

Selektion, Prüfung und Anzucht von wurzelechten und klimaangepassten Straßen- und Alleebaumsortimenten für die Baumschulproduktion

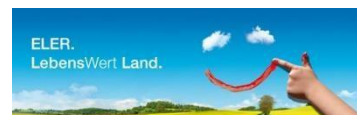
(Trees4Streets)

Zuwendungsempfänger	Lorberg Quality Plants GmbH & Co.KG Stefan Lorberg www.lorberg.com Zachower Straße 4, 14669 Ketzin OT Tremmen, Herr Hanno-Friedrich Leight Tel: 033233 84 150 mail: leight@lorberg.com
Projektkoordination	
Mitglieder der Operationellen Gruppe	Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde Ralf Kätzel Humboldt-Universität zu Berlin Antje Schüttig Sämann Pflanzenkontor GmbH Martin Sämann Baumschulen Nauen GmbH Margarethe Hobohm
assoziierter Partner	Pflanzenschutzamt Berlin Martin Schreiner
Projektlaufzeit:	15.02.2016 – 30.04.2022
Budget	1.651.966,27 €

Datum:	14.09.2022
Autoren	Prof. Ralf Kätzel Antje Schüttig Sonja Löffler Julia Eckardt Margarethe Hobohm Ronja Lorberg



EUROPÄISCHE UNION
Europäischer Landwirtschaftsfonds
für die Entwicklung des
ländlichen Raums



Inhaltsverzeichnis

1	Kurzfassung in deutscher Sprache.....	1
2	Kurzfassung in englischer Sprache.....	1
3	Situation zu Projektbeginn	2
3.1	Ausgangssituation	2
3.2	Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens.....	3
4	Projektverlauf	4
5	Projektergebnisse	10
5.1	<i>In vitro</i> -Versuche.....	10
5.2	<i>In vivo</i> -Versuche.....	20
5.3	Weiterkultur der <i>in vitro</i> erzeugten Gehölze zum Alleebaum.....	37
5.4	Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen	41
5.5	Beitrag der Ergebnisse zu förderpolitischen EIP-Zielen	43
5.6	Nutzen der Ergebnisse für die Praxis.....	44
5.7	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	45
5.8	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen ⁴⁶	
5.9	Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit und weiterführende Fragestellungen.....	47
6	Zusammenarbeit der operationellen Gruppe	48
7	Kommunikations- und Disseminationskonzept	48
	Literaturverzeichnis.....	57

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Prolingehalt [% AS] der Blätter von *Tilia cordata* 'Wega' und *Tilia dasystyla* nach drei Wochen In-vitro-Kultur in den MS-Mediumvarianten M1 (1650 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Nicotinsäure), M2 (825 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Pyridoxin) und M3 (2475 mg/l NH_4NO_3 + dreifache Makronährstoffe + 0,2 mg/l Pyridoxin) nach MURASHIGE & SKOOG (1962); je in fester (8 g/l Agar; „Fest“) und flüssiger Kulturform (Temporary Immersion System; „TIS“) 14
- Abb. 2:** Prolingehalt [% AS] der Sprosse von *Tilia cordata* 'Wega' und *Tilia dasystyla* nach drei Wochen In-vitro-Kultur in den MS-Mediumvarianten M1 (1650 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Nicotinsäure), M2 (825 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Pyridoxin) und M3 (2475 mg/l NH_4NO_3 + dreifache Makronährstoffe + 0,2 mg/l Pyridoxin) nach MURASHIGE & SKOOG (1962); je in fester (8 g/l Agar; „Fest“) und flüssiger Kulturform (Temporary Immersion System; „TIS“) 15
- Abb. 3:** Drei Auftausalzkoncentrationsvarianten (0g/l ATS, 2,9 g/l ATS, & 5,8 g/l ATS) des Versuches 2: Stressinduktion nach 6 Wochen Kulturdauer 18
- Abb. 4.:** Prozentualer Boden-Restwassergehalt der unbewässerten Versuchsvariante in Abhängigkeit von der Versuchsdauer bzw. der untersuchten Klone exemplarisch für das Versuchsjahr 2019 22
- Abb. 5:** Versuchspflanzen zu Beginn des Trockenstressversuchs (03.07.2019) 22
- Abb. 6:** Zustand der Versuchspflanzen nach ca. drei Wochen Trockenstress (25.07.2019); 22
- Abb. 7:** Relativer Gehalt ausgewählte Blatinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Tilia x europaea* 'Konings' (Klon 77000) 23
- Abb. 8 :** Relativer Gehalt ausgewählte Blatinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3) 24
- Abb. 9:** Relativer Gehalt ausgewählte Blatinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Acer davidii* 'Rosalie' (Klon 50.3) 24
- Abb. 10:** Relativer Gehalt ausgewählte Blatinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Platanus x hispanica* (Klon 11.3) 25
- Abb. 11:** Blattwassergehalt in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt der beiden *Acer*-Klone (50.3; 19.05) und des *Platanus*-Klons (11.3) 25
- Abb. 12.:** Reihenfolge des Blattwasserverlustes in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt 26
- Abb. 13:** Spross- und Wurzellängen sowie deren absoluten und prozentualen Verhältnisse aller Klone im Versuchsjahr 2019 differenziert nach Stressvarianten (K=bewässerte Kontrolle; TS=Trockenstress, Erläuterung im Text) 31
- Abb. 14:** Untersuchung der Wurzelmorphologie der Klone nach unterschiedlicher Trockenstressbehandlung (links: *Tilia dasystyla* (Klon 36.3); Pfl. 57; rechts: *Platanus x hispanica* (Klon 11.3); Pfl. 133) 31
- Abb. 15.:** Ergebnisse der Austriebsbonitur im Frühjahr 2020 nach dem Trockenstress 2019 differenziert nach Arten/Klonen in drei Vitalitätsstufen 32
- Abb. 16:** Reihenfolge des erfolgreichen Wiederaustriebs der Klone im folgenden Frühjahr nach dem Trockenstress 32
- Abb. 17:** Probengewinnung für die (epi-)genetischen Untersuchungen in flüssigen Stickstoff während des Trockenstressversuches 2019 33

Abb. 18: Akklimation der in vitro-Pflanzen im Forschungsgewächshaus der HU Berlin	39
Abb. 19: Packen der ca. 3000 Jungpflanzen für die Weiterkultur in der Baumschule Nauen	39
Abb. 20.: Vergleich Akklimation 2018 (links, Standard-Methode) und 2019 (rechts, neu entwickeltes Fog- System)	39
Abb. 21: Akklimation von 2019, (links: Ahorn und rechts: Ulme)	40

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zeitplan des Projektes Trees4Streets von 2016 bis 2022 für die 7 Arbeitspakete	4
Tab. 2: Absolute Überlebensrate sowie der Prolingehalt der Explantate von <i>Tilia cordata</i> 'Wega' und <i>Tilia</i> 'Humboldt' im Versuch: Trockenstressinduktion durch Trocknung der Sprosse auf Silikagel	12
Tab. 3.: Anzahl der untersuchten Klone je Art im Untersuchungsjahr 2019	21
Tab. 4: Zuordnung der Bäume der <i>Tilia x europaea</i> 'Konings' (Klon 77000) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt	27
Tab. 5: Zuordnung der Bäume der <i>Tilia dasystyla</i> (Klon 36.3) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt	27
Tab. 6: Zuordnung der Bäume der <i>Tilia cordata</i> 'Wega' (Klon 67.3) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt	28
Tab. 7: Zuordnung der Bäume des Schlangenhautahorns Klon 50.3 in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt	28
Tab. 8: Zuordnung der Bäume des <i>Acer platanoides</i> (Klon 19.05) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt	29
Tab. 9: Zuordnung der Bäume der <i>Platanus x hispanica</i> (Klon 11.3) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt	29
Tab. 10: Probennahmeplan mit Angabe der Sequenzierungsmethode. Alle Proben: MACE-Seq, M: Methyl-Seq, R: RNA-Seq, S: smallRNA-Seq.	33
Tab. 11: Anzahl der differenziell exprimierten Gene in <i>Tilia</i> -Linien (<i>T. cordata</i> 'Wega' (Klon 67.3), <i>T. x europaea</i> 'Konings' (Klon 77000) und <i>T. dasystyla</i> (Klon 36.3)) nach Trockenstressbehandlung mit mindestens 100 Reads und einer Expressionsänderung >2-fach.	34
Tab. 12: Klonbezeichnungen der in vitro erzeugten Projektpflanzen	41
Tab. 13: Darstellung der Stakeholder und Akteure in Bezug auf die Gehölzproduktion	49

1 Kurzfassung in deutscher Sprache

Gegenwärtig sind für den urbanen Raum produzierte Gehölze an künftige Witterungsextreme nur unzureichend angepasst. Vor diesem Hintergrund arbeiteten drei Baumschulbetriebe, zwei Forschungseinrichtungen und Kommunen im Rahmen einer Operationellen Gruppe zur Produktion neuer klimaangepasste Baumsortimente für die Region Berlin-Brandenburg mit dem Ziel zusammen, neue wurzelechte, stresstolerantere Gehölzsortimente für Straßenbäume zu entwickeln. Hierfür wurden die methodischen Grundlagen für Screening- und Zertifizierungsverfahren für die klimawandelangepassten Gehölze erarbeitet. Die im Projekt potenziell trockentoleranten, wurzelechten Gehölze werden in Demonstrationspflanzungen in der Baumschule und in Kommunen für Informations-, Marketing- und Monitoringzwecke angelegt. Mit den entwickelten *in vitro*-Schnelltestverfahren (Stresstests und Biomarkermuster auf der Basis wurzelechter Klone) kann der Selektions- und damit der Produktionszeitraum um mindestens 2 Jahre verkürzt und somit Kosten reduziert werden.

2 Kurzfassung in englischer Sprache

Currently, woody plants produced for urban areas are insufficiently adapted to future climate extremes. As a result, three nurseries, two research institutions and municipalities cooperated within the framework of an operational group for the production of new climate-adapted tree assortments for Berlin-Brandenburg, with the goal of developing own-root trees and a more stress-tolerant assortment of street trees. For this purpose, the methodological basis for screening and certification procedures for the climate-change-adapted woody plants was developed. The potentially drought-tolerant, own-root plants developed in the project will be planted in demonstration areas both in the nursery and in cities for informative, marketing, and monitoring purposes. With the newly developed rapid *in vitro* test procedure (stress tests and biomarker patterns based on own-root clones), the selection- and production period can be shortened by at least two years, resulting in reduced costs.

3 Situation zu Projektbeginn

3.1 Ausgangssituation

Die „Deutsche Anpassungsstrategie an den Klimawandel“ (DAS, UBA 2015, S.46) sieht die Möglichkeit einer Milderung der Auswirkungen des Klimawandels in Städten durch eine Stabilisierung und Förderung von Grünflächen und Gehölzanpflanzungen. Dem steht entgegen, dass urbane Räume bereits jetzt für Gehölze Extremstandorte darstellen, an die nur wenige Sorten ausgewählter Arten über einen begrenzten Zeitraum angepasst sind. Für das alleinreiche Brandenburg und den Ballungsraum Berlin-Potsdam wird sich die erwartete, weitere Häufung von Klimaextremen (z.B. Trockenheit und Hitze in der Vegetationszeit) besonders nachteilig auswirken. Das Umweltbundesamt (UBA) kommt zu dem Schluss, dass sich insbesondere Straßenbäume künftig *„als klimatisch nicht mehr geeignet für die Verwendung im urbanen Raum erweisen ... dürften“*. Bereits 2013 forderte das UBA den städtischen Baumbestand nachhaltig zu sichern und weiterzuentwickeln. Die Baumschulbranche verfügte vor Projektstart noch über keine geprüften, klimaangepassten Gehölzsortimente, die den Kommunen bzw. den Straßenämtern für Alleepflanzungen angeboten werden können. (*Anm.: Klimaangepasste Gehölzsortimente für die Region Berlin/Brandenburg beziehen sich insbesondere auf Trockenstress, Hitze- und Spätfrosttoleranz*). Die Ursachen hierfür sind in mehreren Problemen zu begründen.

Die bisherige Baumschulpraxis setzte bei der vegetativen Vermehrung von Klonen mit den gewünschten, selektierten Eigenschaften vorrangig auf die Pfropfung des genetisch einheitlichen Materials auf genetisch unterschiedliche Wurzelunterlagen. Es bestand daher die Herausforderung auch wurzelechte Sorten über *in vitro*-Kulturen in großen Stückzahlen für die Freilandanzucht in den Baumschulen bereitzustellen.

Die Vitalitätsentwicklung von Gehölzen wurde den bisherigen Versuchsanbauten (fast ausschließlich) durch hoch variable, unspezifische phänotypische Merkmale (Wachstum, Blattschäden, Blattverlust, Schäden an Krone und Stamm etc.) beschrieben. Es fehlt bislang die Anwendung von physiologischen Markern, welche auf der Grundlage kausaler Ursache-Wirkungs-Beziehungen bzgl. der o.g. gewünschten Eigenschaften die notwendige Sicherheit für die Ausprägung dieser Toleranzmerkmale bieten. Dies wäre aber sowohl für die sichere Selektion als auch für die spätere Prüfung der Gehölze (z.B. für eine Zertifizierung) notwendig. Darüber hinaus würde der Einsatz sogenannter Biomarker den Selektionsprozess deutlich verkürzen. Versuche zur Klimatoleranz sind allerdings zeitaufwändig und stellen Baumschulen vor große ökonomische Risiken, da eine Vielzahl angezogener Bäume die Selektionstests nicht bestehen und vernichtet werden müssten. Die herkömmliche Produktion von qualitativ hochwertigen Alleebäumen erfordert ca. 8-15

Jahre, je nach Baumart und Stammumfang. Weder auf der Seite der Gehölzproduzenten noch auf der Seite der Abnehmer bestanden hinreichend Informationen über den Stand des Wissens, der Versuche und der Risiken bei der Verwendung von ungeeigneten Gehölzen und der künftigen Verfügbarkeit klimaangepasster Gehölzsortimente.

3.2 Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens

Übergeordnetes Ziel des Projektvorhabens war es, ein geprüftes Gehölzsortiment aus verschiedenen Baumarten und Sorten bereitzustellen, das infolge der erhöhten Klima- (hier insbesondere Trockenstress-) toleranz eine erhöhte Anbausicherheit für die Verwendung als Straßen- oder Alleebaum bietet.

Hierzu mussten zunächst Baumindividuen von zahlreichen Versuchsstandorten sowie Selektionen aus Baumschulen vorselektiert und Pflanzenmaterial zur Weitervermehrung zusammengetragen werden. Eine grundsätzliche Strategie des Vorhabens war es, das künftige Gehölzsortiment über *in vitro*-Verfahren anzuziehen, um so u.a. Bäume mit genetisch eigenen Wurzeln herzustellen und die Produktionszeiträume zu verkürzen. Bereits während der *in vitro*-Anzucht sollten erste physiologische/biochemische Frühtests Auskunft über die mögliche Toleranz gegenüber osmotischem Stress liefern. Nach der Überführung der Klone in die *in vitro*-Kultur sollten diese etabliert, hochvermehrt, *in vitro* bewurzelt und anschließend im Gewächshaus akklimatisiert werden. In sich anschließenden Gewächshaus-/Containerversuchen sollten weitere (Trocken-) Stresstests erfolgen und die physiologische Stressantwort nochmals anhand von Biomarkern, phänotypischen Vitalitätsmerkmalen und dem Austriebsverhalten im Folgejahr gemessen und bewertet werden. Während der Projektbearbeitung wurde eine molekularbiologische Transkriptionsanalyse für einige Klone als zusätzliches Teilziel aufgenommen.

Parallel zu den Stresstestungen muss gleichfalls ausreichend Material *in vitro* erzeugt werden, welches die Baumschulen für die modellhafte Jungpflanzenproduktion übernehmen können. Die entwickelten *in vitro*-Anzuchtverfahren, die physiologischen Stresstests und Nachweisverfahren sollen für die künftige Gehölzanzucht etabliert und die Kommunikation zwischen Laboren, Baumschulen und den Kommunen und Straßenämtern gefördert werden. Hierzu sollte ein Demonstrationsquartier mit den wichtigsten Gehölzklonen eingerichtet und erste Modellanpflanzungen an innerstädtischen Standorten, z. B. in Eberswalde, vorbereitet werden.

4 Projektverlauf

Tab. 1: Zeitplan des Projektes Trees4Streets von 2016 bis 2022 für die 7 Arbeitspakete

Arbeitspakete (AP)	2016				2017				2018				2019				2020				2021				2022							
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV				
AP 1: Vorauswahl Baumarten, Klone aus Versuchssortimenten und Stadtstandorten																																
AP 2: In-vitro-Kultur																																
(2a) Überführen dieser Gehölze in die In-vitro-Kultur; Etablierung																																
(2b) Testung der Kulturverfahren in vitro; Vermehrung, Bewurzelung, Akklimatisierung																																
(2c) Erhaltungslinie der Klone in vitro																																
AP 3: Physiologische Untersuchungen während der In-vitro-Kultur																																
(3a) Durchführung von Stresstests in der In-vitro-Kultur																																
(3b) Vitalitätsdiagnostik auf der Grundlage von Biomarkern																																
AP 4: Physiologische Untersuchungen an Jungpflanzen																																
(4a) Durchführung von Stresstests an Jungpflanzen im Container																																
(4b) Vitalitätsdiagnostik auf der Grundlage von Biomarkern																																
AP 5: Entwicklung von Überführungsverfahren von In-vitro-Pflanzen in die Baumschulpraxis																																
AP 6: modellhafte Produktion der in vitro vermehrten Klone in der Baumschule zum auspflanzfähigen Straßen- und Alleebaum																																
AP 7: Kommunikation- und Verbreitungskonzept																																

AP 1: Vorauswahl Baumarten, Klone aus Versuchssortimenten und Stadtstandorten

Die Selektion der potenziell klimaanpassungsfähigen Genotypen fand auf der Grundlage von phänotypischen Bonituren statt. Die Projektmitarbeiter der HU Berlin sowie der assoziierte Partner (Pflanzenschutzamt in Berlin) entnahmen Triebe in den Alleen in Berlin und Bautzen mit Projektbeginn im Frühjahr 2016 als auch 2017. Weitere Entnahmestandorte befanden sich im Botanischen Garten Berlin, im Forstbotanischen Garten Tharandt, am Versuchsstandort der HU Berlin in Zepernick, am Versuchsstandort der HU Berlin in Dahlem sowie bei der BS Lorberg in Kleinziethen. Weiteres Material kam von den Versuchsstandorten Veitshöchheim, Quedlinburg und Hohenheim. Somit konnten durch die vielen unterschiedlichen Selektionen über den Projektzeitraum der ersten 4 Jahre insgesamt 170 Klone aus 14 Gattungen (*Quercus*, *Acer*, *Tilia* und 11 weitere Gattungen) vorausgewählt werden.

AP 2: In vitro-Kultur

In vitro kultivierte Pflanzen leben unter kontrollierten Bedingungen, bei denen natürlich vorkommende abiotische und biotische Stressfaktoren weitestgehend ausgeschaltet sind. An die Stelle natürlicher Umwelteinflüsse treten allerdings andere, kulturbedingte Einflüsse, die sich negativ auf die Entwicklung der jeweiligen Pflanzen auswirken können. Vor allem Etablierung und Akklimatisation der Explantate werden als kritische Phasen bezüglich der zuvor genannten Stressfaktoren *in vitro* betrachtet. Somit ist diese Kulturmethode an sich und ihre Auswirkungen auf die Pflanze als potenzielle Störgröße nicht zu vernachlässigen. Die Schwierigkeiten zeigten sich in der Oberflächensterilität der Pflanzen. Hierzu wurden zahlreiche Testungen zur Etablierung in 5 Projektjahren (2016-2021) von Frühjahr bis teilweise in die Sommermonate hineingeführt. Jeder Klon wurde mindestens zweimal-maximal zehnmal versucht in die *in vitro*-Kultur zu überführen. Dies war abhängig von der Menge des Ausgangsmaterials sowie der Relevanz der ausgewählten Gattung. Über den Projektzeitraum konnten 40 Klone *in vitro* kultiviert werden, jedoch starben immer wieder Kulturen innerhalb der Phase der Hochvermehrung *in vitro* ab, da sich diese Pflanzen nicht an die Kulturbedingungen anpassen ließen. Bei 21 Klonen aus 8 Gattungen gelang die sichere *in vitro*-Etablierung, d.h. diese wurden den gesamten Prozess bis zur Akklimatisation ins Gewächshaus kultiviert und konnten somit zur Weiterkultur den Baumschulen bereitgestellt werden.

(2a) Überführen dieser Gehölze in die in vitro Kultur; Etablierung

Diese *in vitro*-Untersuchungen fanden über den gesamten Projektzeitraum von 2016 bis 2022 statt. Die geschnittenen Zweige befanden sich im Knospenstadium und wurden im

Labor ins Wasserglas zum Austrieb gestellt, um mehrere Entnahmezeitpunkte zu gewährleisten. Durch ein mehrmaliges und zeitversetztes Etablieren *in vitro* zu ermöglichen, wurde auch ein Teil des entnommenen Pflanzenmaterials, durch Veredelung, durch die Baumschule Nauen gesichert. Für die Etablierung der Klone als Kopf- oder Teilstecklinge in die *in vitro*-Kultur, erfolgten innerhalb des Projektzeitraumes mehrere genotypabhängige Testungen verschiedener Kulturmedien nach MURASHIGE und SKOOG (1962), nachfolgend MS-Medien genannt und WOODY PLANT Medien nach LLOYD und MCCOWN (1980), nachfolgend als WPM-Medien bezeichnet. Diese Nährmedien wurden je nach Versuch, mit unterschiedlichen Hormonvarianten zur Vermehrung und Sprossstreckung (BAP als Cytokinin, Giberellinsäure) und Bewurzelung (NES und IES als Auxin), sowie Aktivkohlemedien (gegen phenolische Ausscheidungen) und Antibiotikamedien (gegen endogene Bakterien) modifiziert. Zusätzlich wurden Meristeme als Ausgangsexplantate unter dem Mikroskop präpariert. Meristeme benötigen einen längeren Zeitraum für die Entwicklung zum Spross als Kopf- oder Teilstecklinge. Der Vorteil der Meristemkulturen ist jedoch deren endogene Pathogenfreiheit. Zur Optimierung der Methoden wurden ab Januar 2018 im *in vitro*-Labor der HU Berlin neue Methoden zur Etablierung von 16 Klonen getestet. Dazu wurde ein Teil der Triebe, zur Brechung der Knospendormanz, bei – 18 °C eingefroren. Anschließend, je nach Versuchsvariante der jeweiligen Gehölze, im Labor vorgetrieben und *in vitro* etabliert. Die besten Ergebnisse zur Überführung der Gehölze in die Laborbedingungen wurden mit im Winter abgeschnittenen Trieben von dem Projektpartner BS Nauen erzeugten Veredelungen, die ins Wasserglas zum Austreiben gestellt wurden, erreicht (Durchführung von 2017 bis 2022).

(2b) Testung der Kulturverfahren in vitro; Vermehrung, Bewurzelung, Akklimatisation

Für die *in vitro* etablierten Klone wurden genotypabhängige Kulturprotokolle entwickelt. Viele Probleme, die sich während der Vermehrungsphase bei den Pflanzen zeigten, waren auf Vitrifikation zurückzuführen, die durch den Cytokinineinsatz als auch die hohe Luftfeuchte in den Kulturgefäßen verursacht wird. Hierbei musste für jeden einzelnen Genotyp die richtige Konzentration ermittelt werden, um eine hohe Vermehrungsrate zu gewährleisten und gleichzeitig einen vitalen Habitus erzeugen zu können. Die Konzentrationen beliefen sich dabei genotypabhängig in einer Spanne von 0,5 bis 1,5 mg/l Benzylaminopurin (BAP) je Kulturmedium und Klon. Weitere Schwierigkeiten ergaben sich durch das Auftreten von endogenen Bakterien. Dies begründete sich eher weniger auf das hohe Alter der Ausgangsbäume, sondern auf den Prozess der Veredelung der vorgenommen werden musste, um das Mutterpflanzenmaterial länger für die Etablierung vorhalten zu können. Hierdurch wurden allerdings endogene Bakterien von der Unterlage in den Klon übertragen,

was zu einem höheren Pflegeaufwand führte. Folglich mussten vorrangig Nährmedien, mit Antibiotikum (0,05 g/l Ampicillin) versetzt werden.

Hinsichtlich der Bewurzelung wurde das Pflanzenmaterial nach der Hochvermehrung zunächst für eine Subkultur auf hormonfreies Medium überführt, da die Hormone der Vermehrungsphase oft Auswirkungen auf die Weiterkultur *in vivo* haben. Die Bewurzelungsmedien wurden generell mit 2 g/l Aktivkohle (gegen phenolische Ausscheidungen) und Naphtylessigsäure (1 mg/l NES) versetzt. Nach 3 bis 5 Wochen war die Induktion zur Wurzelbildung abgeschlossen. Viele Klone hatten hierbei auch Wurzeln *in vitro* gebildet, aber entscheidend ist die Zugabe des Auxins in der Bewurzelungsphase, da somit auch die weitere Wurzelentwicklung und Sprossachsenstreckung in der Akklimationsphase im Gewächshaus bedeutend verbessert wurde. Die Bewurzelung fand dann in der Phase der Gewächshauskultur in Multitopfpaletten statt. Durch die Induktion *in vitro* wuchsen die Pflanzen sehr schnell weiter. Innerhalb des Projektes wurde für die Überführung der Pflanzen ins Gewächshaus eine Nebel-Anlage (FOG-Anlage) gebaut. Durch den Einsatz eines RaspberryPi wurde diese anhand von Sensordaten zu relativer Luftfeuchte und Temperatur gesteuert, um den ca. 2 cm großen *in vitro*-Pflanzen optimale Akklimationsbedingungen zu gewährleisten. Überlebensraten zeigten sich hier nach dem ersten Topfen der Pflanzen in 9er Töpfe von 80 bis 100 % der überführten Pflanzen aus *in vitro* in die Gewächshauskultur. Zuvor lagen die Überlebensraten lediglich bei höchstens 50 %. Im Anschluss an die Akklimation erfolgte die Weiterkultivierung der Pflanzen bei der HU Berlin, damit zum einem im Anschluss die Stressversuche in Containern stattfinden konnten und zum anderen parallel die Pflanzen zur modellhaften Weiterkultur in den Baumschulen gebraucht wurden.

(2c) Erhaltungslinie der Klone in vitro

Alle Klone, die in die *in vitro*-Kulturführung überführt wurden, sind für die vielen Testungen über den gesamten Versuchszeitraum gepflegt, also ständig hochvermehrt worden. Auch bis zum Projektende (und darüber hinaus) werden die Pflanzen für mögliche Folgeuntersuchungen in geringen Stückzahlen (ca. 50 Pflanzen je Klon) *in vitro* bereitgestellt.

AP 3: Physiologische Untersuchungen während der in vitro-Kultur

(3a) Durchführung von Stresstests in der in vitro-Kultur

Im Frühjahr 2017 fand der erste Versuch zur Entwicklung der Schnelltestmethoden *in vitro* statt: Einfluss der Agarkonzentration auf die Induzierbarkeit von Trockenstress. Die zweite Trockenstressinduktion: Trocknung der Sprosse auf Silikagel erfolgte (2018 und 2019).

Um zu ermitteln, wie sich die einzelnen Genotypen gegenüber den getesteten Methoden der Stressinduktion und den Varianten innerhalb der Versuche verhalten, wurden unterschiedliche Parameter untersucht. Hierzu zählt die Bestimmung der morphologischen Parameter, wie Sprossanzahl und -länge, Blattanzahl und Überlebensrate in Etablierungs- und Akklimatisationsphase. Die Analysen der ersten Stressversuche zeigten einen positiven Verlauf der Testungen *in vitro*. Es ließen sich Stresserscheinungen nachweisen, jedoch musste in weiteren Untersuchungen erarbeitet werden, ob sich bei *in vitro*-Pflanzen gleichermaßen Stress nachweisen lässt, wie bei konventionell erzeugten Pflanzen. Die unterschiedliche Ernährungsweise (*in vitro*: heterotroph / konventionell: autotroph) zeigte sich hierbei ausschlaggebend.

Die Stresswirkung durch Kälte, also niedrige Umgebungstemperaturen, wurde 2018 untersucht. Ebenso wurden vier Hitzestresstests der *in vitro*-Sprosse vorgenommen. Mit dem Stressor Salzbelastung endeten 2019 die *in vitro*-Stresstestungen, da die biochemischen Analysen in der ursprünglichen Projektlaufzeit sonst nicht mehr durchführbar gewesen wären.

(3b) Vitalitätsdiagnostik auf der Grundlage von Biomarkern

Die Aufarbeitung des beprobten Materials aus der *in vitro*-Kultur zeigte sich als sehr arbeits- und zeitintensiv. Für das Vermahlen der Proben mit flüssigem Stickstoff stand oft zu wenig Probenmaterial je Versuchsvariante aus den Stresstestungen *in vitro* zur Verfügung. Die bereits aus anderen Projekten erarbeiteten methodischen Protokolle mussten an diese neuen Untersuchungen angepasst und aufwendig überarbeitet werden. Es erfolgten die phenolische Extraktion, Inhaltsstoffanalysen, wie freie Aminosäuren-, Arginin-, Kohlenhydratbestimmung etc. und der Aufbau einer Datenbank in SPSS für die biochemischen Analyseergebnisse je Stressversuch und Versuchsvariante.

AP 4: Physiologische Untersuchungen an Jungpflanzen

In drei aufeinander folgenden Sommern (2017, 2018, 2019) fanden Containerversuche an *in vitro* erzeugten Jungpflanzen statt. Diese Versuche bauten in der Methodenentwicklung aufeinander auf. Auch konnten einige Pflanzen in zwei aufeinander folgenden Jahren (2018 und 2019) gestresst werden.

(4a) Durchführung von Stresstests an Jungpflanzen im Container

Die drei Stressversuche wurden mit unterschiedlichen Klonen durchgeführt. Ziel über die drei Jahre war die Erarbeitung des optimalen Versuchsaufbaus sowie die Größe des Pflanzenmaterials im Verhältnis zur Topfgröße (Container), so dass zum einen eine schnelle

Stresswirkung möglich ist, zum anderen aber auch genügend Blattmaterial für die biochemische Analyse bereitgestellt werden kann.

(4b) Vitalitätsdiagnostik auf der Grundlage von Biomarkern

Innerhalb des Versuchszeitraumes wurden die Blätter wöchentlich entnommen und zunächst eingefroren. Da die Jungpflanzen *in vivo* normal große Blätter aufwiesen, konnte das Pflanzenmaterial laut Methodenprotokoll aufbereitet werden und die biochemischen Analysen ohne methodische Anpassungen erfolgen.

AP 5: Entwicklung von Überführungsverfahren von in vitro Pflanzen in die Baumschulpraxis

Die Mitarbeiter des Projektpartners Baumschule Sämman sowie die Mitarbeiter der HU Berlin teilten sich ab Projektbeginn die Verantwortlichkeiten für die Etablierung der Gehölze in die *in vitro*-Kultur. Hierbei erfolgte ein ständiger Austausch an Methoden, Techniken sowie Erfahrungen hinsichtlich Kulturform und Medienzusammensetzung. Die wissenschaftlich erarbeiteten Protokolle wurden dem Praxispartner zur Verfügung gestellt und gemeinschaftlich wurden auch Anpassungen vorgenommen. Die Kulturführung *in vitro* ist allein schon sehr spezifisch, erst recht für die Gehölzproduktion. Innerhalb der Kulturführung können sehr schnell extreme Schwierigkeiten in einzelnen Phasen der Kultur, wie bei der Hochvermehrung und Bewurzelung der Pflanzen oder auch noch bei der Akklimatisation auftreten, so dass immer wieder genotypische Anpassungen hinsichtlich Medienzusammensetzung stattfinden müssen.

AP 6: modellhafte Produktion der in vitro vermehrten Klone in der Baumschule

Die Anlage der Baumschulquartiere wurden von den Projektpartnern Baumschule Nauen und Baumschule Lorberg ab dem zweiten Projektjahr vorgenommen. Die *in vitro* erzeugten Gehölze konnten somit auf die produktionstechnischen Bedingungen zur Jungpflanzenanzucht (Baumschule Nauen) und zur Alleebaumanzucht (Baumschule Lorberg) angepasst werden. Es konnte hierbei ein Vergleich zwischen konventionell über Veredelung erzeugten Gehölzen und den wurzelechten *in vitro* erzeugten Gehölzen vorgenommen werden. Auch wurde das Weiterwachsen der Bäume *in vivo* bonitiert. Die Rückmeldung aus der Baumschulproduktion erbrachte, dass einige Lindenklone zu viele sprossbürtige Seitentriebe erzeugen und somit mehr Schnittmaßnahmen notwendig wären. Dies resultiert aus der hormonellen Nachwirkung der Vermehrungsphase *in vitro*. Durch Reduzierung der Cytokininkonzentration und/oder einer hormonfreien Phase vor der Bewurzelungsphase *in vitro*, konnte die erhöhte Seitentriebbildung bei den Gehölzen eingestellt werden.

AP 7: Kommunikations- und Verbreitungskonzept

Innerhalb der Projektlaufzeit wurde eine Internetseite erstellt, welche unter www.trees4streets.de aufzurufen ist. Hier werden die Projektpartner, wichtige Ereignisse in einer Bildergalerie und das Projekt in einer Kurzfassung vorgestellt.

Mit weiterem Projektfortschritt haben die wissenschaftlichen Mitarbeiter des LFE und der HU einige Ergebnisse auf mehreren Fachtagungen vorgestellt. Das Projekt wurde ebenso mit einem Rollup auf der internationalen Pflanzenmesse in Essen (IPM) 2019 präsentiert. Gleichfalls wurde im Mai 2021 ein Workshop (online) mit 36 Stakeholdern der Baumschulbranche organisiert und die Projektergebnisse detailliert vorgestellt. Im Frühjahr 2021 präsentierte die damalige Staatssekretärin des MLUK Silvia Bender das Projekt, erste Bäume und Ergebnisse gemeinsam mit den Projektmitarbeitenden in der Baumschule Lorberg gegenüber Medienvertretern. Eine Abschlussveranstaltung soll im Oktober 2022 stattfinden.

5 Projektergebnisse

5.1 *In vitro*-Versuche

1. Stressor: Trockenheit

Einfluss der Agarkonzentration auf die Induzierbarkeit von Trockenstress

Bei dem ersten Versuch wurden sieben (6 *Tilia*-Klone und 1 *Platanus*-Art) der hochvermehrten Klone aus dem Jahr 2016 mit vier verschiedenen modifizierten MS-Medienvarianten, die unterschiedliche Agarkonzentrationen (8; 12; 16; 24 g/l Agar Agar Kobe 1) enthielten, getestet. Durch die erhöhte Festigkeit der Nährmedien und des damit verbundenen abgesenkten Wasserpotentials für die Pflanzen, wurden diese unter Trockenstress gesetzt. Die untersuchten Parameter waren: Sprosslänge und Blattanzahl am Ende der jeweiligen Wachstumsperioden, der Prolingehalt, ggf. Blattnekrosen oder ähnliche Stressanzeichen. Am tolerantesten gegenüber der gesteigerten Agarkonzentration zeigten sich im gesamten Versuch die Klone der *Tilia dasystyla* II und *Tilia europaea* 'Konings' durch den durchschnittlich größten Zuwachs der Sprosse und Blätter. Auffällig war auch die extrem hohe Seitentriebbildung, trotz hormonfreier Medienvariation, besonders bei den Klonen der *Tilia cordata* 'Wega' und der *Platanus x hispanica*. Die längste gesamt durchschnittliche Sprosslänge der *Tilia*-Klone hatte die *Tilia dasystyla* II mit 2,3 cm. Dabei liegen bis auf die Sprosslänge der *Tilia* 'Humboldt' alle bei mindestens 2 cm, die der *Platanus x hispanica* bei 1,6 cm. Dies könnte gattungsabhängig sein oder daran liegen, dass die *Platanus* extremer auf die Stressinduktion reagiert hat. Die größte Blattanzahl unter den *Tilia*-Klonen hatte *Tilia cordata* 'Wega' mit 5,8 Blättern. Die *Platanus* übertrifft dies mit

durchschnittlich 9,8 Blättern je Spross. Bei der Auswertung fiel auf, dass *Platanus* viele kleine Blätter und mehr Seitentriebe gebildet hatte, also einen Rosettenwuchs, die *Tilia* hingegen wenige Blätter und dafür umso größere. Ob dies artenbedingt ist oder durch die erhöhte Agarkonzentration beeinträchtigt wurde, ist unbekannt. Unabhängig von der Agarkonzentration, sind die Sprosse aller Klone nach längerem Aufliegen auf dem Medium gewachsen. Dies ist einerseits eine Folge der längeren Wachstumsperiode allerdings war auch die Stressdauer länger. Die abgestorbenen, verfärbten, durchscheinenden und verdickten Blätter wurden nicht in die Prolinanalyse miteinbezogen. Solche Blattanomalien wurden durch die Trockenstressinduktion hervorgerufen, was in dieser Untersuchung als positive Reaktion auf den Trockenstress gewertet wird. Bei osmotischem Stress wird meist die Aminosäure L-Prolin in hohen Konzentrationen angereichert (SCHULZE et al., 2014). In der biochemischen Analyse der Versuchsvarianten zeigte sich kein signifikanter Anstieg des freien Prolins mit zunehmender Agarkonzentration, auch nicht nach verlängerter Kultivierungsdauer (von 19 auf 54d). Der Prolingehalt schwankte innerhalb der Versuchsvarianten. Ein geringer Prolingehalt signalisierte, dass die Explantate nicht unter Trockenstress standen, was bei *Tilia cordata* 'Wega', *Tilia x europaea* 'Konings' und den beiden *Tilia dasystyla* in Betracht gezogen werden konnte. Passend dazu schnitten diese Klone im Hinblick auf das Spross- und Blattwachstum gut ab und ließen sich weder auf morphologischer noch biochemischer Ebene von der Steigerung der Agarkonzentration im Medium beeinflussen. Die Prolingehalte der *Tilia oliveri* und der *Tilia* 'Humboldt' sind mit Abstand höher, vor allem in längerer Kulturdauer von 54 Tage. Gleichzeitig waren die phänotypischen Symptome durchschnittlich am schlechtesten, was für eine Trockenstressinduktion bei diesen Klonen spricht. Insgesamt ließ sich durch diesen einfachen Versuchsansatz keine Trockenstressinduktion nachweisen, da Variationen innerhalb der Agarkonzentration, nicht zu entsprechenden Korrelationen zum Prolingehalt führten.

Trockenstressinduktion durch Trocknung der Sprosse auf Silikagel

Der zweite Versuchsansatz zur Trockenstressinduktion erfolgte durch das Auflegen der Sprosse auf wasserentziehendes Silikagel. Wiederum wurde Stresswirkung anhand des gehemmten Blatt- und Sprosswachstums, des Absterbens der Sprosse und einen erhöhten Prolingehalt in den Explantaten nachgewiesen.

Dazu wurden 60 g Silikagel in WECK-Gläser (Fassungsvermögen 300 ml) gefüllt. Zwischen den Sprossen und Silikagel wurde jeweils Filterpapier (Rundfilter Ø 70 mm) platziert. Entsprechend des Versuchs von DE KLERK (2007) wurden die Pflanzen für eine Mindestperiode von 150 Minuten, über 240 bis zu einer maximalen Einwirkzeit von 300 Minuten gestresst. Für diesen Versuch wurden Explantate von *Tilia* 'Humboldt' und *Tilia*

cordata 'Wega' verwendet. Von den *in vitro* vorkultivierten Klonen wurden jeweils 30 Kopfstecklinge (ca. 1 cm lang) pro Zeitvariante (plus Kontrollgruppe je Zeitvariante: Sprosse ohne Silikagel) unter sterilen Bedingungen präpariert und anschließend pro Versuchsgefäß zehn Explantate appliziert. Nach den jeweiligen Trocknungszeiten wurden die Explantate wieder auf Kulturgefäße mit frischem MS-Medium gesetzt. Ein weiteres Umsetzen erfolgte nach weiteren vier Wochen. Dabei wurden die Sprosse basal angeschnitten, um die Leitbahnen zu öffnen und damit aufnahmefähig für Wasser und Nährstoffe zu machen. Die abschließende Bonitur erfolgte nach acht Wochen (Tab. 2). Dafür wurden sämtliche Blätter, inklusive Blattstiele, sowie die Sprossachse der Sprossexplantate in verschließbare Eppendorf-Röhrchen überführt und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur biochemischen Analyse der Stressparameter bei -80 °C gelagert. Das generell eine Trockenstressinduktion stattgefunden hat, ließ sich durch die Unterschiede der morphologischen Parameter zwischen den jeweiligen Kontrollgruppen und Varianten mit Silikagel zeigen. Die Trockenstressinduktion durch den Wasserentzug, über verschiedene Zeitperioden auf Silikagel, führte zwischen den Klonen und Zeitvarianten zu unterscheidbaren Ergebnissen. Das Blatt- und Sprosswachstum der *Tilia cordata* 'Wega' verringerte sich mit Erhöhung der Trocknungszeit auf Silikagel. Die Überlebensrate der *Tilia cordata* 'Wega' sank je länger die Explantate auf dem Silikagel auflagen. Die Überlebensrate bei *Tilia* 'Humboldt' stieg bei der höchsten Stressinduktion von 300 min auf Silikagel auf 73 % (Tab. 2).

Tab. 2: Absolute Überlebensrate sowie der Prolingehalt der Explantate von *Tilia cordata* 'Wega' und *Tilia* 'Humboldt' im Versuch: Trockenstressinduktion durch Trocknung der Sprosse auf Silikagel

	Versuchsvariante Trocknungszeitraum (K=Kontrolle, S=Silikagel)					
	150 min K	150 min S	240 min K	240 min S	300 min K	300 min S
Absolute Überlebensrate (%) <i>Tilia cordata</i> 'Wega'	100	100	96,7	81,8	100	43,3
Prolingehalt (% AS) <i>Tilia cordata</i> 'Wega'	0,4	0,41	0,44	0,57	9,78	/
Absolute Überlebensrate (%) <i>Tilia</i> 'Humboldt'	100	80	93,7	66,7	96,7	73,3
Prolingehalt (% AS) <i>Tilia</i> 'Humboldt'	2,2	1,85	1,5	1,52	1,91	2,06

Allerdings zeigten die Klone von *Tilia cordata* 'Wega' und *Tilia* 'Humboldt' nach unterschiedlichen Zeitintervallen auf Silikagel keine Akkumulation der Aminosäure Prolin. Die Werte lagen innerhalb der Versuchsvariante sehr eng beieinander (Tab. 2). Es zeigte sich somit, dass auch die Trocknungsdauer mit Silikagel keinen Unterschied zur Kontrollvariante (Trocknung ohne Silikagel) erbrachte, so dass ein Folgeversuch mit Erhöhung der Trocknungsdauer gemacht wurde.

In einem weiteren Versuch (2019) zur Trockenstressinduktion durch Silikagel wurden die Klone *Tilia tuan* und *Tilia x europaea* 'Konings' miteinander verglichen. Die verschiedenen

Zeitvarianten wurden auf Kontrolle 0 h, 3 h, 5 h, 7 h angepasst. Für die morphologische Betrachtung wurden die Sprosse anschließend wieder *in vitro* aufs Nährmedium transferiert und für vier Wochen kultiviert und endbonitiert. Die Hälfte der Sprosse wurde direkt nach der Trockenstressinduktion für die biochemische Analyse eingefroren. Bei der Betrachtung der gemessenen morphologischen Parameter wurde deutlich, dass sich in den Kontrollvarianten, der 3 h und 5 h Variante beider Klone eine Trockenstressinduktion durch Silikagel nachweisen lässt.

Die Ergebniskombination der zwei variablen Parameter, der durchschnittlichen Blattanzahl und der prozentualen Blattanomalien, lässt vermuten, dass bei beiden Klonen eine Stressanpassung durch eine Reduktion der Transpirationsoberfläche stattgefunden hat. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Befunde auf eine Stagnation der Wachstums- und Stoffwechselprozesse zurückzuführen sind. Im Vergleich der zwei Klone *Tilia tuan* und *Tilia x europaea* 'Konings' konnte festgestellt werden, dass sich bei der durchgeführten Silikagel-Trockenstressinduktion *Tilia x europaea* 'Konings' als stresstoleranter erwies. *Tilia x europaea* 'Konings' wies in allen Zeitvarianten durchschnittlich längere Sprosse auf als *Tilia tuan*. Zudem war die durchschnittliche Blattanzahl höher als von *Tilia tuan*. *Tilia x europaea* 'Konings' hatte außerdem ein deutlich vitaleres Erscheinungsbild bei der Bonitur als *Tilia tuan*. Die Unterschiede der Sprosslänge und durchschnittlichen Blattanzahl könnten durch die genotypischen Unterschiede der verschiedenen *Tilia*-Arten begründet werden. Es ließ sich kein eindeutiger Unterschied zwischen den Varianten des sofortigen Einfrierens und den weiterkultivierten Klonen feststellen. Es ist bei der weiteren Kulturführung zu kritisieren, dass es in diesen Pflanzen theoretisch zu einer Regeneration kommen kann, die sich hier jedoch nicht klar nachweisen lässt. Es kann festgestellt werden, dass sowohl die Stress-Varianten als auch die Kontroll-Varianten in der Analyse, erhöhte Stress-Parameter zeigten.

Wie häufig für *in vivo*-Experimente für andere Baumarten beschrieben (u. a. KÄTZEL und LÖFFLER 2014) sollte bei sehr starken Stresseinwirkungen Chlorophyll abgebaut werden. Bei dem Vergleich zwischen der Kontroll-Variante und der 7 h Variante des Klons *Tilia tuan* ist dagegen ein Anstieg des Chlorophyllgehaltes erkennbar. Nach WOODWARD und BENNETT (2015) lässt sich ebenfalls keine Korrelation zwischen Chlorophyllgehalt und induziertem Stress nachweisen.

2. Stressor: N-mangel und N-Überschuss

Untersuchungen zu Stressreaktionen im Vergleich drei modifizierter MS-Nährmedien in temporary immersion system (TIS) und Agarkultur

In diesem Versuch (Mai bis Juli 2017) wurde untersucht, ob und inwiefern Faktoren in der *in vitro* Kultur Stressreaktionen von Pflanzen auslösen können. Dazu wurden Kulturversuche mit *Tilia cordata* 'Wega' und *Tilia dasystyla*-Explantaten in drei unterschiedlich modifizierten MS-Medien sowohl in Festkultur (mit 8 g/l Agar), als auch in Flüssigmedium (ohne Agarzugabe) mittels Temporary Immersion System (TIS) durchgeführt. Medium 1 enthielt 1650 mg/l NH_4NO_3 und 0,2 mg/l Nicotinsäure, Medium 2 enthielt einen reduzierten Stickstoffgehalt von 825 mg/l NH_4NO_3 und 0,2 mg/l Pyridoxin und Medium 3 enthielt 2475 mg/l NH_4NO_3 , sowie die dreifache Konzentration der MS-Makronährstoffe und 0,2 mg/l Pyridoxin. Alle MS-Mediumvarianten waren frei von Wachstumsregulatoren. Nach ca. drei Wochen Kulturdauer wurden die Explantate hinsichtlich der Parameter durchschnittliche Sprosslänge, Blattanzahl und morphologische Veränderungen der Blätter ausgewertet. Ebenso fand die Laboranalyse des prozentualen Prolingehaltes am Anteil aller freien Aminosäuren von Blättern und Sprossen statt. Dabei stellte sich heraus, dass vor allem die Kulturform (Fest- oder TIS-Kultur) Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen hatte, wobei sich in TIS-Kultur vermehrt morphologische Abweichungen, wie eingerollte Blätter, zeigten. Die Analyse des Prolingehaltes ergab, dass insbesondere Medium 2 (reduzierter Stickstoffgehalt) in TIS-Kultur Stress in den Pflanzen induzierte. Ebenso zeigte sich, dass die Reaktion der Blätter auf den Prolingehalt deutlich ausgeprägter ausfiel als die der Sprosse (Abb. 1 & Abb. 2).

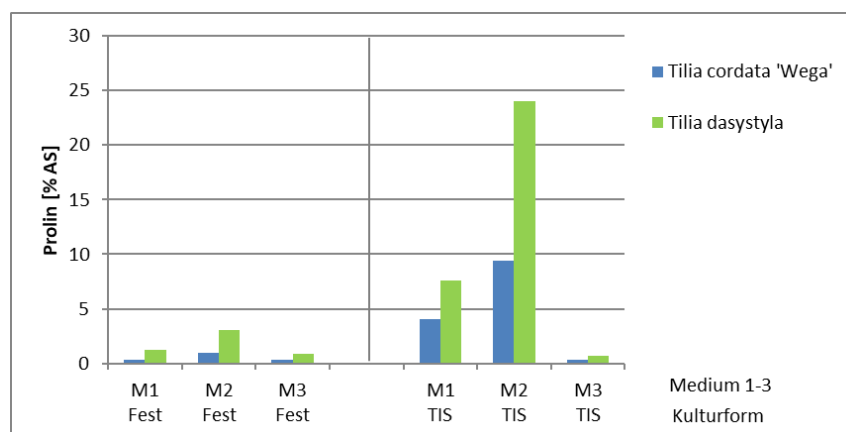


Abb. 1: Prolingehalt [% AS] der Blätter von *Tilia cordata* 'Wega' und *Tilia dasystyla* nach drei Wochen In-vitro-Kultur in den MS-Mediumvarianten M1 (1650 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Nicotinsäure), M2 (825 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Pyridoxin) und M3 (2475 mg/l NH_4NO_3 + dreifache Makronährstoffe + 0,2 mg/l Pyridoxin) nach MURASHIGE & SKOOG (1962); je in fester (8 g/l Agar; „Fest“) und flüssiger Kulturform (Temporary Immersion System; „TIS“)

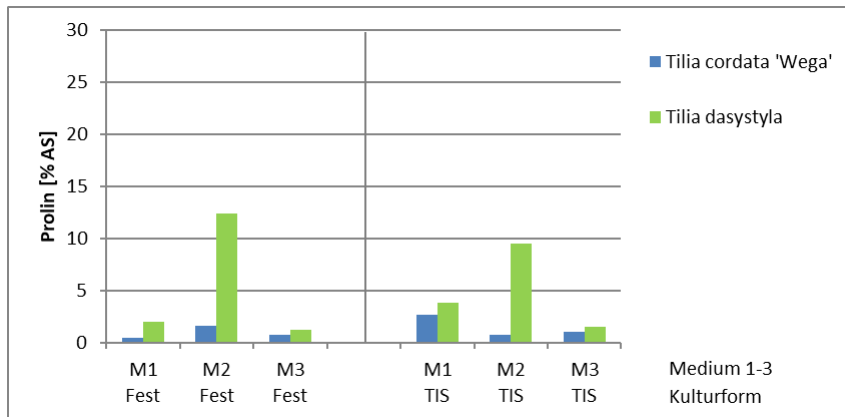


Abb. 2: Prolingehalt [% AS] der Sprosse von *Tilia cordata* 'Wega' und *Tilia dasystyla* nach drei Wochen In-vitro-Kultur in den MS-Mediumvarianten M1 (1650 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Nicotinsäure), M2 (825 mg/l NH_4NO_3 + 0,2 mg/l Pyridoxin) und M3 (2475 mg/l NH_4NO_3 + dreifache Makronährstoffe + 0,2 mg/l Pyridoxin) nach MURASHIGE & SKOOG (1962); je in fester (8 g/l Agar; „Fest“) und flüssiger Kulturform (Temporary Immersion System; „TIS“)

Weiterhin wurde deutlich, dass die Stressreaktionen artspezifisch variieren und gleichzeitig von der jeweiligen Kulturform und Nährstoffzusammensetzung abhängig sind. So lag die durchschnittliche Sprosslänge und Blattanzahl der Explantate bei *Tilia cordata* 'Wega' in TIS-Kultur höher als in Festkultur, bei *Tilia dasystyla* umgekehrt. Zudem wurden bei *Tilia dasystyla* stets etwas höhere Prolinwerte als bei *Tilia cordata* 'Wega' ermittelt, sodass von einer generell höheren Stressempfindlichkeit dieser Art ausgegangen werden kann. Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse ist nicht auszuschließen, dass die *in vitro*-Kultur an sich Stress bei Pflanzen auslöst, möglicherweise durch die heterotrophe Ernährungsweise und die reduzierte Photosyntheseaktivität.

3. Stressor: Kälte- und Hitzeinwirkung

Kältestressinduktion durch Einfrieren der *in vitro*-Sprosse

Die Frostempfindlichkeit wurde durch die Kältestressinduktion in einem Gefrierschrank von sterilen Sprossen im Babykostglas mit anschließender Weiterkultur auf Nährmedium untersucht. Dazu wurden *in vitro*-Explantate von *Tilia dasystyla* sowie *Tilia cordata* 'Wega' genutzt. Der erste Versuch beinhaltete drei Kältestressvarianten mittels Einfrieren der *in vitro*-Explantate bei -18°C für 10, 15 oder 20 min. Der Stichprobenumfang betrug 30 Pflanzen je Variante. Für den zweiten Kältestressversuch wurde der Stichprobenumfang auf 60 Explantate erhöht (Erhöhung des Materials für die biochemische Analyse notwendig) und nach optischer Bonitur des ersten Versuches, die Varianten auf 5, 10 und 15 min Kälteinduktion, angepasst. Nach dem Einfrieren wurden die Explantate angeschnitten und auf ein jeweils auf die Genotypen abgestimmtes Nährmedium überführt und weiterkultiviert. Nach vier Wochen Kulturdauer wurden bei beiden Versuchen die Sprosse optisch nach den

Parametern Sprosslänge, Blattanzahl und Blatteigenschaften bonitiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren und zum Projektpartner der LFE Eberswalde zur Analyse gebracht.

Die Ergebnisse der biochemischen Analyse zeigten einen klaren Trend bei den Kohlenhydratgehalten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen die Sprosse nach 30- minütiger Stressinduktion einen deutlich erhöhten Kohlenhydratgehalt auf, wobei nach 20 min der höchste Kohlenhydratgehalt erreicht wurde. Nach einer 10- minütigen Einwirkzeit war noch kein Anstieg zu erkennen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Thermotoleranzreaktion der Sprosse nach dieser Zeitspanne noch nicht erfolgt war. Die Erhöhung des Kohlenhydratgehalts als Reaktion auf Kältestress steht im Einklang mit den Ergebnissen der Literatur. Bei den Versuchen von OLDENHOFF et al. (2006) wurde die erhöhte Frosttoleranz von *Physcomitrella*-Gewebe durch eine Abscisinsäure- (ABA) Behandlung auf eine Erhöhung des endogenen Sucrosegehalts zurückgeführt. Die Ergebnisse der Prolinanalyse zeigen einen ähnlichen Trend des Kohlenhydratgehalts. Nach 10-minütiger Stressinduktion war noch kein Anstieg des Prolingehalts zu erkennen, während nach 20 min eine deutliche Zunahme zu verzeichnen war. Nach 30 min kam es nochmals zu einem leichten Anstieg. Die deutlich erhöhten Prolinwerte gegenüber der Kontrollgruppe decken sich mit den Ergebnissen von BODE et al. (1985). Sie untersuchten die Stresswirkungen an geschädigten Fichten und konnten ebenfalls eine erhöhte Akkumulation von Prolin nachweisen. Die Ergebnisse der biochemischen Analyse des Versuches deuten darauf hin, dass die Stressreaktion der Sprosse zwischen einer Einwirkzeit von 10 und 20 min auftritt. Eine genauere Eingrenzung des Eintritts der Pflanzenreaktion könnte in zukünftigen Versuchen durch eine Verwendung von kürzeren Zeitintervallen im Bereich zwischen 10 min und 20 min erfolgen. Die morphologischen Parameter der beiden Testungen zeigen eine Abnahme der Blattanzahl und eine Zunahme von Anomalien über die steigenden Einwirkzeiten der Stressinduktion hinweg.

Die Überlebensrate nach der 1. Testung sank zwischen 10 und 20 min Einwirkzeit deutlich ab, während bei der 2. Testung alle Sprosse unter den Einwirkzeiten 5, 10 und 15 min überlebten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der kritische Zeitpunkt der Kältestressinduktion in dem Zeitraum zwischen 15 und 20 min liegt. Insgesamt konnte die Methodik zur *in vitro*-Kältestressinduktion als praktikabel und aussagekräftig angesehen werden.

Hitzestressinduktion von *in vitro*-Sprossen

Weitere vier *in vitro*-Stressversuche erfolgten mittels Hitzestress in Kombination von Trockenstress im Wasserbad und im Trockenschrank mit sterilen und unsterilen Explantaten des Klons *Tilia dasystyla*. Die Temperaturbereiche lagen bei zwei Varianten zwischen 35-

45 °C und 50-60 °C. Nachfolgend die Kurzcharakteristik der vier Versuchsanstellungen (V1-4):

- V 1: Hitzestressinduktion im Wasserbad von unsterilen Sprossen,
- V2: Hitzestressinduktion im Wasserbad von unsterilen Sprossen im Babykostglas,
- V3: Hitzestressinduktion in einem Trockenschrank von unsterilen Sprossen im Babykostglas) und
- V4: Hitzestressinduktion in einem Trockenschrank von sterilen Sprossen im Babykostglas mit anschließender Weiterkultur auf Nährmedium

In den Proben wurden u. a. die Prolin- und Kohlenhydratgehalte biochemisch analysiert. Parallel wurden die Sprosslänge, Blattanzahl und die Anomalienanzahl aufgenommen. Auch bei den Stresswirkungen durch hohe Umgebungstemperaturen konnte eine erfolgreiche Methode zur Stresstestung entwickelt werden. Zunächst musste hierfür die nötige Sterilität der Explantate für die Auswertung der Sprosse bei Rückführung auf das Kulturmedium gewährleistet werden. Es ließ sich ein ansteigender Kohlenhydratgehalt im niedrigeren Temperaturbereich 35-45 °C und das Absinken der Kohlenhydratgehalte im hohen Temperaturbereich 50-60 °C nachweisen. Auch die Anomalienanzahl der Blätter stieg an. Die Sprosslänge und Blattanzahl zeigten keinen erkennbaren Trend. Im höheren Temperaturbereich von 50-60 °C sanken in den Versuchen 1-3 die Kohlenhydratgehalte ab. Besonders drastisch zeigte sich dies beim Versuch 1. Im Zuge der optischen Bonitur des Versuches 4 änderten sich die Sprosslängen und Blattanzahlen nicht. Die Anomalienanzahl erhöhte sich dagegen mit steigenden Einwirkzeiten. Die Ergebnisse der Versuche 1-3 zeigten, dass im niedrigeren Temperaturbereich 35-45 °C eindeutigere Ergebnisse zur Stresswirkung erzielt werden können als bei V4. Basierend auf diesen Methoden kann auch künftig eine *in vitro*-Selektion hitzestresstoleranter Klone erfolgen.

4. Stressor: Salzbelastung

Salzstressinduktion durch Erhöhung der Makrosalze im Nährmedium

Zur Entwicklung der Schnelltestmethoden *in vitro* konnte der Stressor Salzbelastung in Versuchen erstmals im Jahr 2016 in Untersuchungen einbezogen werden. Hierbei wurde die Makrosalzkonzentration erhöht. Es zeigten sich allerdings bei den *in vitro*-Pflanzen als auch in den Kontrollvarianten bei der biochemischen Analyse Stresssymptome. Von morphologischen Veränderungen, wie Sprosswachstum und Anomalien wie Blattverfärbungen oder Blattrollungen sind die Pflanzen der Kontrollvarianten jedoch nicht betroffen. Hintergrund schien der unterschiedliche physiologische Zustand der *in vitro*-Pflanzen zu sein. Es schlossen sich in weiteren Versuchen Nährmediumvariationen an, um herauszufinden, ob sich die Pflanzen *in vitro* stressfrei kultivieren lassen (siehe

Untersuchungen zu Stressreaktionen im Vergleich drei modifizierter MS-Nährmedien in temporary immersion system (TIS) und Agarkultur).

Salzstressinduktion durch Verwendung von Auftausalzen im Nährmedium

Ein groß angelegter Salzstressversuch fand von Dezember 2018 bis April 2019 für *Tilia dasystyla* statt. Dem Nährmedium wurde Auftausalz (ATS) in drei Varianten (0 g/l; 2,9 g/l; 5,8 g/l ATS) in Anlehnung an den Versuch von WATANABLE et al. (2001) hinzugefügt. Die Untersuchung der Sprosse fand in zwei Varianten, entweder vier Wochen (morphologische Bonitur der Stressparameter) oder sechs Wochen statt. Nach vier Wochen wurden 30 Sprosse auf ein neues hormonfreies Nährmedium aufgesetzt. Dadurch war eine ideale Nährstoffversorgung gewährleistet. Anschließend wurden die Sprosse für weitere zwei Wochen kultiviert und bonitiert. Die anderen 30 Sprosse wurden nach den vier Wochen Stresseinwirkung aus der *in vitro*-Kultur entnommen und für die analytische Untersuchung eingefroren. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach den gleichen Parametern und Kriterien. Bei der Betrachtung der morphologischen Parameter ist eine Verschlechterung des Zustandes der Pflanze festzustellen. Die Messungen bestätigen den visuellen Eindruck, der sich mit durchschnittlich sinkender Blattzahl und steigender Zahl der Blattanomalien bei einer Erhöhung der Auftausalzkonzentration zeigt. In der sechs Wochen-Variante ist eine Auftausalzstressinduktion und Schädigung des Pflanzengewebes durch Auftausalz besonders deutlich erkennbar (Abb. 3).



Abb. 3: Drei Auftausalzkonzentrationsvarianten (0g/l ATS, 2,9 g/l ATS, & 5,8 g/l ATS) des Versuches 2: Stressinduktion nach 6 Wochen Kulturdauer

Die vier Wochen-Variante weist hingegen Messergebnisse auf, die nicht auf die induzierte Methode zurückzuführen war. Dabei war die durchschnittliche Blattanzahl im Vergleich zwischen der Kontroll- und der 2,9 g/l ATS-Variante besonders auffällig. Dies galt auch für die Sprosslänge bei 5,8 g/l ATS-Variante. Die ermittelten Werte waren entgegen der

Annahme höher als in der 2,9 g/l ATS-Variante. Wie von KÄTZEL UND LÖFFLER (2014) [nach LARCHER 1978] beschrieben, kann kurzzeitiger Stress auch einen positiven Einfluss auf das Wachstum einer Pflanze haben. In der Literatur wird Eustress als Stress beschrieben, welcher sich kurzzeitig negativ auf die Pflanze auswirkt, bei dem es anschließend jedoch zur Erholung der Pflanze kommt. Es ist zu vermuten, dass bei einer vier Wochen andauernden Stressinduktion die Anpassung der Pflanzen noch zum Überleben ausreicht. Um dies nachzuweisen, könnten die Sprosse anschließend auf ein hormonfreies Nährmedium gesetzt werden, um zu prüfen, ob es zu einer Regenerationsphase kommt. Bei einer Konzentration über 8,7 g/l NaCl wies WATANABLE et al. (2001) bei dem Klon der *Euphrat-Pappel* eine Reduktion der Blätterzahl nach. Bei den getesteten *Tilia dasystyla*-Sprossen zeigte sich bereits bei 5,8 g/l Auftausalz eine Reduktion der Blätteranzahl in beiden Zeitvarianten. Die in Versuchen von WATANABLE et al. (2001) getesteten Salzkonzentrationen lagen über denen dieses Versuchs. Dabei zeigte die *Euphrat-Pappel* eine Überlebensrate von 100 % in allen gemessenen Salzkonzentrationen. *Populus alba* cv *Pyramidalis* x *Populus tomentosa* hingegen zeigten bereits bei 8,7 g/l NaCl eine Überlebensrate von 78%. Die Überlebensrate dieses Klons sank bei 14,4 g/l NaCl auf 0 % ab. In den eigenen Untersuchungen überlebten 100 % der *Tilia dasystyla* Sprosse. Mit Hilfe der *in vitro*-Kultur kann morphologisch nachgewiesen werden, dass Salzstress durch Auftausalz an der Gattung *Tilia dasystyla* induzierbar ist. Nach vierwöchigem Stress sank ebenfalls der Chlorophyllgehalt. Dennoch ist zu beachten, dass die Intensität der Stressinduktion nach vier Wochen noch schwer nachweisbar ist. Insgesamt ist wie bei der Trockenstressinduktion durch Silikagel, die Inhomogenität des Ausgangsmaterials zu berücksichtigen. Deutlichere Ergebnisse liefert die sechswöchige Stressinduktion. Als besonders aussagekräftig erwiesen sich der Kohlenhydrat- und Chlorophyllgehalt. Diese beiden Parameter verhielten sich ähnlich wie es bei den Untersuchungen an Gehölzen von KÄTZEL UND LÖFFLER (2014) beschrieben wurde. Wie von WATANABLE et al. (2001) nachgewiesen, kann es durch die Induktion von Salzstress durch NaCl zu einer Erhöhung des Kohlenhydratgehaltes kommen. Die Ergebnisse der sechs Wochen-Stress-Variante legen nahe, dass ein permanent induzierter Stressfaktor eindeutiger Ergebnisse erbringt. Andere biochemisch untersuchte Inhaltsstoffe, vor allem der Stärkegehalt, waren für die Differenzierung während der *in vitro*-Kultur nicht geeignet. Der pflanzliche Stoffwechsel ist unter *in vitro*-Bedingungen gegenüber natürlichen Wuchsbedingungen deutlich verändert. Dieses unerwartete Nebenergebnis eröffnet die Möglichkeit die pflanzenphysiologischen Prozesse künftig genau zu untersuchen und ggf. auf diesen Grundlagen, die *in vitro* ablaufenden Prozesse zu optimieren.

5.2 *In vivo*-Versuche

Container-Trockenstressversuche

Erfolgreich akklimatisierte *in vitro*-Pflanzen wurden anschließend gleich in die ersten Containerversuche (Sommer 2017) zur Stresstestung *in vivo* eingebunden. Diese erfolgte zunächst zur Entwicklung der Stresstests an drei Genotypen von *Tilia* in zwei unterschiedlichen Pflanzengrößen, da hierbei ausreichend Stückzahlen im gleichen Spross- /Blattverhältnis zur Verfügung standen und somit eine Vergleichbarkeit gegeben war. Dabei sind drei *Tilia*-Klone in einer Pflanzhöhe von ca. 20 cm sowie im Vergleich dazu ein *Tilia*-Klon davon in ca. 60 cm Pflanzhöhe als akklimatisierte Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur bereitgestellt worden. Ein Teil der Gefäßkulturen wurden zu Versuchsstart für zwei Monate nicht mehr bewässert und es erfolgte in mehreren Abständen die Entnahme von Blattmaterial für die analytische Biomarkeruntersuchung.

Zur Vorbereitung des zweiten Trockenstress-Containerversuches im Freiland (Sommer 2018) wurden alle erfolgreich akklimatisierten Klone aus dem Jahr 2017 getopft. Dabei wurden sowohl die von der HU-Berlin als auch die vom Projektpartner BS Sämman aus Bautzen nach Berlin-Dahlem transportierten Pflanzen ins gleiche Kultursubstrat getopft, um eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb des Versuches zu gewährleisten. Hierbei mussten auch Containergröße und Anzahl der Pflanzen je Klon im Hinblick auf die Versuchsparameter beachtet werden, jedoch auch abhängig vom Entwicklungsstand der Pflanzen in unterschiedliche Kategorien geteilt werden. Auch mussten in Vorbereitung phytosanitäre Maßnahmen erfolgen, also das Spritzen gegen Blattläuse bei den *Tilia*-Klonen, um weitere Stressparameter auszuschließen. Nach den Voruntersuchungen zur Methodentestung für die Stressuntersuchungen im Container von 2017 an der LFE in Eberswalde wurde der zweite Versuch von den Mitarbeitern der HU Berlin mit 78 Testpflanzen durchgeführt. Hierfür sind 5 *Tilia*-Klone, eine Platane sowie ein *Acer* in einer Pflanzhöhe von ca. 20 cm sowie im Vergleich dazu ein *Tilia*-Klon in ca. 120 cm Pflanzhöhe für sechs Wochen den Trockenstressuntersuchungen unterzogen worden. Die Topfkulturen, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, wurden zu Versuchsstart (20.06.2018) nicht mehr bewässert und es erfolgte, in wöchentlichen Abständen, die Entnahme von Blattmaterial für die analytische Untersuchung. Zur optischen Beurteilung wurden, ebenfalls wöchentlich, Pflanzenhöhe und der Vitalitätszustand, hinsichtlich Blattverfärbung, Blattrollungen und Blattnekrosen aufgenommen. Der Trockenstressversuch an den Jungpflanzen *in vivo* im Sommer 2018 erzeugte teilweise widersprüchliche Ergebnisse bei einigen Klonen zwischen Kontrollvariante und Stressvariante. Obwohl die Klone genetisch identisch waren, zeigten sich gehölzindividuelle Unterschiede der Stressantwort innerhalb einer Klonlinie. Als Gründe sind hierfür die Verwendung von Pflanzen unterschiedlicher Pflanzhöhe und der damit

verbundenen unterschiedlichen Beschaffenheit hinsichtlich Blattgröße und Blattmenge und zu kleiner Topfgröße zu sehen. Anderes Pflanzenmaterial stand zum damaligen Zeitpunkt *in vivo* nicht zur Verfügung.

Für den dritten Trockenstress-Containerversuch fand eine optimale Vorbereitung der Versuchspflanzen im Winter/ Frühjahr 2019 statt. Der verbesserte Versuchsaufbau bestand u. a. im Topfen der Pflanzen vor dem Austrieb in gleiche Topfgrößen und der Akklimatisation im Gewächshaus in Eberswalde bereits vor dem Austrieb (23.04.2019). In folgender Tab. 3 sind die für diese Versuche verwendeten 5 *Tilia*-Klone, 2 *Acer*-Klone sowie eine *Platanus* aufgeführt.

Tab. 3.: Anzahl der untersuchten Klone je Art im Untersuchungsjahr 2019

Gattung	Art	Klon
<i>Tilia</i>	<i>T. x europaea</i> 'Konings'	77000
	<i>T. dasystyla</i>	35.3
		36.3
	<i>T. cordata</i> 'Wega'	67.3
	<i>T. europaea</i> 'Heiligendamm'	120
<i>Acer</i>	<i>A. davidii</i> 'Rosali'	50.3
	<i>A. platanoides</i>	19.05
<i>Platanus</i> .	<i>P. x hispanica</i>	11.3

Begleitend zur Vitalitätsbonitur der Versuchspflanzen wurden alle Töpfe zweimal wöchentlich gewogen, um den Wasserverlust der Stressvariante während der Versuchsdauer dokumentieren zu können. Die Abb. 4 zeigt exemplarisch den relativen Bodenrestwassergehalt der einzelnen Klone für das Versuchsjahr 2019, der während der gut dreiwöchigen Versuchsdauer erwartungsgemäß absinkt. Der stärkste Wasserverlust ist in den ersten 10-13 Versuchstagen zu verzeichnen.

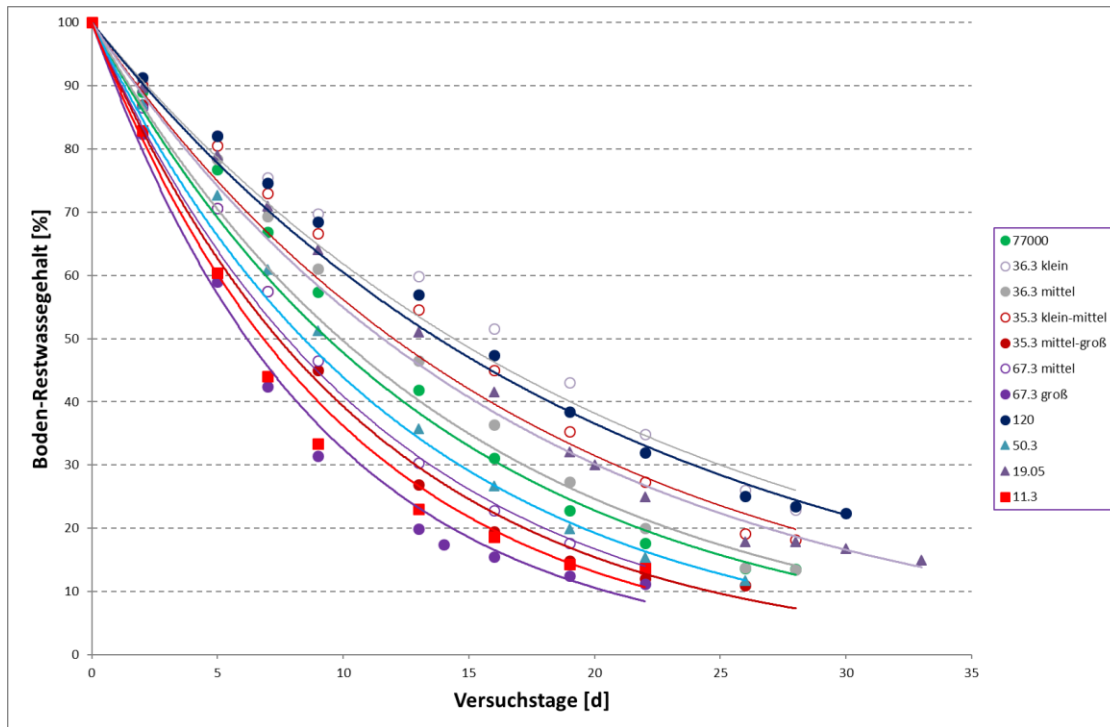


Abb. 4.: Prozentualer Boden-Restwassergehalt der unbewässerten Versuchsvariante in Abhängigkeit von der Versuchsdauer bzw. der untersuchten Klone exemplarisch für das Versuchsjahr 2019



Abb. 5: Versuchspflanzen zu Beginn des Trockenstressversuchs (03.07.2019)



Abb. 6: Zustand der Versuchspflanzen nach ca. drei Wochen Trockenstress (25.07.2019; links: *Tilia dasystyla* (Klon 36.3); rechts: *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3)

Die großen Unterschiede zwischen den Einzelpflanzen (Abb. 6: rechts) sind überwiegend auf die unterschiedlichen Pflanzengrößen und Blattflächen zurückzuführen. Den stärksten Wasserverlust erlitten die mittelgroßen und großen Pflanzen der *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3) und der Ahornblättrigen Platane (Klon 11.3). Die *Tilia x europaea* 'Heiligendamm' (Klon 120) und die kleinen Pflanzen der *Tilia dasystyla* (Klon 36.3) hatten die geringsten Transpirationsverluste.

Mit zunehmender Dauer des Trockenstresses veränderten sich die Blattgehalte einzelner Inhaltsstoffe im Vergleich zu den bewässerten Kontrollpflanzen. Bei der *Tilia x europaea* 'Konings' (Klon 77000) stiegen zunächst die Gehalte an löslichen Kohlenhydraten, was die Osmolalität der Blätter erhöht, um das Restwasser in der Pflanze zu mobilisieren. Ab der dritten Woche stiegen die Gehalte der löslichen Aminosäure Prolin als Stressmetabolit drastisch an (Abb. 7). Dagegen blieben die Chlorophyllgehalte weitgehend stabil.

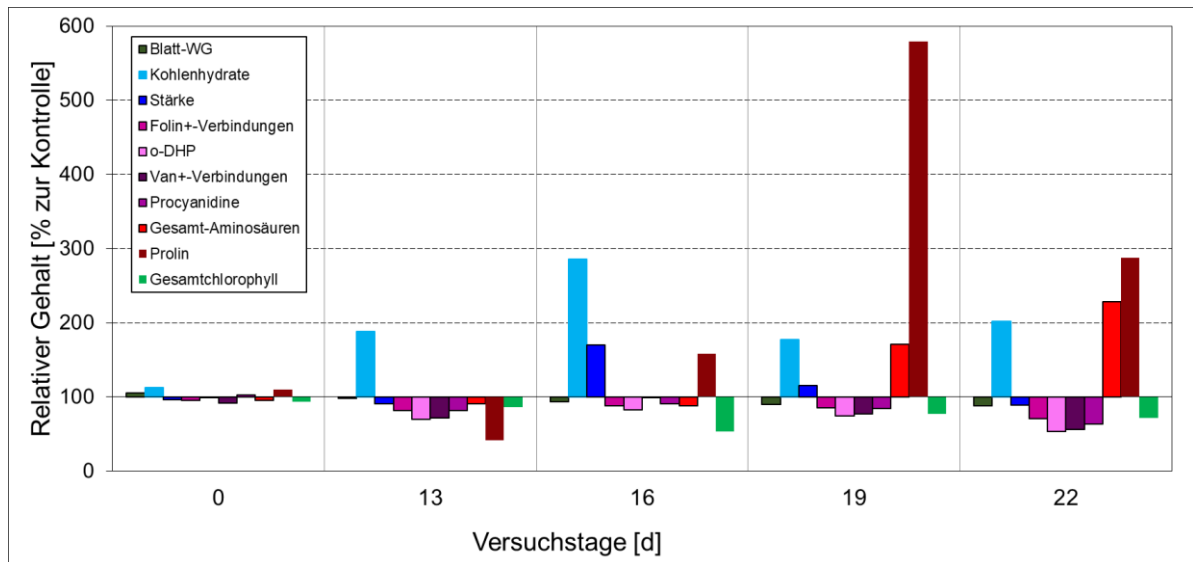


Abb. 7: Relativer Gehalt ausgewählte Blattinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Tilia x europaea* 'Konings' (Klon 77000)

Im Gegensatz zu dem Klon 77000 der Holländischen Linde (*T. x europaea* 'Konings') zeigten sich die Versuchspflanzen des Klons 67.3 – der Winterlinde (*Tilia cordata* 'Wega') deutlich sensibler. Bereits nach zweiwöchiger Versuchsdauer stiegen die Prolingehalte. Die Stärkegehalte nahmen deutlich ab. Ebenso zeigte sich ein erster Abbau des Chlorophylls.

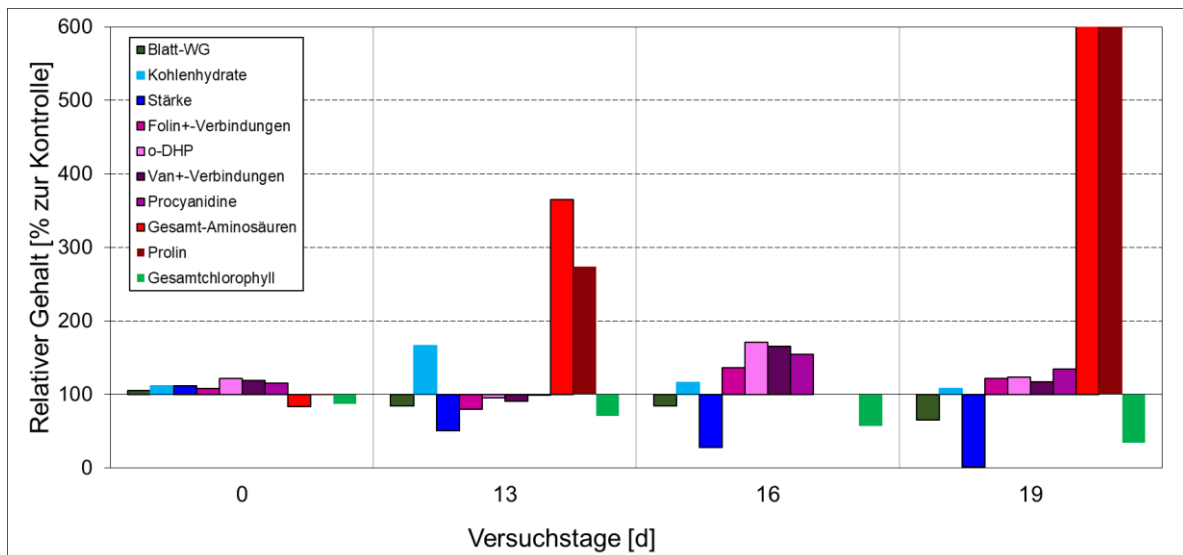


Abb. 8 :Relativer Gehalt ausgewählte Blattinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3)

Insgesamt erwiesen sich die *Tilia*-Klone jedoch als toleranter im Trockenstresstest als die untersuchten Linien des *Acer davidii* 'Rosalie' (Klon 50.3) und des Plantanen-Klons 11.3. Der Schlangenhautahorn war in den ersten zwei Wochen des Trockenstresses sehr stabil, brach dann aber ähnlich wie die Platane abrupt zusammen. Das zeigt auch das Spektrum der Blattinhaltsstoffe im Vergleich zu den bewässerten Kontrollpflanzen. Nach den ersten zwei Wochen Wassermangel stiegen die Gehalte an Prolin und freien Aminosäuren um ein Vielfaches an, während die Stärke nahezu vollständig abgebaut wurde (Abb. 9).

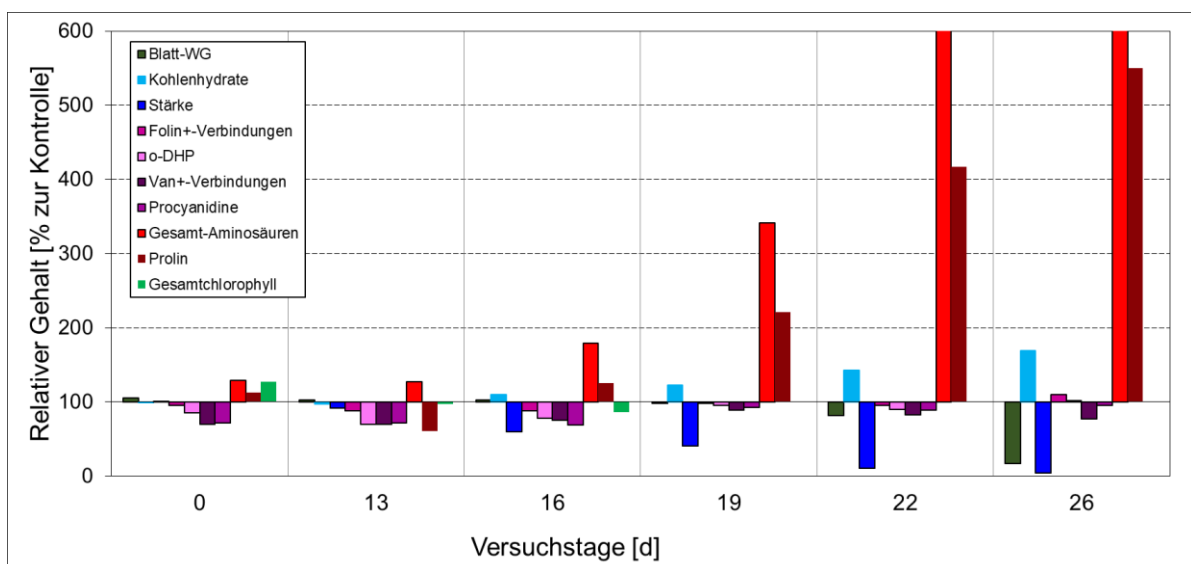


Abb. 9: Relativer Gehalt ausgewählte Blattinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Acer davidii* 'Rosalie' (Klon 50.3)

Die Ahornblättrige Platane (Klon 11.3; *Platanus x hispanica*) fiel vor allem durch eine starke Freisetzung von freien Aminosäuren ab der zweiten Stresswoche auf, was auf einen

verstärkten Proteinabbau hindeutet, während die Prolingehalte kaum anstiegen. Ebenso fielen die Chlorophyll-, Stärke- und Blattwassergehalte ab (Abb. 9).

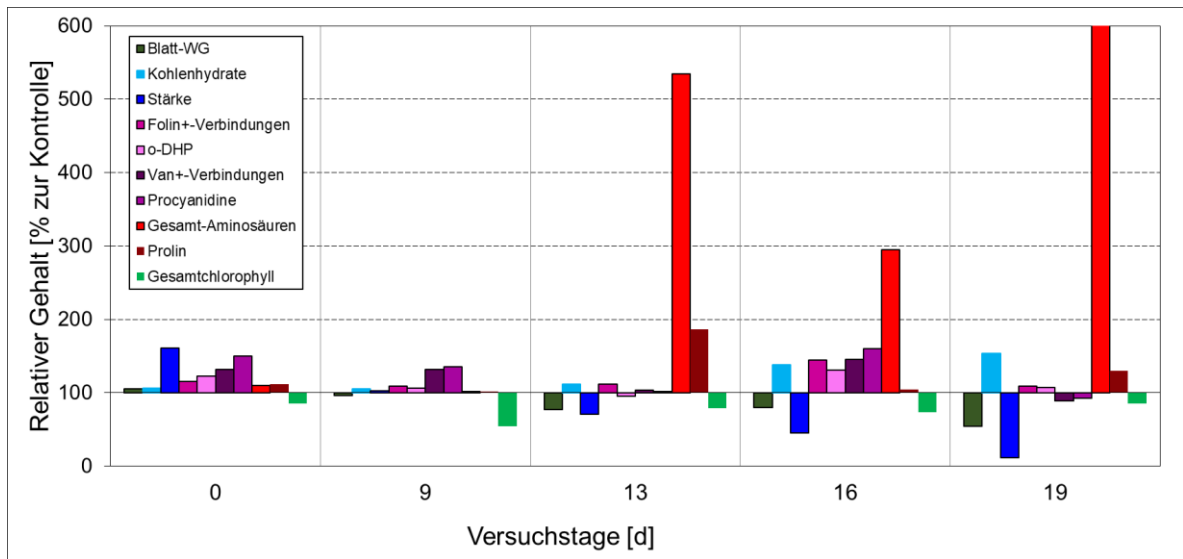


Abb. 10: Relativer Gehalt ausgewählte Blattinhaltsstoffe der unbewässerten Versuchspflanzen in Bezug zu den bewässerten Kontrollpflanzen im Versuchsverlauf bei *Platanus x hispanica* (Klon 11.3)

Der Blattwassergehalt spiegelt den abrupten Zusammenbruch der drei untersuchten Ahorn- bzw. Platanenklone besonders unterhalb eines Bodenrestwassergehalts von <20 % deutlich wider (Abb. 11).

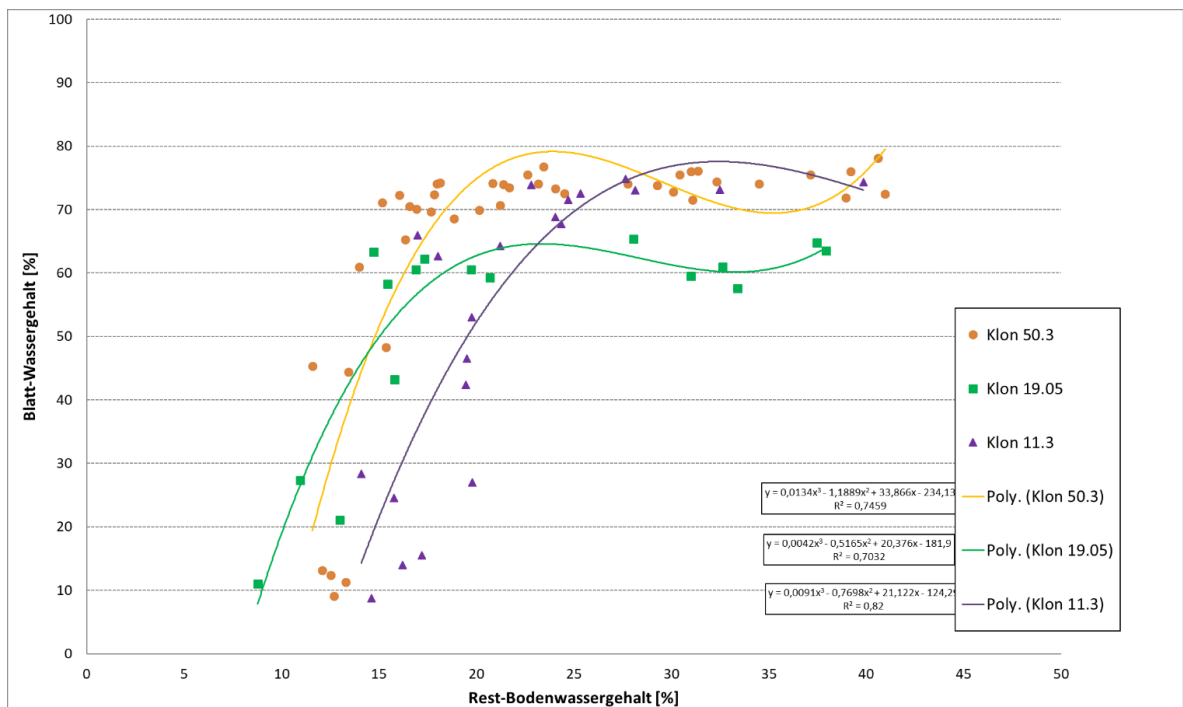


Abb. 11: Blattwassergehalt in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt der beiden *Acer*-Klone (50.3; 19.05) und des *Platanus*-Klons (11.3)

Bezüglich des Blattwasserverlustes in Abhängigkeit vom Bodenrestwassergehalt ergab sich folgende Rangfolge:

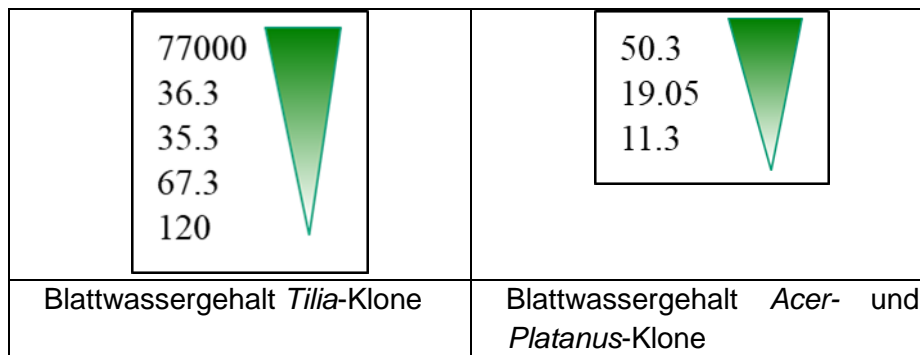


Abb. 12.: Reihenfolge des Blattwasserverlustes in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt

Anschließend wurde mit Hilfe einer hierarchischen Clusteranalyse (Ward-Methode) geprüft, welche spezifischen biochemischen Muster sich ergeben, die verschiedene physiologische Zustände charakterisieren.

Aus dem Spektrum der untersuchten Biomarker wurden für die Clusteranalyse folgende Parameter ausgewählt:

- Blatt-Wassergehalt [%] zur Charakterisierung des Wasserhaushaltes der Bäume,
- lösliche Kohlenhydrate [mg/g TM], Stärke [mg/g TM] als Biomarker des Primärstoffwechsels,
- Gesamtgehalt an löslichen Aminosäuren [$\mu\text{mol/g TM}$],
- Prolin [in % der Aminosäuren] als weiteren Parameter zur Charakterisierung des Wasserhaushaltes.

Bäume, die dem Cluster 1 (grüne Einfärbung) zugeordnet wurden, zeigen eine hohe Vitalität mit hohen Wasser- und Stärkegehalten, während die Gehalte an löslichen Kohlen- und Aminosäuregehalten gering ausfielen. Die intermediäre Clustergruppe 2 (gelbe Einfärbung), die eine mittlere Stressbelastung darstellt, fasst Bäume zusammen, die noch immer hohe Blattwassergehalte haben, deren Kohlenhydrate aber bereits auf Kosten der Stärkegehalten angestiegen sind. Die Gehalte an freien Aminosäuren und Prolin sind nur geringfügig erhöht. Dagegen befinden sich Bäume der Clustergruppe 3 (rote Einfärbung) in einem akuten Stresszustand. Die Gehalte an freien Aminosäuren und Prolin sind sehr hoch, während der Blattwassergehalt nur noch gering ist. Die Stärkegehalten sind aufgebraucht.

Der Klon 77000 (*Tilia x europaea* 'Konings') übersteht die Trockenstressbelastung gut. Nur ein Baum wird am Ende des Trockenstressphase bei einem Restwassergehalt von <24 % dem Cluster 3 zugeordnet. Bei mittlerem Wassermangel befand sich jeweils die Hälfte der Bäume in den Gruppen 1 und 2.

Tab. 4: Zuordnung der Bäume der *Tilia x europaea* 'Konings' (Klon 77000) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt

Rest-WG [%]	100	99 – 24	< 24
	n = 51 x Cluster 1	n = 10 x Cluster 1 n = 10 x Cluster 2	n = 2 x Cluster 1 n = 10 x Cluster 2 n = 1 x Cluster 3

Bei der Kaukasischen Linde (Klon 36.3) fiel die Stressbelastung etwas stärker aus. Aufgrund des etwas höheren Transpirationsverlustes betrug der Bodenrestwassergehalt am Ende des Versuches noch <18 %. Die überlebenden Bäume wurden dem biochemischen Muster 2 und 3 zugeordnet. Aber auch bei einer mittleren Belastung entsprachen die meisten Bäume dem Cluster 2 (1x Cluster 3). Nur 1/5 der Bäume befanden sich noch in dem stressfreien Cluster 1.

Tab. 5: Zuordnung der Bäume der *Tilia dasystyla* (Klon 36.3) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt

Rest-WG [%]	100	99 – 18	< 18
	n = 44 x Cluster 1	n = 5 x Cluster 1 n = 17 x Cluster 2 n = 1 x Cluster 3	n = 4 x Cluster 2 n = 1 x Cluster 3

Noch deutlich sensibler zeigte sich *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3), wo sich bereits bei mittlerer Stressbelastung fast alle Bäume im Stress-Cluster 2 befanden. Bei einem Restwassergehalt von <23 % wurden 2/3 der Linden dem Cluster 3 zugeordnet.

Tab. 6: Zuordnung der Bäume der *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt

Rest-WG [%]	100	99 – 23	< 23
	n = 55 x Cluster 1 n = 6 x Cluster 2	n = 1 x Cluster 1 n = 7 x Cluster 2	n = 12 x Cluster 2 n = 23 x Cluster 3

Wie sich bereits bei der Untersuchung der Blattwassergehalte andeutete, verhielten sich die Ahorn- bzw. Platanen-Klone ganz anders bei zunehmendem Wassermangel als die Linden-Klone. Noch bei mittlerem Trockenstress befanden sich 90 % der Versuchspflanzen (=27 Bäume) in einem stressfreien Biomarker-Muster (Cluster 1). Fiel der Bodenrestwassergehalt auf <17 %, ging über die Hälfte der Bäume in einen akuten Stresszustand (Cluster 3) über, während die anderen Bäume noch der Clustergruppe 2 zugeordnet wurden.

Tab. 7: Zuordnung der Bäume des Schlangenhautahorns Klon 50.3 in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt

Rest-WG [%]	100	99 – 17	< 17
	n = 85 x Cluster 1	n = 27 x Cluster 1 n = 3 x Cluster 2	n = 6 x Cluster 2 n = 7 x Cluster 3

Noch drastischer fällt die Stressreaktion beim Berg-Ahorn (Klon 19.05) aus. Ein Biomarker-Muster, das dem Cluster 2 entsprach, ließ sich nicht abgrenzen. Lange Zeit verblieben die Pflanzen auch bei Wassermangel in dem Biomarkermuster 1 (n=15 Bäume). Bei fortlaufender Transpiration fiel der Bodenrestwassergehalt am Ende des Versuches auf <12 %. In diesem finalen Stadium konnten nur noch von 2 Bäumen Blattproben entnommen werden, die dem Stress-Cluster 3 entsprachen.

Tab. 8: Zuordnung der Bäume des *Acer platanoides* (Klon 19.05) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt

Rest-WG [%]	100	99 – 12	< 12
	n = 23 x Cluster 1	n = 15 x Cluster 1 n = 2 x Cluster 3	n = 2 x Cluster 3

Bei der Platane (Klon 11.3) ließ sich ebenfalls keine Übergangsphase im Stressablauf (Cluster 2) abgrenzen. Bis auf wenige Pflanzen (n=5) befanden sich die meisten Platanen trotz abnehmender Wasserverfügbarkeit in einem physiologisch relativ stressfreien Zustand (zumindest, was die untersuchten Blattinhaltsstoffe betraf). Bei einem Absinken des Bodenrestwassergehaltes auf <17 % gingen bei mehr als der Hälfte der Bäume die biochemischen Muster von der Clustergruppe 1 in die Gruppe 3 über. Viele Bäume verloren aber auch sehr rasch ihre Blätter, so dass eine Analyse nicht mehr sinnvoll war.

Tab. 9: Zuordnung der Bäume der *Platanus x hispanica* (Klon 11.3) in die drei ermittelten Cluster in Abhängigkeit vom Boden-Restwassergehalt

Rest-WG [%]	100	99 – 17	< 17
	n = 44 x Cluster 1	n = 15 x Cluster 1 n = 5 x Cluster 3	n = 3 x Cluster 1 n = 4 x Cluster 3

Am Ende der Vegetationsperiode 2019 wurden im Zuge des Umtopfens von allen Pflanzen die Spross- und Wurzellängen gemessen. Unabhängig von der untersuchten Baumart waren die Sprosslängen bei allen bewässerten Pflanzen meist mehr als doppelt so lang, als bei der Trockenstressvariante. Am geringsten fielen die Zuwachstdefizite bei den mittelgroßen Pflanzen der *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3) aus (Abb. 13 a).

Überraschenderweise bestanden bei den meisten Versuchsvarianten keine signifikanten Unterschiede in den Wurzellängen zwischen den beiden Stressvarianten. Möglicherweise waren hier die Topfgrößen der begrenzende Faktor. Nur bei den beiden *Tilia dasystyla* Klonen (36.3m und 35.3g) und der *Tilia x europaea* 'Heiligendamm' (Klon 120) und bei dem *Acer davidii* 'Rosalie' (Klon 50.3) lagen die Mittelwerte der Trockenstressvarianten über denen der Kontrollen, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. Bei den wenigen Pflanzen des *Acer platanoides* (Klon 19.05) waren die Wurzellängen der Trockenstressvariante deutlich kürzer als bei den Kontrollpflanzen (Abb. 13 b). Aufgrund der sehr ähnlichen Wurzellängen verhielten sich die Spross-Wurzel-Verhältnisse ähnlich wie die Sprosslängen und waren unter Wassermangelbedingungen hochsignifikant vermindert. Auffällig geringere Quotienten traten bei den *Tilia*-Klonen 67.3m und 120 auf (Abb. 13 c). Um die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Klonen zu erleichtern, wurde die prozentuale Verminderung des Spross-Wurzel-Verhältnisse berechnet, wobei die Spross-Wurzel-Verhältnisse der Kontrolle gleich 100 % gesetzt wurden. Dabei zeigte sich, dass prozentuale Verminderung dieses Quotienten bei den *Tilia*-Klonen 120, 36.3k und 35.3m am stärksten ausfielen, d. h., dass das Wurzelwachstum gegenüber dem Sprosswachstum unter Trockenstress besonders stark aktiviert wurde. Die geringsten relativen Spross-Wurzel-Veränderungen waren bei den großen Pflanzen des *Tilia*-Klones 67.3 und bei dem *Tilia*-Klon 77000 zu beobachten (Abb. 13 d).

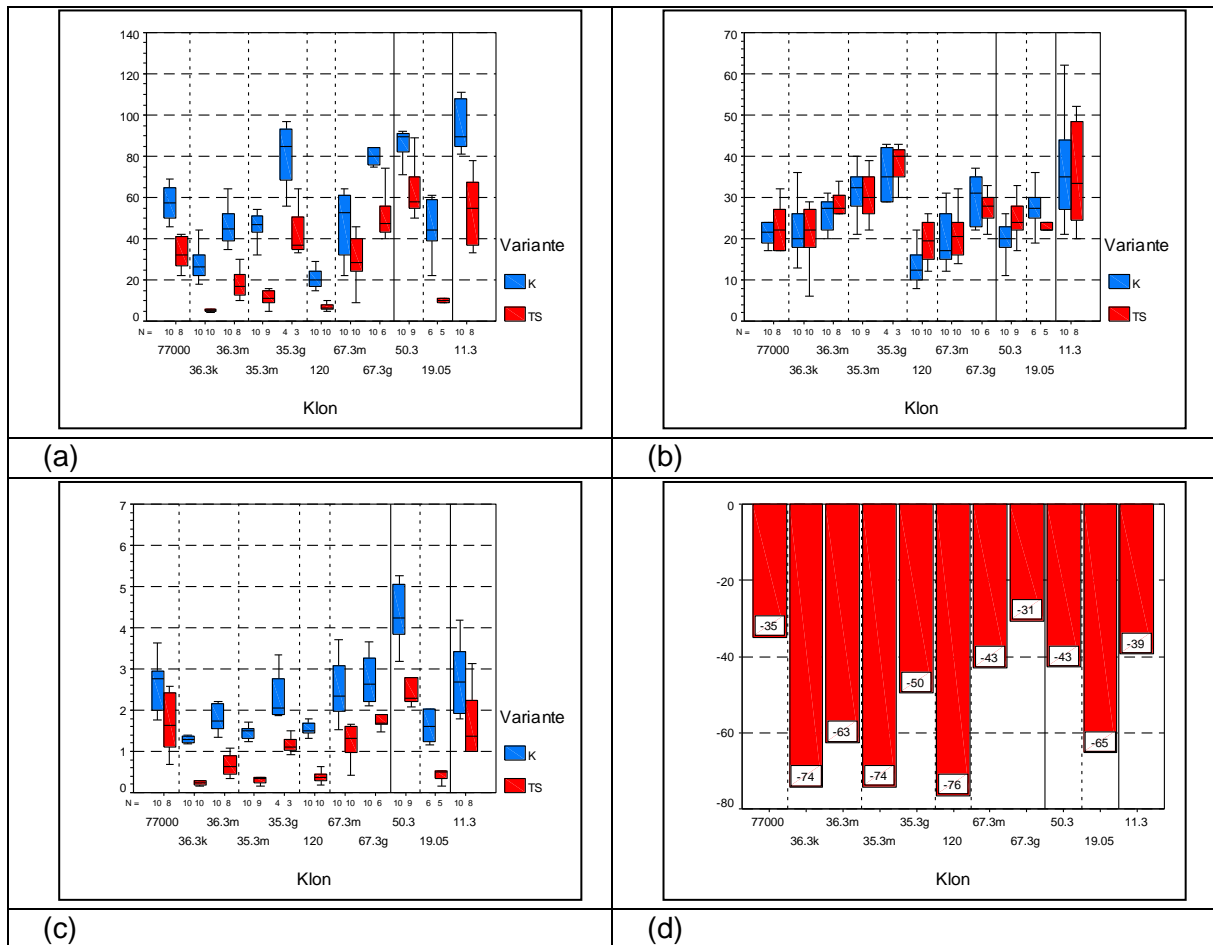


Abb. 13: Spross- und Wurzellängen sowie deren absoluten und prozentualen Verhältnisse aller Klone im Versuchsjahr 2019 differenziert nach Stressvarianten (K=bewässerte Kontrolle; TS=Trockenstress, Erläuterung im Text)

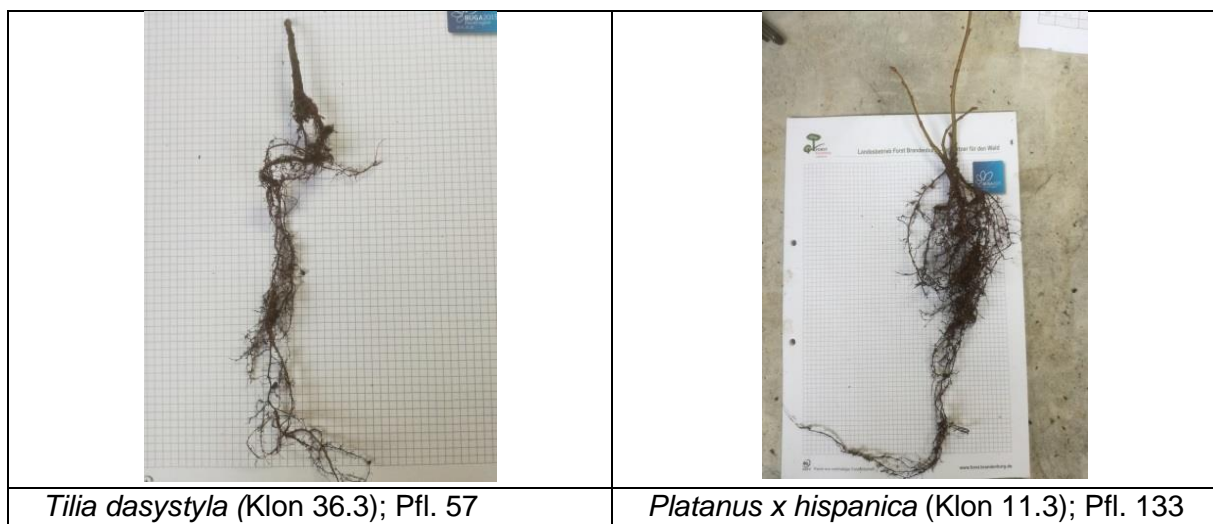


Abb. 14: Untersuchung der Wurzelmorphologie der Klone nach unterschiedlicher Trockenstressbehandlung (links: *Tilia dasystyla* (Klon 36.3); Pfl. 57; rechts: *Platanus x hispanica* (Klon 11.3); Pfl. 133)

Im Frühjahr 2020 wurde der Wiederaustrieb der Pflanzen in drei Stufen bonitiert. Den intensivsten Wiederaustrieb zeigten die drei *Tilia*-Klone *T. x europaea* 'Konings' (Klon 77000) gefolgt von den beiden *T. dasystyla* Klonen 36.3 und 35.5. Aber auch von dem *Acer davidii* 'Rosalie' (Klon 50.3). überlebten alle Pflanzen den Trockenstress in 2019 und die anschließende Vegetationsruhe. Die geringste Wiederaustriebrate zeigte die Platane (Klon 11.3). Hier waren die meisten Pflanzen abgestorben. Ein verminderter Wiederaustrieb war ebenso bei der *Tilia x europaea* 'Heiligendamm' (Klon 120) zu beobachten, bei dem über die Hälfte der Pflanzen nicht wieder austrieb. Der Winterlinden-Klon 67.3 (*T. cordata* 'Wega') hatte den geringsten Anteil vitaler Bäume und den höchsten Anteil von Bäumen mit mittlerer Vitalität. Die beiden Ahornarten verhielten sich ähnlich, wobei dem Spitzahorn-Klon 19.05 zwar mehr Pflanzen der Austriebsstufe „vital“ zugeordnet wurden, aber auch gleichzeitig mehr Pflanzen abgestorben waren (Abb. 16).

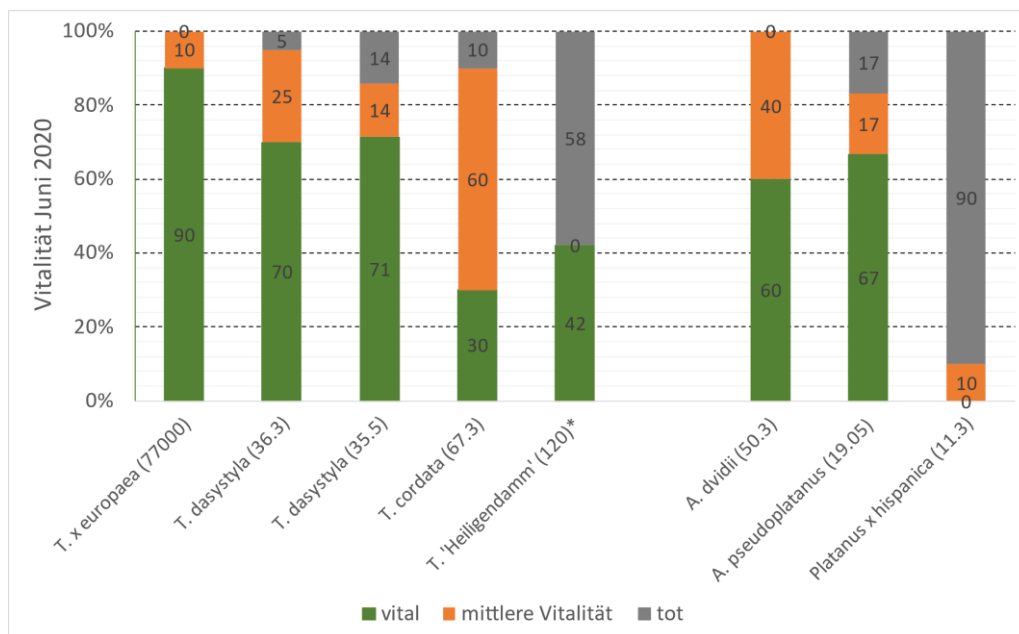


Abb. 15.: Ergebnisse der Austriebsbonitur im Frühjahr 2020 nach dem Trockenstress 2019 differenziert nach Arten/Klonen in drei Vitalitätsstufen

Bezüglich des Wiederaustriebs der Klone im nächsten Frühjahr nach dem Trockenstress ergab sich folgende Rangfolge:

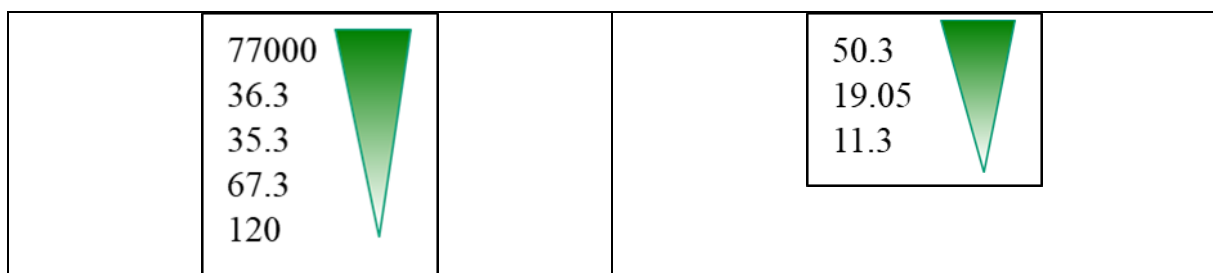


Abb. 16: Reihenfolge des erfolgreichen Wiederaustriebs der Klone im folgenden Frühjahr nach dem Trockenstress

Nach der physiologischen Differenzierung der einzelnen Klone sollte exemplarisch an drei *Tilia*-Linien (Klone 67.3; 36.3; 77000) untersucht werden, inwieweit die Unterschiede genetisch determiniert sind. Insbesondere interessierte die Frage, wie sich die Transkriptome unter Stressbedingungen unterscheiden (d.h. welche Gene werden bei Wassermangel aktiviert oder deaktiviert) und ob hierfür ggf. zusätzlich epigenetische Effekte verantwortlich sind.

Die Analyse des Transkriptoms gibt Aufschluss über die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle produzierten RNAs [mRNAs und nicht-kodierende RNAs (Transkripte)]. Der Vergleich der Genexpression in trockenstressbehandelten und nichtbehandelten *Tilia*-Linien zeigt daher die transkriptionelle Anpassung bei Wassermangel. Daraus können genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen Klonen erkannt werden. Als Untersuchungsmaterial diente tiefgefrorenes Blattmaterial (20 Proben je 3 g Frischgewicht) von den drei *Tilia*-Linien mit und ohne Trockenstressbehandlung. Die Probenentnahme wurde an mehreren Zeitpunkten durchgeführt (Tab. 10).

Tab. 10: Probennahmeplan mit Angabe der Sequenzierungsmethode. Alle Proben: MACE-Seq, M: Methyl-Seq, R: RNA-Seq, S: smallRNA-Seq.

<i>Tilia</i> -Linie	Behandlung	Termin 1 16.07.2019	Termin 2 19.07.2019	Termin 3 25.07.2019	Termin 4 01.08.2019
67.3	Kontrolle	1 ^{M,R}	7	13 ^S	
67.3	Stress	2	8	14 ^{M,S}	
77.000	Kontrolle	3 ^R	9	15	
77.000	Stress	4	10	16	
36.3	Kontrolle	5 ^{M,R}		17 ^S	11
36.3	Stress	6		18 ^{M,S}	12 ^M
35.3	Kontrolle				19
35.3	Stress				20

Das während des Trockenstressversuches aufbereitete Probenmaterial (Abb. 17) wurde an das Labor der *Agroscience AIPlanta GmbH*, Neustadt-Mußbach in Trockeneis übergeben. Dort wurden alle Untersuchungen, bis auf die Erstellung der Sequenzierungsdaten (GenXPro, <https://genxpro.net>) durchgeführt.



Abb. 17: Probengewinnung für die (epi-)genetischen Untersuchungen in flüssigen Stickstoff während des Trockenstressversuches 2019

Das Blattmaterial wurde in einer Zelmühle (Retsch MM301) homogenisiert, und die Nukleinsäuren mittels folgender Extraktionskits extrahiert:

- DNA: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
- RNA: InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit (Stratag Molecular)
- Kleine RNAs: MirVana miRNA Isolationskit (Invitrogen)

Zur Identifizierung differenziell exprimierten Genen wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Die RNA-Sequenzierung dient hier als Vorlage zur Assemblierung der Reads zu Contigs. Die anschließende Genannotation wurde auf die Pflanzen innerhalb der Familie der Malvengewächse begrenzt (z.B. *Theobroma cacao*, *Gossypium raimondii*, *Corchorus olitorius*, etc.). Mit der MACE-Sequenzierung (Massive analysis of cDNA Ends) wurden die Transkripte in allen Proben quantifiziert und durch den Abgleich mit der RNA-Sequenzierung identifiziert.

Für die Bestimmung des Methylierungsstatus der Genome wurde die DNA mit einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym (HpaII), dessen C'CGG-Schnittstelle durch Methylierung je eines der Cs inhibiert wird, fragmentiert und sequenziert.

Folgende Datenbanken wurden bei der Recherche eingesetzt:

- www.ncbi.nlm.nih.gov
- www.uniprot.org
- www.mirbase.org

Im Zuge der Transkriptomanalyse wurden insgesamt 21.909 Gene in allen *Tilia*-Linien und Konditionen identifiziert. Davon wurden Gene als differenziell exprimiert betrachtet, die nach der Trockenstressbehandlung eine mindestens zweifache Änderung der Expression zeigten und zusätzlich mehr als 100 Reads unter den jeweiligen Konditionen aufwiesen („Kontrolle“ bei hochregulierten Genen und „Stress“ bei runterregulierten Genen).

Die physiologisch sensitive *Tilia*-Linie (Klon 67.3; *T. cordata* 'Wega') zeigte im Vergleich zu den toleranteren Klonen *T. x europaea* 'Konings' (Klon 77000) und *T. dasystyla* (Klon 36.3) als Stressantwort eine starke transkriptionelle Änderung. Zum einen war die Anzahl differenziell exprimierter Gene stark erhöht (1.284 im Vergleich zu 135 bzw. 109). Zum anderen ist das Ausmaß der Expressionsänderung bei dem Klon 67.3 deutlich ausgeprägter als bei den beiden anderen Klonen (Tab. 11). Dies ist ein erster Hinweis auf unterschiedliche Strategien der Stressreaktion der verschiedenen *Tilia*-Linien, die bei genauerer Betrachtung der Funktion differenziell regulierter Gene offensichtlich werden.

Tab. 11: Anzahl der differenziell exprimierten Gene in *Tilia*-Linien (*T. cordata* 'Wega' (Klon 67.3), *T. x europaea* 'Konings' (Klon 77000) und *T. dasystyla* (Klon 36.3)) nach Trockenstressbehandlung mit mindestens 100 Reads und einer Expressionsänderung >2-fach.

<i>Tilia</i> -Klon	Anzahl der TS-relevanten Gene	
	hochreguliert	runterreguliert
67.3	637	647
77000	40	95
36.3	73	36
Gesamt	21.909	

Die Stressantwort zeichnete sich bei Wassermangel bei dem Klon 67.3 durch eine Deregulierung der in der Energiegewinnung und Stoffwechsel beteiligten Gene (z.B. *RuBisCO*, *Chlorophyll-bindende Proteine*) aus. Dies führt zu einem Wachstumsarrest, um mit dem verbleibenden Wasser so lange wie möglich auszukommen. Um dem reduzierten Energiebedarf gerecht zu werden, sind Gene hochreguliert, die im Abbau von Proteinen beteiligt sind (z.B. *Cysteine-Proteinasen*). Dies erklärt auch die hohen Gehalte an freien Aminosäuren bei den biochemischen Analysen.

Der Wassermangel induzierte die Produktion des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA). ABA steuert die Schließung der Spaltöffnungen am Blatt (Stomata), was den Wasserverlust durch Transpiration minimiert. Dies spiegelt sich in der Hochregulierung der bei ABA-Produktion und Signalweiterleitung-beteiligten Gene (z.B. *Carotenoid cleavage dioxygenase 1*) wider. Jedoch findet bei geschlossenen Stomata kein Gasaustausch statt, was zu einer Anreicherung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (z.B. H_2O_2) in der Zelle führt. Zum Schutz vor den oxidativen Schäden werden Antioxidantien produziert (z. B. *Ferretin*, *Phosphoenolpyruvat carboxykinase*, *Catalase*).

Ein wichtiger Teil der Stressantwort ist die Koordination der Genexpression der trockenstressrelevanten Gene. Dieses komplexe Netzwerk wird unter anderem durch Transkriptionsfaktoren dirigiert, die sich direkt an die DNA binden und die Expression vieler verschiedener Gene steuern. Die stark erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *Homeobox 7* lässt seine Funktion in der Koordination der trockenstressinduzierenden Genregulation vermuten.

Im Gegensatz zum sensitiven Klon 67.3 (*Tilia cordata* 'Wega') induziert der Wassermangel bei dem toleranten Klon 77000 (*Tilia x europaea* 'Konings') nur eine milde Änderung der Expression der Energiegewinnung- und Stoffwechsel-Gene. Das bedeutet, in dieser Linie wurde das Wachstum wenig eingeschränkt.

Bei dem intermediären Klon 36.3 (*Tilia dasystyla*) wurden Gene der Energiegewinnung (*Chlorophyll-bindende Proteine*) noch hochreguliert. Zusammen mit dem Wassermangel kann diese Überreaktion zu schweren Schäden in der Pflanze führen.

Zusätzlich wurden in allen *Tilia*-Linien Insekten- und Blattlaus-spezifische RNA detektiert. Das deutet auf einen Schädlingsbefall der Pflanzen und daraus resultierend eine Verunreinigung der RNA-Proben hin.

Da sich die Trockenstressreaktionen der einzelnen Individuen auch innerhalb der Klonlinien unterschieden, stellte sich die Frage, ob die jeweilige Trockenstressreaktion nicht nur genetisch determiniert ist, sondern auch einer epigenetischen und damit baumindividuellen Regulation unterliegt. Ein Hauptmerkmal der epigenetischen Genregulation ist die DNA-Methylierung. Diese Modifikation der DNA kann die Expression eines Gens beeinflussen,

wenn regulatorische Sequenzen methyliert sind (z.B. Promotorsequenz oder Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren).

Um den Methylierungsstatus des Genoms der untersuchten *Tilia*-Klone festzustellen, wurde die DNA mit einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym fragmentiert. Das Enzym schneidet die DNA an der Erkennungssequenz C'CGG, die allerdings im methylierten Zustand blockiert ist und nicht geschnitten werden kann. Durch eine anschließende PCR der Restriktionsfragmente mit einer Mischung von zahlreichen kurzen und damit unspezifischen Primern werden Produkte generiert, die sich je nach Methylierungsstatus des Ausgangsmaterials unterscheiden. Liegt beispielsweise in einem Fragment eine CCGG-Schnittstelle vor, kann ein PCR-Produkt nur dann gebildet werden, wenn diese Sequenz methyliert vorliegt. Ist die Sequenz nicht methyliert, wird das Fragment geschnitten und es kann keine PCR-Amplifikation erfolgen. Die generierten PCR-Produkte aus diesen Experimenten wurden anschließend sequenziert.

Wenn der Trockenstress einen Einfluss auf die DNA-Methylierung und somit auf die Expression trockenstressrelevanter Gene hat, müsste ein verändertes Methylierungsmuster zu unterschiedlich detektierten Sequenzen führen. Als einschränkender Faktor dieser Analyse erwies sich das fehlende Referenzgenom der Linde. Deshalb wurden planmäßig nur die Unterschiede in trockenstressbehandelten und nicht behandelten Linien verglichen. Dies ergibt nur Informationen über das Vorhandensein der Methylierung an einer bestimmten Stelle, jedoch fehlen jegliche Informationen über den genetischen Kontext.

Ein weiteres Hindernis war die Präsenz von DNA aus Chloroplasten und Mitochondrien in den Proben. Insgesamt wurden 1.048.576 Sequenzen identifiziert. Nach einer ersten Bereinigung verblieben noch 416.354 Sequenzen, die der genomischen DNA zuzuordnen sind. Durch den hohen Anteil an Plastid-DNA war die Anzahl an Reads von genomischen DNA-Fragmenten so gering, dass abschließend noch keine verlässlichen Aussagen über eine mögliche differentielle Methylierung gemacht werden konnte. Eine Möglichkeit dieses Problem bei künftigen Untersuchungen zu umgehen, wäre eine Anreicherung der Zellkerne mit anschließender Extraktion der Nukleinsäure. Somit wäre nur die genomische DNA für die Analyse vorhanden. Diese erweiterten Untersuchungen waren jedoch im Projektzeitraum nicht mehr zu realisieren.

Aufgrund der Problematik in der Analyse des Methylierungsstatus wurde eine Untersuchung *kleiner RNAs* durchgeführt. Neben der DNA-Methylierung, sowie Veränderung der Chromatinstruktur durch Histon-Modifikationen, sind *kleine RNAs* Teil der epigenetischen Regulation. Sie sind ein Teil des RNA-Interferenz-Mechanismus. *Kleine RNAs* mit Größen zwischen 20 bis 27 Nucleotiden (nt) werden hauptsächlich in microRNA (miRNAs) und small interfering RNAs (siRNAs) unterschieden. miRNAs und 21-nt lange siRNAs führen zur

Stilllegung eines Gens, indem sie sequenzspezifisch den Abbau der Transkripte einleiten. Folglich werden keine Proteine mehr gebildet. Die miRNAs sind generell sehr konserviert, wodurch eine Identifizierung eines Zielgens auch aus anderen Pflanzenarten möglich ist, jedoch können auch artenspezifische Unterschiede in der Funktion eines Gens bzw. der Sequenz vorliegen. Das Auftreten von 24-nt siRNAs steht in direkter Verbindung mit der sequenzspezifischen *de novo* DNA-Methylierung. Jedoch ist auch hier die Zuordnung auf die genomische Region ohne Referenzgenom nur sehr bedingt möglich.

Insgesamt wurden 119.304 Sequenzen mit einer Größe zwischen 17-56 nt identifiziert. Die RNA der Längen 21, 22 und 24-nt wurden herausgefiltert. Zur Identifizierung einer miRNA wurden die einzelnen Sequenzen mit den bekannten miRNAs der miRBase Datenbank (www.mirbase.org) abgeglichen. So konnten einige bekannte miRNAs identifiziert werden. Zusätzlich wurden potenzielle Kandidaten für neue miRNAs erkannt. Die Identifizierung eines Zielgens, das durch 21-nt siRNAs reguliert wurde, forderte ein Zusammenfassen einzelner, überlappender siRNA Sequenzen zu sogenannten Contigs. Dabei konnte eine Sequenz um eine bzw. mehrere Basen verschoben sein und/oder es fand ein Basenaustausch statt. Beides erschwert die Suche nach den überlappenden Ziel-Sequenzen, da jeweils wieder eine neue Sequenz entsteht. Jede Sequenz wurde in kleinere Stücke unterteilt, die für den Abgleich mit identischen Zielgenen verwendet wurden. Dies ist zwingend notwendig, da jede Sequenz unterschiedliche häufig gezählt wurde (Counts). Die Erfassung aller Sequenzen war zwingend nötig damit die Summe der Counts erfasst wird, wodurch der Einfluss der Trockenstressbehandlung deutlich wird.

Die Ergebnisse der Analyse kleiner RNAs zeigen eine hohe Wahrscheinlichkeit für epigenetische Gen-Regulation zur Bewältigung des Trockenstresses in den untersuchten *Tilia*-Linien an. Die Ergebnisse sollten daher dazu ermutigen, diese epigenetischen Studien fortzusetzen. Eine Genomsequenzierung der verwendeten *Tilia*-Sorte und „*whole-genome bisulfite sequencing*“ (WGBS) Analysen wäre von großem Nutzen, um den Methylierungsstatus regulatorischer Elemente genau bestimmen zu können.

Insgesamt bestätigen die exemplarisch durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen an den drei Lindenklonen die deutlichen Unterschiede in den biochemischen und baumphysiologischen Stressreaktionen, was den Zusammenhang zur genetischen Determination der physiologischen Stressreaktion untermauert.

5.3 Weiterkultur der *in vitro* erzeugten Gehölze zum Alleebaum

Die Abgabe der ersten Gehölze zur Weiterkultur und zu der Erziehung zum Alleebaum erfolgte erstmals ab 2017 an den Projektpartner Baumschule Nauen. Anschließend gingen die Pflanzen bei entsprechendem Entwicklungsstand an die Baumschule Lorberg, erstmals 2017 (aus Vorkultur der HU Berlin), 2018 (aus Kultur BS Nauen) und ab da jedes Projektjahr

von der HU Berlin an die BS Nauen. Die Jungpflanzen erhielten von den Mitarbeitern der HU Berlin Schlaufenetiketten, welche mit Klonnummer und botanischen Namen sowie einem QR-Code mit Hintergrundinformationen zu dem Versuch, wie Nährmediumvariante, Akklimatisierungsdatum etc. beinhalteten. Dies sollte später Rückschlüsse zur Kulturführung *in vitro* zulassen, da die Bäume auch langfristig, über den Projektzeitraum hinaus, beobachtet und bonitiert werden sollen. Allerdings kam es durch die Baumschularbeit bei den kleinen Jungpflanzen, wie Umtopfen oder der Überkopfberegnung, zu Verschmutzungen, so dass der QR-Code vom Smartphone nicht mehr ausgelesen werden konnte.

Im Verlauf der Akklimatisation mussten die Kulturen *in vitro* auf hormonfreie Kulturmedien gesetzt werden, bevor diese auf ein Bewurzelungsmedium überführt werden konnten. Dieser Prozess fand gestaffelt statt, um schrittweise Pflanzen aus *in vitro* ins Gewächshaus überführen zu können. Idealerweise beträgt die relative Luftfeuchte während der Akklimatisationsphase 95 bis 100 %. Die konventionelle FOG-Anlage im Gewächshaus der HU Berlin schafft jedoch nur 70 % Prozent relative Luftfeuchte. Um die Überlebensrate der Sprosse bei der Überführung *in vivo* Bedingungen zu verbessern, erfolgte der Aufbau einer neuen mobilen FOG-Anlage (2019). Die Programmierung der Steuerung wurde selbst übernommen, da die handelsüblichen Lösungen zu teuer bzw. nicht praktikabel waren, da die Sensoren zu schnell ausfielen und nicht eigenständig ausgetauscht werden konnten, so dass die Pflanzen zu schnell abstarben. Durch die selbstständige Programmierung konnte auch eine Überwachung des Systems ermöglicht werden, um bei Ausfall oder Störung schnellstmöglich reagieren zu können. Durch diese neue FOG-Anlage erfolgte die Akklimatisation der Pflanzen im Gewächshaus erstmalig ab Mitte Dezember 2019, (zuvor immer erst ab März/April). Mit strahlungsabhängiger Zusatzbeleuchtung konnten die Pflanzen bereits nach fünf Wochen schrittweiser von ursprünglich 98 auf 65 % rel. Luftfeuchte abgehärtet werden. Die Pflanzen erreichten in dieser Zeit Zuwächse bis 15 cm, was als erheblicher Vegetationsvorsprung zu verzeichnen ist. Das System lief zuverlässig und es konnte eine (genotypabhängige) Überlebensrate von 70 bis 100 % erzielt werden. Diese Entwicklung bedeutete einen großen Projektfortschritt. Somit konnte in den Folgejahren auch die Überführung der Gehölze an die Gewächshausbedingungen bereits ab Oktober starten, um die Vegetationsperiode im Folgejahr noch besser ausnutzen zu können.



Abb. 18: Akklimation der *in vitro*-Pflanzen im Forschungsgewächshaus der HU Berlin

Die getopften Jungpflanzen aus *in vitro*-Kultur wurden für die Weiterkultur in der Baumschule Nauen vorbereitet. Hierzu etikettierten die Mitarbeiter der HU Berlin die Gehölze. Anschließend wurden sie in Kisten sortiert und zur Baumschule Nauen in mehreren Transporten gebracht (Abb. 19).



Abb. 19: Packen der ca. 3000 Jungpflanzen für die Weiterkultur in der Baumschule Nauen

Die Unterschiede der Pflanzenqualität durch das neu entwickelte FOG-System, gegenüber der Standardmethode, innerhalb der Akklimation im Gewächshaus sind deutlich zu erkennen (Abb. 20).



Abb. 20.: Vergleich Akklimation 2018 (links, Standard-Methode) und 2019 (rechts, neu entwickeltes Fog-System)

Die Jungpflanzen zeigten innerhalb der Vegetationsperiode einen enormen Zuwachs, was in der Kulturführung *in vitro* begründet ist (Abb. 21).



Abb. 21: Akklimatisation von 2019, (links: Ahorn und rechts: Ulme)

Die Pflanzen aus der Akklimatisierungsphase Winter 2020/21 wurden in den Sommermonaten 2021 getopft: 475 *Tilia tuan*, 400 *Tilia oliveri*, 200 *Tilia 'Humboldt'* und bleiben zur Weiterkultur und Überwinterung bei der HU Berlin und gehen nach Projektende im Frühjahr 2023 an die Baumschule Nauen.

Bei der Baumschule Nauen werden zum Projektende ca. 4200 Pflanzen von 20 Klonen kultiviert. Entsprechend des unterschiedlichen Kultivierungsfortschritts befinden sich die Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Durch die Mitarbeiter der HU Berlin konnten im Rahmen der Entwicklungsarbeit nicht so hohe Stückzahlen gleichzeitig produziert werden, wie das in *in vitro*-Produktionsbetrieben möglich wäre. Da die Anzucht einer dynamischen Abfolge unterliegt, werden auch nach Projektende durch die Mitarbeiter der HU Berlin noch restliche Pflanzen an die Baumschule Nauen zur Weiterkultur abgegeben. Es erfolgt dann eine Selektion hinsichtlich Qualität und Entwicklungsstand durch die Baumschule Nauen.

Zum Projektende im April 2022 befanden sich in der Akklimatisierung im Gewächshaus der HU Berlin noch folgende Pflanzen aus der letzten Akklimatisierung im Winter 2021/22: 96 *Tilia tuan*, 135 *Acer davidii 'Rosalie'*, 8 *Tilia oliveri*, 166 *Tilia mongolica*, 170 *Tilia miqueliana* und 453 *Tilia 'Humboldt'*. Diese Pflanzen werden voraussichtlich im Herbst 2022 oder 2023 an die Baumschule Nauen zur Weiterkultur abgegeben.

In den Quartieren der Baumschule Nauen befinden sich derzeit noch folgende *in vitro* angezogene Klone/Sorten zur Weitergabe an die Baumschule Lorberg: *Tilia cordata 'Wega'*, *Tilia x europaea 'Konings'*, *Tilia mongolica*, *Tilia tuan*, *Tilia dasystyla* (2 Klone), *Tilia oliveri*, *Tilia 'Humboldt'*, *Tilia europaea 'Heiligendamm'*, *Platanus x hispanica* (2 Klone),

Catalpa speciosa, *Diospyros lotus*, *Diospyros virginiana*, *Toona sinensis*, *Liquidambar orientalis*, *Acer x zoeschense* 'Annae', *Acer platanoides* (2 Klone), *Acer davidii* 'Rosalie'.

Bei der Baumschule Lorberg befinden sich derzeit ca. 626 Pflanzen (8 Klone) im Produktions- und Demonstrationsquartier. Hierzu gehören 73 *Tilia cordata* 'Wega', 162 *Tilia x europaea* 'Konings', 348 *Platanus x hispanica*, 14 *Catalpa speciosa*, 10 *Diospyros lotus*, 4 *Diospyros virginiana*, 11 *Toona sinensis*, 4 *Liquidambar orientalis*. In das Demonstrationsquartier sollen 8 Pflanzen je Klon in einem Pflanzabstand von 4x4m gesetzt werden und diese Pflanzen werden, je nach Verfügbarkeit, jede Saison „aufgefüllt“.

Für die Kennzeichnung der wissenschaftlich bearbeiteten *in vitro* Klone wurde eine Klonbezeichnung vorgenommen (Tab. 12).

Tab. 12: Klonbezeichnungen der *in vitro* erzeugten Projektpflanzen

Klonnummer	Klonname
50	<i>Acer davidii</i> 'Rosalie'
19.05	<i>Acer platanoides</i> 'AlleeGrün'
21.05	<i>Acer platanoides</i> 'Berlin'
154	<i>Acer x zoeschense</i> 'Annae'
16.1	<i>Diospyros lotus</i> 'AlleeGrün'
16.4	<i>Diospyros virginiana</i> 'AlleeGrün'
26.5	<i>Catalpa speciosa</i> 'AlleeGrün'
13.3	<i>Liquidambar orientalis</i> 'AlleeGrün'
11.3	<i>Platanus x hispanica</i> 'AlleeGrün'
40.57	<i>Platanus x hispanica</i> 'Branitz'
35.3	<i>Tilia dasystyla</i> 'BoGa'
36.3	<i>Tilia dasystyla</i> 'AlleeGrün'
77000	<i>Tilia x europaea</i> 'Konings'
120	<i>Tilia x europaea</i> 'Heiligendamm'
82002	<i>Tilia</i> 'Humboldt'
114.13	<i>Tilia miqueliana</i> 'AlleeGrün'
113.15	<i>Tilia mongolica</i> 'AlleeGrün'
38.3	<i>Tilia oliverii</i> 'AlleeGrün'
46.15	<i>Tilia tuan</i> 'AlleeGrün'
67.3	<i>Tilia cordata</i> 'Wega'
23.4	<i>Toona sinensis</i> 'AlleeGrün'

5.4 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen

Entsprechend der Projektziele wurde durch die OG „Klimaangepasste Baumarten für Brandenburg/Berlin“ ein Gehölzsortiment entwickelt, das aus vorselektierten, *in vitro* erzeugten und physiologisch (hinsichtlich der Trockenstresstoleranz) geprüften Gehölzen besteht und im Herbst 2022 an erste Freilandstandorte gepflanzt werden kann.

Neben der eigentlichen Gehölzproduktion konnten insbesondere hinsichtlich der Methodenentwicklung, für die Erzeugung von Gehölzen auf eigener Wurzel als *in vitro*-Kultur große Fortschritte erzielt werden. Innerhalb des Vorhabens konnten Protokolle für die Kulturführung genotypabhängig für 10 *Tilia*-Klone und 4 *Acer*-Klone als auch für 7 Klone 6 weiterer Gattungen wie *Platanus* (2 Klone), *Diospyros* (2 Klone), *Catalpa*, *Toona* und *Liquidambar* erarbeitet werden. Allerdings stagnierte die Vermehrungsrate der Pflanzen innerhalb der Kulturführung oftmals. Für diese Klone wurden immer wieder neue Versuchsmedien getestet. Trotzdem starben 19 Klone innerhalb der *in vitro* Kultur ab. Da in den Wintermonaten genetisch festgelegte Wachstumsruhen bei den Pflanzen auftreten können, wurde bei diesen Klonen auf Phytohormongaben verzichtet. Jedoch ist gerade dies der Zeitraum, indem die Pflanzen zu höchsten Stückzahlen hochvermehrt und bewurzelt werden müssen, um im zeitigen Frühjahr ins Gewächshaus überführt werden und somit die komplette Vegetationszeit für das Wachstum nutzen zu können.

Entgegen dem Projektziel konnten für die Gattung *Quercus* keine dauerhaften *in vitro* Kulturen entwickelt werden, obwohl innerhalb des Projektzeitraumes einige *Quercus*-Klone erfolgreich unter Laborbedingungen überführt werden konnten. Nach ca. 3 bis 9 Monaten waren diese jedoch abgestorben. Hierfür wurden viele unterschiedliche Nährmedien getestet, vor allem auch in Hinblick auf unterschiedliche Gefäßtypen, da die Vermutung besteht, dass *Quercus* den hohen relativen Luftfeuchten (98 %) innerhalb der *in vitro* Kultur nicht standhält und darauf empfindlich reagiert.

Die Baumschulen Nauen GmbH hat ab Herbst 2017 fort folgend Pflanzen aus der *in vitro*-Vermehrung und Anzucht der HU Berlin erhalten. Diese und auch die in der Folgezeit regelmäßig dorthin abgebenden Gehölze wurden für die Jungbaumproduktion aufgeschult. In den Quartieren der Baumschulen Nauen wurde kein wissenschaftlich angelegter Vergleich zu konventionell veredelten Jungbäumen in Stresstests angelegt. Es erfolgte die Anzucht nach fachlicher Praxis in der Baumschulproduktion. Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob sich die Produktionszeit für den Jungbaum sichtbar verkürzt oder vergleichbar mit der konventionellen Produktion deckt. So sollte festgestellt werden, ob die Kultur, der *in vitro* vermehrten Alleebäume, einen produktiven und damit wirtschaftlichen Vorteil gegenüber der konventionellen Kultur von veredelten Alleebäumen besitzt. Die Aufschulungen erfolgten somit sowohl als Herbst- und auch als Frühjahrspflanzung. Abgesehen von der Gattung *Acer* wurden alle Gehölze in das Freiland gepflanzt. Die *Acer* wurden aus phytosanitären Gründen (a. G. der Problematik *Verticillium*befall) als Containerkultur geführt. Die Gehölze der Herbstaufschulung hatten einen deutlichen Entwicklungsvorsprung gegenüber der Frühjahrsaufschulung bei sonst gleichen Produktionsbedingungen bis Mitte der Vegetationszeit. Insgesamt konnten die Gehölze

jeweils als Jungbäume mit der Sortierung H 2xv 8-12 nach zwei Vegetationsperioden durch die schnellen Zuwächse an die Baumschulen Lorberg zur weiteren Kultivierung zum Alleebaum geliefert werden. Dies ist für die Baumschulpraxis unter den klimatischen und geographischen Gegebenheiten im Land Brandenburg eine deutliche Produktionsverkürzung um mindestens ein Jahr, teilweise um zwei Produktionsjahre. Damit hat sich die Arbeitshypothese zur Verkürzung der Produktionszeit für Jungbäume bestätigt.

Die für die *in vitro*-Phase aufwendig entwickelten Stresstests und biochemischen Nachweisreaktionen aus minimaler Pflanzenbiomasse erbrachten nur zum Teil praktisch verwertbare Ergebnisse. Hinsichtlich ihres methodischen und wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns sind die Ergebnisse allerdings wertvoll und entwickeln neue Ideen für Folgevorhaben. Jedoch steht ein jederzeit sicherer, für alle Gehölzsortimente einheitlicher und praktisch anwendbarer Frühtest mit biochemischen Markern in der *in vitro*-Phase nicht zur Verfügung. Hierfür waren die Variabilitäten zwischen Arten und Klonen zu hoch bzw. die Stressreaktionen unterschieden sich nur in Ausnahmefällen zwischen der Kontroll- und Stressvariante. Unterschätzt wurde hierbei, dass die *in vitro*-Kultur selbst eine stressphysiologisch relevante Belastungssituation darstellt. Positive Ansätze für weiterführende Untersuchungen boten die Induktion von Trockenstress durch Silikagel, der Hitzestress- sowie der Salzstressversuch.

Im Gegensatz dazu waren die *in vivo*-Trockenstressversuche, als Gefäßversuch mit etablierten Jungpflanzen unter Gewächshausbedingungen sehr erfolgreich. Aus den im letzten Versuchsjahr 2019 getesteten Klonen ließen sich mit Hilfe der Biomarkerreaktionen und der daraus abgeleiteten biochemischen Muster Rangfolgen der Trockenstresstoleranz erstellen bzw. unterschiedliche Anpassungsstrategien ableiten, die auch für andere Klone/Sorten fortgeführt werden sollten. Der im nachfolgenden Frühjahr bonitierte Wiederaustrieb bestätigte die differenzierte Sensitivität einschließlich ihrer Spätfolgen. Für Wissenschaft und Praxis gleichermaßen interessant ist, dass die unterschiedlichen Stressreaktionen z.B. auf einer genetischen Basis beruhen. So veränderte sich z.B. das Transkriptionsmuster des stressphysiologisch sensitiven Klons *Tilia cordata* 'Wega' (Klon 67.3) enorm bei Wassermangel, während sich die Genexpression des toleranten Klons *Tilia x europaea* 'Konings' (Klon 77000) nur geringfügig änderte.

5.5 Beitrag der Ergebnisse zu förderpolitischen EIP-Zielen

Das Vorhaben der OG ordnete sich in das EIP-Leitthema „*Lösungsansätze zur Eindämmung des Klimawandels und Anpassung an seine Folgen durch gezielte Maßnahmen und verbesserte Bewirtschaftungsmethoden*“ ein. Darüber hinaus wurden mit den entwickelten

Methoden, entsprechend der EIP-Zielsetzung (Leitthema 1) „*Lösungsansätze zur Entwicklung effektiver, umweltgerechter und/oder ökologischer Anbau- und Nutzungsverfahren, Verbesserung der Produktivität der Pflanzenproduktion und des Gartenbaus über standortangepasste Sorten*“ für den Produktionsbereich von Baumschulen entwickelt.

Wie in der Ergebnisdarstellung beschrieben, wurden diese Ziele erreicht. Die *in vitro* angezogen und physiologisch im Gefäßversuch geprüften Gehölze mit der höchsten Trockenstresstoleranz sollen ab Herbst 2022 an Freilandstandorten z.B. in Eberswalde ausgepflanzt und einem fortgesetzten Monitoring unterzogen werden. Protokolle zur Anzucht und zum Monitoring stehen für weitere Selektionsversuche zur Verfügung. Die Ergebnisse des Vorhabens zeigen, dass es möglich ist, witterungsstressangepasste Gehölze zu selektieren und auf eigener Wurzel *in vitro*, in hoher Stückzahl und in kürzerer Zeit anzuziehen.

5.6 Nutzen der Ergebnisse für die Praxis

Der unmittelbare Nutzen für die Baumschulpraxis und Kommunen, die klimaangepasste Gehölze anpflanzen wollen, besteht in der Bereitstellung entsprechender Bäume. Das Demonstrationsquartier in der Baumschule Lorberg bietet darüber hinaus die Möglichkeit, die entsprechenden, geprüften Klone/Sorten in Augenschein zu nehmen. Wenn die im Projektzeitraum angezogenen Bäume vollständig an ihre Endstandorte ausgebracht wurden, besteht die Möglichkeit, den dargelegten Methoden folgend, weitere Pflanzen des Gehölzsortimentes anzuziehen bzw. weitere Gehölzsortimente zu entwickeln.

Innerhalb des Projektzeitraumes sind hierfür 21 *in vitro* Kulturprotokolle erarbeitet worden, die eine Produktion von Pflanzen auf eigener Wurzel ermöglichen und der Praxis zur Verfügung gestellt werden können. Durch das neu entwickelte Anbausystem, der Produktion der Gehölze auf eigener Wurzel, kann eine Verkürzung des Produktionszeitraums um mindestens 2 Jahre gewährleistet werden. Weitere Vorteile sind eine bessere Feinwurzel Ausbildung im Ballen, ein einfacheres Verpflanzen in der Baumschule, ein besseres Anwachsen am Endstandort und eine Erhöhung der durchschnittlichen Lebensdauer der Bäume am Endstandort. Das neuartige Anzuchtverfahren mittels der *In-vitro*-Kultur bringt weitere Vorteile mit sich:

- die schnelle Verfügbarkeit und ein kurzer Zeitraum zur Etablierung neuer Arten und Sorten für ein neues klimaangepasstes Straßen- und Alleebaumsortiment
- eine schnelle Massenvermehrung bei geringem Platzbedarf
- gesundes Pflanzenmaterial, ohne phytopathogene Kontaminationen durch die sterile *In-vitro*-Kulturtechnik
- jahreszeitenunabhängiger Produktionsablauf

- keine Probleme hinsichtlich Dormanz und der Verfügbarkeit des Saatgutes
- keine Verwendung undefinierter Unterlagen
- keine Inkompatibilitätsprobleme durch Verzicht von Veredlungsverfahren
- positive Eigenschaften der selektierten Sorte bleiben vollständig erhalten, können sonst durch die Unterlage minimiert oder ausgeschlossen werden (z.B. Salz- oder Trockenstresstoleranz)
- Nutzung des Rejuvenilisierungseffektes der Pflanzen (höhere Wüchsigkeit, späteres Blühen und Fruchten, längere Lebensdauer)
- höherer Feinwurzelanteil im Ballen, dadurch besseres Verpflanzen und Anwachsen am Endstandort, dadurch Einsparung von Ressourcen
- Möglichkeiten der Virusfreimachung

Innerhalb der Projektlaufzeit erfolgten die Screeningtests in überlappenden Serien, d.h. nach Vorlage erster selektierter Klone wurde mit dem Anzuchtverfahren begonnen. Somit stehen nach Projektabschluss weitere erfolgreich *in vitro* erzeugte Klone zur Verfügung, die jedoch nicht mehr alle einem Screeningtest unterzogen werden konnten. Diese werden dennoch den Baumschulbetrieben nach Projektende zur weiteren Produktion zum Hochstamm übergeben, um sie den Kommunen bei geeigneter Pflanzenhöhe zum Auspflanzen in der Stadt zur Verfügung stellen zu können. Die erste Pflanzung ist im Herbst 2022 in der Stadt Eberswalde geplant.

5.7 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Vor dem Hintergrund, dass z.B. Straßen- und Alleebaumpflanzungen kostenintensive Investitionen sind, die ihre Funktion nachhaltig auch an Extremstandorten erfüllen sollen, sind Entscheidungen zur Gehölzverwendung mit deutlich höheren Risiken verbunden als z.B. auf natürlichen Waldstandorten. Erprobungsphasen sind daher langwierig.

Innerhalb dieses 6-jährigen Vorhabens konnten 170 Klone aus 14 Gattungen potenziell vitaler Gehölze, trotz Stresseinwirkung am Stadtstandort, sowie aus ausgewählten Versuchsstandorten erfasst und beprobt werden. Von diesen Gehölzen wurden 40 Klone in die *in vitro* Kultur etabliert. Für 21 Klone konnten erfolgreich komplette *in vitro* Kulturprotokolle erarbeitet werden. Somit wurde ein wesentlicher Beitrag zur Sortimentserweiterung von Pflanzen auf eigener Wurzel geleistet. Mit 9 Klonen sind *in vitro* Stresstests wissenschaftlich erarbeitet worden. Hierbei wurden die Stressoren Trockenheit, N-Überschuss und N-mangel, Hitze- und Kälteeinwirkung sowie Salzbelastung untersucht. In die *in vivo* Untersuchungen zu Trockenstressuntersuchungen an *in vitro* erzeugten Jungpflanzen im Container sind 12 Klone in 3 Versuche einbezogen worden. Die Entwicklung von *in vitro* Schnelltestverfahren an *in vitro* erzeugten Pflanzen unter Laborbedingungen konnte realisiert werden. Diese ausführlichen Ergebnisse und die entwickelten Methodenprotokolle stehen somit zur Verfügung und können für weitere

Untersuchungen genutzt werden. Mit Hilfe der *in vitro*-Technik konnte das von Pathogenen befallene Material sehr gut vermehrt werden. Juvenile, vollkommen gesunde und kräftige Pflanzen sind das Ergebnis der *in vitro* Kulturtechnik. Die Modifizierung speziell auf die Bedürfnisse der Genotypen abgestimmter Nährmedien ist ein wichtiger Beitrag im Bereich der *in vitro* Kultur und dem Erhalt neuer Pflanzen auf eigener Wurzel. Weiterhin konnte mit der Entwicklung einer Nebel-Anlage (FOG-System) im Gewächshaus auf die Bedürfnisse der maximal 2 cm großen *in vitro* Pflanzen bei der Überführung ins Gewächshaus eine erfolgreiche Methode zur Akklimatisation erarbeitet werden. Zusammenfassend ergeben sich folgende Kategorien von angestrebten Zwischen- und Endergebnissen:

- *selektiertes Pflanzenmaterial zur in-vitro-Vermehrung mit besonderen Toleranzeigenschaften*
- *klimatolerante Gehölzsortimente mehrerer Gattungen zur Verwendung im urbanen Raum*
- *eine Demonstrationsfläche mit Gehölzen bei der Baumschule Lorberg*
- *eine Internetplattform unter www.trees4streets.de*
- *öffentlich zugängliche Dokumentationen der wissenschaftlichen Arbeiten zu Stresstests und Biomarkeranalysen von in vitro Kulturen in Form von Berichten und Methodenbeschreibungen*
- *Erstellung artspezifischer in vitro Kulturprotokolle*
- *Verfahrensentwicklung und Anpassung von in vitro Schnelltestmethoden*

Die erzielten Ergebnisse dienen aber auch dazu, künftig an weiteren innovativen Schnelltestmethoden bereits in der *in vitro* Kultur oder anschließend an *in vitro* erzeugten Jungpflanzen *in vivo* in der Containerkultur zu arbeiten. Hier könnten insbesondere Testverfahren für Trocken- und Salzstress, Hitze- und Frostempfindlichkeit, Nährstoffmangel und Nährstoffüberschuss (N) mit neuen molekularen Markern erfolgreich sein.

5.8 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Dieses Projekt beinhaltet eine Reihe von Teilzielen, die voneinander abhängig waren und auch aufeinander aufbauten. Wie die Darstellung der Ergebnisse bereits zeigte, sind die wesentlichen Ziele des Projektes erreicht worden. Durch die zielführende Kooperation der Praxispartner ließen sich trotz der kurzen Projektzeit bereits für einzelne Klone auspflanzfähige Hochstämme heranziehen. Durch die Überführung der *in vitro* kultivierten Gehölze in den Prozess der Baumschulproduktion sowie die Anlage von Demonstrationsbeständen wird eine längerfristige Sicherung der Gehölze erreicht, da auch weiterführende Pflanzungen dieser Gehölze in der Stadt Eberswalde und auch Berlin über

das Projektende hinaus erfolgen. Weiterhin kann so auch wertvolle Erfahrung mit den Ergebnissen der weiteren Bonituren durch die Pflanzenschutzdienste gesammelt werden. Auf Grund des zeitlichen Aufwandes der analytischen Untersuchungen konnten nicht alle *in vitro* erzeugten Klone während des Projektzeitraumes in die Stresstestungen einbezogen werden, was den Vergleich der Genotypen bedeutend erhöht hätte. Hierzu wären weitere ca. 3 bis 4 Jahre Forschungsarbeit notwendig, da die *in vivo*-Tests an die Vegetationsperioden gebunden sind. Durch die Modifizierung der angewandten *in vitro* Kulturtechniken konnten hervorragende Ergebnisse hinsichtlich der Etablierung, Hochvermehrung und Bewurzelung des Pflanzenmaterials und somit der Kulturführung von *Acer* und *Tilia* sowie 6 anderer Gattungen, mit insgesamt 21 Klonen erreicht werden. Es stehen somit neue Kulturprotokolle *in vitro* zur Verfügung. Ein weiterer großer Erfolg besteht in der Entwicklung einer neuen FOG-Anlage für die Akklimatisation der *in vitro* Pflanzen im Gewächshaus. Hierbei erhöhte sich die Überlebensrate von 40-50 % auf 90 -100 %.

Als nicht realisierbar erwies sich jedoch (trotz hoher Aufwendungen) die sichere Stressprüfung *in vitro* sowie die *in vitro*-Kultivierung aussichtsreicher Eichenklone.

Auf die möglichen Ursachen für die inkonstanten Ergebnisse bei der Anwendung von Schnelltestmethoden *in vitro* zur Trocken- und Salzstress, Hitze- und Frostepfindlichkeit, Nährstoffmangel und Nährstoffüberschuss (N) mit biochemischen Markern wurde bereits im Ergebniskapitel hingewiesen.

Schwierigkeiten ergaben sich bei der Etablierung der Gattung *Quercus* in die *in vitro*-Kultur. Die Methodik der Desinfektion konnte für *Quercus* optimiert werden, jedoch starben die Sprosse innerhalb der Kulturführung immer spätestens nach 9 Monaten ab. Somit konnten keine Stresstestungen für diese Gattung vorgenommen werden.

Um die lückenlose Dokumentation aller durchgeführten *in vitro*-Arbeiten wurde innerhalb der Projektlaufzeit (2019) zusätzlich eine Access-Datenbank: „Labordatenbank“ angelegt, die die Etablierung, Vermehrung, Bewurzelung, Akklimatisation und Weiterkultur der Gehölze *in vivo* gewährleisten sollte, in die jedoch, auf Grund des zu hohen Zeitaufwandes, letztlich nicht mehr alle Daten rückwirkend eingepflegt werden konnten.

5.9 Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit und weiterführende Fragestellungen

Das Projektvorhaben, seine wissenschaftlichen Ergebnisse und vor allem die bereits vorhandenen Bäume zeigen der Praxis (Baumschulen, Kunden, Kommunen) eindrucksvoll, dass es möglich ist, geprüfte, *in vitro* vermehrte Gehölze auf eigener Wurzel zu produzieren. Durch diese Untersuchungen ist der Nachweis gelungen, dass sich Gehölz-Genotypen

wissenschaftlich nachweisbar in ihrer Stresstoleranz unterscheiden und entsprechend den Erfordernissen selektieren lassen.

Für die wissenschaftlichen Anschlussfähigkeiten ergeben sich u.a. folgende weiterführende Themenstellungen:

- Fortsetzung der Stresstests für weitere Klone
- Entwicklung von stabilen genetischen Markern für die wichtigsten Gehölgattungen, die im Routinebetrieb, die Stresstoleranz bewerten lassen
- Erweiterung der bisher monofaktoriellen Stresstests zu kombinierten Stresstests in vivo (Trockenheit, Hitze, Frost)
- Entwicklung eines physiologischen basierten Zertifizierungssystems für Baumschulgehölze
- Monitoring (Auswahl eines Indikatorensets) der Stabilität der Stresstoleranz mit dem zunehmenden Alter der Gehölze

6 Zusammenarbeit der operationellen Gruppe

Während der Projektlaufzeit fand ein ständiger Austausch der Ergebnisse zwischen den Forschungseinrichtungen (HU Berlin und LFE und den Baumschulen) statt. In regelmäßigen Projekttreffen wurde der erarbeitete Sachstand allen Projektpartnern bekannt gegeben. Es konnte innerhalb der OG kritisch über Fortschritt und Probleme unterrichtet und diskutiert werden. Projektrelevante Entscheidungen wurden mit allen Partnern entsprechend des Kooperationsvertrages abgestimmt. Während der Bearbeitung bestanden zur Vermeidung von Interessenkonflikten klar abgegrenzte Arbeitsbereiche, die nach den jeweiligen Kompetenzen (BS Sämann: *in vitro* Laborproduktion, BS Nauen: Anzucht von Jungpflanzen, Produktion von Halbfertigware und BS Lorberg: Produktion von Heistern als Straßen- und Alleebäume sowie von Solitär- und Formgehölzen) aufgeteilt wurden. Gleiches gilt für die beteiligten Wissenschaftseinrichtungen, die arbeitsteilig an den beiden wesentlichen Labormethoden (HU Berlin: *in vitro* Kultur, LFE: Biomarkeranalyse) arbeiteten.

7 Kommunikations- und Disseminationskonzept

Grundlage für den Wissenstransfer zwischen Wissenschaftlern und Praxispartnern bildete das im Arbeitspaket 7 erarbeitete „*Kommunikation- und Verbreitungskonzept*“. Hier wurden u.a. Wege zur Wissensvermittlung und Akzeptanzsteigerung von biotechnologischen, biochemischen und gehölzphysiologischen Verfahren und Grundlagen sowie zur Verwendung nichtheimischer Gehölze für unterschiedliche Zielgruppen entwickelt.

Tab. 13: Darstellung der Stakeholder und Akteure in Bezug auf die Gehölzproduktion

Zielgruppen	Vertreter
Nutzer Praxis (P)	Baumschulen GaLa-Baubetriebe Baumgutachter/Innen Landschaftsarchitekt/Innen
Wissenschaftler, Studierende (W)	Gartenbau, Ökophysiologie, Klimawandel
Behörden, Politik (V)	Verwaltungen: Gartenbauämter der Städte und Gemeinden Stadt- und Gemeindevertreter Ministerien Abgeordnete von Kommunen und Land
Interessierte Öffentlichkeit (Ö)	Landschaftsvereine, Naturschutz

Für den fachlichen Austausch wurden Arbeitsberatungen mit anderen Dialoggruppen bzw. aus anderen EIP-Projekten organisiert (Zielgruppe W). Die öffentlichkeitswirksame Außendarstellungen erfolgte schwerpunktmäßig in Form von Postern und Vorträgen auf Veranstaltungen und Messen [u.a. auf der IPM (Internationale Pflanzenmesse), Tagungen der GALK (Deutsche Gartenamtsleiterkonferenz), Tagungen des BdB (Bund Deutscher Baumschulen), Tagungen des ADIVK (Arbeitskreis Deutscher In Vitro Kulturen), Tagungen des DGG (Deutsche Gartenbauliche Gesellschaft)] (Zielgruppe P).

Folgende Botschaften bzw. Themen umfassten das Projektvorhaben:

- Problemanalyse zur Situation von Gehölzen auf urbanen Extremstandorten unter den Bedingungen des Klimawandels → Notwendigkeiten von Anpassungsstrategien
- Klassische Produktionswege zur Erzeugung von Gehölzen für die Verwendung im urbanen Bereich
- Akzeptanz zur Erzeugung von Gehölz-Klonen über *in-vitro*-Verfahren (Vor- und Nachteile, Erfahrungswissen aus der Obstproduktion)
- Funktionsweise von Toleranzen gegenüber Witterungsextremen bei Gehölzen (genetische und physiologische Ebene) → Möglichkeiten und Grenzen
- Wege der künstlichen Selektion von klimawandelangepassten Gehölzindividuen
- Differenzierung der Klimaanpassung unterschiedlicher Arten, Herkünfte und Individuen: Notwendigkeit zur Erweiterung des Artenspektrums
- Definitionen von heimischen Arten, Neobionta und potenzielle invasiven Arten: Risikobewertung
- Organisation der Zusammenarbeit zwischen Akteuren der Gehölzforschung und Baumschulpraxis: Probleme, Sichtweisen, Schwerpunkte, Akzeptanz

- Wege vom Labormaßstab in die Massenproduktion von Gehölzen: Voraussetzungen, Probleme, Lösungswege

Diese sollen über folgende Kommunikationswege vertrieben werden:

Internetpräsentation

Über einen externen Dienstleister wurde eine webbasierte Informationsplattform (www.trees4streets.de) geschaffen.

Medien (Zeitungsartikel und Fachpublikationen, Radio- und Fernsehbeiträge, Flyer, Broschüren, Praxisblätter)

Organisation eigener Fachtagungen

- Fachworkshop (2021): (Zielgruppe W, P), ca. 36 Beteiligte der Baumschulbranche, Anmeldung über IDL: Organisation HU, LFE

- Abschlusstagung (geplant September 2022): Organisation Leadpartner

Im Zuge der Organisation der Abschlussveranstaltung erfolgt eine Pressemitteilung.

Durch die Anlage von Demonstrationsflächen erfolgt auch über die Projektlaufzeit hinaus die Präsentation der Projektergebnisse durch die Pflanzung der *in vitro* erzeugten wurzelechten Gehölze am Endstandort Stadt. Es sollen weitere Monitoringuntersuchungen vorgenommen werden.

Es sollen drei Demonstrationspflanzungen an folgenden Standorten angelegt werden:

- Standort Baumschule Lorberg
- Stadtgebiet Eberswalde (nach Projektende)
- Stadtgebiet Berlin (nach Projektende)

Literaturverzeichnis

BODE, J.; KÜHN, H.-P; WILD, A. „Die Akkumulation von Prolin in Nadeln geschädigter Fichten (*Picea abies* [L.] Karst.)“ Forstwissenschaftliches Centralblatt Vol.104, Dezember 1985: 353–360.

DE KLERK, G. J; PUMISUTAPON, P. (2008): Protection of in vitro grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. In: *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95: 149-154

HOHENWARTER, L., LÖFFLER, S., KÄTZEL, R. (2022): Biochemische Stressreaktionen und differenzielle Transkriptionsanalysen bei Lindenklonen unter Wassermangel. 7. Sektionstagung „Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung“, Hamburg-Ahrensdorf (12.-14.09.2022)

KÄTZEL, R.; LÖFFLER, S. (2014): Stiftung Preußische Schlösser und Gärten Berlin und Brandenburg. Historische Gärten im Klimawandel. 1. Auflage, Potsdam, Autoren und Edition Leipzig in der Seemann Henschel GmbH & Co. KG, Leipzig

KÄTZEL, R.; LÖFFLER, S. (2014): Physiologische Indikatoren zur Bewertung von Trockenstress bei Bäumen. In: Generaldirektion der Stiftung Preußische Schlösser und Gärten Berlin-Brandenburg (Hrsg.): Wasserhaushalt und Pflanzen - Historische Gärten im Klimawandel – Empfehlungen zur Bewahrung: 40-45.

OLDENHOFF, H., J.L. BOWMAN, F. TABLIN, und J.H. CROWE. „Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopic study.“ *Biochimica et Biophysica Acta* Volume 1760, August 2006: 1226-1234.

SCHULZE, E.-D.; BECK, E.; MÜLLER-HOHENSTEIN, K. (2002): Pflanzenökologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin: 133-163, 184ff

WATANBLE, S. KOJIMA, K. DIE, Y. UND SASAKI, S. (2001): Effects of saline and osmotic Stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. © Kluwer Academic Publishers S. 199-206.

WOODWARD, A. J. und BENNETT, I. A. (2005): The effect of salt and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *eucalyptus camaldulensis* © Springer 2005 S. 189-200.