländliche Räume, Europa und Verbraucherschutz des Landes Schleswig-Holstein (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2023 für Schleswig-Holstein. S. 23–26. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8412865>
- Rohde M, Hurling R, **Langer G**, Bußkamp J, Plašil P (2023) Insekten und Pilze. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.), Waldzustandsbericht 2023 für Hessen. S. 25–28. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8430920>

- Rohde M, **Langer G**, Hurling R, Plašil P (2022) Waldschutzsituation 2021 in Nordwestdeutschland. AFZ-Der-Wald 77(9): 40–43.
- Tan YP, Bishop-Hurley SL, Shivas RG, Cowan DA, Maggs-Kölling G, Maharachchikumbura SSN, Pinruan U, Bransgrove KL, De la Peña-Lastra S, Larsson E, Lebel T, Mahadevakumar S, Mateos A, Osieck ER, Rigueiro-Rodríguez A, Sommai S, Ajithkumar K, Akulov A, Anderson FE, Arenas F, Balashov S, Bañares Á, Berger DK, Bianchinotti MV, Bien S, Bilański P, Boxshall A-G, Bradshaw M, Broadbridge J, Calaça FJS, Campos-Quiroz C, Carrasco-Fernández J, Castro JF, Chaimongkol S, Chandranayaka S, Chen Y, Comben D, Dearnaley JDW, Ferreira-Sá AS, Dhileepan K, Díaz ML, Divakar PK, Xavier-Santos S, Fernández-Bravo A, Gené J, Guard FE, Guerra M, Gunaseelan S, Houbraken J, Janik-Superson K, Jankowiak R, Jeppson M, Jurjević Ž, Kaliyaperumal M, Kelly LA, Kezo K, Khalid AN, Khamsuntorn P, Kidanemariam D, Kiran M, Lacey E, **Langer GJ**, López-Llorca LV, Luangsa-ard JJ, Lueangjaroenkit P, Lumbsch HT, Maciá-Vicente JG, Mamatha Bhanu LS, Marney TS, Marqués-Gálvez JE, Morte A, Naseer A, Navarro-Ródenas A, Oyedele O, **Peters S**, Piskorski S, Quijada L, Ramírez GH, Raja K, Razzaq A, Rico VJ, Rodríguez A, Ruszkiewicz-Michalska M, Sánchez RM, Santelices C, Savitha AS, Serrano M, Leonardo-Silva L, Solheim H, Somrithipol S, Sreenivasa MY, Stępniewska H, Strapagiel D, Taylor T, Torres-García D, Vauras J, Villarreal M, Visagie CM, Wołkowycki M, Yingkunchao W, Zapora E, Groenewald JZ, Crous PW (2022) Fungal Planet description sheets: 1436-1477. *Persoonia* 49:261– 350. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2022.49.08>

Poster und Vorträge sind in Tabelle 9 in Kapitel II.2.

TV4.2

geplante Veröffentlichungen

- Ferrari RC, Chano V, Shrestha K, Dominguez-Flores T, **Ridley M**, Fussi B, Seidel H, Gailing O, Budde KB (submitted) Transcriptional profiling of *Fraxinus excelsior* leaves during the early infection phase of ash dieback. *J Plant Dis Prot*.
- Ridley M**, Bubner B, Gross A, **Enderle R** (in preparation) Population structure of *Hymenoscyphus fraxineus* in Germany
- Ridley M***, Demir Ö*, Schulz B, Surup F, Steinert M, **Enderle R** (in preparation) Fungal endophytes in the microbiome reduce symptom development of ash dieback disease, caused by *Hymenoscyphus fraxineus*
- Ridley M**, Demir Ö, Giron EC, Schulz B, Surup F, Steinert M, **Enderle R** (in preparation) Priming of ash saplings with a low-virulent *Hymenoscyphus fraxineus* strain as a possible strategy for reducing symptoms of ash dieback

erfolgte Veröffentlichungen

- 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, 1285–1295. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00670-z>.
- Lutz T*, **Ridley M***, Hadelers B, Schulz B, **Enderle R**, Steinert M, Heinze C (2023) Evaluation and identification of viruses for biocontrol of the ash dieback disease. *J Plant Dis Prot*. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00804-x>.

* haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen

Konferenzbeiträge mit Erstautorenschaft

- Enderle, R. Rückblick auf die Forschung zum Eschentriebsterben. September 26th-29th 2023, FraxForFuture Conference, Göttingen, Germany.
- Enderle, R. Zukunft der Esche – Situation und Forschung in Deutschland. Zukunft der Esche Workshop, November 18th 2021. Eidgenössische Anstalt für Schnee, Wald und Landschaft, Birmensdorf, Schweiz.
- Ridley, M. und Enderle, R. Virulence differences in *Hymenoscyphus fraxineus*. September 26th-29th 2023, FraxForFuture Conference, Göttingen, Germany.
- Ridley, M. und Enderle, R. Priming as a potential method for reducing disease symptoms of ash dieback in ash saplings. September 26th-29th 2023, 63rd German Plant Protection Conference (DPST), Göttingen, Germany.

- Ridley, M. und Enderle, R. Investigating the variation in virulence of *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback. August 20th-25th 2023, 12th International Congress of Plant Pathology, Lyon, France.
- Ridley, M. und Enderle, R. Using infection studies and molecular techniques to investigate differences in virulence of the agent causing dieback on ash trees (*Hymenoscyphus fraxineus*). October 11th- 13th 2021, 13th Young Scientists Meeting [online].
- Ridley, M. und Enderle, R. Infection studies to determine differences in virulence of *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback. September 21st-23rd 2021, 62nd German Plant Protection Conference (DPST) [online].
- Ridley, M. und Enderle, R. Analysing the variation in virulence of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus*. August 30th- September 1st 2021, 50th Annual Meeting of the GfÖ: Ecological Society of Germany, Austria and Switzerland [online].

TV4.3

geplante Veröffentlichungen

Knauf L, Remmele S, **Grüner J** Arbeitstitel: Dendrochronological investigations of the temporal development and the damage progression over time of stem collar necroses on *Fraxinus excelsior* in the context of Ash Dieback. (Journal of Plant Diseases and Protection).

erfolgte Veröffentlichungen

Fuchs S, Häuser H, Peters S, **Knauf L**, Rentschler F, Kahlenberg G, Kätzel R, Langer GJ (2024) Ash dieback assessments on intensive monitoring plots in Germany: Influence of time, stand and site on disease progression. J Plant Dis Prot. <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00889-y>

Konferenzbeiträge mit Erstautorenschaft

Knauf L, Remmele S, Grüner J (2023, 11. September) Untersuchungen zu Entstehung und Schadensverlauf von Stammfußnekrosen an *F. excelsior* im Zusammenhang mit dem Eschentriebsterben. Forstwissenschaftliche Tagung, Dresden.

Knauf L, Remmele S, Grüner J (2023, 27. September) Untersuchungen zu Entstehung und Schadensverlauf von Stammfußnekrosen an *F. excelsior* im Zusammenhang mit dem Eschentriebsterben. FraxForFuture – Erhalt der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*) als Wirtschaftsbaumart im Rahmen der 63. Deutschen Pflanzenschutztagung, Göttingen.

Medienbeiträge

Interview für den Radiobeitrag „Eschenrettung“ des SWR 4; gesendet am 24.04.2021

Beitrag „Schädlinge bedrohen Eschen in Deutschland“ der ARD für die Tagesschau anlässlich des Tag des Baumes, gesendet am 25.04.2023

TV4.4

erfolgte Veröffentlichungen

Lysenko L, Griem E, Wagener P, **Langer EJ** (2024) Fungi associated with fine roots of *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback detected by next-generation sequencing. J Plant Dis Prot <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00923-z>

Peters S, Fuchs S, Bien S, Bußkamp J, Langer GJ, **Langer EJ** (2023) Fungi associated with stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. Mycol Progress. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01897-2>

Peters S, Gruschwitz N, Bien S, Fuchs S, Bubner B, Blunk V, Langer GJ, **Langer EJ** (2024) The fungal predominance in stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* — a study on *Hymenoscyphus fraxineus* multilocus genotypes. J Plant Dis Prot. <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00912-2>

Lysenko L, **Langer E** (2023) Das Mykobiom im Wurzelraum von Eschen. FraxForFuture - Erhalt der gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*) als Wirtschaftsbaumart: Tagungsband im Rahmen der 63. Deutschen Pflanzenschutztagung am 27.09.2023 in Göttingen. Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg, Freiburg, S. 25–27

Konferenzbeiträge mit Erstautorenschaft

Lysenko L, Langer E (2021) Untersuchung zum Mycobiom der Rhizosphäre der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*) mittels NGS. FraxForFuture Tagung Online

Lysenko L, Langer E (2023) Das Mykobiom im Wurzelraum von Eschen. FraxForFuture Tagung Göttingen.

TV4.5*geplante Veröffentlichungen*

Böhm JW, Zübert C, Kahlenberg G, Jochner-Oette S, Kube M (under review) Load of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* differs in Soil. *Journal of Plant Diseases and Protection*.

erfolgte Veröffentlichungen

Zübert C und Kube M (2024) Differential Gene Expression of *Hymenoscyphus fraxineus* Grown on *Fraxinus excelsior* and *F. mandshurica* Supplemented Media. *Journal of Plant Diseases and Protection*. DOI 10.1007/s41348-024-00932-y

Konferenzbeiträge mit Erstautorenschaft

Zübert C und Kube M (2022) Analysen zur Pathogen-Wirt-Interaktion zur Identifizierung differentiell exprimierter Genmarker von *H. fraxineus*. FraxForFuture Tagung, 17.-18.05.2022, Kassel

Zübert C und Kube M (2023) Neue Einblicke in die differentielle Genexpression von *Hymenoscyphus fraxineus* bei Wachstum auf mit *Fraxinus excelsior* und *F. mandshurica* supplementierten Nährmedien. 63. Deutsche Pflanzenschutztagung 26. bis 29. September 2023, Georg-August-Universität Göttingen (Poster).

TV4.6*geplante Veröffentlichungen*

Ridley M, Demir Ö, Charria-Girón E, **Schulz B**, **Steinert M**, Surup F, Enderle R (in Vorbereitung) Priming of ash saplings with a low-virulent *Hymenoscyphus fraxineus* strain as a possible strategy for reducing symptoms of ash dieback.

Demir Ö, **Schulz B**, Rabsch L, **Steinert M**, Surup F (eingereicht) Strong antagonism of an endophytic *Penicillium manginii* towards the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, is mediated by the antifungal secondary metabolite PF1140. *Experimental Microbiology*.

erfolgte Veröffentlichungen

Demir Ö, Zeng H, **Schulz B**, Schrey H, **Steinert M**, Stadler M, Surup F (2023) Bioactive compounds from an endophytic *Pezizula* sp. showing antagonistic effects against the Ash Dieback pathogen. *Biomolecules* 13:1632.

Lutz T, Hadel B, Jaeckel M, **Schulz B**, Heinze C (2023a) Stable overexpression and targeted gene deletion of the causative agent of ash dieback *Hymenoscyphus fraxineus*. *Fungal Biology and Biotechnology* 10:1. <https://doi.org/10.1186/s40694-023-00149-y>

Lutz T, Ridley M, Hadel B, **Schulz B**, Enderle R, **Steinert M**, Heinze C (2023b) Evaluation and identification of viruses for biocontrol of the ash dieback disease. *Journal of Plant Disease and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00804-x>

TV4.7*geplante Veröffentlichungen*

Lutz T, Jaeckel M, Hadel B, Heinze C (2023) Fast preparation of high-quality viral dsRNA from fungal tissue by commercial nucleic acid extraction kits. *J. Virol. Methods*.

Lutz T, Ridley M, Hadel B, Schulz B, Enderle R, Steinert M, Heinze C (2023) Evaluation and identification of viruses for biocontrol of the ash dieback disease. *J Plant Dis Prot*.

Lutz T, Langer G, Heinze C. (2023) Transcapsidation and polysomal encapsulation as putative strategies for the genome protection of the novel *Diplodia fraxini* fusagravirus 1 (DfFV1). doi: 10.20944/preprints202307.0901.v1

Heinze C et al.:

Virus infected *H. fraxineus* to control ash dieback. (In dieser Publikation sollen die Ergebnisse der Biotests mit hypovirulenten, virusinfizierten Stämmen publiziert werden. Kooperation mit der Universität Braunschweig.)

erfolgte Veröffentlichungen

Lutz T, Japčić E, Bien S, Langer GJ, **Heinze C** (2022a) Characterization of a novel alternavirus infecting the fungal pathogen *Fusarium solani*. *Virus Research* 317:198817. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198817>

Lutz T, Langer G, **Heinze C** (2022b) Complete genome sequence of a new quadrivirus infecting a member of the genus *Thelonectria*. *Arch Virol* 167(2):691–694. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05353-y>

Lutz T, Langer G, **Heinze C** (2023a) Complete genome sequence of a novel alternavirus infecting the fungus *Ilyonectria crassa*. *Arch Virol* 168(2):34. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05652-y>

Lutz T, Langer GJ, **Heinze C** (2023b) A virus from *Aspergillus cibarius* with features of alpha- and betachrysoviruses. *Virus Genes*. <https://doi.org/10.1007/s11262-023-02043-6>

Lutz T, Hadel B, **Heinze C** (2023) Bekämpfung des Eschentriebsterbens mit Hilfe hypovirulenter Viren. *Freiburger Forstliche Forschung*, 106, 48-51.

Lutz T, Hadel B, Jaeckel M, Schulz B, **Heinze C**. (2023) Stable overexpression and targeted gene deletion of the causative agent of ash dieback *Hymenoscyphus fraxineus*. *BMC Fungal Biol. Biotechnol.* 10:1.

TV4.8

Hohenwarter L, Hanke A, Hadel B, Bassler, A, Langer G, Krczal G, Uslu VV (2024) Functional RNA Interference in *Hymenoscyphus fraxineus*: Hairpin RNA-Induced Gene Silencing Of A Polyketide Synthase-like Gene. *Journal of Plant Diseases and Protection*. Manuskript eingereicht.

TV4.9

erfolgte Veröffentlichungen

Becker R, Ulrich K, Behrendt U, Schneck V und Ulrich A (2022). Genomic Characterization of *Aureimonas altamirensis* C2P003 - A Specific Member of the Microbiome of *Fraxinus excelsior* Trees Tolerant to Ash Dieback. *Plants*, 11(24), 3487, doi:10.3390/plants11243487.

Burghard V, Wende S und Ulrich A (2023). Strain-specific quantitative detection of two putative biocontrol strains for suppression of ash dieback. *Biological Control*, 187, 105376, doi: 10.1016/j.biocontrol.2023.105376

Behrendt U, Burghard V, Wende S, Ulrich K, Wolf J, Neumann-Schaal M, Ulrich A (2024). *Schauerella fraxinea* gen. nov., sp. nov., a bacterial species that colonizes ash trees tolerant to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*. *Systematic and Applied Microbiology* 47(4), 126516, <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2024.126516>.

Präsentation der Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen

Burghard V, Becker R, Ulrich K, Ulrich A (2021) Einfluss des Mikrobioms der Esche auf den Befall durch *H. fraxineus*. Vortrag & Abstract in: Knoke, T. und Holzer, D. (eds) Forstwissenschaftliche Tagung 2021 in Freising; 13.-15. September 2021. Professur für Waldinventur und nachhaltige Nutzung, TU München, p. 210.

Burghard V, Wende S, Becker R, Ulrich K, Ulrich A (2022) qPCR based detection of three beneficial bacterial strains colonizing *F. excelsior* leaves. ePoster & Abstract (eP322) in VAAM Digital, ISBN: 978-3-948023-22-5

Burghard V, Wende S, Häuser H, Kahlenberg G, Kätzel R, Ulrich A (2023) Biotische und Abiotische Einflüsse auf das Eschenmikrobiom. Poster & Abstract (Tagungsband unveröffentlicht) Forstwissenschaftliche Tagung 2023 in Dresden, 11. - 13. September 2023

Burghard V, Ulrich A (2023) TV 9: Optimierung der Mikrobiota vitaler Eschen-Genotypen zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber *Hymenoscyphus fraxineus*. Vortrag & Abstract in 475 Julius-Kühn-Archiv (eds) Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland 63. Deutsche Pflanzenschutztagung in Göttingen, 26. - 29. September 2023. Georg-August-Universität Göttingen

Zitierte Literatur

- Ad-hoc-Arbeitsgruppe Boden, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (eds) (2005) Bodenkundliche Kartieranleitung, 5., verbesserte und erweiterte Auflage. In Kommission: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele und Obermiller), Stuttgart
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs. *Nucleic acids research* 25:3389–402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Arx JA von (1981) *The genera of fungi sporulating in pure culture*, 3rd edn. Cramer, Vaduz
- Augustin NH, Musio M, von Wilpert K, Kublin E, Wood SN, Schumacher M (2009) Modeling Spatiotemporal Forest Health Monitoring Data. *Journal of the American Statistical Association* 104(487):899–911. <https://doi.org/10.1198/jasa.2009.ap07058>
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Crozier J, Thomas SE, Samuels GJ, Vinyard BT, Holmes KA (2008) Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biol. Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Bakys R, Pliūra A, Bajerkevičienė G, Marčiulynas A, Marčiulynienė D, Lynikienė J, Menkis A (2022) Mycobiota Associated with Symptomatic and Asymptomatic *Fraxinus excelsior* in Post-Dieback Forest Stands. *Forests*. <https://doi.org/10.3390/f13101609>
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67:1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Becker R, Ulrich K, Behrendt U, Kube M und Ulrich A (2020). Analyzing ash leaf-colonizing fungal communities for their biological control of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Frontiers in Microbiology* 11:590944. doi: 10.3389/fmicb.2020.590944.
- Becker R, Ulrich, K, Behrendt, U, Schneck, V, & Ulrich, A (2022) Genomic Characterization of *Aureimonas altamirensis* C2P003 - A Specific Member of the Microbiome of *Fraxinus excelsior* Trees Tolerant to Ash Dieback. *Plants*, 11(24), 3487, <https://doi.org/10.3390/plants11243487>.
- Behrendt U, Burghard, V, Wende, S, Ulrich, K, Wolf, J, Neumann-Schaal, M, & Ulrich, A (2024) *Schauerella fraxinea* gen. nov., sp. nov., a bacterial species that colonizes ash trees tolerant to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*. *Syst Appl Microbiol*, *Under review*.
- Bengtsson SBK, Vasaitis R, Kirisits T, Solheim H, Stenlid J (2012) Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*. *Fungal Ecol* 5:147–153 <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.10.004>
- Berg G, Kusstatscher, P, Abdelfattah, A, Cernava, T, & Smalla, K (2021) Microbiome modulation - toward a better understanding of plant microbiome response to microbial inoculants. [Review]. *Front Microbiol*, 12, 650610, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.650610>.
- Berg G, Rybakova, D, Fischer, D, Cernava, T, Vergès, M-CC, Charles, T, Chen, X, et al. (2020) Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103, <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.
- Bhunjun CS, Phillips AJL, Jayawardena RS, Promputtha I, Hyde KD (2021) Importance of Molecular Data to Identify Fungal Plant Pathogens and Guidelines for Pathogenicity Testing Based on Koch's Postulates. *Pathogens* 10(9):1096. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091096>
- Booth C (1971) *The genus Fusarium*. C.A.B.
- Brasier CM (1991) *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia*, 115(3), 151-161, <https://doi.org/10.1007/BF00462219>.
- Breitenbach J, Kränzlin F (1984) *Fungi of Switzerland*. Volume 1: Ascomycetes. Verlag Mykologia, Luzern, Switzerland
- Brink RA (1962) Phase change in higher plants and somatic cell heredity. *Univ Chic P J*, 37(1), 1-22, <https://doi.org/10.1086/403567>.
- Burghard V, Wende, S, & Ulrich, A (2023) Strain-specific quantitative detection of two putative biocontrol strains for suppression of ash dieback. *Biol Control*, 187, 105376, <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105376>.

- Bußkamp J (2018) Schadenserhebung, Kartierung und Charakterisierung des „Diplodia-Triebsterbens“ der Kiefer, insbesondere des endophytischen Vorkommens in den klimasensiblen Räumen und Identifikation von den in Kiefer (*Pinus sylvestris*) vorkommenden Endophyten. Dissertation, Universität Kassel
- Bußkamp J, Langer GJ, Langer EJ (2020) *Sphaeropsis sapinea* and fungal endophyte diversity in twigs of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Germany. *Mycological Progress* 19:985–999. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01617-0>
- Butin H (2011) Krankheiten der Wald- und Parkbäume - Diagnose, Biologie, Bekämpfung. Eugen Ulmer, Stuttgart (Hohenheim)
- Calistru C, McLean M, Berjak P (1997) In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*. <https://doi.org/10.1023/A:1006802423729>
- Carrari E, Capretti P, Santini A und Luchi N (2015) *Hymenoscyphus fraxineus* mycelial growth on media containing leaf extracts of different *Oleaceae*. *Forest Pathology*, 45:540–543.
- Chandelier A, André F und Laurent F (2010) Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real time PCR. *Forest Pathology*, 40:87–95.
- Chandelier A, Delhaye N und Helson M (2011) First Report of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Anamorph *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium. *Plant disease*, 95:220.
- Chandelier A, Gerarts F, Martin GS, Herman M, Delahaye L (2016) Temporal evolution of collar lesions associated with ash dieback and the occurrence of *Armillaria* in Belgian forests. *Forest Pathology* 46:289–297. <https://doi.org/10.1111/efp.12258>
- Chang JJM, Ip YCA, Ng CSL, Huang D (2020) Takeaways from mobile DNA barcoding with BentoLab and MinION. *Genes*. <https://doi.org/10.3390/genes11101121>
- Compant S, Samad, A, Faist, H, & Sessitsch, A (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res*, 19, 29-37, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>.
- Cross H, Sønstebo, JH, Nagy, NE, Timmermann, V, Solheim, H, Børja, I, Kauserud, H, et al. (2017) Fungal diversity and seasonal succession in ash leaves infected by the invasive ascomycete *Hymenoscyphus fraxineus*. *New Phytol*, 213(3), 1405-1417, <https://doi.org/10.1111/nph.14204>.
- Dababat AA, Sikora RA, Hauschild R (2006) Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Commun Agric Appl Biol Sci* 71:953-61
- Davidov K, Iankelevich-Kounio E, Yakovenko I, Koucherov Y, Rubin-Blum M, Oren M (2020) Identification of plastic-associated species in the Mediterranean Sea using DNA metabarcoding with Nanopore MinION. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74180-z>
- Davydenko K, Vasaitis, R, Stenlid, J, & Menkis, A (2013) Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *For Pathol*, 43(6), 462-467, <https://doi.org/10.1111/efp.12055>.
- Dehner U, Renger M, Bräunig A, Lampater A, Bauriegel, A, Burbaum B, Hartmann K, Hennings V, Idler F, Krone F, Martin W, Meyer K, Waldmann F (2015) Neue Kennwerte für die Wasserbindung in Böden - Ergebnisse der Abstimmung zwischen dem Personenkreis Wasserhaushaltstabellen der Ad-hoc-AG Boden und dem DWA. *Berichte der DBG*
- Demir Ö, Schulz B, Rabsch L, Steinert M, Surup F (eingereicht) Strong antagonism of an endophytic *Penicillium manginii* towards the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, is mediated by the antifungal secondary metabolite PF1140. *Experimental Microbiology*.
- Demir Ö, Zeng H, Schulz B, Schrey H, Steinert M, Stadler M, Surup F (2023) Bioactive compounds from an endophytic *Pezizula* sp. showing antagonistic effects against the Ash Dieback pathogen. *Biomolecules* 13:1632.
- Denton JO, Denton GJ (2014) First report of *Ilyonectria* sp. affecting foliage of *Tulipa*. *New Disease Reports*. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.023>
- Dolan SK, O’Keeffe G, Jones GW, Doyle S (2015) Resistance is not futile: Gliotoxin biosynthesis, functionality and utility. *Trends Microbiol* 23:419–428. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.005>
- Downes SG, Doyle S, Jones GW, Owens RA (2023) Gliotoxin and related metabolites as zinc chelators: implications and exploitation to overcome antimicrobial resistance. *Essays Biochem* 0:1–12. <https://doi.org/10.1042/ebc20220222>

- Eickenscheidt N, Augustin NH, Wellbrock N (2019) Spatio-temporal modelling of forest monitoring data: modelling German tree defoliation data collected between 1989 and 2015 for trend estimation and survey grid examination using GAMMs. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 12(4):338. <https://doi.org/10.3832/ifor2932-012>
- Elfstrand M, Chen J, Cleary M, Halecker S, Ihrmark K, Karlsson M, Davydenko K, Stenlid J, Stadler M, Durling MB (2021) Comparative analyses of the *Hymenoscyphus fraxineus* and *Hymenoscyphus albidus* genomes reveals potentially adaptive differences in secondary metabolite and transposable element repertoires. *BMC Genomics* 22:1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07837-2>
- Enderle R (2023) Eine kleine Chronologie der Eschentriebsterbenforschung - was können wir lernen? In: Steinhart F, Tim Burzlaff, Hartebrodt C (eds) *FraxForFuture - Erhalt der gemeinen Esche (Fraxinus excelsior) als Wirtschaftsbaumart: Tagungsband im Rahmen der 63. Deutschen Pflanzenschutztagung am 27.09.2023 in Göttingen*. Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg, Freiburg, S. 3–10
- Enderle R, Fussi B, Lenz H, Langer G, Nagel R, Metzler B (2017a) Ash dieback in Germany: research on disease development, resistance and management options. In: Vaisatis R, Enderle R (eds) *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.) - Consequences and Guidelines for Sustainable Management*. SLU Uppsala, Uppsala, pp 89–105
- Enderle R, Metzler B, Riemer U, Kändler G (2018) Ash Dieback on Sample Points of the National Forest Inventory in South-Western Germany. *Forests* 9(1):25. <https://doi.org/10.3390/f9010025>
- Enderle R, Sander F, Metzler B (2017) Temporal development of collar necroses and butt rot in association with ash dieback. *iForest – Biogeosciences and Forestry* 10(3):529–536. <https://doi.org/10.3832/ifor2407-010>
- Enderle R, Stenlid J, Vasaitis R (2019) An overview of ash (*Fraxinus* spp.) and the ash dieback disease in Europe. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources* 14. <https://doi.org/10.1079/PAVSNR201914025>
- Evers J, Dammann I, König N, Paar U, Stüber V, Schulze A, Schmidt M, Schönfelder E, Eichhorn J, Versuchsanstalt NF (2019) Waldbodenzustandsbericht für Niedersachsen und Bremen. Ergebnisse der zweiten Bodenzustandserhebung im Wald (BZE II). <https://doi.org/10.17875/gup2019-1162>
- Evers J, Paar U, Dammann I, Schönfelder E (2016) Hauptergebnisse der Waldbodenzustandserhebung in Hessen (BZE II). *Waldzustandsbericht 2016 für Hessen* :27–29
- Evers J, Paar U, Eichhorn J (2013a) Bestätigt die BZE die Trophieeinschätzung der forstlichen Standortskartierung. *AFZ-DerWald* 14:11–15
- Evers J, Paar U, Schmidt-Walter P, Eichhorn J (2013b) Substratgruppen in der BZE als Brücke zur forstlichen Standortskartierung. Ergebnisse der BZE II für Niedersachsen, Hessen und Sachsen-Anhalt. *AFZ-Der Wald* 68(14):16–20
- Forstplanungsamt Niedersachsen (2006) Forstliche Standortsaufnahme - Geländeökologischer Schätzrahmen. <https://www.landesforsten.de/wir/struktur-und-organisation/nfp/downloads/>. Accessed 5 Sep 2023
- Gardiner DM, Howlett BJ (2005) Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 248:241–248. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.046>
- George J-P, Sanders TGM, Timmermann V, Potočić N, Lang M (2022) European-wide forest monitoring substantiate the necessity for a joint conservation strategy to rescue European ash species (*Fraxinus* spp.). *Sci Rep* 12(1):4764. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08825-6>
- Gerlach N, Nirenberg H (1982) Nr. 209 (1982): The Genus *Fusarium* - a Pictorial Atlas.
- Ghabrial SA, Suzuki N (2009) Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 47:353–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081932>
- Gherghel F, Fussi B, Donges K, Haustein M, Jakob KM, Müller K, Piškur B, Hauptman T, Lenz HD, Konnert M, Kost G, Rexer K-H (2013) The development of a species-specific test to detect *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in ash tissues. *For Pathol* 44:137–144. <https://doi.org/10.1111/efp.12078>
- Glynou K, Nam B, Thines M, Maciá-Vicente JG (2018) Facultative root-colonizing fungi dominate endophytic assemblages in roots of nonmycorrhizal *Microthlaspi* species. *New Phytol*. <https://doi.org/10.1111/nph.14873>
- Grelet GA, Ba R, Goeke DF, Houlston GJ, Taylor AFS, Durall DM (2017) A plant growth-promoting symbiosis between *Mycena galopus* and *Vaccinium corymbosum* seedlings. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0797-5>

- Griffiths SM, Galambao, M, Rowntree, J, Goodhead, I, Hall, J, O'Brien, D, Atkinson, N, et al. (2019) Complex associations between cross-kingdom microbial endophytes and host genotype in ash dieback disease dynamics. *J Ecol*, 108(1), 291-309, <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13302>.
- Gross A, Grünig CR, Queloz V, Holdenrieder O (2012) A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *For Pathol* 42:252–264. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00751.x>
- Gross A, Hosoya T, Queloz V (2014) Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Mol Ecol* 23:2943–2960. <https://doi.org/10.1111/mec.12792>
- 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* 49:977–986. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.08.008>
- Halecker S, Wennrich JP, Rodrigo S, Andrée N, Rabsch L, Baschien C, Steinert M, Stadler M, Surup, F, Schulz B (2020) Fungal endophytes for biocontrol of ash dieback: The antagonistic potential of *Hypoxyton rubiginosum*. *Fungal Ecol* 45:100918.
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
- Haňáčková Z, Černý, K, Koukol, O, Havrdová, L, & Zahradník, D (2017) Fungal endophytes in ash shoots – diversity and inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Balt For*, 23, 89-106.
- Haňáčková Z, Koukol O, Čmoková A, Zahradník D, Havrdová L (2017b) Direct evidence of *Hymenoscyphus fraxineus* infection pathway through the petiole-shoot junction. *Forest Pathology* 47(6):e12370. <https://doi.org/10.1111/efp.12370>
- Hao Y, Aluthmuhandiramb JVS, Chethanab KWT, Manawasingheb IS, Li X, Liu M, Hyde KD, Phillips AJL, Zhang W (2020) *Nigrospora* Species Associated with Various Hosts from Shandong Peninsula, China. *Mycobiology*. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1761747>
- Harder CB, Hesling E, Botnen SS, Lorberau KE, Dima B, von Bonsdorff-Salminen T, Niskanen T, Jarvis SG, Ouimette A, Hester A, Hobbie EA, Taylor AFS, Kauserud H (2023) *Mycena* species can be opportunist-generalist plant root invaders. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16398>
- Harwood TD, Tomlinson, I, Potter, CA, & Knight, JD (2011) Dutch elm disease revisited: past, present and future management in Great Britain. *Plant Pathol*, 60(3), 545-555, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02391.x>.
- Heinze C (2012) A novel mycovirus from *Clitocybe odora*. *Arch Virol* 157:1831–1834. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1373-0>
- Heinzelmann R, Spiegel P, Prospero S, Queloz V, Hintze T (2023) Hallimaschpilz setzt den Eschen ebenfalls stark zu. *Wald und Holz* :22–25
- Hoegger PJ, Rigling D, Holdenrieder O, Heiniger U (2000) Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. *Mycological Research* 104:1108–1116. <https://doi.org/10.1017/S0953756299002397>
- Höhle J, Bielefeldt J, Dühnelt P, König N, Ziche D, Eickenscheidt N, Grüneberg E, Hilbrig L, Wellbrock N (2018) Bodenzustandserhebung im Wald - Dokumentation und Harmonisierung der Methoden. Thünen Working Paper 97:542. <https://doi.org/10.3220/WP1526989795000>
- Hosseini B, El-Hasan A, Link T, Voegelé RT (2020) Analysis of the species spectrum of the *Diaporthe/Phomopsis* complex in European soybean seeds. *Mycol Progress*. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01570-y>
- Husson C, Caël O, Grandjean JP, Nageleisen LM, Marçais B (2012) Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathology* 61(5):889–895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02578.x>
- ICP Forests (2016) Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. UNECE, ICP Forests, Hamburg
- Ioos R, Kowalski T, Husson C und 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*, 125:329–335.
- Jeyarajan R, & Nakkeeran, S (2000) Exploitation of microorganisms and viruses as biocontrol agents for crop disease management. In R. K. Upadhyay, K. G. Mukerji, & B. P. Chamola (Eds.), *Biocontrol*

- Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes* (pp. 95-116). Boston, MA: Springer US.
- Jiang N, Voglmayr H, Piao C-G, Li Y (2021) Two new species of *Diaporthe* (*Diaporthaceae*, *Diaporthales*) associated with tree cankers in the Netherlands. *MycKeys* 85:31–56. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.85.73107>
- 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. *For Pathol* 40:111–115. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2009.00614.x>
- Ju Y, Rogers J, Martin F, Granmo A (1998) The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon* (66):1–98
- Jumpponen A (2001) Dark septate endophytes – are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s005720100112>
- Jung T, Blaschke, H, & Oßwald, W (2000) Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathol*, 49(6), 706-718, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00521.x>.
- Junker C (2013). Pathogenese und Ansätze zur Kontrolle von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* – Erreger des Eschentriebsterbens: Variabilität von Virulenz, Morphologie, Biochemie und Sekundärstoffwechsel. Dissertation, Technische Universität Braunschweig,
- Junker C, de Vries J, Eickhorst C, Schulz B (2017) Each isolate of *Hymenoscyphus fraxineus* is unique as shown by exoenzyme and growth rate profiles. *Baltic Forestry* 23(1): 25-40.
- Junker C, Mandey F, Pais A, Ebel R, Schulz B (2014) *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and *Hymenoscyphus albidus*: viridiol concentration and virulence do not correlate. *For. Pathol.* 44:39–44.
- Kaczyński P, Łozowicka, B, Perkowski, M, Zoń, W, Hrynko, I, Rutkowska, E, & Skibko, Z (2021) Impact of broad-spectrum pesticides used in the agricultural and forestry sector on the pesticide profile in wild boar, roe deer and deer and risk assessment for venison consumers. *Sci Total Environ*, 784, 147215, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147215>.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12):1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kearsley MJC, & Whitham, TG (1989) Developmental changes in resistance to herbivory: Implications for individuals and populations. *Ecology*, 70(2), 422-434, <https://doi.org/10.2307/1937547>.
- 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. *Frontiers in Forests and Global Change* :645920 (11 pp.). <https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.645920>
- Kosawang C, Amby, DB, Bussaban, B, McKinney, LV, Xu, J, Kjaer, ED, Collinge, DB, et al. (2018) Fungal communities associated with species of *Fraxinus* tolerant to ash dieback, and their potential for biological control. *Fungal Biol*, 122(2-3), 110-120, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.002>.
- Kosawang C, Buchvaldt Amby D, Bussaban B, McKinney LV, Xu J, Kjaer ED, Collinge DB, Nielsen LR (2018) Fungal communities associated with species of *Fraxinus* tolerant to ash dieback, and their potential for biological control. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.002>
- Kowalski T, Bartnik C (2010) Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. *Acta Agrobot* 63:99–106
- Kowalski T, Bilański P (2021) Fungi Detected in the Previous Year's Leaf Petioles of *Fraxinus excelsior* and Their Antagonistic Potential against *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forests*. <https://doi.org/10.3390/f12101412>
- Kowalski T, Kraj W, Bednarz B (2016) Fungi on stems and twigs in initial and advanced stages of dieback of European ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Eur J Forest Res* 135:565–579. <https://doi.org/10.1007/s10342-016-0955-x>
- Kwon HJ, Owa T, Hassig CA, Shimada J, Schreiber SL (1998) Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3356–3361. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3356>
- Langer G (2017) Collar Rots in Forests of Northwest Germany Affected by Ash Dieback. *Baltic Forestry* 23:4–19

- Langer G, Harriehausen U, Bressemer U (2015a) Eschentriebsterben und Folgeerscheinungen (Ash dieback and after-effects). *AFZ-DerWald* 20/2015:22–28
- Langer GJ (2017) Collar rots in forests of Northwest Germany affected by ash dieback. In: Enderle R, Pliura A, Vaisatis R (eds) *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.) - Consequences and Guidelines for Sustainable Management*. SLU Uppsala, Uppsala, pp 4–19
- Langer GJ, Bressemer U, Habermann M (2009) Eschentriebsterben III- Vorläufige Handlungsempfehlungen; Waldschutzinfo Nr. 07 / 2009. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8207854>
- Langer GJ, Harriehausen U, Bressemer U (2015b) Stammfußnekrosen bei Esche (Collar rots associated with ash). *AFZ-DerWald* 20/2015:29–31
- Lee I-S, Langer E (2012) New records of *Hyphodontia* species from Taiwan. *Nova Hedwigia* 94(1–2):239–244. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2012/0094-0239>
- Lee L, Zhang Y, Ozar B, Sensen CW, Schriemer DC (2016) Carnivorous Nutrition in Pitcher Plants (*Nepenthes* spp.) via an Unusual Complement of Endogenous Enzymes. *J Proteome Res* 15:3108–3117. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00224>
- Likar M, Regvar M (2013) Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1656-6>
- Lin B, Hui J, Mao H (2021) Nanopore technology and its applications in gene sequencing. *Biosensors*. <https://doi.org/10.3390/bios11070214>
- Lutz T, Hadeler B, Jaeckel M, Schulz B, Heinze C (2023a) Stable overexpression and targeted gene deletion of the causative agent of ash dieback *Hymenoscyphus fraxineus*. *Fungal Biology and Biotechnology* 10(1):1. <https://doi.org/10.1186/s40694-023-00149-y>
- Lutz T, Ridley M, Hadeler B, Schulz B, Enderle R, Steinert M, Heinze C (2023b) Evaluation and identification of viruses for biocontrol of the ash dieback disease. *Journal of Plant Disease and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00804-x>
- LWF (2011). Kohlenstoffspeicherung von Bäumen. Merkblatt 27
- Lygis V, Prospero S, Burokiene D, Schoebel CN, Marciulyniene D, Norkute G, Rigling D (2017) Virulence of the invasive ash pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in old and recently established populations. *Plant Pathol* 66:783–791. <https://doi.org/10.1111/ppa.12635>
- MacDonald GM (2008) *Tree Rings and Environment: Dendroecology*. By F. H. SCHWEINGRUBER. 24·5×16·5 cm. Pp. 609. Berne, Switzerland: Paul Haupt, 1996. Price h/b: DM 66.00, ISBN 3 258 05458 4. *New Phytol*, 138(4), 743-750, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1998.149-8.x>.
- Mandyam K, Jumpponen A (2005) Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud Mycol*. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.173>
- Mansfield JW, Galambos N, Saville R (2018) The use of ascospores of the dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus* for infection assays reveals a significant period of biotrophic interaction in penetrated ash cells. *Plant Pathol* 67:354–1361. <https://doi.org/10.1111/ppa.12844>
- Marcais B, Husson C, Godart L, Cael O (2016) Influence of site and stand factors on *Hymenoscyphus fraxineus* induced basal lesion. *Plant Pathology* 65. <https://doi.org/10.1111/ppa.12542>
- Marinier E, Zaheer, R, Berry, C, Weedmark, KA, Domaratzki, M, Mabon, P, Knox, NC, et al. (2017) Neptune: a bioinformatics tool for rapid discovery of genomic variation in bacterial populations. *Nucleic Acids Res*, 45(18), e159, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx702>.
- McLaren MR, & Callahan, BJ (2020) Pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome. *Philos Trans R Soc Lond, B Biol Sci*, 375(1808), 20190592, <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0592>.
- Meiklejohn KA, Damaso N, Robertson JM (2019) Assessment of BOLD and GenBank – Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. *PLOS ONE* 14(6):e0217084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217084>
- Meyn R, Langer GJ, Gross A, Langer EJ (2019) Fungal colonization patterns in necrotic rootstocks and stem bases of dieback-affected *Fraxinus excelsior* L. *Forest Pathology* 0(0):e12520. <https://doi.org/10.1111/efp.12520>
- Mistry J, Chuguransky S, Williams L, et al. (2021) Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res*: 49(D1):D412-D419. doi: 10.1093/nar/gkaa913.

- Mitter B, Pfaffenbichler, N, Flavell, R, Compant, S, Antonielli, L, Petric, A, Berninger, T, et al. (2017) A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Front Microbiol*, 8, 11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00011>.
- Moëne-Loccoz Y, Mavingui, P, Combes, C, Normand, P, & Steinberg, C (2015) Microorganisms and biotic interactions. In J.-C. Bertrand, P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, P. Normand, & T. Sime-Ngando (Eds.), *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology* (pp. 395-444). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Müller T, & Behrendt, U (2021) Exploiting the biocontrol potential of plant-associated pseudomonads – A step towards pesticide-free agriculture? *Biological control : theory and applications in pest management*, 155, 104538, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104538>.
- Nemesio-Gorrioz M, McGuinness B, Grant J, Dowd L, Douglas GC (2019) Lenticel infection in *Fraxinus excelsior* shoots in the context of ash dieback. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 12(2):160–165. <https://doi.org/10.3832/ifor2897-012>
- Nguyen DT, Cleary MR, Enderle R, Berlin A, Stenlid J (2016) Analyses of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, suggest role of tree species diversity on colonization and population structure differentiation. *Forest Pathology* 46(1): 82-84.
- NW-FVA (2016) Praxis-Information Nr. 4 - Eschentriebsterben. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Göttingen
- Oertel B (2003) Bibliographische Recherchen in der Mykologie. Ein Leitfaden für Leser im deutschsprachigen Raum und darüber hinaus. *Z MYKOL* 69(1):3–42
- Okigbo RN, Ikediugwu FEO (2000) Studies on Biological Control of Postharvest Rot in Yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. *Journal of Phytopathology* 148:351–355. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00515.x>
- Ongena M, Jourdan, E, Adam, A, Paquot, M, Brans, A, Joris, B, Arpigny, JL, et al. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbio*, 9(4), 1084-1090, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>.
- Ozimek E, Hanaka A (2021) *Mortierella* Species as the Plant Growth-Promoting Fungi Present in the Agricultural Soils. *Agriculture*. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010007>
- Paar U, Evers J, Dammann I, König N, Schulze A, Schmidt M, Schönfelder E, Scheler B, Ullrich T, Eichhorn J (2016) Waldbodenzustandsbericht für Hessen. Ergebnisse der zweiten Bodenzustandserhebung im Wald (BZE II). <https://doi.org/10.17875/gup2016-1001>
- Peters S, Fuchs S, Bien S, Bußkamp J, Langer GJ, Langer EJ (2023) Fungi associated with stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. *Mycological Progress* 22:52. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01897-2>
- Peters S, Langer, G, & Kätzel, R (2021) *Eschentriebsterben – Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen*. Gülzow-Prüzen: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR).
- Pieterse CM, Zamioudis, C, Berendsen, RL, Weller, DM, Van Wees, SC, & Bakker, PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*, 52, 347-375, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>.
- Pomerantz A, Sahlin K, Vasiljevic N, Seah A, Lim M, Humble E, Kennedy S, Krehwinkel H, Winter S, Ogden R, Prost S (2022) Rapid in situ identification of biological specimens via DNA amplicon sequencing using miniaturized laboratory equipment. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00682-x>
- Pourmoghaddam MJ, Lamert C, Surup F, Khodaparast SA, Krisai-Greilhuber I, Voglmayr H, Stadler M (2020) Discovery of a new species of the *Hypoxylon rubiginosum* complex from Iran and antagonistic activities against the Ash Dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, in dual culture. *MycKeys*. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.66.50946>
- R Core Team (2023) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH (2017) Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod* 80(3):756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Raquin C, Jung-Müller B, Dufour J, Frascaria-Lacoste N (2002) Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl.). *Ann. For. Sci.*, 59:219-224.

- Rashid MH, & Chung, YR (2017) Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes. *Front Plant Sci*, 8, 1816, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01816>.
- Raymaekers K, Ponet, L, Holtappels, D, Berckmans, B, & Cammue, BPA (2020) Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biol Control*, 144, 104240, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>.
- Ridley M, Demir Ö, Charria-Girón E, Schulz B, Steinert M, Surup F, Enderle R (in Vorbereitung) Priming of ash saplings with a low-virulent *Hymenoscyphus fraxineus* strain as a possible strategy for reducing symptoms of ash dieback.
- Ries LNA, Pardeshi L, Dong Z, Tan K, Steenwyk JL, Colabardini AC, Filho JAF, De Castro PA, Silva LP, Preite NW, Almeida F, De Assis LJ, Dos Santos RAC, Bowyer P, Bromley M, Owens RA, Doyle S, Demasi M, Hernández DCR, Netto LES, Pupo MT, Rokas A, Loures F V., Wong KH, Goldman GH (2020) The *Aspergillus fumigatus* transcription factor RglT is important for gliotoxin biosynthesis and self-protection, and virulence. *PLoS Pathog* 16:1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008645>
- Rigling D, Prospero S (2018) *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol Plant Pathol* 19:7–20. <https://doi.org/10.1111/mpp.12542>
- Romera FJ, Garcia, MJ, Lucena, C, Martinez-Medina, A, Aparicio, MA, Ramos, J, Alcantara, E, et al. (2019) Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Front Plant Sci*, 10, 287, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B (2019) Food and Indoor Fungi. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht
- Sanchez J, Iturralde P, Koch A, Tello C, Martinez D, Proano N, Martinez A, Viera W, Ayala L, Flores F (2019) *Dactylonectria* and *Ilyonectria* Species Causing Black Foot Disease of Andean Blackberry (*Rubus Glaucus* Benth) in Ecuador. *Diversity*. <https://doi.org/10.3390/d11110218>
- Scharf DH, Brakhage AA, Mukherjee PK (2016) Gliotoxin - bane or boon? *Environ Microbiol* 18:1096–1109. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13080>
- Scharf DH, Heinekamp T, Remme N, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C (2012) Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:467–472. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3689-1>
- Scharf DH, Remme N, Heinekamp T, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C (2010) Transannular disulfide formation in gliotoxin biosynthesis and its role in self-resistance of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Am Chem Soc* 132:10136–10141. <https://doi.org/10.1021/ja103262m>
- Schlegel M, Dubach V, von Buol L, Sieber TN (2016) Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen. *FEMS Microbiol Ecol* 92(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw142>
- Schlegel M, Queloz, V, & Sieber, TN (2018) The endophytic mycobiome of European ash and sycamore maple leaves – geographic patterns, host specificity and influence of ash dieback. [Original Research]. *Front Microbiol*, 9(2345), 2345, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02345>.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoebel CN, Zoller S, Rigling D (2014) Detection and genetic characterisation of a novel mycovirus in *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback. *Infect Genet Evol* 28:78–86. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.001>
- Scholtysik A, Unterseher, M, Otto, P, & Wirth, C (2013) Spatio-temporal dynamics of endophyte diversity in the canopy of European ash (*Fraxinus excelsior*). *Mycol Prog*, 12(2), 291-304, <https://doi.org/10.1007/s11557-012-0835-9>.
- Schrettl M, Carberry S, Kavanagh K, Haas H, Jones GW, O'Brien J, Nolan A, Stephens J, Fenelon O, Doyle S (2010) Self-protection against gliotoxin—a component of the gliotoxin biosynthetic cluster, gliT, completely protects *Aspergillus fumigatus* against exogenous gliotoxin. *PLoS Pathog* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000952>
- Schulz B, Haas, S, Junker, C, André, N, & Schobert, M (2015) Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Curr Sci*, Vol. 109, 39-45.
- Schumacher J, Kehr R, Leonhard S (2010) Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2009.00615.x>

- Seifert KA (2009) Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular ecology resources*.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x>
- Sigma-Aldrich Co. LLC. (2014) OligoArchitect™ Online.
<http://www.oligoarchitect.com/ShowToolServlet?TYPE=DPROBE>. Accessed May 2021.
- Skovsgaard JP, Wilhelm G, Thomsen I, Metzler B, Kirisits T, Havrdová L, Enderle R, Dobrowolska D, Cleary M, Clark J (2017) Silvicultural strategies for *Fraxinus excelsior* in response to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forestry* 00:1–18. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpx012>
- Steinhart F, Westhauser A, Mausolf K, Osewold J, Schrewe FR, Fischer H, Burzlaff T, Nagel RV (2024, in Vorbereitung) Zukunft der Esche – Empfehlungen zum forstbetrieblichen Umgang mit dem Eschentriebsterben. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., Gülzow-Prüzen
- Stoffel M, & Bollschweiler, M (2008) Tree-ring analysis in natural hazards research - An overview. *Nat Hazards Earth Syst Sci*, 8, <https://doi.org/10.5194/nhess-8-187-2008>.
- Sun X (2015) History and current status of development and use of viral insecticides in China. *Viruses* 7:306–319. <https://doi.org/10.3390/v7010306>
- Syed Ab Rahman SF, Singh, E, Pieterse, CMJ, & Schenk, PM (2018) Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci*, 267, 102-111, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>.
- Tedersoo L, Bahram M, Zinger L, Nilsson RH, Kennedy PG, Yang T, Anslan S, Mikryukov V (2022) Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology*.
<https://doi.org/10.1111/mec.16460>
- The UniProt Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51 (D1):523–D531. doi.org/10.1093/nar/gkac1052
- Thoen E, Harder CB, Kauserud H, Botnen SS, Vik U, Taylor AFS, Menkis A, Skrede I (2020) In vitro evidence of root colonization suggests ecological versatility in the genus *Mycena*. *New Phytologist* 227:601-612
- Tropf J, Bien S, Eurich L, Grüner J, Langer GJ (2022) Pilzliche Schäden an der Rotbuche. *AFZ - Der Wald* 177(2):32–35
- Turczański K, Dyderski MK, Rutkowski P (2021) Ash dieback, soil and deer browsing influence natural regeneration of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Science of The Total Environment* 752:141787. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141787>
- Turczański K, Rutkowski P, Dyderski M, Wrońska-Pilarek D, Nowiński M (2019) Soil pH and organic matter content affects European ash (*Fraxinus excelsior* L.) crown defoliation and its impact on understory vegetation. *Forests* 11:22. <https://doi.org/10.3390/f11010022>
- Ulrich K, Becker R, Behrendt U, Kube M und Ulrich A (2020). A comparative analysis of ash leaf-colonizing bacterial communities identifies putative antagonists of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Frontiers in Microbiology* 11:966. doi: 10.3389/fmicb.2020.00966
- Ulrich K, Becker, R, Behrendt, U, Kube, M, Schneck, V, & Ulrich, A (2022) Physiological and genomic characterisation of *Luteimonas fraxinea* sp. nov., a bacterial species associated with trees tolerant to ash dieback. *Syst Appl Microbiol*, 45(4), 126333, <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126333>.
- Unterseher M, Reiher, A, Finstermeier, K, Otto, P, & Morawetz, W (2007) Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycol Prog*, 6, 201-212, <https://doi.org/10.1007/s11557-007-0541-1>.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology evolution*.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
- Vannier N, Agler, M, & Hacquard, S (2019) Microbiota-mediated disease resistance in plants. *PLoS Pathog*, 15(6), e1007740, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007740>.
- Verkley GJM (1999) A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. *Studies in Mycology* 44:1–180
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR (2007) Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Pano-
 pily of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Vitale A, Aiello D, Guarnaccia V, Perrone G, Stea G, Polizzi G (2011) First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x>
- Voorhuijzen-Harink MM, Hagelaar R, van Dijk JP, Prins TW, Kok EJ, Staats M (2019) Toward on-site food authentication using nanopore sequencing. *Food Chemistry: X*.
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100035>

- Wagemans J, Holtappels D, Vainio E, Rabiey M, Marzachi C, Herrero S, Ravanbakhsh M, Tebbe CC, Ogliaastro M, Ayllón MA, Turina M (2022) Going Viral: Virus-Based Biological Control Agents for Plant Protection. *Annu Rev Phytopathol* 60:21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021621-114208>
- Wang DN, Toyotome T, Muraosa Y, Watanabe A, Wuren T, Bunsupa S, Aoyagi K, Yamazaki M, Takino M, Kamei K (2014) GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin. *Med Mycol* 52:504–516. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu007>
- Wang GQ, Chen GD, Qin SY, Hu D, Awakawa T, Li SY, Lv JM, Wang CX, Yao XS, Abe I, Gao H (2018) Biosynthetic pathway for furanosteroid demethoxyviridin and identification of an unusual pregnane side-chain cleavage. *Nat Commun* 9:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04298-2>
- Wang Y-P, Pan, Z-C, Yang, L-N, Burdon, JJ, Friberg, H, Sui, Q-j, & Zhan, J (2021) Optimizing plant disease management in agricultural ecosystems through rational in-crop diversification. *Front Plant Sci*, 12, 767209, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.767209>.
- Wellbrock N, Aydin C-T, Block J, Bussian B, Deckert M, Diekmann O, Evers J, Fetzer KD, Gauer J, Gehrmann J, Kölling C, König N, Liesebach M, Martin J, Meiwes KJ, Milbert G, Raben G, Riek W, Schäffer W, Wolff B (2006) Bodenzustandserhebung im Wald (BZE II), Arbeitsanleitung für die Außenaufnahmen. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Bonn
- Wende S (2023) ssqPCRmf (Strain-specific qPCR Marker Finder). <https://github.com/SonWende/ssqPCRmf>. Accessed 24.06.2023.
- Wight WD, Kim KH, Lawrence CB, Walton JD (2009) Biosynthesis and role in virulence of the histone deacetylase inhibitor depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:1258–1267. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-10-1258>
- Wood SN (2017) Generalized Additive Models: An Introduction with R, 2nd edn. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton
- Wu M, Zhang L, Li G, Jiang D, Ghabrial SA (2010) Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology* 406:117–126. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.010>
- Ye W, Liu T, Zhang W, Zhang W (2021) The toxic mechanism of gliotoxins and biosynthetic strategies for toxicity prevention. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222413510>

Teilvorhaben 4.1

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Eine wichtige Rolle bei der Mortalität von Eschen spielen Stammfußnekrosen. Sie treten häufig bei an Eschenriebsterben erkrankten Bäumen auf. Die Ätiologie der Stammfußnekrosen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Auch der Erreger *H. fraxineus* selbst, kann sie primär verursachen. Deshalb ist das Ziel des Teilvorhabens 4.1, die Ursache der Stammfußnekrosen an Eschen zu klären und den Einfluss von Standortfaktoren auf deren Entstehung zu quantifizieren. Dazu sollen auf den Untersuchungsflächen standörtliche Gegebenheiten und das Vorkommen von Stammfußnekrosen untersucht werden. Um die Standorte zu charakterisieren werden schon vorhandene WZE-/ BZE-Daten akquiriert und ausgewertet, ebenso wird die Aufnahme von standörtlichen Parametern ein Aspekt in der Untersuchung auf Intensivmonitoringflächen sein. FraxCollar ist direktes Bindeglied zum Unterbund 2 FraxMon, da ein Projektmitarbeiter in beiden Unterverbänden in Personalunion forscht. Auf den Untersuchungsflächen werden die Stammfußnekrosen kartiert und ihr Ausmaß (Größe, Tiefe) erfasst sowie die Eschen in Schadstufen des Erkrankungsprozesses eingeteilt. Von den Nekrosen werden Proben geworben und im mykologischen Labor untersucht, d.h. es werden aus den Randbereichen der Nekrosen Pilze aus dem Holz isoliert. Diese Pilze (*H. fraxineus* und andere assoziierte Pilze der Stammfußnekrosen) werden DNA- und morphologisch gestützt identifiziert und hinsichtlich ihrer ökologischen Funktion charakterisiert. *H. fraxineus*-Stämme, Endophyten, sekundäre Schaderreger und potentielle Antagonisten werden an andere Teilvorhaben/Verbünde weitergegeben. Forschungsergebnisse münden in Empfehlungen für die forstliche Praxis ein. Zusätzlich hat das TV4.1 die Koordination des Unterverbundes 4, koordiniert die Probennahmen für alle anderen Teilvorhaben im Unterverbund FraxPath und übernimmt den fachlichen Austausch mit FraxForFuture sowie FraDiv.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP1 bis AP5 (siehe ausführliche Darstellung in Kapitel II.1)

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Grundsätzlich sei hier auf die ausführliche Darstellung der Ergebnisse des Hauptteils (II.1, AP1 bis AP5) verwiesen

Koordination und Wissenstransfer

Eine Hauptaufgabe des Teilvorhabens FraxPath 4.1 war die Koordination des Verbundvorhabens FraxPath mit neun verschiedenen Vorhabenspartnern. Durch regelmäßige Präsenz- und Online-Veranstaltungen fand ein vertrauensvoller, intensiver, zielführender Austausch zwischen den neun FraxPath-Teilvorhaben und innerhalb des Demonstrationsprojekts FraxForFuture mit seinen fünf Verbundvorhaben statt.

Der Wissenstransfer in die nationale und internationale wissenschaftliche Gemeinschaft erfolgte durch peer-reviewed Open-Access-Publikationen in einschlägigen Journalen der Pflanzenpathologie, Mykologie und Virologie (siehe Kapitel II.4). Ein erster Meilenstein zum Wissenstransfer innerhalb von FraxForFuture und zur Vorstellung des Demonstrationsvorhabens auf internationaler wissenschaftlicher Ebene war die von TV4.1 koordinierte und verbundübergreifend erstellte sogenannte Basispublikation: „FraxForFuture — research on European ash dieback in Germany“ (Langer et al. 2022). Ein weiterer Meilenstein lag bei der Initiierung eines Special Issues FraxForFuture im Journal of Plant Diseases and Protection, welche vom FraxForFuture Koordinationskreis (Demonstrationsprojektsprecher, FraxConnect und Verbundprojektleiter) beschlossen wurde. Frau Dr. Gitta Langer hat die Gasteditorenrolle in diesem Special Issue, das in 2024 erscheinen soll, übernommen. Hier sollen Hauptergebnisse des Demonstrationsprojekts FraxForFuture und neue Erkenntnisse zum Eschenriebsterben gesammelt veröffentlicht werden.

Boniturschlüssel

In Zusammenarbeit mit FraxMon TV2.1 wurde vom TV4.1, basierend auf eigenen Studien und Expertise innerhalb von FraxForFuture, ein einheitlicher Boniturschlüssel hinsichtlich des Schadausmaßes des Eschenriebsterbens an Alteschen (Sommerzustand, Winterzustand) und Jungeschen erstellt. Dieser Boniturschlüssel wurde 2021 in der Allgemeinen Forstzeitschrift für Waldwirtschaft und Umweltvorsorge (AFZ-DerWald) veröffentlicht (Peters et al. 2021b) und als Broschüre und zum Download von der FNR (Peters et al. 2021a) herausgegeben. Der entwickelte, modulare Boniturschlüssel wurde von allen beteiligten Projektpartnern in FraxForFuture verwendet, um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten. Zur Absicherung einer möglichst

einheitlichen und objektiven Anwendung des Schlüssels, wurde eine theoretische und praktische Boniturschulung durchgeführt. Alle Mitarbeitenden im Projekt, die Eschen auf den gemeinsamen Intensivbeobachtungsflächen bonitierten (IBF-Verantwortliche) sowie Plusbaum-Auswählenden (FraxGen) wurden durch das TV4.1 an der NW-FVA geschult.

Mykologie

Im Teilvorhaben 4.1 wurden insgesamt 30 Probenahmen an 26 Standorten (in den Bundesländern ST, NI, HE, SN, RP, TH, NW, BW, SH) durchgeführt. Unter den 145 entnommenen Eschenproben (*Fraxinus excelsior*, Gemeine Esche) befanden sich Blätter, Zweige, Fruchtkörper, Blattspindeln, Wasserreiser und Stammfüße, die von TV4.1 im Labor bearbeitet wurden. Zusätzlich wurde Material der beprobten Eschen anderen Teilvorhaben innerhalb von FraxPath und FraxForFuture zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Von TV4.1 wurden insgesamt 9740 mit Esche assoziierte Gewebeproben auf Nährmedium inkubiert. Dabei kam es zu 6233 pilzlichen Auswüchsen, die 268 Morphotypen (Pilzarten) zugeordnet werden konnten. Werden nur die Stammfüße betrachtet, wurden 13 Probenahmen an zwölf Standorten durchgeführt. Von den 104 Eschenstammfußproben wurden 9390 Holzstückchen überwiegend aus symptomatischen Holzmaterial inkubiert. Aus diesen wuchsen 5851 pilzliche Myzelien aus. Abgesehen von eindeutigen Kontaminationen oder wenigen nicht isolierbaren bzw. nicht bestimmbar Pilzen wurden insgesamt 261 verschiedene Morphotypen (Pilzarten) ermittelt. Bezogen auf die Frequenz (Anteil der Artisolate bezogen auf alle Isolate) wurden am häufigsten die Arten *Diplodia fraxini* (18,8 %), *Hymenoscyphus fraxineus* (15,4 %), *Armillaria* spp. (13,5 %), *Trichoderma* sp. (11,3 %), *Neonectria punicea* (5,5 %), *Diaporthe* cf. *eres* (3,5 %), *Paracucurbitaria* sp. (3,3 %) und *Fusarium* cf. *lateritium* (2,8 %) aus den Eschenstammfüßen isoliert. Bezogen auf den Anteil an allen Stammfußproben mit Stammfußnekrose (n = 95) kam *Diplodia fraxini* am häufigsten in 79 (= 82 %) der beprobten Stammfußnekrosen vor. Folgende Pilze waren ebenfalls sehr häufig mit den nekrotischen Stammfußbereichen assoziiert: *Hymenoscyphus fraxineus* (59 %), *Trichoderma* sp. (58 %), *Armillaria* spp. (58 %), *Paracucurbitaria* sp. (42 %), *Fusarium* cf. *lateritium* (41 %), *Diaporthe* cf. *eres* (40 %) und *Neonectria punicea* (35 %). 56,3 % der Morphotypen aller Stammfußproben wurden nur einmalig isoliert. An den untersuchten Eschenstandorten war das Artenspektrum der häufig mit Stammfußnekrosen assoziierten Pilze relativ ähnlich (Peters et al. 2023). Diese Untersuchungsergebnisse lieferten einen großen Beitrag zur bisher weitgehend unbekannt mykologischen Biodiversität von Eschenholz in Deutschland. So wurden einige Pilzarten erstmals für die Gemeine Esche beschrieben, darunter auch der Erreger der Rußrindenkrankheit des Ahorns *Cryptostroma corticale* oder *Diplodia sapinea* (Erreger des Kiefern- oder Diplodia-Triebsterbens von Koniferen). Erste Pathogenitätstests mit *C. corticale* an *F. excelsior* ergaben, dass der Erreger der Rußrindenkrankheit keine Schäden an jungen, gesunden Eschen hervorruft und in den Stammfußnekrosen der an Eschentriebsterben erkrankten Eschen wahrscheinlich nur opportunistisch vorkommt (Langer et al. 2023). Zudem wurde die neue Schlauchpilzart *Vexillomyces fraxinicola* PETERS LANGER BIEN 2022 (Tan et al. 2022) entdeckt und für die Wissenschaft erstmals beschrieben. Die Ergebnisse der mykologischen Untersuchungen von Stammfußnekrosen lassen darauf schließen, dass in den meisten Fällen *H. fraxineus* der primäre Verursacher des Schadens ist und andere Pilze opportunistisch assoziiert sind bzw. latent im Stammfuß von Eschen vorkommen.

Am Beispiel eines Eschenmischbestandes am Standort Holzminden wurden in Zusammenarbeit mit FraxGen TV3.1 die dort isolierten *H. fraxineus* Stämme aus zehn Eschen mittels Mikrosatellitenanalyse genotypisiert (Peters et al. 2024). Es wurde festgestellt, dass in fortgeschrittenen Stammfußnekrosen in der Regel mehrere Genotypen des Schaderregers beteiligt sind. Waren mehrere Multilokus-Genotypen in einer Stammfußnekrose vorhanden, so überwog in der Regel einer der Genotypen die anderen, was die Annahme unterstützt, dass die Primärinfektion des Stammfußes hauptsächlich durch *H. fraxineus* geschieht. Eine Abhängigkeit der Genotypenanzahl von dem Ausmaß der Stammfußnekrose bzw. dem Schädigungsgrad wurde allerdings nicht nachgewiesen.

Durchführung und Auswertung von Bonituren sowie Boden-Feinkartierungen auf den Intensivbeobachtungsflächen

Auf den 14 Intensivbeobachtungsflächen des Gesamtverbundes wurde eine Boden-Feinkartierung inklusive Bodenanalytik durchgeführt und die Zusammenführung und Auswertung der Eschenbonituren übernommen. Auf Basis dieser erhobenen Daten entstand eine Publikation des Gesamtverbundes (Fuchs et al. 2024). Es zeigte sich, dass Eschen im Sommerzustand durchweg vitaler beurteilt werden und dass feine Unterschiede bei der strukturellen Schädigung von Eschenkronen im Winterzustand besser beurteilbar sind. Stammfußnekrosen der Stufe 2 (starke Stammfußnekrose) erwiesen sich als sehr guter Indikator für unzureichende Standortsicherheit: Das Risiko, innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2,5 Jahren umzufallen, war für eine Esche mit Stammfußnekrosenstufe 2 etwa fünfmal höher als für eine Esche ohne oder mit schwachen Stammfußnekrosen der Stufe 1. Generell waren Kronenzustand und Stammfußnekrosen hochgradig korreliert. Über den Beobachtungszeitraum verschlechterte sich der Kronenzustand der Eschen im Allgemeinen, was allerdings hauptsächlich von Mortalitätsereignissen (Kronenstufe 5) getrieben war. Der Zustand der überlebenden Eschenpopulation verbesserte sich sogar auf sechs von elf Flächen signifikant. Allgemein waren Eschen mit niedrigem Brusthöhendurchmesser (BHD) stärker betroffen als Eschen mit hohem BHD. Räumlich betrachtet war der Eschenzustand innerhalb von Beständen (sowohl Krone als auch Stammfußnekrosen) meist dort schlechter, wo die Böden hydromorphe Merkmale aufwiesen (also stau- oder grundwasserbeeinflusst waren)

oder wo die Eschengrundflächendichte lokal höher war. Daraus lässt sich ableiten, dass insbesondere bei flächenhaften, kostenintensiven Wiederanbauversuchen von Eschen, die entweder durch Auslese oder Bekämpfungsverfahren toleranter gegenüber dem Erreger sind, in Zukunft Reinbestände und hydromorphe Bodenverhältnisse vermieden werden sollten. Insgesamt erklärten Standorts- und Bestandesparameter nur einen kleinen Teil der Gesamtvarianz, der weitaus größere Teil ließ sich individuellen Unterschieden zuordnen (mutmaßlich Unterschiede im Geno- und Phänotyp).

Akquise und Auswertung der WZE- und BZE-Daten, Bereisung und Bonitur der WZE-Plots

Alle Daten der Waldzustandserhebung (WZE) zur Esche seit 1983 wurden aus allen Bundesländern akquiriert und gemeinsam mit Bodendaten aus der Bodenzustandserhebung im Wald (BZE) hinsichtlich des Eschentriebsterbens und Standortfaktoren ausgewertet. Auf dem Raster der Waldzustandserhebung kommt die Esche bundesweit seit 2002 auf insgesamt 243 Plots vor (209 davon mit BZE-Erhebung) und ist in Norddeutschland viel seltener als in Süddeutschland. Mortalitätsereignisse sind bei dieser dünnen Datenlage zu selten, um statistisch ausgewertet werden zu können. Deshalb wurde die Kronenverlichtung (Blattverlust in % des Kronenvolumens), der einzige in Raum und Zeit vergleichbar und regelmäßig aufgenommene Parameter, als Proxy für das Eschentriebsterben genutzt. Der Zusammenhang zwischen Kronenschadstufen nach dem Boniturschlüssel und Kronenverlichtung ist allerdings mit einem R^2 von 0.8 sehr hoch (Fuchs et al. 2024). Seit etwa 2010 stieg die Kronenverlichtung in weiten Teilen Deutschlands an, besonders früh und stark zeigten sich Schäden in Mecklenburg Vorpommern und Baden-Württemberg. Besonders erhöhte Kronenverlichtungswerte zeigten sich immer in Jahren, deren Vorjahr von hohen Niederschlagssummen im Hochsommer geprägt war. Außerdem begünstigten stau- und grundwasserbeeinflusste Böden sowie ein hoher Eschenanteil im Bestand die Kronenverlichtung. Junge Eschen waren vor Beginn des Eschentriebsterbens weniger stark verlichtet als Alteschen, zeigten aber im zeitlichen Verlauf der Krankheit eine viel schnellere Zunahme der Kronenverlichtung.

Da die Methodik der Waldzustandserhebung nicht speziell auf die Esche zugeschnitten ist, fehlen dort Daten zu Stammfußnekrosen und zu Strukturschäden in Eschenkronen. Deshalb wurde eine zusätzliche bundesweite Erhebung auf 109 WZE-/BZE-Plots mit ausreichendem Eschenvorkommen unter Anwendung des Boniturschlüssels (Peters et al. 2021a) durchgeführt. Dabei wurden pro Plot die 20 räumlich nächsten Eschen um das BZE-Bodenprofil bonitiert. Die Datengrundlage wurde durch die Einbeziehung von Inventurdaten der FraxForFuture Intensivbeobachtungsflächen des Gesamtverbundes erweitert, was in einem Gesamtdatensatz von 2440 Eschen auf 122 Flächen mündete. Zusätzlich standen für alle Flächen standortkundliche Daten aus der Bodenzustandserhebung im Wald sowie aus der Bodenbeprobung der Intensivbeobachtungsflächen zur Verfügung, um deren Einfluss auf das Eschentriebsterben und die Ausprägung von Stammfußnekrosen zu untersuchen. Insgesamt wiesen 63 % der Eschen Stammfußnekrosen auf, wobei 38 % in die Kategorie „starke Stammfußnekrosen“ fielen. Ziemlich eindeutig konnte dargestellt werden, dass Eschen, die auf hydromorphen Standorten mit Stau- oder Grundwassereinfluss, sowohl in der Krone als auch im Stammfußbereich größere Schäden aufweisen. Zusätzlich zum Einfluss des Wasserhaushalts wurde ein Einfluss des pH-Werts im Oberboden auf den Eschenzustand festgestellt - analog zu den Ergebnissen von Turczański et al. (2019, 2021). Darüber hinaus wurde ein noch stärkerer Effekt des pH-Werts der Humusaufgabe gefunden. In allen Fällen stand ein alkalischer pH-Wert mit stärkeren Symptomen des Eschentriebsterbens in Verbindung. Weitere Parameter wie Trophie, nutzbare Feldkapazität und klimatische Feuchte in verschiedenen zeitlichen Aggregationen wurden ebenfalls in die Auswertung einbezogen, zeigten aber allesamt nur marginalen bis keinen Einfluss auf den Gesundheitszustand der Eschen.

Einrichtung der FraxCollar-Intensivflächen, Bodenuntersuchungen, Auswertungen zu kleinräumigen Zusammenhängen zwischen Bodenvariablen und Stammfußnekrosen

Bei allen Untersuchungen auf dem WZE-Raster ist der Eschenzustand stark von Bestandesunterschieden (Struktur, Alter, Genetik) und von der räumlichen Ausbreitung des Eschentriebsterbens (Epidemiologie) beeinflusst. Um den Eschenzustand innerhalb von homogenen Beständen in Abhängigkeit von kleinräumiger Variabilität des Bodens zu untersuchen, wurden fünf FraxCollar-Intensivflächen eingerichtet. Diese Flächen wurden basierend auf Forsteinrichtungsdaten lokalisiert. Dabei war entscheidend, dass der Grundflächenanteil von Eschen mit einem Brusthöhendurchmesser (BHD) zwischen sieben und 20 cm mindestens 20 % betrug und die Bestände zudem vorwiegend jünger als 60 Jahre waren. Zudem sollten die Flächen mehrere geologische Substratgruppen abdecken, die für Eschenvorkommen typisch sind (zum Beispiel Basalt, Kalkstein und Lösslehm). Klimatisch und höhenzonal sollten sich die Flächen nicht in den Extremen befinden, damit die Bodenbedingungen eine ausschlaggebende Einflussgröße darstellen. Die FraxCollar-Intensivflächen wurden insgesamt in 14 Teilflächen unterteilt, die jeweils bezüglich Bestandessituation, Ausgangssubstrat und der Lage im Relief möglichst homogen waren. Innerhalb jeder Teilflächen wurden mehrere Probekreise (10 m Radius) ausgewiesen, die jeweils entweder nur Eschen mit möglichst stark ausgeprägten Stammfußnekrosen oder mit möglichst gesunden Eschenstammfüßen enthielten. Anschließend wurde untersucht, ob sich physikalische und chemische Bodenkennwerte systematisch zwischen "besseren" und "schlechteren" Probekreisen innerhalb der Teilflächen unterscheiden. Dazu wurde im Zentrum jedes Probekreises ein Bodenprofil bis 60 cm Tiefe angelegt, morphologisch beschrieben und in jeweils vier Tiefenstufen (0-5, 5-10, 10-30 und 30-60 cm) nach der Arbeitsanleitung zur zweiten Bodenzustandserhebung im Wald (Wellbrock et al.

2006) beprobt und analysiert. Die Auswertung anhand von linearen, gemischten Modelle legte nahe, dass fast alle bodenchemischen oder bodenphysikalischen Kenngrößen sich nicht systematisch zwischen "besseren" und "schlechteren" Probekreisen unterschieden. Einzig der pH-Wert in den oberen 30 cm des Mineralbodens war signifikant niedriger in den „besseren“ Probekreisen. Dass Eschen auf weniger alkalischen Standorten vitaler sind, ist bereits in der Literatur bekannt (Turczański et al. 2019). Unsere Ergebnisse bestätigen dies nun auch für Stammfußnekrosen und kleinräumige Standortsunterschiede innerhalb von Beständen.

Fazit zum Eschentriebsterben und Standortfaktoren

Die Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Standort/Bestand und dem Schädgeschehen auf verschiedenen Flächenkollektiven mit unterschiedlich ausgerichtetem Fokus lassen einige Schlüsse zu: Grundsätzlich wird nur ein kleiner Teil der beobachteten Varianz des Eschentriebsterbens von Standorts- und Bestandesunterschieden erklärt. Zu den wenigen Parametern, die eindeutig die Symptomatik verstärken, gehören dabei Grund- und Stauwassereinfluss, hohe pH-Werte des Oberbodens und der Laubstreu, hohe lokale Eschendichte und ein geringes Alter oder ein geringer BHD von Eschen. Dies gilt in den meisten Fällen gleichermaßen für Kronenzustand und Stammfußnekrosen, da die beiden Symptome weitgehend korreliert sind. Zeitlich betrachtet hat die Witterung des Vorjahres einen großen Einfluss auf die Kronenverlichtung im jeweiligen Jahr, wobei feuchte Bedingungen im Hochsommer des Vorjahres die Verlichtung stark beschleunigten. Außerdem verschlechterte sich in den vergangenen Jahren der durchschnittliche Eschenzustand in Deutschland weiterhin.

Auf großräumiger Ebene sind die Haupteinflussfaktoren, neben dem Standort, vermutlich Unterschiede in der Dauer und Intensität des epidemiologischen Geschehens, genetische Unterschiede zwischen Eschenpopulationen und Unterschiede in der Virulenz zwischen Populationen des Erregers. Kleinräumig sind die beobachteten Unterschiede zwischen einzelnen Eschen zwar groß - lassen sich allerdings kaum mit kleinräumiger Standortvariabilität begründen, sondern eher mit individuellen Unterschieden hinsichtlich Genetik und phänotypischer Plastizität der Eschen. Dafür spricht auch der bei fast allen Bonituren gewonnene subjektive Eindruck, dass stark und kaum geschädigte Eschen eher selten räumlich gruppiert im Bestand vorkommen, sondern relativ gleichmäßig durchmischt sind. Risikoabschätzungen für die Befallsintensität des Eschentriebsterbens, die auf rein standörtlichen Gegebenheiten basieren (z. B. Risikokarten), sind aus diesen Gründen kaum sinnvoll.

Zitierte Literatur:

- Fuchs S, Häuser H, Peters S, Knauf L, Rentschler F, Kahlenberg G, Kätzel R, Langer GJ (2024) Ash dieback assessments on intensive monitoring plots in Germany: Influence of time, stand and site on disease progression. *J Plant Dis Prot.* <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00889-y>
- 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* 129:1285–1295. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00670-z>
- Langer GJ, Peters S, Bußkamp J, Bien S (2023) *Cryptostroma corticale* and fungal endophytes associated with *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. *J Plant Dis Prot.* <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00750-8>
- Peters S, Fuchs S, Bien S, Bußkamp J, Langer GJ, Langer EJ (2023) Fungi associated with stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. *Mycol Progress* 22:52. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01897-2>
- Peters S, Gruschwitz N, Bien S, Fuchs S, Bubner B, Blunk V, Langer GJ, Langer EJ (2024) The fungal predominance in stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* — a study on *Hymenoscyphus fraxineus* multilocus genotypes. *J Plant Dis Prot.* <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00912-2>
- Peters S, Langer G, Kätzel R (2021a) Eschentriebsterben - Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen. Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Gülzow-Prüzen
- Peters S, Langer G, Kätzel R (2021b) Bonitur geschädigter Eschen im Kontext des Eschentriebsterbens. *AFZ - DerWald* 76:28–31
- Tan YP, Bishop-Hurley SL, Shivas RG et al. (2022) Fungal Planet description sheets: 1436-1477. *Persoonia* 49:261– 350. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2022.49.08>
- Turczański K, Dyderski MK, Rutkowski P (2021) Ash dieback, soil and deer browsing influence natural regeneration of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Science of The Total Environment* 752:141787. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141787>
- Turczański K, Rutkowski P, Dyderski M, Wrońska-Pilarek D, Nowiński M (2019) Soil pH and organic matter content affects European ash (*Fraxinus excelsior* L.) crown defoliation and its impact on understory vegetation. *Forests* 11:22. <https://doi.org/10.3390/f11010022>

Teilvorhaben 4.2

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Ziel ist die Untersuchung der Virulenz und der Populationsstruktur von *H. fraxineus* sowie Infektionsversuche für die Erforschung von Infektionsprozessen und Möglichkeiten zur biologischen Bekämpfung von *Hymenoscyphus fraxineus*, sowie die Bereitstellung von pilzlichen Subkulturen für Projektpartner.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP6.1	Virulenztests, Auswahl virulenter und weniger aggressiver <i>H. fraxineus</i> -Stämme für die Verwendung in anderen TVs
AP6.2	Mikrosatellitenanalyse (Populationstruktur) mit ausgewählten Stämmen unterschiedlicher Virulenz, Herkunft und Ausgangssubstrat
AP6.3	Zulieferungen von Pilzstämmen an andere Projektpartner
AP6.4	Infektionsversuche am Wurzelansatz zur Klärung der Ätiologie von Stammfußnekrosen
AP6.5	Infektionsversuche und Phytotoxizitätstests in Zusammenarbeit mit anderen Projektpartnern

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

In Zusammenarbeit mit Projektpartnern wurden 162 *H. fraxineus*-Stämme isoliert. Es wurden Infektionsexperimente zur Identifizierung von hoch- und schwach- oder nichtvirulenten Stämmen durchgeführt. Daten und Subkulturen wurden den Projektpartnern in FraxForFuture zur Verfügung gestellt. Es wurden Gewebeproben von infizierten Eschen an verschiedene Projektpartner für weiterführende Untersuchungen versendet.

Die Virulenz von Stämmen aus ganz Deutschland wurde getestet und die Stämme unterschieden sich stark in ihrer Virulenz. Noch vorläufige Ergebnisse der Populationsstrukturanalyse von *H. fraxineus* für Deutschland deuten eine allmähliche Diversifizierung der Population an. Die statistischen Analysen werden fortgeführt, eine Veröffentlichung ist geplant.

Möglichkeiten der biologischen Bekämpfung von *H. fraxineus* wurden getestet. Erste Ergebnisse unter Gewächshausbedingungen sind ermutigend. Das Primingexperiment (Prägung) erwies sich als potenzielle zusätzliche Biokontrolloption. Bei Tests mit antagonistischen Endophyten wurde für bestimmte Organismuskombinationen eine reduzierte oder verzögerte Symptomentwicklung in den Versuchspflanzen festgestellt. Manuskripte sind in Vorbereitung. Allerdings sind weitere Tests von entscheidender Bedeutung, um die Ergebnisse zu bestätigen und die Wechselwirkungen vollständig zu untersuchen. Es wurde hingegen kein Zusammenhang zwischen Virulenz und Vorhandensein des Mykovirus HfMV1 gefunden. Damit bestätigt sich, dass eine Hypovirulenz mit diesem Virus nicht zur biologischen Kontrolle geeignet ist (Lutz et al. 2023).

Ein Infektionsversuch zur Untersuchung der Entstehung von Stammfußnekrosen blieb ergebnislos.

Teilvorhaben 4.3

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Auf bestehenden Untersuchungsflächen der FVA und in Anbindung an Probematerial der Intensivbeobachtungsflächen konnten Datierungen vorhandener Stammfußnekrosen Aufschlüsse über eine zeitliche Einordnung, auch für die Pathogenese, liefern. Mithilfe histologischer Präparate konnten mikroskopische Analysen Einblicke in die Infektionsmechanismen und den Schadensverlauf liefern. Eine Analyse, anhand unterschiedlicher mikroskopischer Techniken, untersucht Gewebereiche aus Teilen der Proben der dendrochronologischen Untersuchungen und aus Infektionsversuchen hinsichtlich der Infektionsverläufe. In kontrollierten Infektionsversuchen wurde die Nekrostisierung an Stammfußbereichen von Eschensämlingen untersucht.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Arbeitspaket	Bearbeitung
Histologische Untersuchungen (SEM, Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie) zur Klärung des Infektionsweges von <i>H. fraxineus</i> , der Chronologie und des Schadensverlaufs bei Stammfußnekrosen und anderer Gewebetypen	<ul style="list-style-type: none">• Mikroskopische Analyse von 25 histologischen Präparaten aus natürlich entstandenen Stammfußnekrosen.• Mikroskopische Analyse histologischen Präparaten aus <i>in vitro</i> mit <i>H. fraxineus</i> und <i>A. gallica</i> inokulierten Mikrobohrkernen• Mikroskopische Analyse von 80 histologischen Präparaten aus <i>in vivo</i> mit <i>H. fraxineus</i> und <i>A. gallica</i> beimpften Eschensämlingen
Erkenntnisse über das Zustandekommen von Nekrosen an unterschiedlichen Infektionsloci	<ul style="list-style-type: none">• Durchführung von zwei <i>in vivo</i>-Inokulationsversuchen an insgesamt 210 Eschensämlingen mit <i>H. fraxineus</i> und <i>A. gallica</i>, um Erkenntnisse über die Infektionsdynamik der beiden Pilzarten am Stammfuß von Eschen zu gewinnen
Dendrochronologische Einordnung von Stammfußnekrosen	<ul style="list-style-type: none">• Dendrochronologische Einordnung von Stammfußnekrosen an 79 Eschenstammscheiben mittels Jahrringanalysen• Datierung des Baumalters, der Entstehungsjahre von 700 nekrotischen Schadstellen in 314 Schadclustern, der Überwallungen und Überwallungsversuche und des Zeitpunkts der letalen Schädigung des Kambiums an der Schadstelle

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Dendrochronologische Untersuchungen

Zur dendrochronologischen Datierung von Stammfußnekrosen wurde, in Anlehnung an Enderle et al. (2017), eine Methodik ausgearbeitet. Diese ermöglicht die Aufnahme komplexer Schäden, u.a. mit mehrjähriger Entwicklungsdauer und Überwallungen. An 79 Eschen-Stammscheiben, von zehn über Deutschland verteilten Versuchsflächen, wurde das Entstehungsjahr von 700 Schadstellen in 314 Schadclustern datiert. Es konnte ein vermehrtes Auftreten und ein deutlicher jährlicher Anstieg von Stammfußnekrosen ab 2010, und somit in einem zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten des Eschentriebsterbens in Deutschland, festgestellt werden. 39 % der Schäden dehnten sich über mehrere Jahre hinweg von Jahr zu Jahr weiter aus (ausgeklammert wurden hierbei Schäden, die sich, aufgrund ihres Entstehungszeitpunktes nahe am Zeitpunkt der Fällung, nicht ausbreiten konnten). 54 % der Schadcluster wiesen Überwallungen oder Überwallungsversuche auf. Das zeigt ein hohes Potential von Eschen, Abwehrreaktionen, erbringen zu können. Die letale Schädigung des Kambiums trat bei 88 % der Schadstellen während der Vegetationsruhe ein.

Untersuchungen zu Infektionsablauf und Fäuledynamik

Die Analyse histologischer Präparate, aus natürlich entstandenen Stammfußnekrosen, zur Untersuchung des Infektionsablaufs durch *H. fraxineus* am Stammfuß von Eschen erwies sich als ungeeignet, da im Gewebe sichtbare Pilzhypen nicht zweifelsfrei *H. fraxineus* zugeordnet werden konnten, da eine Vielzahl an Pilzarten

in Eschen-Stammfußnekrosen zu finden ist (Peters et al. 2023). *In vitro*-Inokulationen von Eschen-Mikrobohrkernen mit *H. fraxineus* oder *A. gallica* wurden erfolgreich durchgeführt. Die mikroskopische Analyse histologischer Präparate dieser Bohrkerne zeigte eine erfolgreiche Besiedelung durch *H. fraxineus*. Pilzhyphen fanden sich sowohl auf der Rindenoberfläche als auch im Rindengewebe in den Zellen. Auch das Durchwachsen von Zellwänden im Rindengewebe konnte beobachtet werden. *In vivo*-Inokulationen von 160 2-jährigen Eschen-Sämlingen wurden im Sommer 2022 durchgeführt. Inokuliert wurde in unterschiedlichen Varianten mit *H. fraxineus* und *A. gallica* um deren Interaktion und Infektionsdynamik bei der Infektion am Stammfuß von Eschen zu untersuchen. Die tendenziell schnellste und stärkste Nekrosenentwicklung konnte an Eschensämlingen beobachtet werden, die zuerst mit *H. fraxineus* und in einem zeitlichen Versatz von drei Wochen zusätzlich mit *A. gallica* inokuliert wurden. Insgesamt entwickelten sich jedoch nur schwache Nekrosen. Weder *H. fraxineus* noch *A. gallica* konnte aus den Versuchspflanzen reisoliert werden. In den angefertigten histologischen Präparaten konnte keine Besiedelung des Eschengewebes durch Pilzhyphen festgestellt werden. *In vivo*-Inokulationen von weiteren 50 Eschen-Sämlingen wurden im Frühjahr 2023 durchgeführt. Inokuliert wurde erneut in unterschiedlichen Varianten mit *H. fraxineus* und *A. gallica*. Die tendenziell stärkste Nekrosenentwicklung konnte, anders als im Sommer, an Eschensämlingen beobachtet werden, die zuerst mit *A. gallica* und in einem zeitlichen Versatz von drei Wochen zusätzlich mit *H. fraxineus* inokuliert wurden. Insgesamt konnte jedoch nur eine schwache Entwicklung von Nekrosen/Verbraunungen beobachtet werden. Eine Reisolation von *H. fraxineus* oder *A. gallica* war nicht erfolgreich.

Alteschenbonitur

Auf den Intensivbeobachtungsflächen BW1 „Plattenwald“ und BW2 „Weisweil“ wurde zweimal jährlich eine Bonitur der Alteschen durchgeführt und die Daten allen Projektpartner:innen zur Verfügung gestellt. An einem Treffen zur Auswertung der projektweit erhobenen Boniturdaten wurde teilgenommen und an einer Publikation der Daten mitgewirkt:

Fuchs S, Häuser H, Peters S, **Knauf L**, Rentschler F, Kahlenberg G, Kätzel R, Langer GJ (2024) Ash dieback assessments on intensive monitoring plots in Germany: Influence of time, stand and site on disease progression. *J Plant Dis Prot.* <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00889-y>

Zitierte Literatur

Enderle R, Sander F, Metzler B (2017) Temporal development of collar necroses and butt rot in association with ash dieback. *iForest – Biogeosciences and Forestry* 10(3):529-536. <https://doi.org/10.3832/ifor2407-010>

Peters S, Fuchs S, Bien S, Bußkamp J, Langer GJ, Langer EJ (2023) Fungi associated with stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. *Mycological Progress* 22:52. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01897-2>

Teilvorhaben 4.4

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Es sollte das Mykobiom der Feinwurzeln sowie des Bodens von *Fraxinus excelsior* kulturbasiert und durch die Verwendung des ONT MinION untersucht werden. Hierbei sollte auch geklärt werden, ob *Hymenoscyphus fraxineus* sich in Feinwurzeln oder dem Boden nachweisen lässt und somit ein weiterer Infektionsweg in Frage käme. Zusätzlich sollten potenzielle Antagonisten in vitro detektiert werden.

Der Arbeitsplan (AP8) gliedert sich in logisch aufeinander folgende Schritte: Isolation von Reinkulturen und DNA, Analyse der Reinkulturen und DNA, Kulturversuche, Verschneidung der Ergebnisse und Interpretation.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP 8.1, 8.2, (8.3), 8.4, (8.5), 8.6, 8.7, 8.8

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

H. fraxineus konnte nicht aus den Feinwurzeln oder Bodenproben isoliert werden; lediglich aus Stark- und Grobwurzeln, diese wurden allerdings nur bei TH2 und NI2 probeweise untersucht.

Durch den kulturbasierten Ansatz ließen sich etwa 64 unterschiedliche Gattungen ermitteln. Wobei 36 davon jeweils nur von einem Standort isoliert wurden. Vertreter von neun Gattungen konnten wenigstens von fünf Standorten isoliert werden. *Ilyonectria* wurde an allen elf Standorten isoliert, *Diaporthe* und *Trichoderma* jeweils an neun, *Cadophora* und *Pezicula* an acht, *Dactylonectria* und *Nemania* an sieben, *Camposporium* an sechs und *Coprinellus* an fünf. Es dominierten dabei die Ascomycota, während die Basidiomycota vereinzelte Isolate darstellten.

Die NGS-basierte Analyse lieferte insgesamt 333 unterschiedliche Gattungen. In den Bodenproben gehörten *Saitozyma*, *Solicoccozyma*, *Mortierella*, *Apiotrichum*, *Penicillium*, *Podila*, *Sebacina*, *Trichoderma*, *Keithomyces*, *Coprinellus* und *Phallus* zu den häufigsten Gattungen. Bei den unsterilisierten Feinwurzeln sind *Mycena*, *Mycenella*, *Ilyonectria*, *Leptodontidium*, *Cladophialophora*, *Saitozyma*, *Keithomyces*, *Solicoccozyma*, *Sebacina*, *Dendrophoma* und *Mortierella*. Bei den sterilisierten Wurzelproben dominierten *Mycena*, *Mycenella*, *Glomus*, *Mycetinis*, *Leptodontidium*, *Pezicula*, *Cladophialophora*, *Delicatula*, *Teratosphaeria*, *Berkeleyomyces*, *Dendrophoma*, *Chalara*, *Keithomyces* und *Atractospora*. Insgesamt konnten elf unterschiedliche Gattungen der Glomeromycota nachgewiesen werden. Die Alpha-Diversität war in den Bodenproben am höchsten und in den sterilisierten Wurzelproben am geringsten. Die Beta-Diversität zeigte eine deutliche Aufteilung der Proben nach untersuchtem Kompartiment, sowie eine geringere Streuung innerhalb der Bodenproben und eine größere innerhalb der Wurzelproben.

28 Isolate, unter anderem auch *Hypoxyylon rubiginosum*, wurden in vitro auf ihre antagonistische Aktivität gegenüber vier Stämmen von *H. fraxineus*, RH03-T2-B5-1 und RH03-T7-B5-2 (schwach virulent) sowie RH03-T2-B1-1 und RH03-T5-B1-1 (stark virulent), getestet. Bei Stamm RH03-T5-B1-1 konnten keine Antagonisten gefunden werden, da die Selbstinhibition nicht angewachsen ist.

Bei RH03-T2-B5-1 zeigten 43% der verwendeten Isolate eine Hemmwirkung, wobei zwei Isolate von *Trichoderma*, ein Isolat von *Podila* und ein Isolat von *Pezicula* die höchsten Hemmwirkungen aufwiesen. Bei RH03-T7-B5-2 zeigten 23% der verwendeten Isolate eine hemmende Wirkung, wobei hier wieder drei *Trichoderma*-Isolate (zwei vom zuvor genannten Stamm) die größte Hemmwirkung aufwiesen. Bei dem Stamm RH03-T2-B1-1 zeigten 27 Isolate eine Hemmwirkung, mit der höchsten Hemmwirkung bei *Trichoderma*, *Mortierella*/*Podila*, *Ilyonectria* und *Diaporthe*.

Außerdem wurden 50 Isolate von den Jungeschen gegen die zwei stark virulenten *H. fraxineus* Stämme in vitro getestet, dabei zeigten 36 Isolate eine Hemmwirkung und 49 keine. Die höchsten Hemmwirkungen erzielten unter anderem *Ilyonectria*/*Dactylonectria*, *Trichoderma*, *Plectosphaerella*, *Colletotrichum*, *Nemania* und *Nigrospora oryzae*, alle an Stamm RH03-T2-B1-1.

Teilvorhaben 4.5

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Teilprojekt fokussierte sich auf die Aufklärung der Abhängigkeiten und Interaktionsprozesse von *Hymenoscyphus fraxineus* bei der Infektion unterschiedlicher Eschenarten, die auf eine Infektion entweder sensibel (*Fraxinus excelsior*) oder tolerant (*Fraxinus mandshurica*) reagieren. Dabei sollte die Pathogen-Wirtinteraktion in Hinblick auf die exprimierten Virulenzfaktoren, die pflanzliche Abwehr und die funktionalen Gencluster zur Verwertung der jeweilig in den Geweben bereitgestellten pflanzlichen Metabolite mit Hilfe von Transkriptionsstudien analysiert werden. Diese Analysen zur Genexpression sollten grundlegende Einblicke in die beobachteten unterschiedlichen Infektionsverläufe mit lokal begrenztem Auftreten des Pathogens oder einem invasiven Verlauf ermöglichen. Über die komparative Analyse der Transkriptome sollten Schlüsselgene bei der Verwertung der art- und gewebeabhängigen Metabolitkompositionen von Eschenblatt und -holz identifiziert werden. Die Erkenntnisse zu den Faktoren, die eine endophytische oder nekrophytische Kolonisation erst ermöglichen, werden dringend benötigt, um den Krankheitsverlauf im Detail zu erschließen.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP9.1 Identifizierung von differentiell exprimierten Genmarkern von *H. fraxineus in vitro*

In diesem Arbeitspaket erfolgte zunächst die (MS1) Identifizierung von differentiell exprimierten Genmarkern von *H. fraxineus in vitro*. Die notwendige Auswertung für den umfangreichen Datensatz der mRNA-Sequenzierung zur Identifizierung von Kandidatengenomen wurde erfolgreich abgeschlossen und potenzielle Marker gene identifiziert. Grundlage hierfür war die (MS2) Anzucht der *H. fraxineus* Kulturen *in vitro* mit und ohne pflanzliche Zusätze zur Gewinnung der Sequenzieremplate. Die Erstellung der RNA-Sequenzieremplate für die Pilzisolat wurde erfolgreich abgeschlossen. Die (MS3) Bestimmung der Genexpression der *H. fraxineus* aus den *In-vitro*-Kulturen via RNA-Seq erfolgte erfolgreich für die Isolate 1431 und 1511. Es schlossen sich die Analysen zur (MS4) Bestimmung der art- und substratspezifisch regulierten Gene und deren Bedeutung für den wirtsabhängigen Metabolismus und die Virulenz an. Diese umfangreichen Datenanalysen zur differentiellen Genexpression wurden ebenfalls erfolgreich abgeschlossen.

AP9.2 Identifizierung von differentiell exprimierter Genmarkern von *H. fraxineus in planta*

Hier erfolgte die (MS5) Identifizierung von differentiell exprimierten Genmarkern von *H. fraxineus in planta*. Eine erste Auswahl der potentiellen Genmarker wurde designt, evaluiert und für erste Gene in der RT-qPCR am experimentell infizierten Eschenmaterial abgeschlossen. Grundlage waren die (MS6) experimentellen Infektionen der Blattspindel und Sprossachse bei *F. excelsior* und *F. mandshurica* am JKI in Braunschweig. Die experimentellen Infektionen (Stamminfektion mit Agarpfropfen) wurden für 153 Eschen wiederholt durchgeführt und erfolgreich abgeschlossen. Blattspindelexperimente wurden aufgrund der hohen Ausfallraten nicht durchgeführt.

Mit Hilfe des gewonnenen Materials erfolgte die (MS7) Bestimmung der Genexpression von *H. fraxineus in planta*. Die Durchführung wurde erfolgreich abgeschlossen mit neuen Assays für *gliT* und *eEf1 α* als interne Pflanzenkontrolle. Die letzten Analysen im Arbeitspaket zu der (MS8) Bestimmung der *in planta* art- und substratspezifisch regulierten Gene konnten in der Projektlaufzeit nicht im vollen Umfang abgeschlossen werden. Bisherige Ergebnisse zeigen keine Unterschiede in der Expression der Virulenzfaktoren.

AP9.3 (Evaluierung der Expression von Genmarkern in selektiertem sensiblem und widerstandsfähigem Vermehrungsgut im Bereich der Blatt- und Stammfußnekrosen) und AP9.4 (Transkriptomanalysen zum Einfluss von Applikationen zur Kontrolle des Pathogens *in vitro*) konnten in der Projektlaufzeit nicht mehr bearbeitet werden.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Hymenoscyphus fraxineus zeigt in Flüssig- und auf Festmedien, die mit Blattmaterial supplementiert wurden, bei *F. excelsior* ein gutes Wachstum und bei *F. mandshurica* ein schwaches Wachstum. Die supplementierten *in vitro*-Kulturen sowie Flüssigkulturen ohne Supplement konnten nach erfolgreicher Weiterentwicklung des Aufschlusses des Mycels zum Gewinnen von hochwertigen RNA Templaten für eine komparative Transkriptomanalyse der Isolate 1431 und 1511 in der *paired-end* RNA-Sequenzierung genutzt werden. Die Supplementierung mit *F. excelsior* zeigte im Vergleich zu *F. mandshurica* und Medien ohne Pflanzenzusatz eine erhöhte Genexpression. Entsprechend des stimulierten Wachstums zeigte sich beim Isolat 1431 eine deutlich erhöhte Expression für die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Gene. Auffällig war zudem die erhöhte Genexpression von Genen beim Wachstum in Anwesenheit von *F. excelsior* mit Ähnlichkeit zu Toxin-Biosynthesewegen anderer Ascomycota. So konnte eine erhöhte Genexpression für Gene mit Ähnlichkeit zur

Depudecin-Synthese beim Isolat 1511 identifiziert werden. Zudem war bei beiden Isolaten die Expression des Phytotoxins Viridiol hochreguliert. Viridiol kann die Nekrose von Eschengewebe auslösen. Das Sezernieren der Toxine leitet vermutlich eine Beschleunigung der Blattseneszenz ein und dient der Unterdrückung anderer mikrobieller Konkurrenten. Eine solche Wechselwirkung ist für den Wirt am Ende der Vegetationsperiode in Asien weitgehend harmlos, steht aber in Europa womöglich in direktem Zusammenhang mit der Infektion und der Schädigung der Esche. Die Expression solcher an der Toxinproduktion beteiligten Gene erfolgt auch in experimentell infizierten Eschen, wie mit spezifischen qPCR Assays für *F. excelsior* und *F. mandshurica* Bäume gezeigt werden konnte, dabei treten Unterschiede auf. Die Ergebnisse stellen potentielle Genmarker für ein gutes Wachstum des Pathogens zur Identifizierung sensibler Genotypen und von Virulenzfaktoren bereit, mit der Evaluierung wurde begonnen.

Teilvorhaben 4.6

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Endophytische Pilze können durch das Ausscheiden von Sekundärmetaboliten Antagonisten von *Hymenoscyphus fraxineus* sein und besitzen daher ein hohes Potenzial als biologisches Bekämpfungsmittel gegen das Eschentriebsterben. Mit dem Ziel eine Bekämpfungsmaßnahme gegen das Eschentriebsterben zu entwickeln wurde Endophyten isoliert, in Dualkultur auf antagonistischen Metaboliten geprüft, die Strukturen der Metaboliten aufgeklärt und in einem Testsystem mit Eschensämlinge auf ihrer Fähigkeit untersucht Krankheitssymptome des Eschentriebsterbens zu unterbinden.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP10.1, AP10.2, AP10.3, AP10.4, AP10.5 (u.a. Kooperation PP4.2 JKI), AP10.6 (Kooperation PP4.7 UHH)

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Etwa 300 endophytische Pilze wurden isoliert und auf Hemmung von *H. fraxineus* in Dualkultur untersucht. Antagonistische Isolate wurden in axenisch angezogenen Eschensämlinge inokuliert und auf Hemmung von *H. fraxineus* überprüft. Aus einer Auswahl der effektivsten Endophyten wurden die Strukturen der Sekundärmetaboliten aufgeklärt und auf antifungische, antibakterielle, cytotoxische und phytotoxische Eigenschaften überprüft, u.a. um Mykotoxine auszuschließen.

Weiterhin wurde eine Auswahl jener Endophyten in einer Kooperation mit PP4.2 JKI in 2-jährigen Eschen im Gewächshaus inokuliert. Alle sechs der inokulierten Endophyten haben die Entwicklung von Symptomen des Eschentriebsterbens verringert.

In einer Kooperation mit PP4.7 UHH wurde ein mit *gfp* transformierte *H. fraxineus* in axenischen Sämlinge inokuliert und der Erfolg der Transformation mikroskopisch bestätigt. Weiterhin wurden mit Viren transfizierte *H. fraxineus* in Eschensämlinge inokuliert. Die geringe Symptomausprägung deutet darauf hin, dass die Viren dem Pathogen Hypovirulenz verleihen.

Teilvorhaben 4.7

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Teilvorhaben „Bekämpfung des Eschentriebsterbens mit Hilfe natürlich vorkommender hypovirulenter Viren“ soll ein Verfahren entwickeln, das Eschentriebsterben zu bekämpfen und damit für die nachhaltige Forstwirtschaft zur Sicherung der Waldfunktionen beitragen. Da bisher keine hypovirulenten Viren in *H. fraxineus* beschrieben worden sind, sollten von anderen Pilzen solche Kandidaten isoliert werden, um damit *H. fraxineus* künstlich infizieren und dann auf diesem Weg die virusinduzierte Hypovirulenz einsetzen zu können.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP1 Isolierung und Charakterisierung von Viren, Vorbereitung für die Transfektion

AP1.1 Beschaffung von Probenmaterial

Ursprünglich war beabsichtigt, Viren aus heimischen Basidiomyceten zu isolieren. Der Hintergrund dafür war, dass es bei diesen Missbildungen gibt, die auf eine Virusinfektion hindeuten. Hierfür wurde bei der Deutschen Gesellschaft für Mykologie ein Aufruf gestartet, Pilze mit offensichtlichen Missbildungen zur Verfügung zu stellen (Abb. 24, Kapitel II Ergebnisse).

Die Bearbeitung dieser Pilze gestaltete sich aus mehreren Gründen als schwierig. Dazu kam, dass weder von den etwa 50 eingesendeten Fruchtkörpern direkt noch von den Kulturen eine Infektion nachgewiesen werden konnte. Aus einem *Pleurotus eryngii* (Austernseitling) aus dem Supermarkt konnten wir tatsächlich isometrische Partikel reinigen und mit einer Sequenzierung als das Oyster mushroom spherical virus (OMSV) bestimmen. In der axenischen Kultur wurde jedoch das Virus verloren und konnte deswegen nicht weiter berücksichtigt werden.

Da die Suche nach virusinfizierten Basidiomyceten und deren Kultivierung erfolglos war, wurde auf Ascomyceten der Lebendsammlung der NW-FVA Göttingen (Dr. Gitta Langer) zurückgegriffen. Insgesamt wurden etwa 250 Ascomyceten aus der Sammlung bearbeitet. Darüber hinaus wurden 34 *H. fraxineus* Isolate (JKI Braunschweig) mit bekannter Pathogenität untersucht. Ein weiteres Isolat wurde von der Universität BS (M. Steinert, B. Schulz) zur Verfügung gestellt. Diese Art ist von *H. fraxineus* mittlerweile fast komplett verdrängt.

Von den 34 *H. fraxineus* Isolaten (JKI Braunschweig) wurde in 23 das Hymenoscyphus albidus mitovirus 1 (HaMV1) nachgewiesen. Ein Abgleich mit den Daten des JKI bezüglich ihrer Pathogenität ergab keine Korrelation von Virusinfektion und Reduktion der Pathogenität.

AP1.2 Sicherung und Vermehrung des Probenmaterials

Alle Ascomyceten aus der Sammlung der NW-FVA und das Isolat von *H. albidus* wurden in der Regel auf Eschenblattmedium oder auf dem jeweils optimalen Nährboden in Petrischalen vermehrt. Es wurden an der Universität Hamburg nur solche Isolate kryokonserviert, in denen Virus nachgewiesen wurde und die weiterbearbeitet wurden. Die *H. fraxineus* Isolate des JKI BS wurden für die Versuche vermehrt und nicht weiter gesichert. Alle Isolate sind zusätzlich in der NW-FVA, der Universität BS und im JKI vorhanden.

AP1.2.1 Absicherung der Spezies

Die Spezies der Isolate der NW-FVA, in denen Virus nachgewiesen worden war, wurden molekular mittels Sequenzierung der ITS-Region abgesichert. Wenn dies nicht eindeutig möglich war, wurden weitere einschlägige Sequenzen analysiert (Uni HH, NW-FVA Göttingen). Das Isolat *H. albidus* von der Universität Braunschweig wurde molekular bestätigt.

AP1.3 Prüfung auf Virusinfektion

Es gibt verschiedene Methoden der dsRNA-Isolierung, die aber alle eine größere Menge an Ausgangsmaterial benötigen, aufwändig sind oder/und mit organischen Lösungsmitteln arbeiten. Eine Zahl von über 250 Proben konnte mit diesen Methoden nicht bearbeitet werden. Der kommerziell erhältliche dsRNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam-Si, South Korea) war zwar je Probe kostenintensiv, zeigte aber sehr gute Ergebnisse auch bei kleinen Mengen an Probenmaterial (Abb. 26).

Der Kit der Firma iNtRON war während des Projektes nicht mehr lieferbar. Deswegen wurden verschiedene Kits für die RNA- und DNA-Isolierung von Pflanzen (und Pilzen) getestet und adaptiert. Zu unserer Überraschung lieferten verschiedene Kits für die Isolierung genomischer DNA von Pflanzen mit kleinen Adaptionen vergleichbar gute Ergebnisse.

In zehn der untersuchten Proben der Sammlung der NW-FVA Göttingen und dem *H. albidus* Isolat der Universität Braunschweig wurde dsRNA eindeutig nachgewiesen. Bei weiteren Proben der Sammlung waren die Ergebnisse zweideutig. Diese Proben wurden nicht weiterbearbeitet.

AP1.3.1 Isolierung und Sequenzierung von viralen Strukturen

Einige Mykoviren liegen als nackte RNA in der Zelle vor, die sich für eine spätere Transfektion von *H. fraxineus* nicht eignet. Vielmehr sind nur solche Viren geeignet, die durch das Verpacken in eine Proteinhülle Partikelstrukturen ausbilden. Deswegen wurden die Proben, in denen virale dsRNA nachgewiesen worden war (Tabelle 1, II Ergebnisse) auf das Vorhandensein viraler Partikel getestet. Dafür wurde das Myzel zunächst auf Nährmedium vermehrt, geerntet und daraus virale Partikel isoliert.

Die Proben wurden mittels NGS sequenziert und zur Vervollständigung wurde die Sequenzierung nach Sanger herangezogen. Alle detektierten Virusinfektionen waren bisher nicht bekannt und wurden teilweise als Erstbeschreibungen veröffentlicht. Uns lagen also Viruspartikel vor, die für die Transfektion geeignet waren.

AP2 Etablierung der Transfektion von *H. fraxineus*

Zunächst wurde ein Protokoll zur Generierung von Protoplasten und ihrer Regeneration entwickelt. Dies erforderte das Austesten geeigneter Enzyme zum Zellwandverdau, die Einstellung der Bedingungen zur Lebensfähigkeit sowie die Regeneration der Protoplasten zu einem Myzel unter verschiedenen Bedingungen. Für die stabile Transformation, die parallel „on top“ etabliert wurde, mussten geeignete Antibiotika und ihre optimalen Konzentrationen ermittelt werden. Mit Reporter-gen-exprimierenden Mutanten konnte Myzel in Wurzelspitzen von *in vitro* infizierten Eschensämlingen detektiert werden (Abb. 29, II Ergebnisse). Die Mutanten und das Protokoll wurden den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus konnte eine gezielte Genabschaltung mit dieser Methode gezeigt werden, was ebenfalls für die Untersuchung der Biologie des Erregers auf molekularer Ebene hilfreich ist.

AP3 Transfektion von *Hymenoscyphus fraxineus* mit isolierten potenziell hypovirulenten Viren

Für die Transfektion wurden der Viruskomplex aus dem Isolat NW-FVA 5852, das HaVV1 aus *H. albidus* (beide Tabelle 4) und das in der Arbeitsgruppe etablierte hypovirulente FgV-ch9 Chrysovirus aus *Fusarium graminearum* verwendet. Nach der Regeneration wurde Myzel gesichert, was einen vom nicht-infizierten Myzel abweichenden Phänotypen aufwies.

AP3.1 Nachweis der Infektion

Myzel der drei Transfektionen wurde subkultiviert und das Virus mit Hilfe der RT-PCR auf molekularer Ebene nach Isolierung von dsRNA nachgewiesen. Ein Nachweis von dsRNA mit Hilfe der Gelelektrophorese gelang nicht, da wahrscheinlich der Virustiter zu gering war.

AP3.2 Testung des *in vitro* Phänotyps

Die transfizierten Subkulturen wurden auf ihren Phänotyp untersucht. Alle Kulturen wiesen auf Nährmedium einen verringerten Wuchs auf, was auf eine Hypovirulenz deutet. In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner der Universität Braunschweig wurden alle drei Transfektionen im Biotest auf ihre Virulenz getestet. Hier konnte bei allen Proben eine verminderte Virulenz im Vergleich zum virusfreien Myzel beobachtet werden.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Im Rahmen des Projektes wurden für die oben genannten Ergebnisse über 250 Pilzisolat auf das Vorhandensein von dsRNA als Indikator einer Infektion mit Viren getestet. Um den Durchsatz für diese große Probenanzahl zu ermöglichen, wurde eine Methode adaptiert (publiziert). Die meisten Pilze waren nicht mit *Hymenoscyphus fraxineus* verwandt, gehören aber zu den Ascomyceten. Darüber hinaus wurde ein Isolat von *Hymenoscyphus albidus* untersucht und darin ein neues Virus isoliert (publiziert). Alle Isolate stammten von den Projektpartnern der NW-FVA Göttingen und der Universität Braunschweig. Ein Screening von Isolaten von *H. fraxineus* (Projektpartner JKI Braunschweig) auf Virus ergab eine etwa 50 %-ige Durchseuchung mit einem Mitovirus, welches aber keine Auswirkung auf die Infektiosität hatte und damit nicht für den Einsatz von Hypovirulenz geeignet ist (publiziert). Insgesamt wurden mehrere geeignete Virusisolate gefunden, von denen fünf weiter charakterisiert wurden (publiziert). Als Nebenergebnis wurde durch die Charakterisierung des Viroms von ausgewählten Pilzisolaten ein tieferes Verständnis der Virus-Pilz-Beziehung erhalten, das für weitere Einsätze zur Hypovirulenz hilfreich sein wird. Die Methode der Pilztransformation wurde zu dem Projektpartner RLP Agrosience erfolgreich portiert.

Eine Methode zur artifiziellen Infektion der oben genannten Virusisolate in *H. fraxineus* wurde entwickelt (publiziert). Für die Entwicklung dieser Methode wurde zunächst eine Methode zur stabilen Transformation etabliert. Als Nebenergebnis wurden Isolate von *H. fraxineus* mit Reporter-genen markiert. Diese Stämme sind dazu

geeignet, den Infektionsverlauf in der Lebendzellmikroskopie zu verfolgen, und ermöglichen damit einen tieferen Einblick in die Biologie des Erregers. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die Methode für ein *targeted gene knockout* geeignet ist. Es ist also möglich, gezielt Gene auszuschalten, was für die weitere Erforschung der Biologie des Erregers von fundamentaler Bedeutung sein wird (publiziert).

Der virulente *H. fraxineus* Stamm NW-FVA 1856 wurde mit zwei verschiedenen Viren und einem Viruskomplex (nicht publiziert) transfiziert und die Stabilität der Transfektionen in Subkulturen verifiziert. Alle drei Transfektionen zeigten in Subkulturen den für die Hypovirulenz typischen reduzierten Wuchs auf Nährmedium (publiziert). Das *Fusarium graminearum* virus China-9 (FgV-ch9), von dem die Hypovirulenz auf *Fusarium graminearum* bereits bekannt war, und das aus dem verwandten *H. albidus* isolierte Hymenoscyphus albidus victorivirus 1 (HaVV1) wurden eingehender im Biotest auf Eschensämlingen in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner der Universität Braunschweig untersucht. Erste Ergebnisse zeigen hier eine deutlich geringere Infektiosität als der virusfreie Stamm.

Im Projekt FraxVirHyp konnte also gezeigt werden, dass der Einsatz von hypovirulenten Viren, die von verwandten oder nicht verwandten Pilzstämmen isoliert und künstlich übertragen wurden, grundsätzlich möglich ist. Hierfür wurden mehrere Viren isoliert und charakterisiert und Methoden zum Viruscreening und zur Transfektion entwickelt. Als Nebenergebnis stehen Methoden zur Verfügung, um die Biologie des Erregers in einer Tiefe, die vorher nicht möglich war, zu untersuchen.

Teilvorhaben 4.8

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

RNA Interferenz –vermittelte Bekämpfung von *Hymenoscyphus fraxineus*

Es sollen dsRNA-Moleküle designed werden, die über Sequenzhomologie lebensnotwendige Gene von *H. fraxineus* stilllegen, und damit die Infektion zum Stillstand bringen. Aus den Transkriptomdaten, die von uns selbst erzeugt, bzw. die von Konsortialpartnern bereitgestellt werden, können die Sequenzen lebensnotwendiger Gene von *H. fraxineus* identifiziert werden. Diese dsRNA-Moleküle sollen mit der von uns entwickelten Stamminjektion in infizierte Eschensämlinge, die im Rahmen des Verbundes zur Verfügung gestellt werden, eingebracht und ihre Wirksamkeit überprüft werden.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Fertiggestellt: AP12.1, AP12.2, AP12.3, AP12.4

Teilweise Bearbeitung: AP12.5, AP12.6, AP12.7

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

In dieser Studie haben wir *in silico* Beweise für das Vorhandensein eines funktionellen RNA-Interferenz-Signalwegs in *Hymenoscyphus fraxineus* erbracht. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die transgene Expression einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) zu einer Hemmung der Translation ihres Zielgens, der Polyketid-Synthase, einem Pilz-Endogen, führt. Wir untersuchten, ob die dsRNA exogen eingeführt werden kann und zeigten, dass *H. fraxineus* extern applizierte dsRNA-Moleküle aufnehmen kann. Diese Studie beleuchtet den Mechanismus der RNA-Interferenz in *H. fraxineus* und schlägt exoRNA-Anwendungen als vielversprechenden Ansatz zur Bekämpfung des Eschentriebsterbens vor.

Teilvorhaben 4.9

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Die Bekämpfung des Eschentriebsterbens erfolgt derzeit durch die Entnahme befallener Bäume, sowie durch die Markierung, Beobachtung und Auslese symptomfreier Einzelbäume. Eine sinnvolle und möglicherweise synergistisch wirkende Ergänzung dieser Maßnahmen besteht in der biologischen Kontrolle der Erkrankung durch mikrobielle Antagonisten, die den Schaderreger direkt hemmen oder durch Konkurrenz unterdrücken. In einem vorhergehenden FNR-Projekt (Frax-ProMic) konnten spezifische Bakterien- und Pilzgruppen im Mikrobiom widerstandsfähiger Eschen nachgewiesen werden. Isolate dieser Taxa stellen erfolgsversprechende Kandidaten zur Ausprägung einer Kolonisationsresistenz dar. Darüber hinaus wurden *in vitro* antagonistische Isolate mit deutlich wachstumshemmenden Effekten gegenüber *H. fraxineus* identifiziert. Nach der *in planta* Prüfung unter Gewächshausbedingungen wurden wirksame antagonistische Isolate und mikrobielle Konsortien als aussichtsreiche Kandidaten für die biologische Kontrolle zur Verfügung gestellt werden.

Ziel des Projektes war es, unter Nutzung dieses Materials das Mikrobiom von Eschen unter Freilandbedingungen so zu beeinflussen, dass die Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Pathogen erhöht wird. Durch die Verwendung selektierter widerstandsfähiger Eschen-Genotypen (Zusammenarbeit mit dem Verbund FraxGen) sollte die Wirkung über synergistische Effekte optimiert werden. Nach der Entwicklung stammspezifischer real-time PCR-Systeme sollte die erfolgreiche und langfristige Etablierung der Inokulationsstämme überprüft und auch ihre Wirkung gegenüber dem Pathogen in Abhängigkeit vom Pflanzengenotyp evaluiert werden. Hierzu waren Inokulationsversuche im Freiland geplant, die über mehr als eine Vegetationsperiode und an zwei Standorten erfolgen sollten. Neben der Bonitur der Pflanzen und der Überprüfung der Etablierung der Inokulationsstämme wurde die Infektion mit *H. fraxineus* quantitativ erfasst und die Auswirkung auf das Mikrobiom der Eschen untersucht.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP13.1 Entwicklung stammspezifischer real-time PCR-Systeme zum Nachweis der Etablierungsfähigkeit und zur Quantifizierung der Persistenz der Inokulationsstämme

AP13.1.1 Design stammspezifischer Primer und Sonden basierend auf der Genom-Sequenzierung der zu prüfenden Stämme

Durch die Entwicklung eines neuen Workflows konnten stammspezifische Regionen im Genom von drei ausgewählten Bakterienstämmen (B3P038, C2P003, D4P002) identifiziert werden. Basierend auf diesen Sequenzfragmenten wurden qPCR-Assays entwickelt.

AP13.1.2 Etablierung der PCR-Systeme: Prüfung Sensitivität und Effizienz sowie der Spezifität

Die Überprüfung der qPCR-Systeme für diese Bakterienstämme ergab eine hohe Spezifität (stammspezifisch) und Sensitivität (hohe Effizienz, Nachweis 1 Kopie des Zielgens). Die Eignung der entwickelten qPCR-Assays wurde unter Gewächshausbedingungen bestätigt. Hier war ein quantitativer Nachweis nach Inokulation von Eschensämlingen in verschiedenen Pflanzenorganen möglich.

*AP13.2 Detaillierte Analyse einzelner antagonistischer Stämme des bakteriellen Mikrobioms von *F. excelsior**

Basierend auf der Genomanalyse und physiologischen Untersuchungen wurden zwei ausgewählte Bakterienstämme (*A. altamirensis* C2P003 und *S. fraxinea* B3P038) detailliert bezüglich ihrer Wirkung zur Minderung des Eschentriebsterbens und ihrer hierfür vorhandenen genetischen Ausstattung untersucht.

*AP13.3 Prüfung der antagonistischen Mikroorganismen und Konsortien an verschiedenen widerstandsfähigen *F. excelsior* Genotypen im Freilandversuch (Analyse der Performance der inokulierten Eschen und der Widerstandsfähigkeit gegenüber *H. fraxineus*, Bestimmung der Persistenz der Inokulationsstämme)*

In Zusammenarbeit mit dem Thünen-Institut für Forstgenetik wurde die Untersuchungsfläche ausgewählt und die Plusbaum-Nachkommenschaften für den Freilandversuch bereitgestellt. Im Juni 2021 wurden die jungen Eschen mit 10 verschiedenen Inokulationsstämmen/Konsortien inokuliert. Neben der Bonitur der Eschen wurde die Abundanz der Inokulationsstämme und der Befall mit *H. fraxineus* quantifiziert. In diesem Versuch kam es nur zu einer geringen Etablierung der Stämme, ebenso wie auch der Befall mit *H. fraxineus* erst zum Ende der Vegetationsperiode einsetzte.

AP13.4 Bewertung der geprüften Antagonisten und Konsortien nach ihren Wirkungen im Freiland und Auswahl der effektivsten Antagonisten und Konsortien

Neben den unter AP 13.3 erhobenen Daten war es für die Bewertung der Antagonisten und Konsortien bedeutsam, auch ihre Wirkung auf das Mikrobiom der Eschensämlinge zu analysieren. Hierdurch ergab sich ein Gesamtbild der Wirkung, incl. der Pflanze-Mikrobiom-Interaktion. Danach erfolgte eine erste Bewertung der Inokulationsstäme und Konsortien nach dem ersten einjährigen Freilandversuch.

AP13.5 Wiederholung der Freilandprüfung an einem alternativen Standort bzw. im Jahresvergleich

2022 erfolgte die Wiederholung des Freilandversuches auf einer Fläche des Thünen-Instituts in Waldsiedersdorf. In Zusammenarbeit mit dem Thünen-Institut wurde 2023 eine weitere Untersuchungsfläche in Briesen (Mark) ausgewählt, um die Bedingungen einer Infektionssituation in einem Eschenbestand zu nutzen. Der Inokulationsversuch wurde Ende September 2023 bonitiert, die Abundanz der Inokulationsstäme bestimmt sowie die *H. fraxineus* Infektion quantifiziert.

AP13.6 Abschließende Bewertung der Praxiseignung und Selektion der effektivsten Inokulations-stämme

Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen der Freilandversuche wurde die Wirkung der einzelnen Inokulationsstäme und der Konsortien eingeschätzt und eine Auswahl der Bakterienstämme mit der besten Eignung für eine Bekämpfung des Eschentriebsterbens getroffen.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Es wurde ein Workflow entwickelt, mit dem es möglich ist, spezifische Regionen im Genom eines Zielorganismus zu finden und auf deren Grundlage stammspezifische qPCR-Assays zu etablieren. Die qPCR-Systeme für drei ausgewählte Bakterienstämme waren spezifisch und ermöglichten einen hochsensitiven quantitativen Nachweis nach Inokulation von Eschensämlingen. In einem Freiland-Versuch mit zwei Plusbaum-Nachkommenschaften konnte für alle 10 Inokulationsvarianten ein Trend zur Verbesserung des Gesundheitsstatus gezeigt werden. Ein signifikant geringerer Anteil geschädigter Pflanzen ergab sich nach Inokulation mit *Schaurella fraxinea* B3P038 und *Luteimonas fraxinea* D4P002. Zum Ende der Vegetationsperiode war jedoch lediglich *Aureimonas altamirensis* C2P003 auf den Eschensämlingen nachweisbar. Bei der Analyse des Mikrobioms konnte gezeigt werden, dass sowohl der Pflanzengenotyp als auch einige Inokulationsvarianten einen signifikanten Einfluss auf die β -Diversität des bakteriellen und pilzlichen Mikrobioms hatten. Bedingt durch die Wetterverhältnisse konnten bei der Wiederholung des Versuchs 2022 keine verwertbaren Ergebnisse für die Bewertung der Antagonisten und Konsortien erzielt werden. Der Freilandversuch 2023 auf einem zusammenbrechenden Eschenforst zeigte, dass sich insbesondere die Stämme B3P038 und C2P003 nach der Inokulation auf den jungen Eschen etablieren können und dort persistieren. Schadbonitur und Quantifizierung zeigten ebenso einen starken Befall mit *H. fraxineus*. Besonders die Inokulation mit C2P003 und B3P038 führte zu einer signifikanten Minderung der Abundanz des Pathogens. Bisher konnten auf dieser Fläche jedoch keine eindeutig positiven Effekte auf die Pflanzengesundheit nachgewiesen werden. Letztlich scheinen somit die direkte Konkurrenz mit dem Pathogen und die Etablierungsfähigkeit der Inokulationsstäme entscheidend zu sein. Im Hinblick auf die Praxiseignung bieten sich die Stämme B3P038, C2P003 und D4P002 für die weitere Bearbeitung an.