

Demonstrationsprojekt FraxForFuture

Eschentriebsterben eindämmen durch Mikrobiom-Optimierung?

GITTA J. LANGER¹, EWALD LANGER², ANDREAS ULRICH³, BARBARA SCHULZ⁴, MICHAEL STEINERT⁴

¹ ABTEILUNG WALDSCHUTZ, NORDWESTDEUTSCHE FORSTLICHE VERSUCHSANSTALT, GÖTTINGEN

² FACHGEBIET ÖKOLOGIE, FB 10/INSTITUT FÜR BIOLOGIE, UNIVERSITÄT KASSEL

³ MIKROBIELLE BIOGEOCHEMIE, LEIBNIZ-ZENTRUM FÜR AGRARLANDSCHAFTSFORSCHUNG (ZALF) E. V., MÜNCHENBERG

⁴ INFEKTIONS BIOLOGIE, INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, TU BRAUNSCHWEIG

‘FraxForFuture’ was an interdisciplinary project to study the devastating effects of ash dieback on the host, to characterize the associated ash microbiome, and to develop non-chemical and biological control strategies to combat the pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*. Bacteria and fungi as well as fungal secondary metabolites were identified, which have an antagonistic effect against the ash dieback pathogen or can be used for microbiome optimisation. Results, conclusions, and an outlook are presented.

DOI: 10.1007/s12268-024-2317-4
© The Author(s) 2024

Das Eschentriebsterben (**Abb. 1**) bedroht die heimische Baumart Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior*). Verursacher ist der aus Asien stammende invasive Schlauchpilz *Hymenoscyphus fraxineus* (Falsches Weißes Stängelbecherchen, **Abb. 2**). Der Befall mit *H. fraxineus* führt im Gegensatz zur ursprünglichen Wirtsart, der Mandschurischen Esche (*F. mandshurica*), zu Triebster-

ben (**Abb. 2**), Stamm- und Wurzelnekrosen (**Abb. 2**) und ist hauptverantwortlich für das Absterben und den drastischen Rückgang der Eschen in europäischen Waldbeständen. Seit den ersten Beobachtungen der Krankheit in Deutschland 2002 hat sich der Erreger rasant ausgebreitet und droht das einheimische, streng an die Esche gebundene, nicht pathogene Weiße

Stängelbecherchen (*H. albidus*) zu verdrängen.

Im durch den Waldklimafonds geförderten FNR-Demonstrationsprojekt „FraxForFuture“ erforschten wir das Eschentriebsterben und den Erhalt der Baumart Gemeine Esche deutschlandweit interdisziplinär in verschiedenen Verbundvorhaben. Der Verbund Frax-Path widmete sich dem Mikrobiom der betroffenen Eschen. Daneben sollten Lösungsansätze zu einer nicht chemischen Bekämpfung bzw. biologischen Kontrolle des primären Schaderregers entwickelt werden, z. B. die RNA-Interferenz (RNAi)-vermittelte Bekämpfung von *H. fraxineus*, der Einsatz von hypovirulenten Pathogenstämmen mithilfe natürlich vorkommender Viren [1], der Einsatz von pilzlichen Antagonisten mit hemmenden Sekundärmetaboliten gegen den Schaderreger [2, 3] und die Optimierung der Mikrobiota vitaler Eschen zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber *H. fraxineus* [4]. Wir präsentieren hier die Ergebnisse zum Mykobiom der Eschenstammfüße, der Feinwurzel, zum Mikrobiom der Krone sowie zu potenziellen pilzlichen Antagonisten und deren Sekundärmetaboliten.

Mykobiom der Eschenstammfüße

Da Stammfußnekrosen, meist primär verursacht durch *H. fraxineus*, als Hauptmortalitätsfaktoren des Eschentriebsterben gelten, isolierten und identifizierten wir die assoziierten Pilze. Insgesamt wiesen wir weit über 250 verschiedene Pilzarten an Eschen unterschiedlicher Standorte nach. Die festgestellten Pilzgemeinschaften unterscheiden sich deutlich an den Standorten; es gibt nur wenige Arten, die eine hohe Frequenz (Anteil einer Art an den Gesamtisolaten) haben und an den meisten Standorten auftreten. Am häufigsten kommt *Diplodia fraxini* vor, gefolgt von *H. fraxineus* und *Armillaria* spp. *Hymenoscyphus albidus*, das nur Eschenblätter infizieren kann, ist nicht am Schadprozess der Stammfußnekrosen beteiligt. Dagegen konnten wir zahlreiche Arten erstmals an Gemeiner Esche beschreiben, z. B. *Cryptostroma corticale* (Erreger der Rußbrinden-



◀ **Abb. 1:** Eschentriebsterben an Gemeiner Esche. Links: Esche im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (Schadstufe 4 von fünf Schadensufen; 0 = gesund und 5 = tot) mit einer Sekundärkronenbildung. Rechts: Esche mit mittlerer Schadstufe (3) mit einer Primärkronenbildung (Foto: G. Langer).

krankheit des Ahorns) oder *Diplodia sapinea* (Erreger des Diplodia-Triebsterbens von Koniferen). Zudem beschrieben wir die eschenassoziierte Mikropilzart *Vexillomyces fraxinicola* erstmals [5, 6].

Mykobiom der Eschenfeinwurzeln

Eine Untersuchung der Feinwurzeln befallener Eschen aus sechs Bundesländern ergab eine sehr hohe Biodiversität an Pilzarten. Wir nutzten die Next-Generation-Sequenzierungsplattform Oxford Nanopore MinION zur Sequenzierung der gesamten ITS-Region der Proben. Nach einer bioinformatischen Filterung verknüpften wir 1.124 OTUs (*operational taxonomic unit*) mit einer taxonomischen Zuordnung (Art, Gattung etc.). Die häufigsten Phyla in allen Proben waren Basidiomycota (342) und Ascomycota (511). Der Artenreichtum in sterilisierten Wurzeln unterschied sich signifikant von unsterilen Wurzeln und wurzelanhaftendem Boden. Überraschenderweise kamen in sterilisierten Wurzeln die Gattungen *Delicatula*, *Mycena* und *Mycenella* am häufigsten vor [7]. Letztere sind Hutpilze mit saprober Lebensweise, für die es erste Hinweise gibt, dass sie Mykorrhiza-ähnliche Eigenschaften aufweisen [8] und so zur Mikrobiomoptimierung der Esche eingesetzt werden könnten. Von den für die Esche bekannten vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilzen (Glomeromycota) wurden elf verschiedene Gattungen in unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen.

Mikrobiom der Eschenkrone

Das Mikrobiom von Eschenblättern toleranter und anfälliger Genotypen unterscheidet sich, und bestimmte Mikroben kommen bevorzugt auf toleranten Eschen vor [9, 10]. Bei der Inokulation mit potenziell antagonistischen Bakterien hemmen unter Gewächshaus- und Baumschulbedingungen einige Isolate den Erreger des Eschentriebsterbens. Für zwei dieser Isolate mit hemmender Wirkung (*Luteimonas fraxinea*, *Aureimonas altamirensis*) wiesen wir eine Veränderung des Mikrobioms noch 15 Monate nach Inokulation nach [11]. Zu diesem Zeitpunkt waren beide Bakterienstämme nicht mehr an/in der Pflanze detektierbar. Wiederholungen des Versuchs zeigten eine starke Wetterabhängigkeit bezüglich des Inokulationserfolgs, der Infektion mit dem pathogenen Pilz und des Gesundheitszustands der Sämlinge. In einem stark erkrankten Eschenbestand konnten sich ein künstlich eingebrachter *A. altamirensis*- und ein *Schauerella fraxinea*-



◀ **Abb. 2:** Erreger und Symptome des Eschentriebsterbens. Links: Fruchtkörper von *Hymenoscyphus fraxineus* auf einer sklerotisierten Eschenblattspindel. Mitte: Triebsterben. Rechts: Stammfußnekrose (Fotos: NW-FVA Abt. Waldschutz).

Stamm auf den gepflanzten jungen Eschen etablieren und dort persistieren. Es bleibt jedoch zu klären, inwieweit eine Persistenz der Inokulationsstäme und/oder dauerhafte Änderung des Mikrobioms verbunden mit einer signifikanten Eindämmung des Eschentriebsterbens an unterschiedlichen Standorten erreicht werden kann.

Endophyten als potenzielle Antagonisten

Endophytische Pilze können durch das Ausscheiden von Sekundärmetaboliten Antagonisten von *H. fraxineus* sein und besitzen daher ein hohes Potenzial als biologisches Bekämpfungsmittel gegen das Eschentriebsterben. Im Rahmen von FraxPath isolierten wir mehrere Hundert endophytische Pilze, wovon über 150 antagonistisch gegen *H. fraxineus* wirkten. Neben Erreger-Antagonisten-Dualkulturen und Therapieversuchen in axenisch kultivierten Eschensämlingen führten wir auch erfolgreiche *in planta*-Experimente in Eschen mit antagonistischen Endophyten durch. Pilzliche Mykotoxin-Produzenten wurden von der weiteren Entwicklung zum biologischen Pflanzenschutzmittel ausgeschlossen. Die Resistenzstimulation der Eschen mit attenuierten *H. fraxineus*-Isolaten (Priming) [12] wie auch Hypovirulenz-Viren erwiesen sich als potenziell wirkungsvolle Schutzmaßnahmen. Hypovirulente Viren

reduzieren die Virulenz des Erregers und können so die Symptomatik des Eschentriebsterbens verringern.

Sekundärmetabolite pilzlicher Antagonisten

Die Schutzwirkung und Therapieerfolge der pilzlichen Endophyten beruhen in erster Linie auf sekundären Metaboliten, die *H. fraxineus* hemmen oder das Immunsystem der Eschen stimulieren. Daher klärten wir die chemischen Strukturen von antifungischen Metaboliten, die *H. fraxineus* in Dualkultur mit Endophyten hemmen, auf. Hierfür gewannen wir aus entsprechenden Pilzisolaten Kulturextrakte, isolierten sie mittels chromatographischer Verfahren Reinsubstanzen bioaktivitätsgeleitet und klärten die chemischen Strukturen der Metaboliten mithilfe der Kernresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie auf. So charakterisierten wir Metaboliten aus den schützend wirkenden Endophyten *Pezicula ericae* [2] und *Penicillium manginii* [3]. Weitere vielversprechende Endophyten sind u. a. *Hypoxylon rubiginosum*, *H. petriniae* und *Pezicula livida*.

Mikrobiom optimieren

Die erzielten Ergebnisse zum Mikrobiom der Gemeinen Esche liefern neben ihrem Potenzial zur Entwicklung nicht-chemischer Bekämpfungsstrategien einen großen Beitrag

zur Kenntnis der Biodiversität der mit Esche assoziierten Mikroorganismen. Als ein Weg der naturbasierten Kontrolle des Eschentriebsterbens sollte die Mikrobiom-Optimierung mittels der Inokulation mit Bakterien und/oder Pilzen weiterverfolgt werden. Der Vergleich verschiedener Inokulationsmethoden soll einer Optimierung der Wirkung, Persistenz, Dissemination und Resistenz der protektiven epi- und endophytischen Stämme dienen. Da die protektiven Wirkungen der mikrobiellen Metabolite auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen können, testen wir, ob sich durch Kombination verschiedener Inokulationsstämmes synergetische Effekte erzielen lassen. Darüber hinaus werden weitere Mechanismen der Mikrobiom-Optimierung in die Untersuchung einbezogen, wie die Kolonisierungsresistenz oder die Induktion einer systemischen Resistenz in der Esche.

Danksagung

Wir sind den Bundesministerien für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) und für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV) sowie der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR) zu Dank verpflichtet, da unsere Forschung im Rahmen des Waldklimafonds gefördert wurde (FraxPath, Förderkennzeichen: 2219WK22A4, -D4, -F4 und -I4). ■

Literatur

- [1] Lutz T, Ridley M, Haderl B et al. (2023) Evaluation and identification of viruses for biocontrol of the ash dieback disease. *J Plant Dis Prot*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00804-x>
- [2] Demir Ö, Zeng H, Schulz B et al. (2023) Bioactive Compounds from an Endophytic *Pezizula* sp. Showing Antagonistic Effects against the Ash Dieback Pathogen. *Biomolecules* 13: 1632
- [3] Demir Ö, Schulz B, Rabsch L et al. (2024) Strong antagonism of an endophyte of *Fraxinus excelsior* towards the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, is mediated by the antifungal secondary metabolite PF1140. *Appl Environ Microbiol* 90: e0066524
- [4] Langer GJ, Fuchs S, Osewold J et al. (2022) FraxForFuture – research on European ash dieback in Germany. *J Plant Dis Prot* 129: 1285–1295
- [5] Peters S, Fuchs S, Bien S et al. (2023) Fungi associated with stem collar necroses of *Fraxinus excelsior* affected by ash dieback. *Mycol Progress* 22: 52
- [6] Tan YP, Bishop-Hurley SL, Shivas RG et al. (2022) Fungal Planet description sheets: 1436–1477. *Persoonia* 49: 261–350
- [7] 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*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00923-z>
- [8] Grellet G-A, Ba R, Goeke DF et al. (2017) A plant growth-promoting symbiosis between *Mycena galopus* and *Vaccinium corymbosum* seedlings. *Mycorrhiza* 27: 831–839
- [9] Becker R, Ulrich K, Behrendt U et al. (2020) Analyzing Ash Leaf-Colonizing Fungal Communities for Their Biological

Control of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Front Microbiol* 11: 590944

- [10] Ulrich K, Becker R, Behrendt U et al. (2020) A Comparative Analysis of Ash Leaf-Colonizing Bacterial Communities Identifies Putative Antagonists of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Front Microbiol*, DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00966>
- [11] Becker R, Ulrich K, Behrendt U et al. (2022) Genomic Characterization of *Aureimonas altamirensis* C2P003 – A Specific Member of the Microbiome of *Fraxinus excelsior* Trees Tolerant to Ash Dieback. *Plants* 11: 3487
- [12] Ridley M, Demir Ö, Charria-Girón E et al. (2024) Priming of ash saplings with a low virulent *Hymenoscyphus fraxineus* strain as a possible disease control approach for reducing symptoms of ash dieback. *J Plant Dis Prot*, DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4348277/v1>

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle

ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Gitta Langer
 Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt,
 Abteilung Waldschutz
 Mykologie und Komplexerkrankungen
 Grätzelstraße 2
 D-37079 Göttingen
gitta.langer@nw-fva.de
www.nw-fva.de/wir/abteilungen/waldschutz/mykologie

AUTORINNEN UND AUTOREN



Gitta Langer

Diplom-Biologin. 1994 Promotion am Lehrstuhl Spezielle Botanik und Mykologie, Universität Tübingen zu Systematik und Biodiversität holzbewohnender Pilze. 1996 Anton-Deby-Preis; Koordinatorin des DFG-Graduiertenkollegs „Organismische Interaktionen in Waldökosystemen“ und des Verbundvorhabens FraxPath in FraxForFuture.



Ewald Langer

Diplom-Biologe. Seit 2002 Fachgebietsleiter Ökologie an der Universität Kassel. 1994 Promotion am Lehrstuhl Spezielle Botanik und Mykologie, Universität Tübingen über Systematik und Biodiversität holzbewohnender Pilze. 2001 Habilitation in der Fakultät für Biologie, Tübingen; Leitung des Verbundvorhabens FraxPath TV4 FraxRhizo in FraxForFuture.



Barbara Schulz

1968 Bachelor Biologie, Reed College, USA. 1972 Diplom-Biologie, TU Braunschweig. 1980 Promotion Biologie, TU Braunschweig. 1986–1991 Inst. Mikrobiologie, TU Braunschweig. 1991–1993 Institut für Pflanzenbiochemie, Halle. Seit 1993 Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig. 2003 Habilitation Pflanzenpathologie TU Braunschweig.



Michael Steinert

Diplom-Biologe. 1996 Promotion am Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg; PostDoc Centers for Disease Control, USA. 2007 Professor für Mikrobiologie; Vorstandsmitglied Graduiertenschule Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung; Flying Faculty Member Türk-Alman Üniversitesi, Istanbul; ERASMUS-Auslandsfachkoordinator.



Andreas Ulrich

Diplom-Biologe. 1993 Promotion am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld; Bakteriengenetik sowie Wechselbeziehung zwischen Boden- und pflanzenassoziierten Mikroorganismen; wissenschaftlicher Mitarbeiter im Bereich Mikrobielle Ökologie am Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF) e. V., Müncheberg.