

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Verbesserung von Qualität, Ertrag und Klimaanpassung der Wal- und Schwarznuss (Gattung *Juglans*) durch intra- und interspezifische Kreuzungszüchtung

Autoren:

Steffen Fehrenz und Aki Michael Höltnen

Zuwendungsempfänger:

**Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (NW-FVA), Professor Ölkens
Straße 6, 34346 Hann. Münden**

Förderkennzeichen:

2219NR145

Laufzeit:

01.10.2020 – 30.09.2023

Datum der Veröffentlichung:

26.07.2024

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorenschaft.

Inhaltsverzeichnis

I.	Kurzbericht	3
1.	Aufgabenstellung	3
2.	Planung und Ablauf des Vorhabens	3
3.	Resümee der wesentlichen Ergebnisse	4
	a) Arbeitspakete und Meilensteine	4
	b) Zusammenfassung	6
II.	Ausführliche Darstellung der Ergebnisse	7
1.	Erzielte Ergebnisse	7
	Arbeitspaket 1: Intra- und interspezifische Kreuzungen	7
	Arbeitspaket 2: Etablierung und Vermehrung von Gewebekultur-Linien	9
	Arbeitspaket 3: Durchführung von Klimakammerversuchen	12
	Arbeitspaket 4: Etablierung & Einsatz genetischer Marker	15
	Arbeitspaket 5: Versuchsflächenanlage; biometrische, phänologische und physiologische Evaluation der Prüfglieder.....	21
	Arbeitspaket 6: Bereisung Kirgistan (Evaluierung der Bestände, Nussernte)	28
2.	Verwertung	29
	a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen	29
	b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende	29
	c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende	29
	d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit	29
3.	Erkenntnisse von Dritten	30
4.	Veröffentlichungen	30

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Das Holz von Nussbäumen hat hervorragende optische und technische Eigenschaften. Deshalb wird es vor allem für hochwertige Holzwaren verwendet, wofür sonst nur Tropenhölzer Anwendung finden. Die Entwicklung und Produktion hochwertigen Vermehrungsgutes in der Gattung *Juglans* ist auch hinsichtlich des Ausfalls heimischer Eschen- und Ulmenvorkommen von besonderem Interesse. Ähnliche Standortansprüche einhergehend mit einer höheren Toleranz gegenüber zukünftigen Dürreereignissen könnten die entstehenden Lücken in der Wertholzproduktion schließen. Allerdings sind die meisten mitteleuropäischen Genotypen der Walnuss das Ergebnis einer jahrhundertelangen anthropogenen Selektion zum Zwecke der Fruchtnutzung. Steigerungen von Holzerntrag, Holzqualität sowie Klimadaptation können deshalb nur durch züchterische Verbesserung erreicht werden, indem Material von Originalherkünften mit Potenzial zur Produktion hochwertigen Stammholzes verwendet wird.

In diesem Vorhaben wurde eine Kombination aus klassischen Ansätzen der Forstpflanzenzüchtung mit Methoden der Präzisionszüchtung angewendet. Herkunfts- und Plusbaumselektion, gelenkte und ungelenkte intra- und interspezifische Kreuzungen sowie Feld- und Klimakammerversuche wurden begleitet von DNA-Analysen zur Verifikation von Kreuzungs-Nachkommenschaften und zur Überprüfung der Art- und Verwandtschaftsverhältnisse, Analysen physiologischer Leistungsparameter über die Detektion der Photosynthese durch Chlorophyll-Fluoreszenz sowie phänologischer Ertragsstudien zur frühzeitigen Selektion hochwertiger Genotypen. Die jahreszeitlich unabhängige und in ihrer Lebensphase synchrone Produktion der Prüfglieder für alle *Ex-vitro*-Studien bedingen die Entwicklung von *In-vitro*-Kulturprotokollen für die verschiedenen Arten und Hybriden der Gattung *Juglans*.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zum Erreichen der o.g. Ziele sind folgende Arbeitsprozesse bearbeitet worden:

- Primerscreening zur Entwicklung von genetischen Art- und Herkunftsmarkern über DNA-Proben verschiedener Arten, Hybriden und Herkünften aus Sammlungen und Naturpopulationen
- Genotypisierung und Elternschaftsanalyse von Nachkommen aus gelenkten und ungelenten Kreuzungen
- Genotypisierung und Artidentifikation von zahlreichen Kultivaren aus Sammlungen
- Entwicklung von *In-vitro*-Kulturprotokollen für die Inbetriebnahme der verschiedenen Kultivare aus verschiedenen Arten und Hybriden der Gattung *Juglans*
- Produktion und Rejuvenilisierung von Pflanzenmaterial ausgewählter Kultivare über Pfropfung; vegetative *In-vitro*-Etablierung
- Produktion und Gewinnung von Embryonen aus gelenkten und ungelenten Kreuzungen, Etablierung von Embryonenkulturen
- Vermehrung, *In-vivo*-Etablierung und Anzucht ausgewählter Genotypen, *Ex-vitro*-Überführung und Produktion von Prüfgliedern
- Physiologische, biometrische und phänologische Bonituren der Prüfglieder unter Klimasimulation im Klimaschrank
- Physiologische, biometrische und phänologische Feldbonituren von Klonprüfungen, Samenplantagen und Herkunftsversuchen
- Erweiterung des Genpools der Walnuss durch Besammlung von Naturpopulationen Zentralasiatischer Herkünfte in Kirgistan

3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse

a) Arbeitspakete und Meilensteinplanung

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungs- zeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
AP 1 Intra- und interspezifische Kreuzungen	04/2021 bis 06/2021	Blühreisergewinnung, Pollenernte, Lagerung, Kreuzungen; abgeschlossen
	09/2021	Nussernte; abgeschlossen
	04/2022 bis 06/2022	Blühreisergewinnung, Pollenernte, Lagerung, Kreuzungen; abgeschlossen
	09/2022	Nussernte; abgeschlossen
	11/2023 bis 16/2023	Blühreisergewinnung, Pollenernte, Lagerung, Kreuzungen; abgeschlossen
	09/2023	Nussernte; abgeschlossen
AP 2 Etablierung und Vermehrung von Gewebe Kulturlinien	10/2020 bis 07/2023	Etablierung, Vermehrung, Bewurzelung, <i>In-vivo</i> Adaption; abgeschlossen
AP 3 Durchführung von Klimakammer- versuchen	01/2021 bis 09/2023	Durchführung von Klimasimulationen von verschiedenen Prüfgliedern; abgeschlossen
AP 4 Etablierung und Einsatz genetischer Marker	10/2020 bis 10/2021	Marker-Etablierung; abgeschlossen
	10/2021 bis 09/2023	Genotypisierungen, Elternschaftsanalysen, Artdeterminierungen; abgeschlossen
AP 5 Versuchsflächenan- lage; biometrische, phänologische und physiologische Evaluierung der Prüfglieder	02/2021 bis 09/2021	biometrische, phänologische, physiologische Evaluierung; abgeschlossen
	02/2022 bis 09/2022	biometrische, phänologische, physiologische Evaluierung; abgeschlossen
	02/2023 bis 09/2023	biometrische, phänologische, physiologische Evaluierung; abgeschlossen
	02/2023 bis 03/2023	Versuchsflächenanlagen, nicht abgeschlossen, in Planung
AP 6 Bereisung Kirgistan (Evaluierung der Bestände, Nussernte)	09/2021 bis 10/2021	Evaluierung der Bestände; coronabedingt nicht durchgeführt
	09/2022 bis 10/2022	Evaluierung der Bestände und Nussernte; abgeschlossen
AP 7 Datenauswertungen, Publikationen, Bericht	2023	Publikation: HÖLTKEN, OPFERMANN und FEHRENZ (2023) Hybridisierung und genetische Introgression: Bedeutung für Waldbau, Forstpflanzenzüchtung und Naturschutz, Thünen-Report Nr. 105, S. 134-152)

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	Fälligkeit (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
M 1 Nachweis der ersten künstlich erzeugten Hybridkreuzung von <i>J. x intermedia</i> durch DNA-Analyse	12/2021	nicht erreicht
M 2 Erfolgreiche Etablierung von Gewebekulturlinien erster Neuzüchtungen von <i>J. regia</i> und <i>J. x intermedia</i> mit breiter genetischer Basis (Diversität) (Juni 2021)	12/2021	erfolgreich abgeschlossen
M 3 Selektion und Bereitstellung neuer spätfrosttoleranter und gleichzeitig leistungsstarker Genotypen von <i>J. regia</i> und <i>J. x intermedia</i> basierend auf phänologischen und prädiagnostisch-physiologischen Merkmalen	12/2022	erfolgreich abgeschlossen
M 4 Flächeneinrichtung zur Ermittlung der Wuchsleistung selektierter und vermehrter Klone als potenzielle Basis von Erhaltungs- und Samenplantagen	06/2023	Im Förderzeitraum wurden keine Versuchsflächen angelegt.

b) Zusammenfassung

Das Ziel, die Bereitstellung und Produktion von Neuzüchtungen verschiedener, auf Holzqualität selektierter Kultivare in der Gattung *Juglans*, konnte im Rahmen des PreBNuT-Projekts auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Die verschiedenen Nusskultivare wurden als Plusbäume aus Samenplantagen, Herkunftsversuchen, Sammlungen oder aus Klonprüfungen als Edelreiserpflanzung von Originalbäumen gewonnen und in eine sterile Sprosskultur überführt. Die Gewinnung von embryonalem Zuchtmaterial erfolgte in Naturpopulationen, Hybrid-Samenplantagen wie auch von Einzelbäumen im Rahmen gelenkter und ungenkter Kreuzungen. Es wurden *In-vitro*-Kulturprotokolle für die vegetative und embryonale Inbetriebnahme und Vermehrung dieser Kultivare, Arten, Hybriden oder Sorten entwickelt. Ausgewählte Kultivare verschiedener Arten und Hybriden wurden für Versuche zur Klimasimulation vermehrt und durch physiologische (Chlorophyll-Fluoreszenz), phänologische (Austriebszeiten) sowie

biometrische (Ertrag und Form) Analysen charakterisiert. Es wurden existierende Feldprüfungen von Klonen der Arten *J. x intermedia* und *J. regia* in den aufgeführten Ertragsparametern sowie in ihrer Wuchsform bonitiert. Durch die Korrelation von Daten der Feldprüfung und der Klimakammerversuche konnten Parameter zur frühzeitigen Diagnose von Ertrag und Formeigenschaften entwickelt werden. Diese Schätzer ermöglichen eine Charakterisierung der Zuchtpopulation schon im Stadium der Jungpflanze und haben standortübergreifenden Charakter.

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Arbeitspaket 1: Intra- und interspezifische Kreuzungen

Die Entwicklung der Nährmedien ermöglichte die Inkulturnahme verschiedener Kultivare der Gattung *Juglans*. Voraussetzung für die Etablierung neuer Embryonen ist unter anderem die Produktion durch un gelenkte oder gelenkte Kreuzungen. Es wurden erstmalig gelenkte Kreuzungen zwischen *Juglans nigra* und *Juglans regia* sowie *Juglans regia* x *Juglans regia* durchgeführt. Hierfür wurden Mutterbäume der Schwarznuss und der Walnuss in einem Klonquartier der NW-FVA ausgewählt. Es wurden Wallnuss-Blühreiser zu verschiedenen phänologischen Zeitpunkten von regionalen Walnusskultivaren und der Walnuss-Samenplantage Manshi, Dachigam (FVA-Freiburg) gewonnen und zum Aufblühen unter Gewächshausbedingungen gebracht. Der Pollen wurde geerntet, getrocknet, kühl gelagert (4°C), eingefroren (-20°C), eingefroren (flüssiger Stickstoff, -196°C) und/oder frisch verwendet. Weiterhin wurde Pollen frisch geerntet und wie beschrieben gelagert. Im zweiten und dritten Kreuzungsjahr wurde zusätzlich Pollen von blühwilligen Containerpflanzen geerntet, welche in einer Kühlkammer so lange im Austrieb verzögert wurden (5 - 7 Wochen), bis der Aufblühzeitpunkt der Schwarznussbäume stattfand. Es fanden Pollenkeimungsexperimente auf Pollenkeimmedium statt (Tabelle 1). Die Kreuzungen fanden mit Hilfe einer Hebebühne an 2 Wochen vorher in Gazesäckchen verpackten Blüten statt. Die Blüte der ausgewählten Schwarznussmütter fand in allen drei Kreuzungsjahren im Zeitraum 4. Maiwoche bis 3. Juniwoche statt.

Modus	Lagerung	Trocknung	Keimungsrate
1	frisch		20 - 65%
2	frisch	getrocknet	0 - 15%
3	1 Woche, 4°C		5 - 45%
4	1 Woche, 4°C	getrocknet	0 - 5%
5	5 Wochen, 4°C		0 - 25%
6	5 Wochen, 4°C	getrocknet	0 - 7%
7	5 Wochen, -20°C		0 - 5%
8	5 Wochen, -20°C	getrocknet	0%
9	-196°C		5 - 20%
10	-196°C	getrocknet	0 - 12%

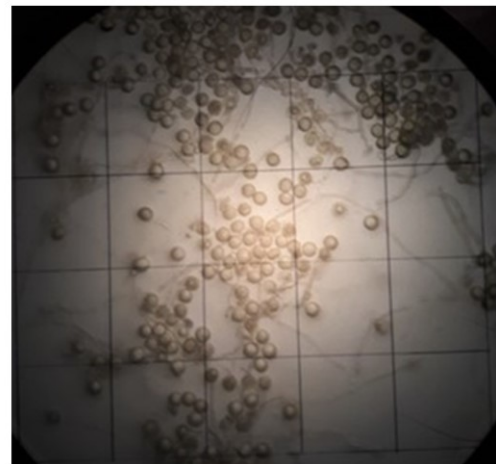


Abb.1: Keimungsrate Walnusspollen auf Pollenkeimmedium (Tab. links) sowie Pollen-Keimtest eines potentiellen Vaterbaumes JR32/27 der Herkunft Dachigam auf Pollenmedium nach Behandlung in Modus 9 (Abb. rechts)

Gelenkte Kreuzungen zwischen Schwarz- und Walnuss wurden im Frühjahr 2021 und 2022 wie in Abbildung 2 dargestellt durchgeführt. Aus insgesamt 165 bestäubten Blüten entwickelten sich 105 Nüsse, die jeweils Ende September geerntet werden konnten. Aus diesen Nüssen konnten 84 Embryonen isoliert werden. 56 Embryonen keimten auf dem dafür entwickelten Nährmedium und waren steril sowie ausreichend wüchsig, um eine Blattprobe für die DNA-basierte Elternschaftsanalyse zu liefern. Die Elternschaftsanalyse der gelenkten Kreuzungen zwischen Schwarz- und Walnüssen des gesamten Berichtszeitraums hat keine hybridogenen Nachkommen identifizieren können. Das bedeutet, dass in den

Embryonen, die aus den geernteten Nüssen der Schwarznussmütter isoliert wurden, keine genetischen Anteile der Walnussväter ermittelt werden konnten. Darüber hinaus sind alle übrigen Embryonen nach der zweiten Subkultur abgestorben, obwohl sie auf einem Schwarznussmedium kultiviert wurden. Das Absterben der Embryonen könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei diesen Pflanzen um haplontische, also unbestäubte Nachkommen handelt. Haplontische höhere Pflanzen haben nur einen einfachen Chromosomensatz und sind nur eingeschränkt lebensfähig. Folgende Hindernisse könnten die Erzeugung von Hybridnachkommen unterbunden haben:

- Die ausgewählten Schwarznussbäume sind physiologisch (Vorhandensein von Inkompatibilitäts-genen) oder physikalisch (zu lange Blüten für den Pollenschlauch der Walnuss) inkompatibel mit den ausgewählten Bestäuberbäumen.
- Die Mutterbäume bevorzugen eine apomiktische Samenproduktion, d.h. die Embryonen bilden sich ohne Bestäubung.
- Geringe Pollenqualität (Lagerung, Alter, Vorbehandlung etc.)
- Die künstliche Bestäubung führte zur Pollenüberladung und die Blüte ist abgestorben.
- Potentielle Hybridembryonen sind abgestorben und die Nüsse abgefallen.
- Potentielle Hybridembryonen sind nicht *in-vitro* gekeimt.
- Potentielle Hybriden sind wegen Wuchsanomalien abgestorben.

Zur Reproduktionsbiologie der Walnüsse und den potentiell auftretenden Reproduktionsbarrieren finden sich in der Publikation „Hybridisierung und genetische Introgression: Bedeutung für Waldbau, Forstpflanzenzüchtung und Naturschutz“ detaillierte Hinweise und Beschreibungen (HÖLTKEN, OPFERMANN und FEHRENZ 2023, Thünen-Report Nr. 105, S. 134-152).

In den Frühjahren 2021 und 2022 wurden insgesamt 44 innerartliche gelenkte Kreuzungen wie in Abb. 2 beschrieben durchgeführt. Die Mutterbäume waren die Sorte *Juglans regia* „Kurmarker Walnuss“ in einem Privatgarten und die Sorte *Juglans regia* „Idealo“ als veredelte Containerpflanze. Auf beiden Mutterbäumen wurden die Blüten mit Mischpollen von drei Individuen der Herkunft Dachigam bestäubt. Es wurden 41 Blüten auf der Kurmarker Walnuss bestäubt und es resultieren daraus 6 intra-hybridogene überlebensfähige Nachkommen. Auf vier Containerpflanzen der veredelten Sorte Idealo wurden 23 Blüten durch den Mischpollen der Herkunft Dachigam bestäubt. Aus dieser Kreuzung resultieren 5 intra-hybridogene überlebensfähige Individuen. In beiden Kreuzungen hat sich nur der Pollen der Nummer JR32/27 durchgesetzt. Dieser Pollen wurde wie in Modus 9 behandelt (Tab. 1, Abb. 1 und 2).

Von ungelenkten Kreuzungen der Sorte Reni, welche aus Saatgut der Jahre 2017 und 2018 stammen, wurden durch die NW-FVA in diesen Jahren Embryonen isoliert und *in-vitro* etabliert. Das Saatgut hatte in diesen Jahren einen Anteil hybridogener Nachkommen von 63 %. 14 Nüsse dieser Kreuzung aus dem Jahr 2018 wurden bei -20°C eingefroren und deren Embryonen im Herbst 2020 isoliert und invitro etabliert. Aus diesem Saatgut stammen 4 weitere hybridogene Pflanzen. Alle Nachkommen wurden genetisch auf ihre Artzugehörigkeit und ihrer Elternschaft analysiert (vgl. Abbildung 8 mit Ergebnissen aus Arbeitspaket 4 zur genetischen Identifikation von Intermedia-Hybriden und Elternschaften).

Qualität und/oder Stückzahl zu produzieren. Es stellte sich heraus, dass Chinesische Walnüsse und die Nordamerikanische Butternuss nur unter Zugabe von Trans-Zeatin wuchsen, aber unter Zugabe von BAP den Wuchs einstellten. Schwarznüsse wuchsen nur unter Zugabe von TZ und/oder BAP wenn gleichzeitig MT hinzugefügt wurde. Die Reine Walnuss konnte nur unter deutlich geringeren Dosen von BAP kultiviert werden. Die Intermedia-Hybriden verhielten sich in ihren Wuchseigenschaften intermediär zwischen der Reinen Walnuss und der Schwarznuss. Demgegenüber limitierte der Artanteil der Chinesischen Walnuss (hier *J. manshurica*) in der Intersektionshybride aus *Juglans nigra x regia x manshurica* den Einsatz von BAP und MT. Diese konnten nur in sehr geringen Mengen und wenn überhaupt dann nur in Kombination mit TZ kultiviert werden. Die Ergebnisse des *In-vitro*-Nährmedientest werden in Abbildung 3 durch 6 typische, die verschiedenen Arten repräsentierende Prüfglieder, dargestellt. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die untersuchten Arten und Hybriden entsprechend ihrer genetischen Charakterisierung verhalten (Abbildung 7). Es ergeben sich daraus 4 grundsätzliche Formulierungen für die Menge und Kombination der benötigten Wuchshormone jeweils für die Walnüsse, Schwarznüsse und Intermedia-Hybriden sowie ein gemeinsames für alle Butternüsse und den Komplexhybriden mit Butternüssen.

Die vegetative Etablierung von ausgewählten Arten, Hybriden und Kultivaren der Walnüsse ist schwierig. So sind von Altbäumen gewonnene Reiser für eine sterile Inbetriebnahme meist ungeeignet. Eine physiologische Alterung verhindert die Aktivierung der meristematischen Gewebe für *In-vitro*-Vermehrungstechniken besonders in der Gattung *Juglans*. Die Pflanzenteile müssen erst einen Rejuvenilisierungsprozess durchleben um ihre physiologische Alterung zu überwinden. Aus diesem Grund werden Reiser von Altbäumen zuerst auf einer Pfropfunterlage veredelt. Nach dem Anwachsen auf der Veredlungsunterlage findet ein physiologischer Verjüngungsprozess statt, welcher die sterile Inbetriebnahme enorm erleichtert. Schon im Februar 2021 wurden aus diesem Grund Reiser von 15 ausgewählten Walnuss-Kultivaren gewonnen und zur Veredelung an die Walnuss-Spezialbaumschule Schott abgegeben. Die hieraus resultierenden 52 Pflanzen wurden zeitgleich produziert, um sie nach Blühstimulation auch zur Pollengewinnung für gezielte Kreuzungen zu nutzen (Abbildung 2). Um eine sterile Inbetriebnahme von vegetativen Meristemen zu ermöglichen, ist es nötig, schon bei der Anzucht der Pfropflinge keimreduzierte Bedingungen zu gewährleisten. Da die mikrobielle Kontamination unter Freilandbedingungen erfahrungsgemäß deutlich höher ausfällt, wird die Anzucht in Gewächshäusern durchgeführt. Im Herbst 2022 wurden erste Blütenkätzchen an verschiedenen Kultivaren festgestellt. Diese Pflanzen werden vor dem Austrieb in einer Kühlkammer bei 4°C so lange gelagert, bis noch genügend Zeit besteht, um sie unter kontrollierten Bedingungen anzutreiben und zur Gewinnung absolut frischen Pollens mit der Aufblühzeit der Schwarznussmütter zu synchronisieren.

Zuchtmaterial verschiedener Arten und Hybriden der Gattung *Juglans* wurde gewonnen durch die Besammlung von Naturpopulationen direkt (*Juglans regia*, Süd-Kirgistan) über Sämlinge, Herkunftsversuche und Samenplantagen (*Juglans regia*; Dachigam, Manschi) indirekt aus Absaaten, Plusbaumselektionen aus Sammlungen (*Juglans x intermedia*, *J. nigra x regia x manshurica*), F1-Embryonen aus Samenplantagen und Sammlungen (*Juglans x intermedia*, *J. cinerea*, *J. cathayensis*, *J. nigra*, *J. microcarpa*, *J. major*), F1-Embryonen aus gezielten Kreuzungen (*J. x intermedia*, *J. regia*) sowie F2-Embryonen aus Sammlungen (*J. x bixbye*).

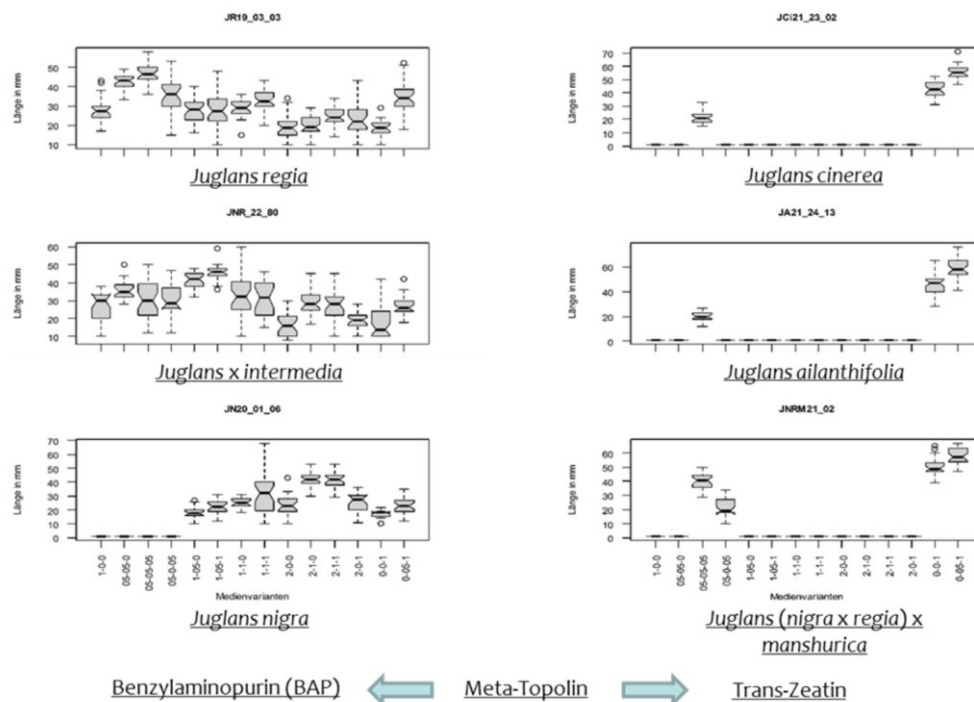


Abb. 3: Mediane der Sprosslängen nach vierwöchiger Kulturzeit und dreimaliger Wiederholung auf 14 sich in der Phytohormonzusammensetzung unterscheidender *In-vitro*-Nährmedien; dargestellt sind sechs repräsentative Arten und Hybriden der vier klassischen Sektionen Echte Walnüsse (*Dioscaryon*) mit *Juglans regia*, Schwarznüsse (*Rhysocaryon*) mit *Juglans nigra*, Asiatische Walnüsse (*Cardiocaryon*) mit *Juglans ailanthifolia* und Butternuss (*Trachycaryon*) mit *Juglans cinerea* sowie der Intersektionshybriden *Juglans x intermedia* und *Juglans (nigra x regia) x manshurica*.

Innerhalb des Projektzeitraums wurden 165 Embryonen aus gelenkte Kreuzungen zwischen *Juglans nigra* und *Juglans regia* sowie 41 gelenkte Kreuzungen zwischen *Juglans regia* x *J. regia* durchgeführt. Zwischen *Juglans nigra* x *J. regia* konnten keine Nachkommen erzeugt werden, die den väterlichen Anteil des Pollinators *Juglans regia* besaßen. Hingegen konnte für die gezielten innerartlichen Kreuzungen 9 Embryonen isoliert werden, in denen der väterliche Anteil des Pollinators vorhanden war (Abb. 10).

Es wurden weiterhin 14 Embryonen aus der ungelenten Kreuzung „Reni“ Baumschule Anton Schott isoliert, von denen 4 hybridogen waren. Aus dieser Kreuzung stammen auch die 18 Prüfglieder, die schon 2017 und 2018 von der NW-FVA isoliert, vermehrt und in 4 Klonprüfungen gepflanzt und in diese Untersuchungen einbezogen wurden. Weitere 2 Intermedia-Prüfglieder wurden vegetativ von hybridogenen Altbäumen der Kreuzung NG38 und eine „Paradox-Hybride“ aus der Sammlung der NW-FVA gewonnen.

Insgesamt stehen bis zum Ende des Projektzeitraumes 2023 insgesamt 96 klonale Linien verschiedener Arten (Hybriden) und Herkünfte der Gattung *Juglans* als *In-vitro*-Material für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Zu diesen Linien gehören die Arten: *Juglans regia* (Herkunft Kirgistan, Kaschmir, Man-schi und Europa), *J. nigra* (Herkunft Unteres- und Oberes Rheintal), *J. x intermedia*, *J. microcarpa*, *J. major*, *J. ailanthifolia*, *J. cathayensis*, *J. cinerea* und *J. nigra x regia x manshurica*.



Abb. 4: Teilkollektion der gepfropften Walnuss-Kultivare für die Produktion von Pollen und zur Gewinnung von Explantaten für die *In-vitro*-Etablierung.

Arbeitspaket 3: Durchführung von Klimakammerversuchen

Zur Durchführung der Klimakammerversuche war es notwendig, die vorgesehenen Prüfglieder auf eine Stückzahl zu vermehren, die das Ausfallen von Prüfgliedern im Verlauf der Anzucht berücksichtigt. Für die Produktion der Pflanzen mussten die Sprosskulturen in speziellen Medien bewurzelt werden. Hierfür ist der Transfer der Pflanzen, zunächst auf ein Wurzel-Induktionsmedium und nach ca. einer Woche ein weiterer Transfer auf das Wurzel-Expressionsmedium für ca. vier bis sechs Wochen notwendig. Die sterilen Walnuss-Sprosskulturen werden in einem Vermehrungsmedium über ihren Kallus vermehrt, dieser bildet sich anstelle der Wurzeln heraus und übernimmt die Nährstoffversorgung der Pflanzen. Nach dieser Zeit erfolgt der Transfer auf ein Kultursubstrat aus Sand-Kompost-Kokosfaser (1:1:1). Es folgt eine 2 wöchige Adaptionsphase in 700 ml Töpfen unter Folienbeuteln bei 25°C Tag- und 20°C Nacht-Temperatur und Tag-Nachtgleichebedingungen. Nach dieser Zeit werden die Pflanzen noch in den selben Töpfen, nach weiteren zwei Wochen dann in mit Sand gefüllten Röhrencontainer an Stark-

lichtbedingungen von 1200 μmol und eine reelle Tageslängenverlängerung angepasst, wie es am Breitengrad Kassel unter Freilandbedingungen beginnend in der ersten Aprilwoche bis zur letzten Juniwoche stattfinden würde. Im weiteren Verlauf der Klimasimulation verkürzt sich dann die Tageslänge wie nach der Sommersonnenwende unter Freilandbedingung in derselben Weise.

In der 12. Woche wurden von allen Pflanzen die Blattflächen, sowie die Fotosynthese-Effizienz über Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen sowie alle biometrischen Ertragsdaten (Höhen, Durchmesser, Blattflächen, Wurzelmasse) sowie phänologischen Beobachtungen (Austriebszeitpunkte) festgestellt. Die Pflanzen haben zu diesem Zeitpunkt noch nicht ihr Höhenwachstum eingestellt. Deshalb werden die biometrischen Ertragsdaten auch noch im entlaubten Zustand ermittelt.

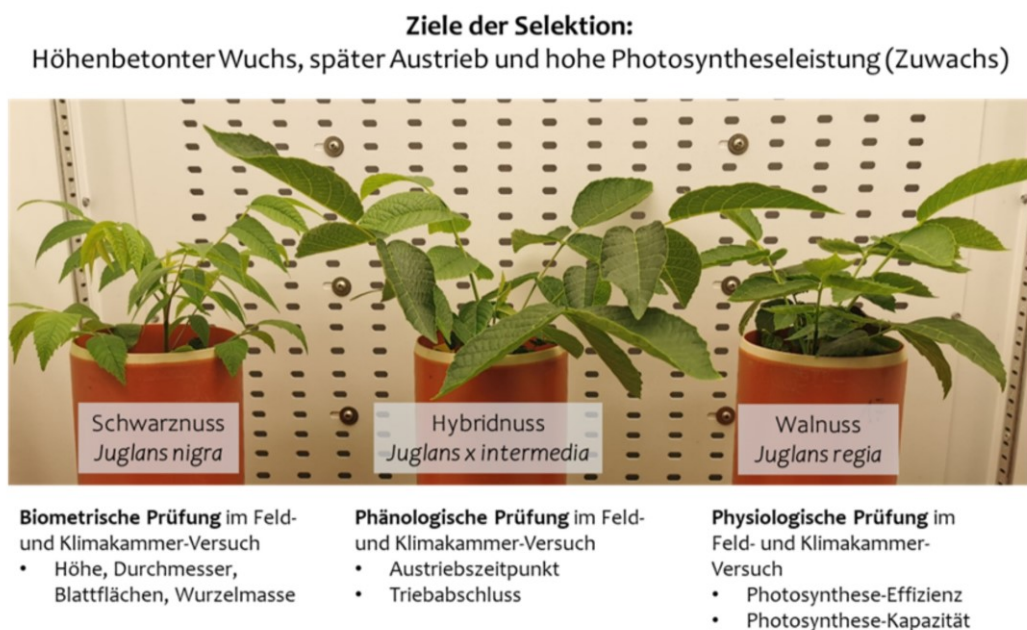


Abb. 5: Versuchsanordnung und morphologische Differenzierung der Arten *Juglans nigra*, *J. x intermedia* und *J. regia* nach 8 wöchiger Kulturzeit in einer Klimakammersimulation

Im Berichtszeitraum konnten 6 Durchgänge mit je 9 Prüfgliedern durchgeführt werden. Es wurden je drei Pflanzen von drei *Juglans regia* Kultivaren, drei Pflanzen von drei *J. x intermedia* Kultivaren und drei Pflanzen von Kultivaren der Arten *J. nigra*, *J. microcarpa* und *J. cathayensis* geprüft.

Ziel der Wachstumsversuche unter Klimakammerbedingungen war die Entwicklung eines physiologischen Ertragsschätzers unter kontrollierten Bedingungen. Durch Klimakammersimulationen können den Wuchs und die Fotosynthese beeinflussende klimatische und edaphische Parameter in ihrer Oszillation eingeschränkt werden. Da die Kultivierung jedes Prüfglieds denselben Temperatur-, Licht-, Nährstoff- und Wasserbedingungen unterliegt, kann bei der Bewertung der erhobenen Daten ausschließlich auf den Genotyp geschlossen werden. *Juglans x intermedia* ist durch die entwickelten *In-vitro*-Protokolle über sterile Sprosskultur vermehrbar. Auch für die ausgewählten Genotypen der Hybridkreuzung Reni und NG23 konnten genügend Pflanzen produziert werden um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren. Die hier ausgewählten Prüfglieder der Hybridkreuzung Reni und NG23 sind eine Stichprobe von Prüfgliedern die in vier Klonprüfungen im Feldversuch einer Serie im Jahr 2018 etabliert wurden. Die biometrischen, physiologischen und phänologischen Daten nach vier Wachstumsperioden können hier im Vergleich mit den Versuchen in der Klimasimulation herangezogen werden. Es ist demzufolge möglich mit Daten, die in der Jugendphase dieser Pflanzen genommen wurden, auf deren potentielle

Entwicklung unter Feldbedingungen zu schließen. Für die Klimakammerversuche wurden Prüfglieder ausgewählt, die auch schon im Feldversuch einer spezifischen Ertragskategorie entsprechen. Sie sollen das Leistungsspektrum der Fotosynthese und der daraus resultierenden Biomasseproduktion repräsentieren. Von jedem Genotyp der insgesamt 13 Klone konnten jeweils 8 Pflanzen angezogen und analysiert werden. Mit einem sehr dichten Zusammenhang von $P = 0,92$ korrelieren die Sprosslängen, die nach 12 Wochen Kulturdauer von den Prüfgliedern produziert wurden, nicht nur mit den an derselben Pflanze genommenen Fotosynthesedaten, sondern fast genauso hoch mit denen, die an den vierjährigen Pflanzen in der Klonprüfung Liliental gemessen wurden (Abbildung 6). Diese hohen Zusammenhänge bekräftigen nicht nur eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der analysierten Chlorophyll-Fluoreszenzdaten zwischen Klimakammer und Feldversuch sondern auch die Unabhängigkeit von der Lebensphase und den Umweltbedingungen der Pflanzen. PI_{total} kann demzufolge als robuster physiologischer Marker zur frühzeitigen Indikation der Leistungsfähigkeit von Pflanzen der Gattung *Juglans* eingeschätzt und angewendet werden. Der Nutzen dieses physiologischen Ertragsschätzers wird noch einmal verstärkt in Anbetracht der Tatsache, dass die Sprosslängen im Klimaschrankversuch zu den Höhen der zweijährigen Pflanzen in der Klonprüfung Liliental im Jahr 2020 mit $P = 0,68$ deutlich geringer und mit den Höhen des Jahres 2022 äußerst gering mit einem Wert von $P = 0,41$ korrelieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die biometrischen Daten eine wesentlich geringere Vorhersagekraft bezüglich der potentiellen Biomasseproduktion besitzen als die über Chlorophyll-Fluoreszenz generierten physiologischen Ertragsschätzer.

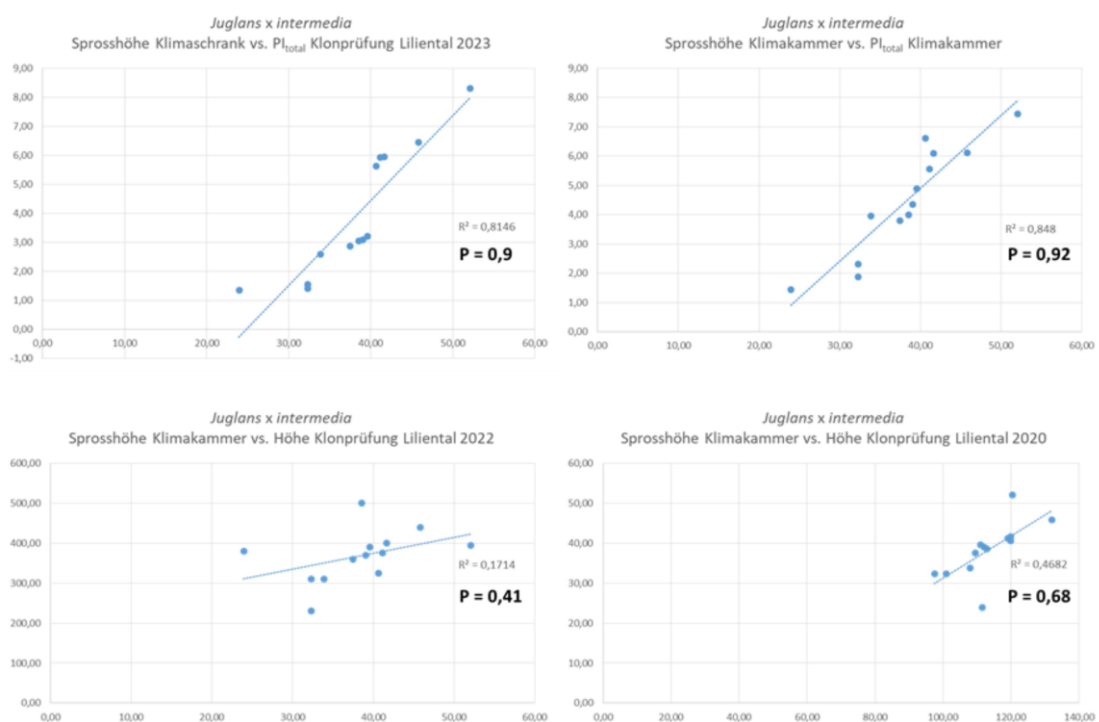


Abb. 6: Korrelation zwischen Sprosslängen im Klimakammerversuch von 13 *Juglans x intermedia* Klonen zum Leistungsindex PI_{total} derselben Pflanzen (oben rechts), zum PI_{total} derselben Klone (oben links) aus der Klonprüfung Liliental, zu den Höhen im Jahr 2020 (unten rechts) und der Höhen derselben Klone der Klonprüfung Liliental des Jahres 2022 (unten links)

Arbeitspaket 4: Etablierung und Einsatz genetischer Marker

Es wurde eine Mikrosatelliten-Analyse an den Arten *Juglans regia*, *J. nigra*, *J. x intermedia*, *J. cinerea*, *J. cathayensis*, *J. manshurica*, *J. major*, *J. microcarpa*, *J. hindsii*, *J. californica* und *J. ailanthifolia* durchgeführt. Ziel war die Identifikation von Genorten, die jeweils eine artübergreifende Amplifikation ermöglichen und eine für die verschiedenen Anwendungen nutzbare genetische Variabilität generieren. Für alle im Projekt anstehenden genetischen Untersuchungen wurde ein Mikrosatelliten-Marker-Set bestehend aus den Genorten WGA027, WGA032, WGA118, WGA331, WGA069, WGA276, WGA089, WGA001, WGA009, WGA004, WGA082 und WGA202 zusammengestellt. Das Primerset wurde genutzt um folgende Analysen durchzuführen:

1. Identifikation von Arten und Herkünften in der Gattung *Juglans*
2. Identifikation von Intermedia-Hybriden und Elternschaftsanalysen
3. Identifikation von unbekanntem und Komplexhybriden
4. Unterscheidung von Hybridtypen
5. Identifikation von Sorten und Kultivaren

Identifikation von Arten und Herkünften in der Gattung Juglans

Die klassische Zuordnung der verschiedenen Walnusstypen zu Arten und die Einordnung in die Gattung differenzierende Sektionen erfolgte über frucht-morphologische Charakterisierungen. Diese Art der Charakterisierung ermöglicht die Bildung der vier klassischen Walnuss-Sektionen Echte Walnüsse (*Juglans* oder *Dioscaryon*), Schwarznüsse (*Rhysocaryon*), Asiatische Walnüsse (*Cardiocaryon*) und Sektion der Butternuss (*Trachycaryon*) mit der einen Art *Juglans cinerea*. Die Analyse unseres Mikrosatelliten-Datensatzes generiert demgegenüber nur drei Gruppen (Abbildung 7). Die analysierten Arten lassen sich in drei Gruppen einordnen. Die Arten *Juglans nigra*, *J. major*, *J. microcarpa*, *J. hindsii*, *J. californica* und *J. australis* werden als Schwarznüsse identifiziert und in der Hauptkoordinatenanalyse (HKA) einer eigenen Gruppe zugeordnet. Eine Untergruppierung dieser Arten lässt die Analyse nicht zu. Demzufolge haben die verschiedenen Schwarznussarten eine enge Verwandtschaft untereinander und die reproduktive Isolation zwischen ihnen ist gering, obwohl die geographische Verbreitung der Schwarznüsse von Süd-Kanada mit *Juglans nigra* über Kalifornien mit *J. hindsii* und *J. californica* bis in die Südlichen Anden reicht und dort mit *J. australis* als einziger Art den Äquator überschreitet.

Die Arten *Juglans cathayensis*, *J. ailanthifolia*, *J. manshurica* der klassischen Sektion der Asiatischen Walnüsse, wie auch die Art *J. cinerea* aus der klassischen Sektion der Butternüsse, werden in dieser Analyse durch eine eigene gemeinsame genetische Gruppe repräsentiert (Abbildung 7). Diese Eingruppierung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Arten dieser beiden klassischen Sektionen genetisch in einer gemeinsamen Sektion „Butternüsse“ zusammengefasst werden sollten. Eine Subgruppierung der einzelnen Butternuss-Arten war durch unseren Datensatz nicht möglich.

Die Herkünfte der Reinen Walnuss *J. regia* aus Kirgistan, Europa, Dachigam, Lolab-Tal, Kangan und Manshi bilden gemeinsam die dritte Gruppe in der HKA in Abb. 7. Eine eindeutige Einordnung in eine gemeinsame Sektion „*Juglans*“ (Echte Walnüsse) ist für alle Genotypen dieser Art möglich. Die verschiedenen Herkünfte lassen eine weitere Subgruppierung zu. Die Einteilung in die Herkünfte Europa, Kirgistan und Himalaya verdeutlicht die hohe genetische Vielfalt innerhalb der Art *J. regia*. Das genetische Spektrum innerhalb dieser Art ist genauso hoch wie das Spektrum zwischen allen hier untersuchten Arten im Vergleich und deutlich höher als das der verschiedenen Arten innerhalb der jeweils anderen beiden Gruppierungen (Schwarz- und Butternüsse). Die genetische Differenzierung durch Subgruppierungen der verschiedenen Herkünfte innerhalb der Reinen Walnuss erreicht ein Niveau, welches erlauben würde, diese möglicherweise in Unterarten oder sogar Arten zu differenzieren.

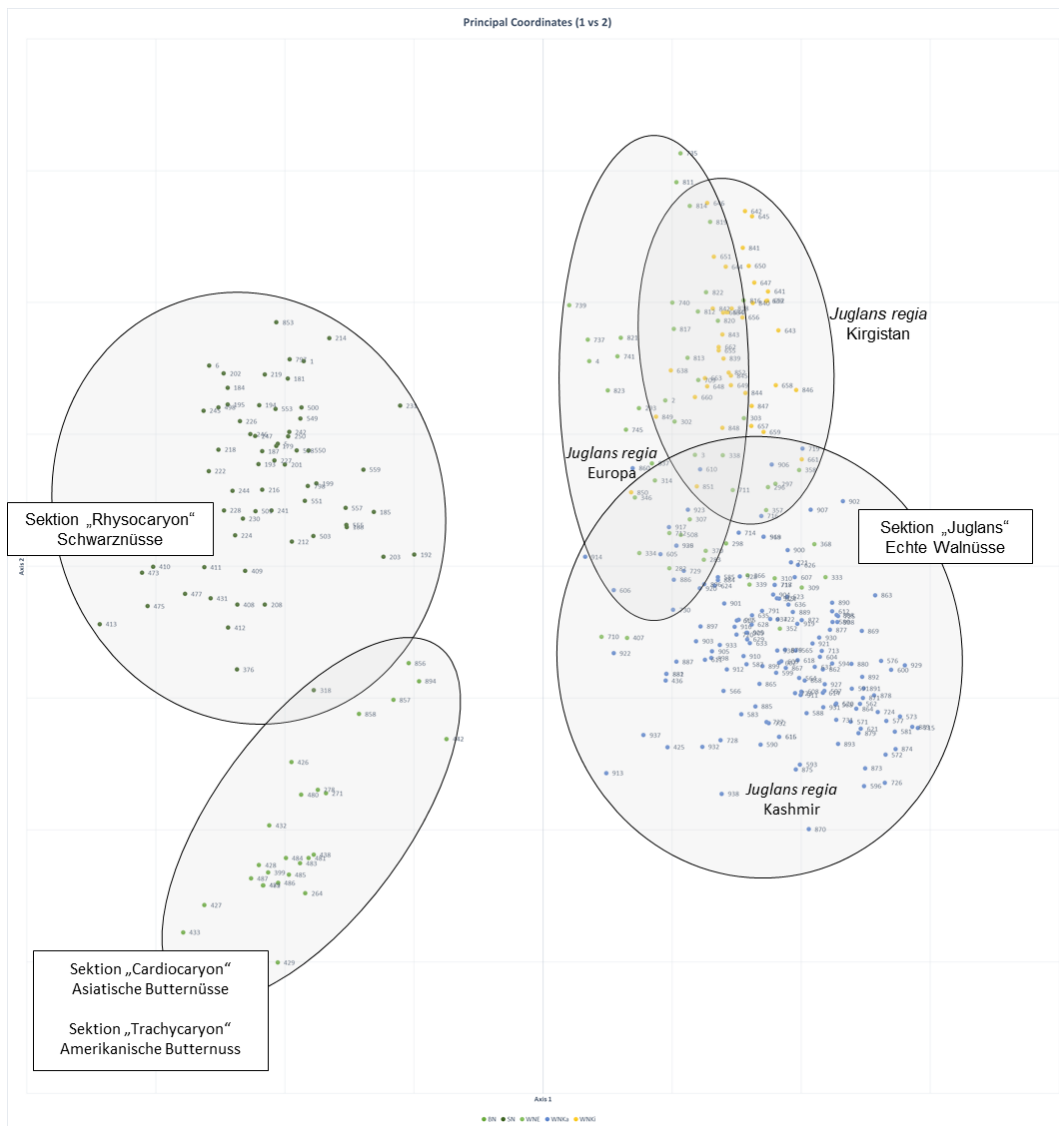


Abb. 7: Hauptkoordinaten-Analyse einer Teilpopulation von insgesamt 939 analysierten Individuen der Gattung *Juglans* zur Identifikation von Arten und Herkünften

Identifikation von *Intermedia*-Hybriden und Elternschaftsanalysen

Die aus gelenkten und un gelenkten Kreuzungen stammenden Nachkommen konnten mit dem zur Verfügung stehenden Marker set aus 12 Genorten eindeutig der Mutterart oder im Fall der erfolgreichen Hybridisierung auch dem Vater zugeordnet werden. Durch gelenkte Kreuzungen zwischen den Arten *Juglans nigra* und *J. regia* konnten keine hybridogenen Nachkommen generiert werden. Alle Nachkommen aus diesen Kreuzungen sind zu 83 % durch Selbstung oder Apomixis entstanden. Die resultierenden Embryonen hatten eine geringe Überlebensrate welches als Hinweis auf genetische Einengung oder sogar Haploidie gewertet wird.

In Abbildung 8 sind die beteiligten Arten inklusive der potentiellen Eltern und ihre genetische Verwandtschaft exemplarisch für einige Kreuzungen dargestellt. Im Fall der un gelenkten Kreuzung mit dem Ziel der Produktion hybridogener Nachkommen der Sorte Reni wurden potentiell hybridogene Embryonen isoliert und auf geeigneten In Vitro-Nährmedien etabliert. Diese wurden anschließend genetisch analysiert. Insgesamt 65 % der Nachkommen einer Stichprobe von Nüssen der Jahre 2017, 2018

und 2019 waren *J. x intermedia*. Von den 35 % nicht hybridogenen Nachkommen sind 74 % aus Selbstung oder Apomixis entstanden. Die übrigen 26 % dieser sind Nachkommen unbekannter Schwarznuss-Väter aus der Umgebung des Mutterbaumes.



Abb. 8: Hauptkoordinaten-Analyse einer Teilpopulation von insgesamt 939 analysierten Individuen der Gattung *Juglans* zur Identifikation der Vaterschaft nach gelenkten und un gelenkten Kreuzungen

Es wurde festgestellt, dass alle Intermedia-Nachkommen der Reni-Kreuzung von 3 Vätern aus der unmittelbaren Umgebung des Mutterbaumes abstammen (Abbildung 8). Von den 42 hier analysierten Nachkommen waren 18 von Vater 1, 15 von Vater 2 und 9 von Vater 3 abstammen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass es sich bei Vater 2 um die Sorte Geisenheim 120 handelt.

Identifikation von unbekanntem und Komplex-Hybriden

Die morphologische Identifikation von unbekanntem und Komplex-Hybriden ist schwierig. Oft sind keine reinen sondern eher intermediäre Merkmale vorhanden. Demgegenüber können einige Individuen eher in die morphologische Ausprägung einer der Elternarten tendieren. Sehr viele Kultivare,

Raritäten und Baumdenkmäler sind unbekannter Herkunft und nur geschätzter Artzugehörigkeit. Sie erzielen oft hohe Dimensionen und ein hohes Alter. Ziel des Projektes war unter anderem die Sicherung und Vermehrung von Genotypen dieser Bedeutung. Bäume mit überragenden Erträgen und Wuchsformen zeigen ihr Potential bereits an ausgewachsenen Individuen. Sie können selektiert werden und haben ein bekanntes Ertrags- und Form-Potential. Sie können diese Eigenschaften auch an klonal vermehrte Pflanzen weiter geben. Die klonale Vermehrung über *In-Vitro*-Techniken setzt das Wissen über die Artzugehörigkeit des Baumes voraus, denn dessen Kultivierungsfähigkeit ist abhängig von der Zusammensetzung des spezifischen Nährmediums. Sogenannte Komplexhybriden vereinigen die Merkmale verschiedener Arten in einem Individuum. Komplexhybriden entstehen aus Kaskadenkreuzungen. Zunächst kreuzen sich nur kompatible Arten wie *Juglans nigra* und *J. regia* miteinander. Erst die daraus resultierende Intermedia-Hybride ist in der Lage sich mit einer Art aus der Sektion der Butternüsse zu kreuzen. Aus diesen Kreuzungen entstehen oft triploide Nachkommen. Diese Nachkommen vereinen aus diesem Grund auch die physiologischen Merkmale ihrer Eltern. Eine typische Komplexhybride ist $(Juglans\ nigra \times regia) \times manshurica$. Verschiedene Kultivare dieser Zusammensetzung oder unbekannter Zusammensetzung werden in Abb. 9 in ihren Verwandtschaftsverhältnissen dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass diese Komplexhybriden auch in der Artzuordnung eine intermediäre Stellung zwischen den drei Ausgangsarten einnehmen.

Weltweit existieren zahlreiche Sorten oder Kultivare des Intermedia-Typs. Diese sind entweder zufällig durch das Nebeneinanderstehen in Arboreten und Botanischen Gärten oder aber gezielt durch das Zusammenstellen in Hybridsamenplantagen entstanden. In Abb. 10 wird deutlich, dass in unserem Datensatz mindestens 2 Hybridtypen unterschieden werden können. Zunächst bilden die hybridogenen Nachkommen der Sorte Reni einen einheitlichen Hybridschwarm, welcher in der Abbildung der ersten und zweiten Koordinate der HKA auf einer Achse zwischen den Elternteilen erscheint. Der zweite Intermedia-Hybridschwarm wird gebildet von Individuen mit unbekannter Herkunft und unbekanntem Eltern. Dennoch erscheint dieser deutlich eingrenzbar und eine Genotypisierung lässt die zweifelsfreie Unterscheidung dieser untereinander und zur Reni-Hybride sowie gegenüber der Hybride NG23 mit der bekannten Mutter Franquette zu.



Abb. 9: Hauptkoordinaten-Analyse einer Teilpopulation von insgesamt 939 analysierten Individuen der Gattung *Juglans* zur Identifikation von Komplexhybriden

Identifikation von Sorten und Kultivaren

Die Verwandtschaftsbeziehungen von Sorten und Kultivaren ist oft ungeklärt. Die Genotypisierung dieser ist von Bedeutung um Verwechslungen auszuschließen, denn diesen Walnüssen können typische Wuchs- und Formeigenschaften zugeordnet werden. Verschiedene Sorten und Kultivare der Gattung *Juglans* wurden von uns genotypisiert (Abb. 10). Es ist bekannt, dass die Sorte Franquette wahrscheinlich die älteste Sorte überhaupt ist und phänologisch insofern interessant, dass sie sehr spät austreibt und blüht und damit nicht nur toleranter gegenüber Spätfrostereignissen ist sondern wegen dieser Eigenschaft auch geeignet ist, um als Pollenspender in einer Intermedia-Hybridkreuzung mit einer Schwarznussmutter in Frage zu kommen. Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass sich in diesem Fall, wie auch in der Hybride NG23 gezeigt, die Blühzeitpunkte beider Elternteile überlappen. Die alten Sorten Hartley, Sorrento und Franquette sind sehr nah verwandt, unterscheiden sich aber deutlich zu den deutschen Sorten Geisenheim 120 und Kurmarker-Walnuss. Die Sorte Idealo zeigt in der HKA ihre Verwandtschaft zu zentralasiatischen Herkünften wie Kirgistan. Die berühmte Hybridnuss aus Meinier wird als Intermedia-Hybride identifiziert und auch die verschiedenen Paradox-Hybriden aus *Juglans*

hindsii x *J. regia* werden diesen zugeordnet. Auch die Garavel-Hybride Mj209 aus *Juglans major* x *J. regia* nimmt eine intermediäre Stellung zwischen den Ausgangsarten ein. Die Oregon Walnut ist eigentlich eine Hybride aus *Juglans nigra* x *J. hindsii*, also eine Intrasektionshybride. Sie wird in unserem Datensatz eher als Intermedia-Hybride identifiziert.

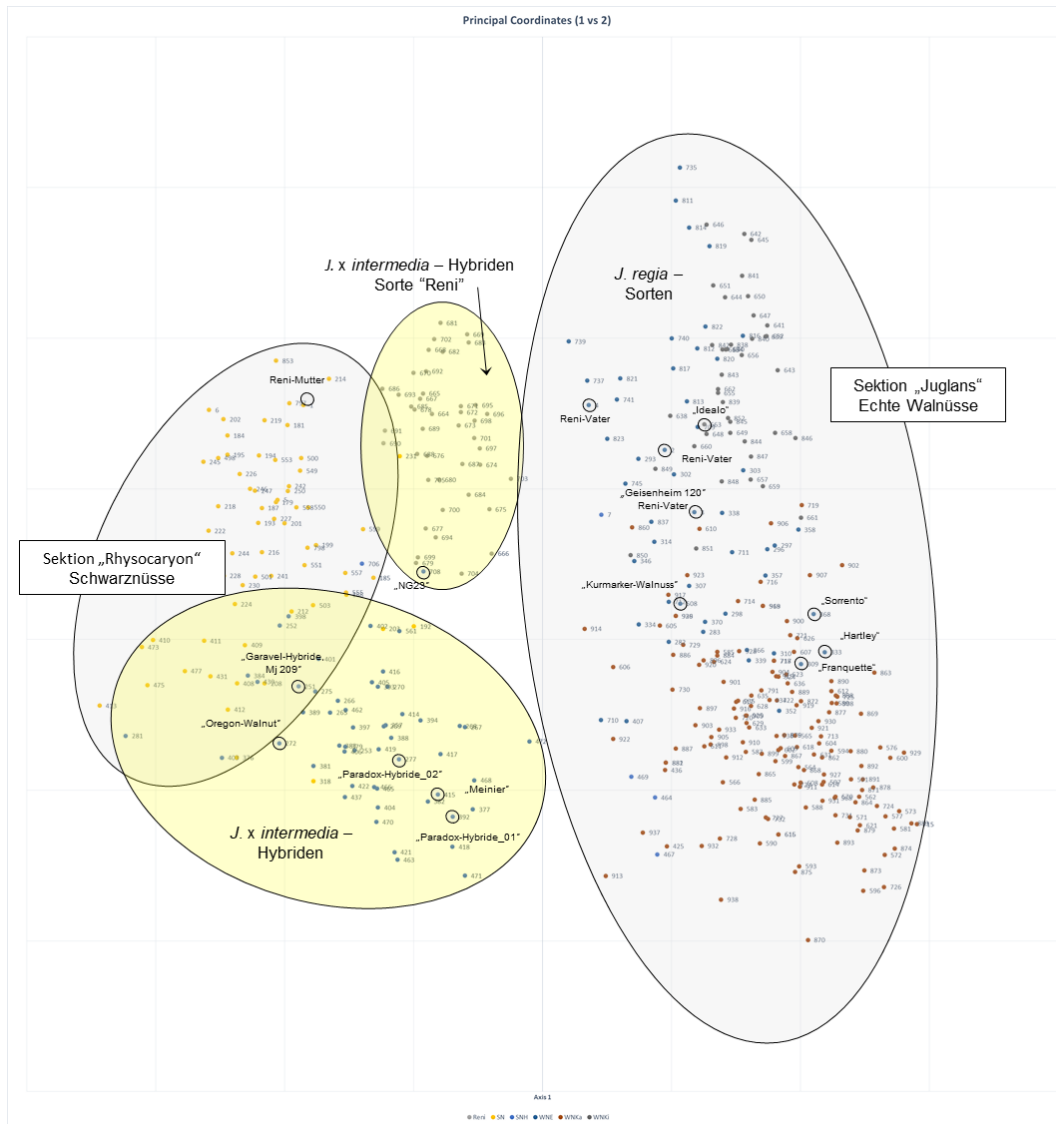


Abb. 10: Hauptkoordinaten-Analyse einer Teilpopulation von 939 Individuen der Gattung *Juglans*; Sorten und Hybridtypen

Arbeitspaket 5: Versuchsflächenanlage, biometrische & physiologische Evaluierung der Prüfglieder

Die biometrischen, physiologischen und phänologischen Bonituren der Prüfglieder dienen der Entwicklung eines physiologischen Ertragsschätzers, dessen Anwendung zur Leistungsdiagnose einer Pflanze in frühen Entwicklungsstadien befähigen soll. Ein **physiologischer Ertragsschätzer** bewertet ohne aufwendige Feldprüfungen die Anbauwürdigkeit des jeweiligen Gehölzes.

Im Projektzeitraum wurden biometrische, physiologische und phänologische Daten von 4 Hybridnuss-Klonprüfungen (Liliental, Rastatt, Gudensberg, Steckby), 3 Walnuss-Klonprüfungen (Holzhausen, Wolfenbüttel, Harzgerode), 1 Walnuss-Samenplantage (Liliental) und 1 Hybridnuss-Samenplantage (Oldendorf) sowie dem Walnuss-Herkunftsversuch (Obfelden) erhoben.

Die **Hybridnuss-Klonprüfung** Gudensberg wurde im Frühjahr 2018 angelegt und wird hier exemplarisch zur Darstellung der Ergebnisse verwendet. Diese Fläche ist eine Versuchsfläche zum vergleichenden Anbau von 33 Prüfgliedern der Hybridnuss *Juglans x intermedia*. Jedes Prüfglied wurde randomisiert in vier Parzellen zu je 4 Pflanzen angebaut. Die Gesamtheit aller Prüfglieder wurde über sterile Sprosskulturen vermehrt. Die zu prüfenden Klone sind aus Embryonen oder über vegetative Etablierung *in vitro* überführt worden. Die Klone stammen aus der Hybridkreuzung der Sorte Reni. Der Klon NG23 wurde über vegetative Inbetriebnahme von einem Altbaum gewonnen.

Nach dreijähriger Kultur wurden im Herbst 2021 die Höhen ermittelt. In den Jahren 2021, 2022 und 2023 fanden **Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen (CF)** statt. Die Messungen der Fotosynthese wurden an 3 Teilblättern von je 2 Pflanzen je Parzelle in insgesamt 4 Parzellen je Klon durchgeführt. Insgesamt entstand für die Versuchsfläche Gudensberg ein CF-Datensatz, der durch 792 Einzelmessungen pro Jahr für diese Versuchsfläche generiert wurde.

Die **Fotosynthese** einer Pflanze ist der zentrale **Energiegewinnungs- und Transformationsprozess**. Die Umsetzung von Licht in elektrische Energie ist an die verschiedenen Umweltbedingungen adaptiert, in der der jeweilige Organismus evolviert ist. Die Fotosynthese ist der energetische Flaschenhals und die Ausprägung ihrer Effizienz hat einen direkten Bezug zur Produktion von Biomasse. Im Projekt wurden die durch Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen ermittelten physiologischen Daten den „realen“ Gegebenheiten, wie dem Ertrag, durch biometrische Vermessung gegenübergestellt. Die Hypothese ist, dass die Ausprägung eines Fotosyntheseparameters in derselben Größe steigt oder fällt wie auch die Produktion von Biomasse einer Pflanze. Mit einer CF-Messung können gleichzeitig 44 Parameter berechnet werden, die einen direkten Bezug zum Energietransfer innerhalb eines bestimmten Bereiches der Fotosynthesekette zulassen. Der quantifizierte Bereich ist ein Ausdruck für die Effizienz oder aber auch einer Schwachstelle (Engpass) im Fotosynthesesystem.

In Abbildung 11 ist eine Stichprobe von *Juglans x intermedia* - Prüfgliedern abgebildet. Die **Korrelationsfaktoren** wurden aber vom Gesamtdatensatz der jeweiligen Fotoperiode ermittelt. Es wurde die Ausprägung verschiedener **Fotosyntheseparameter** ermittelt und dem Median der **Pflanzenhöhen** gegenübergestellt. Die Daten der einzelnen Prüfglieder wurden mit dem jeweiligen Höchstwert standardisiert. Es wurde die Ausprägung von 11 Fotosyntheseparametern und der Höhe abgebildet. Die Höhe des Korrelationskoeffizienten beschreibt die Dichte des Zusammenhangs zwischen der Höhe und dem jeweiligen Fotosyntheseparameter.

Der Median der Höhe des höchsten Klons 32/45 beträgt 1,52 m. Dieser Klon belegt im Ranking der Ausprägungen der verschiedenen Fotosyntheseparameter fast immer die Spitzenposition. Die dargestellten Klone zeigen insgesamt eine sehr hohe Varianz in ihrer Ausprägung in den verschiedenen Fotosyntheseparametern.

Die **Lichtabsorption ABS/CSm** (Abb. 11 und 12) beschreibt den ersten Schritt der Fotosynthese und ist die Menge des in den Lichtsammelkomplexen eingefangenen Lichts. Die Ausprägung dieses Parameters korreliert mit der Dichte der Antennenkomplexe im Blattgewebe. Einige Klone, wie auch 32/45 sind in der Lage sehr viel Licht einzufangen und dieses auch in elektrische Energie umzuwandeln. Demgegenüber sind aber nicht alle Klone in der Lage das aufgenommene Licht effizient zu transformieren und weiterzuleiten und können dieses im Vergleich nur weniger gut in Biomasse umwandeln. Aus diesem Grund besteht auch nur ein mittlerer Zusammenhang von $P = 0,68$ dieses Parameters mit der Höhe.

Die Transformation der Lichtenergie in elektrische Energie wird durch den Parameter des **Trappingstroms TRo/CSm** (Abb. 11 und 12) erklärt. Schon an dieser Stelle wird entschieden wie viel elektrische Energie an die Plastoquinon-Elektronenakzeptoren des Fotosystems 2 weitergeleitet werden kann. Deshalb gibt es einen deutlich überdurchschnittlichen Zusammenhang von $P = 0,76$ dieses Parameters zum Ertrag.

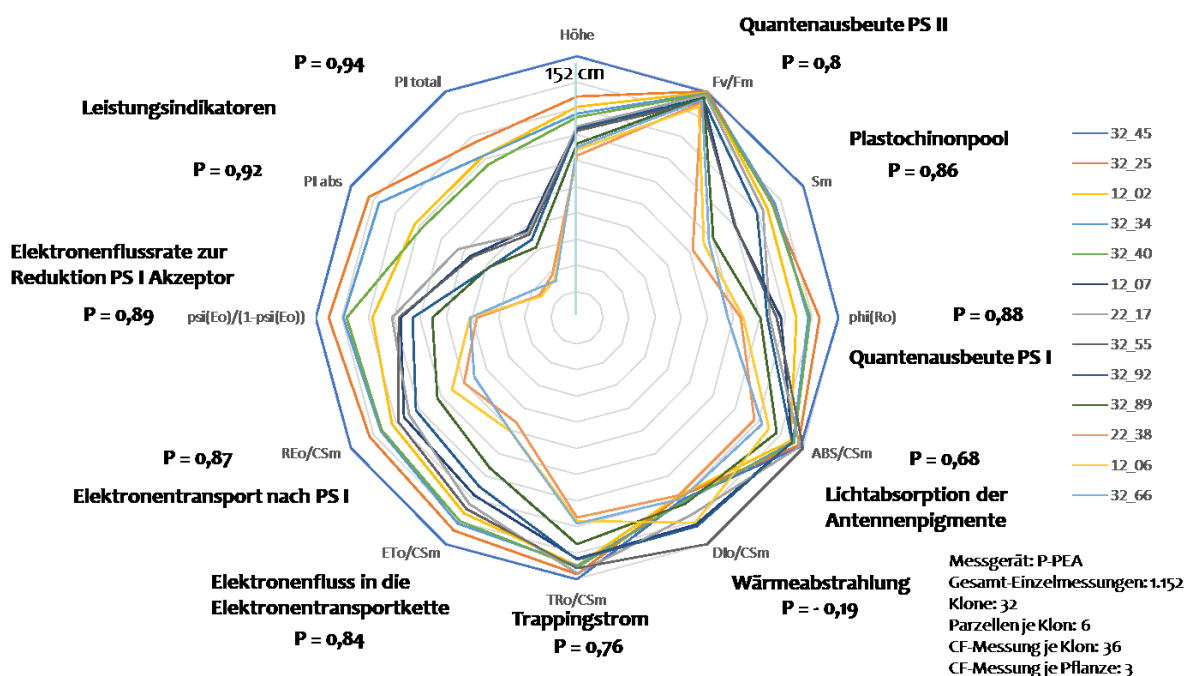


Abb. 11: Ausprägung und Zusammenhang zwischen verschiedenen Fotosynthese-Parametern der Vegetationsperiode 2022 zum Median der Pflanzenhöhe, drei Jahre nach Pflanzung im Herbst 2022 (dreijährige Intermedia-Klonprüfung Gudensberg)

Energie, die nicht in das Fotosystem 2 weiter geleitet wird, muss abgeführt werden und das erfolgt durch **Wärmeabstrahlung Dlo/CSm** (Abb. 11 und 12). Aus diesem Grund ist die abgestrahlte Energie reziprok zur weiter geleiteten Energie. Es entsteht ein negativer Zusammenhang zur produzierten Biomasse. Dieser negative Zusammenhang zwischen Wärmeabstrahlung und Ertrag ist nur schwach ausgeprägt. Am Beispiel des Klons 32/55 wird deutlich, dass es für diesen einen Etagenwechsel im Ranking der Fotosynthese-Effizienz gegeben hat. Dieser Klon startet mit der höchsten Lichtabsorption, hat aber gleichzeitig die höchste Wärmeabstrahlung und positioniert sich deshalb im Ranking des weitergeleiteten Trappingstroms erst an der vierten Stelle. Demgegenüber startet Klon 32/45 mit einer geringeren Lichtabsorption, hat aber gleichzeitig die geringste Wärmeabstrahlung in diesem Datensatz

und liegt deshalb im Ranking des weitergeleiteten Trappingstroms an vorderster Stelle. Lichtenergie die nicht aufgenommen wurde, kann auch nicht auf ineffiziente Weise durch Wärmestrahlung abgegeben werden. Deshalb hat zwar Klon 22/38 die geringste Wärmeabstrahlung, kann aber auch nicht mehr Energie weiterleiten, da nicht mehr Licht absorbiert wurde. Die Wärmeabstrahlung bestimmt nur geringfügig die Höhe des Ertrags. Mit einem Zusammenhang von nur -0,19 zum Ertrag wird deutlich, dass die generierten Fotosyntheseparameter einen sehr geringen Zusammenhang zu Umweltparametern wie Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit haben. Bei begrenzter Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen müsste ein größerer Betrag an Energie als Wärme ungenutzt abgeleitet werden, denn die effiziente Weiterleitung von Energie in die Fotosynthesekette ist an diese gekoppelt.

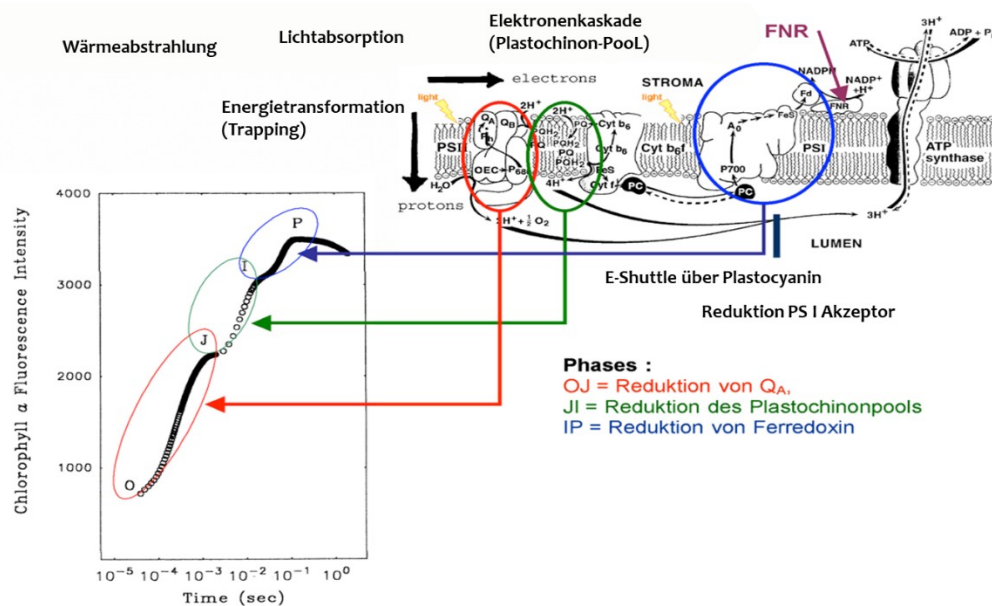


Abb. 12: Zuordnung der einzelnen Phasen der Fluoreszenzkurve zu den jeweiligen Abschnitten des Energietransfers in der Fotosynthesekette

Die eingefangene und transformierte Energie wird an das Fotosystem 2 geleitet. Der Parameter **Fv/Fm** quantifiziert den Elektronendurchgang in diesem Bereich der Fotosynthesekette und wird hier als **Quantenausbeute PS II** (Abb. 11 und 12) bezeichnet. Fv/Fm ist der meistgenutzte Fotosyntheseparameter, der durch die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz generiert und oft zur Beschreibung der Auswirkungen von Stress auf die Fotosynthese herangezogen wird. Fv/Fm hat in dieser Untersuchung eine nur geringe Varianz im Vergleich zu allen anderen hier aufgeführten Parametern, beschreibt aber einen Dichten Zusammenhang von $P=0,8$ zur Höhe.

Die Weiterleitung der Elektronen aus Fotosystem 2 in die **Elektronentransportkette** (Abb. 11 und 12) wird durch den Parameter **ETo/CSm**, mit einem Zusammenhang zum Ertrag von 0,84, beschrieben. Der Elektronendurchsatz innerhalb der Elektronentransportkette wird über die Größe des **Plastochinonpools S_m** quantifiziert. Die Dichte des Zusammenhangs zum Ertrag bleibt auch an den Parametern, die den Elektronentransport nach dem Cytochrom-B-Komplex **REo/CSm** (Elektronentransport zum Fotosystem 1) mit $P=0,87$ und **psi(Eo)/(1-psi(Eo))** (Reduktion PS I – Akzeptor) mit $P=0,89$ beschreiben, sehr hoch. Der von uns messbare Elektronenfluss wird nach einer Sekunde Detektionszeit im Fotosystem 1 begrenzt und durch den Parameter der **phi(Ro)** Quantenausbeute des Fotosystems 1 quantifiziert. Im Fotosystem 1 finden noch einige Rangverschiebungen im Ranking der getesteten Klone statt. Das

bedeutet, dass der Elektronenfluss bis zum Ende der Fotosynthesekette detektiert werden sollte, da auch noch von Fotosystem 1 bedeutende Beiträge zur Energiebilanz beigesteuert werden.

Aus diesem Grund sind die zusammenfassenden Leistungs-Indikatoren PI_{abs} (Abb. 11), mit einem Zusammenhang zum Ertrag von $P=0,92$, und PI_{total} , mit $P=0,94$, für die Einschätzung des potentiellen Biomasseertrags in der Gattung *Juglans* die effizientesten Indikatoren, die über die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz berechnet werden können. Die **Leistungs-Indikatoren** bewerten die Effizienz des Elektronentransports für PI_{abs} bis einschließlich Fotosystem 2 und PI_{total} bis einschließlich Fotosystem 1. Potentielle energetische Flaschenhälse werden in der Gesamtbilanz des Elektronentransports im Fall von PI_{total} über die gesamte Fotosynthesekette betrachtet (Abb. 12). Über die effiziente Nutzung der Energie zur Umwandlung in Biomasse wird in der Gattung *Juglans* schon sehr frühzeitig, ab der Absorption von Licht (ABS/CSm), entschieden. Die Energietransformation (TRo/CSm) und der Abfluss von Wärme (Dlo/CSm) sind dennoch der endgültige energetische Flaschenhals im System des Energieflusses der Fotosynthese in der Gattung *Juglans*.

Das Züchtungsziel in der Gattung *Juglans* ist die Kombination aus einem hohen Ertrag und guten **Formeigenschaften**. Der **Ertrag** ist abhängig von einer effizienten **Fotosynthese** und einer ausreichend langen Fotoperiode. In Abb. 11 wurde durch die Feldstudie Gudensberg ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Effizienz der Fotosynthese und Ertragsdaten dargestellt. Die Hybridnuss *J. x intermedia* zeigt nicht nur eine hohe Variabilität der Ausprägung von Fotosyntheseparametern sondern auch eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Klonen in den resultierenden Ertragsparametern. Das Züchtungsziel ist, neben einem hohen Ertrag, aber auch die Produktion von Bäumen mit guten oder hervorragenden Formeigenschaften. Besonders erwünschte Formeigenschaften sind ein gerader und höhenbetonter Stamm, ein später Kronenansatz und eine natürliche Astreinigung, die einen hohen astfreien Bereich im unteren Stammbereich liefert. Hypothese für unsere Studie ist, dass die Formeigenschaften nicht nur von der Genetik des Verzweigungsmusters des jeweiligen Klons, sondern besonders auch vom **phänologischen Verhalten** eines unterschiedlichen Austriebszeitpunkts abhängig sind. Die verschiedenen Arten der Gattung *Juglans* tendieren beim Anbau in mitteleuropäischen Breiten zu einem frühen phänologischen Austriebszeitpunkt. Dieser frühe Austriebszeitpunkt verursacht das Erfrieren der frischen Triebe bei einem typischen Spätfrostereignis. Das Absterben insbesondere neu gebildeter Terminaltriebe verursacht die Bildung von Ersatztrieben. Diese können zur Zwieselung, Steilastbildung und einem tiefen Kronenansatz sowie zu ungeraden Schaftformen führen. Durch einen späteren Austrieb, möglichst nach einem potentiellen Spätfrostereignis, können solche Schäden verhindert werden. Resultat eines späteren Austriebs ist aber auch eine kürzere Vegetationsperiode. Durch die verkürzte Vegetationsperiode wird auch der Zeitraum zur Produktion von Biomasse verringert. Nur durch eine effiziente Fotosynthese können die Einbußen der Fotoperiode-Zeit ausgeglichen oder - im Optimalfall - aufgeholt werden.

Die *Juglans x intermedia* Klonprüfung Liliental gehört der gleichen Klonprüfungsserie an wie die Klonprüfung Gudensberg und auch da wurden dieselben Klone der Hybridkreuzung Reni sowie eines Klons der Hybridkreuzung NG23 im Jahr 2018 angebaut. Neben der Detektion der Fotosynthese über Chlorophyll-Fluoreszenz von 33 Hybridnussklonen, die über sterile Sprosskultur auf die entsprechende Prüfgliedzahl gebracht wurden, wurden die biometrischen Daten für Holzvolumenberechnungen, Stammform und dem phänologischen Austriebsverhalten ermittelt. Für das produzierte Holzvolumen bis zum Jahr 2022 ergibt sich ein Ranking mit großer Varianz zwischen den verschiedenen Klonen (Abb. 13). Im Vergleich dazu ergibt die gemessene Höhe eine geringere Varianz. Damit wird deutlich, dass der Stammdurchmesser einen erheblichen Beitrag für den Gesamtertrag an Holzbiomasse liefert.

Darüber hinaus ist anhand der Daten davon auszugehen, dass der Standort Liliental edaphisch und klimatisch hervorragend für den Anbau von Hybridnüssen geeignet ist.

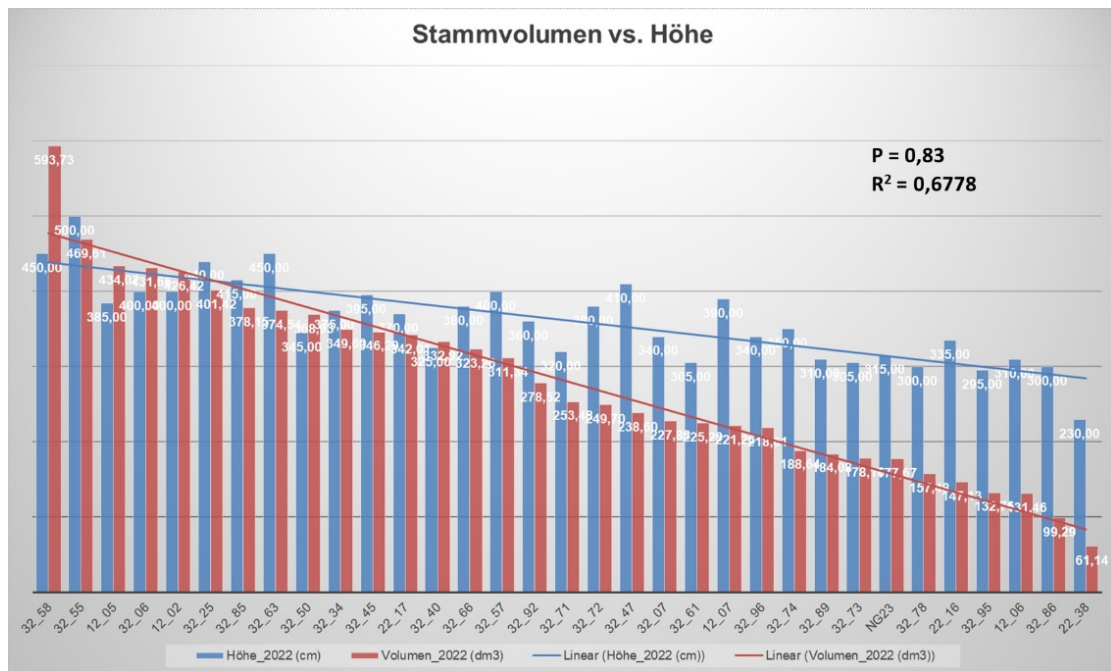


Abb. 13: Vergleich zwischen den Medianen der Pflanzenhöhe und des Stammvolumens von 33 *Juglans x intermedia*-Klonen der vierjährigen Klonprüfung „Liliental“ (Kaiserstuhl, Baden Württemberg)

Um einen Zusammenhang zwischen den biometrischen Daten (**Höhe** und **Durchmesser**) und der physiologischen Bewertung über die Nutzung von Fotosyntheseparametern zu erklären, wurde hier der Parameter PI_{area} benutzt. PI_{area} ist das Integral unter der logarithmierten Intensität der Chlorophyll-Fluoreszenzkurve und ein Ausdruck für die Größe des Plastochinon-Pools, welcher den Elektronentransport zwischen Fotosystem 2 und dem Cytochrom-B-Komplex gewährleistet (Abb. 11 und 12). Dieser Parameter hatte auch schon für die Klonprüfung Gudensberg hohe und stabile Zusammenhänge mit der Höhe gezeigt. Auf der Klonprüfung Liliental konnten auch die Stammdurchmesser gemessen werden und so war eine Stammvolumenberechnung aber auch eine Berechnung des Höhen-Durchmesser-Verhältnisses (Abholzigkeit) möglich. Die Korrelation zwischen Stammvolumen und PI_{area} ergab einen hohen Zusammenhang von $P = 0,71$ (Abbildung 14).

Demgegenüber viel der Zusammenhang zur Höhe desselben Messjahres mit $P = 0,49$ deutlich geringer aus. Die Ausprägung des Korrelationskoeffizienten unterstreicht hiermit nachdrücklich die Effizienz des physiologischen Ertragsschätzers PI_{area} in Bezug auf die Biomasseproduktion in der Gattung *Juglans*, denn der deutlichere Bezug zum Volumen stellt den realen Biomassertrag des Volumens gegenüber der Eindimensionalität der Höhe in den Vordergrund. Bemerkenswert ist, dass der Zusammenhang zwischen PI_{area} gegenüber der Höhe 2020 sehr hoch ist, aber zum Messjahr 2022 deutlich abnimmt. Daraus resultiert, dass eine weitere Dimension, die des Durchmessers, abhängig vom Alter des Baumes, an Bedeutung gewonnen hat. Nachgewiesen wird das am dichten Zusammenhang von PI_{area} mit dem Wurzelhalsdurchmesser von $P = 0,79$.

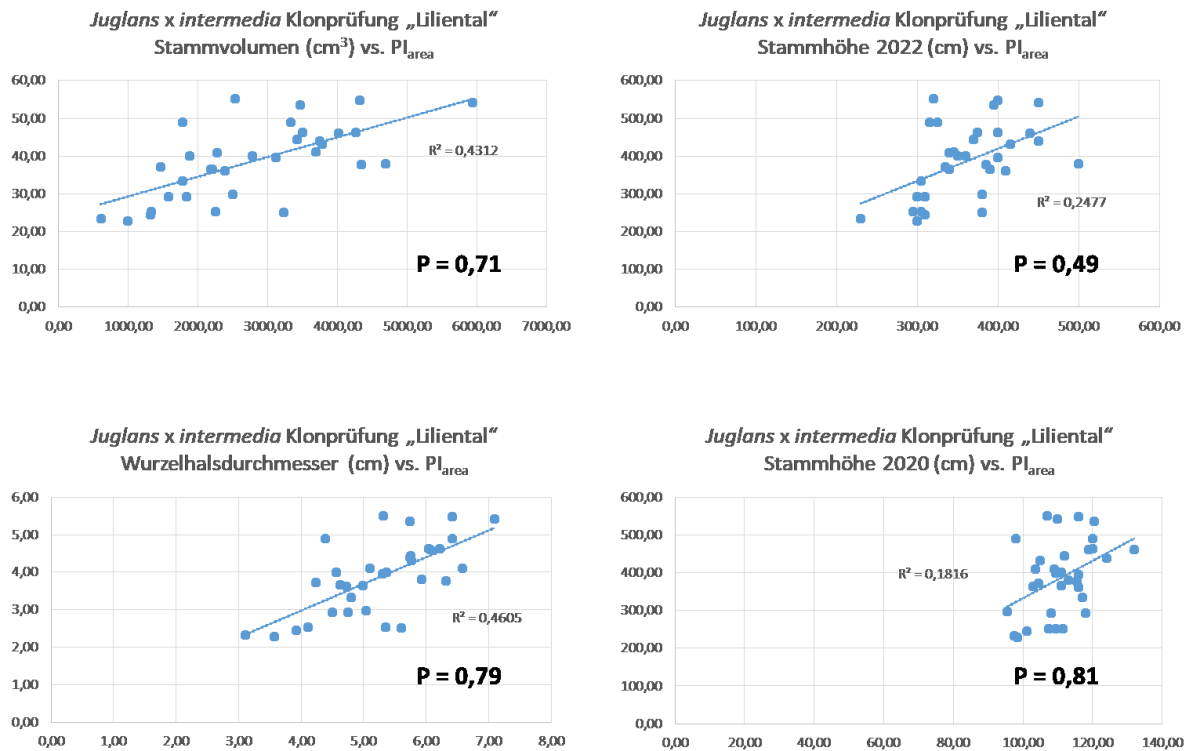


Abb. 14: Korrelation zwischen biometrischen und physiologischen Daten auf der *Juglans x intermedia* Klonprüfung „Liliental“, Volumen, Wurzelhalsdurchmesser, Höhe 2020 und Höhe 2022 versus CF-Leistungsindex PI_{area}.

Die **phänologische Austriebsbonitur** für die Klonprüfung Liliental wurde im Zeitraum 01. März 2023 bis 01. Juni 2023, innerhalb dieses Zeitraums 5-mal durchgeführt. Anhand von 5 phänologischen Stufen wurden alle 33 Klone in 8 Blöcken zu je einer Parzelle, parzellenweise bewertet. Das Spektrum der Einstufung reicht von 0 = alle Knospen im Winterzustand bis 4 = der frische Trieb ist länger als das dritte vollentwickelte Blatt. Die Stufennoten der 5 Bonituren wurden als Durchschnittswert für die phänologische Charakterisierung der verschiedenen Klone eingesetzt. Je geringer die phänologische Boniturnote ausfällt umso später beginnt der Austrieb. In Abb. 15 (braune Balken) sind die Austriebe aller 33 Intermedia-Klone, vom spätesten bis zum frühesten Austriebszeitpunkt, dargestellt. Es wurde weiterhin eine Boniturnote aus dem Durchschnitt der 5 stufigen Parameter **Stammform**, **Wipfelschäftigkeit** und **Astwinkel** im Verhältnis zur **Abholzigkeit** (Durchmesser je Höhe) berechnet. Je höher die Boniturnote ausfällt umso günstiger bewerten die Stufennoten die Stammform und umso weniger verschmälert sich der Stamm zur Höhe. Die Korrelation des phänologischen Austriebszeitpunkts mit der Formnote ergab einen hohen Zusammenhang von $P = -0,71$ (Abb. 15). Aus diesem hohen Zusammenhang lässt sich schließen, dass der Austriebszeitpunkt die Form des Baumes maßgeblich beeinflusst. Weiterhin lässt sich schlussfolgern, dass es unter den *J. x intermedia*-Klonen dieser Versuchsserie Bäume gibt, die spät austreiben und dennoch einen guten Ertrag bei gleichzeitig hervorragenden Formeigenschaften besitzen. Es ist der Fotosynthese dieses Plusbaums demzufolge möglich unter Beibehaltung guter Formeigenschaften, durch hohe Effizienz, trotz verkürzter Vegetationsperiode, einen hohen Ertrag zu erzielen (Abb. 16).

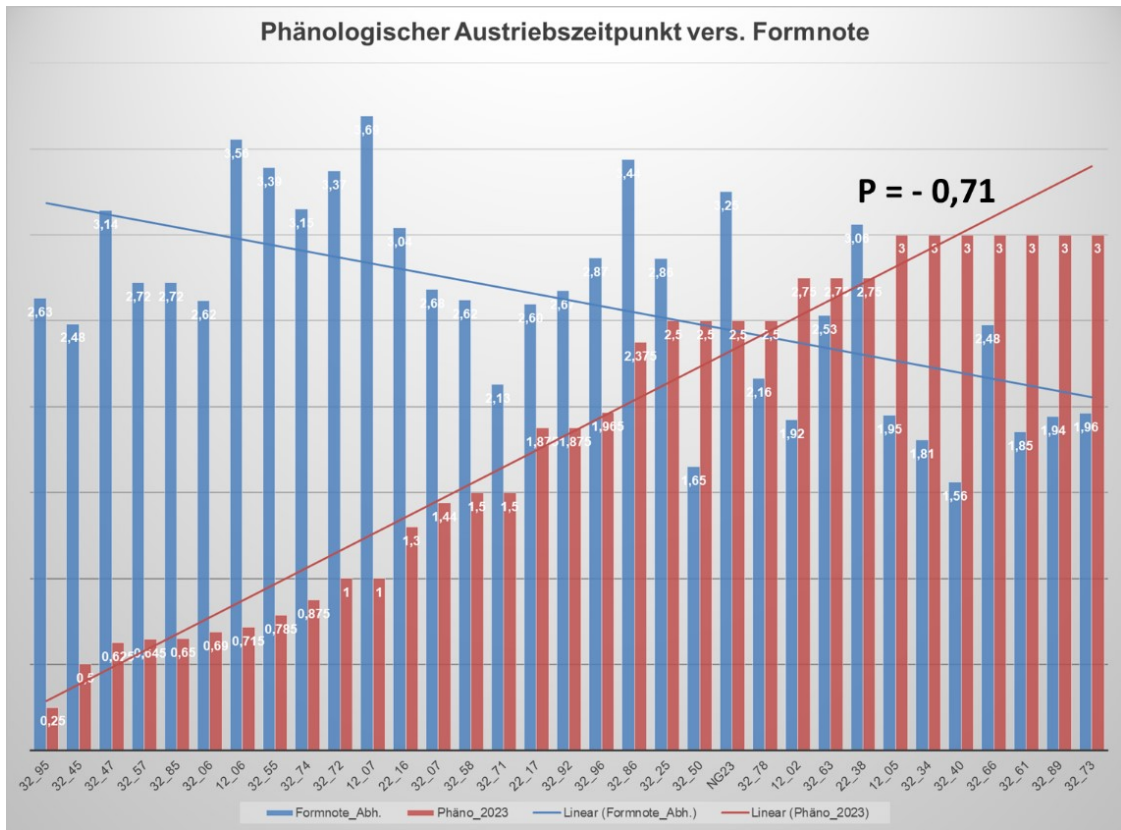


Abb. 15: Zusammenhang zwischen dem phänologischen Austriebszeitpunkt (Frühjahr 2023) und der Formnote (Stammform, Wipfelschäftigkeit, Astwinkel, Abholzigkeit) von 33 *Juglans x intermedia* Kultivaren in der Klonprüfung „Liliental“

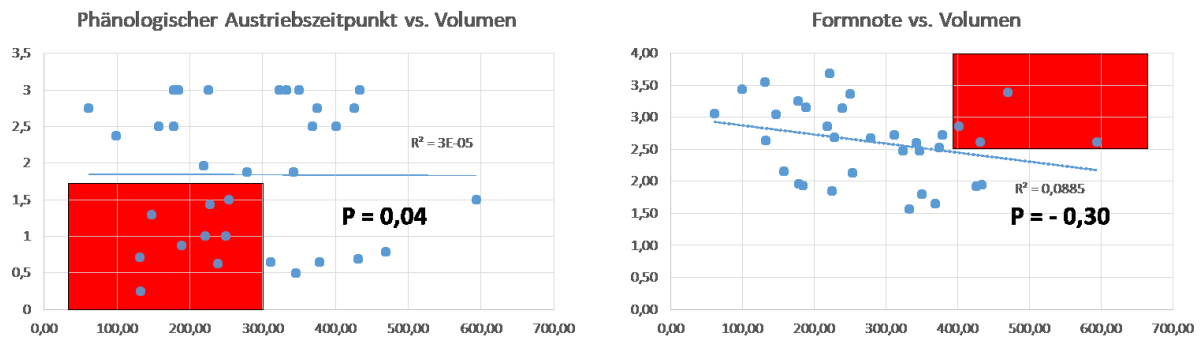


Abb. 16: Korrelation zwischen dem phänologischen Austriebszeitpunkt (Frühjahr 2023) sowie der Formnote (Winter 2023) [Ordinate] mit dem Volumen [Abszisse] auf der *Juglans x intermedia* Klonprüfungsfläche „Liliental“, rotes Rechteck: Optimalbereich für die Selektion von Elitebäumen

Arbeitspaket 6: Bereisung Kirgistan (Evaluierung der Bestände, Nussernte)

Vom 18. September bis 04. Oktober 2022 wurde von Projektmitarbeiter Steffen Fehrenz eine Reise nach Kirgistan durchgeführt. Da die im Jahr vorher schon vorgesehene Bereisung Kirgistans zur Evaluierung der Saatgutbestände coronabedingt nicht stattfinden konnte, wurden im Jahr 2022 die Evaluierung und Besammlung der Bäume in einer Reise zusammen gelegt. Es wurden im Südkirgisischen Nordrand des Ferganabeckens in einer Höhenstufe zwischen 1600 bis 2800 m in den Gebieten Kyzylunkur, Kara Alma und Kugart 280 Nüsse von 28 Bäumen gesammelt und nach Deutschland verbracht (Abb. 17).

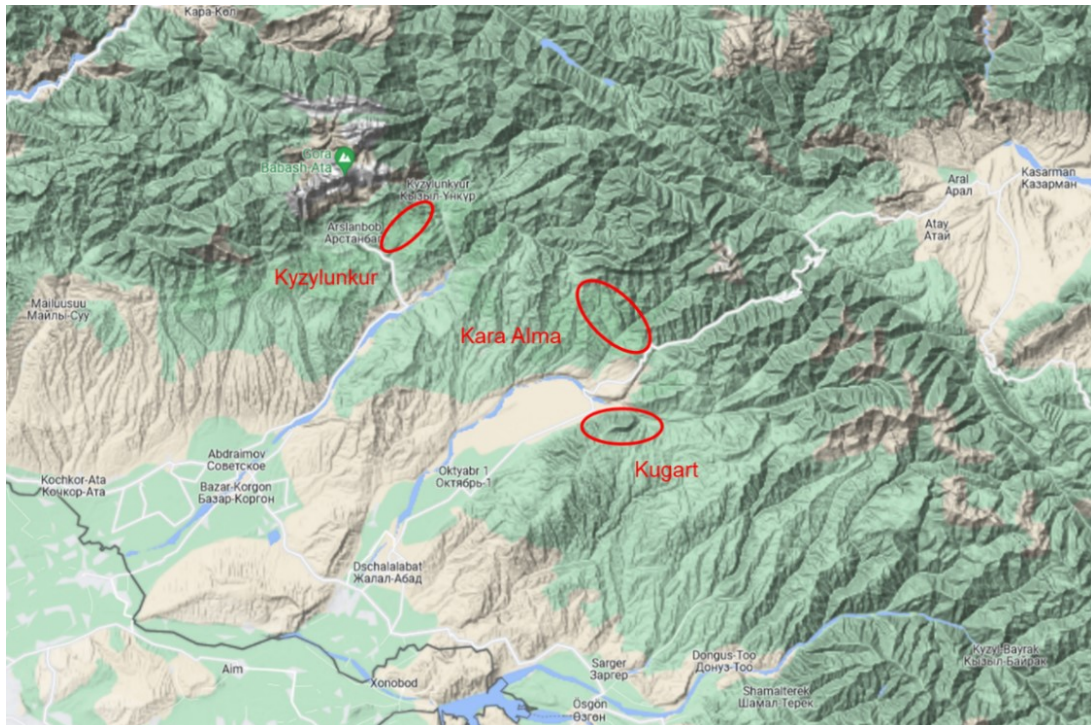


Abb. 17: Herkunftsregionen der Walnuss-Genotypen am Nordrand des Fergana-Beckens in Süd-Kirgistan (Sammelreise 2022)

Die Mutterbäume wurden nach ihrer Schaffform, den Astwinkeln und ihrer Höhenbetonung ausgewählt. Sie wurden fotografiert und es wurde eine Blattprobe zur Genotypisierung und Elternschaftsanalyse genommen. Alle Mutterbäume wurden über GPS eingemessen.

Die Sammelreise wurde durchgeführt unter der Teilnahme des ICRAF-Büroleiters Kumar Aliev. Kumar Aliev unterstützte die logistische Vorbereitung und half als Übersetzer bei der Auffindung von Bäumen bei der Recherche über die heimische Bevölkerung.

2. Verwertung

a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Die Anmeldung von Patenten oder Sorten ist nicht erfolgt.

b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Für ausgewählte Genotypen der hier beschriebenen und durch sterile Sprosskulturen vermehrbaren Kultivare sind nach weiteren erfolgreichen Feldprüfungen Zertifikate wie silvaSELECT oder das sich in Planung befindliche NW+ vorgesehen. Die Vermarktung kann im Anschluss auch über ein *In-vitro*-Kulturlabore erfolgen. Die entwickelten *In-vitro*-Protokolle für die verschiedenen Walnussarten sind sofort in jedem Labor anwendbar und erleichtern die Vermehrung von Pflanzenmaterial der Gattung *Juglans* erheblich.

Die entwickelten physiologischen Ertragsschätzer sollen die Züchtung von Wal- und Hybridnüssen effizienter gestalten und einer hochproduktiven forstlichen Phänotypisierung an selektiertem forstlichem Vermehrungsgut dienen. Die Entwicklung und Etablierung von Samenplantagen aus verschiedenen Walnussherkünften und die Produktion daraus resultierendem hochwertigem Pflanzenmaterial wird die hohe Nachfrage durch Forstbaumschulen, Wald- und Plantagenbesitzer befriedigen. Von besonderem Interesse ist hochwertiges Vermehrungsgut der Gattung *Juglans* im Agroforstbetrieb.

c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Die entwickelten *In-vitro*-Protokolle für die verschiedenen Walnussarten sind sofort in jedem Labor anwendbar und erleichtern die Vermehrung von Pflanzenmaterial der Gattung *Juglans* erheblich. Die entwickelten physiologischen Ertragsschätzer werden die Züchtung von Wal- und Hybridnüssen effizienter gestalten und einer hochproduktiven forstlichen Phänotypisierung an selektiertem forstlichem Vermehrungsgut dienen. Es wurde ein effizientes genetisches Markersset zur Differenzierung der verschiedenen Arten, Hybriden und Herkünften entwickelt. Die daraus resultierende genetische Datenbank erlaubt die vergleichende Genotypisierung zur Zertifizierung von Sorten und Kultivaren. Die Entwicklung und Etablierung von Samenplantagen aus verschiedenen Walnussherkünften und die Produktion daraus resultierendem hochwertigem Pflanzenmaterial wird die hohe Nachfrage durch Forstbaumschulen, Wald- und Plantagenbesitzer sättigen. Die Anwendung des in diesem Projekt entwickelten Methodenspektrums bietet erhebliche Potenziale zur Effizienzsteigerung von Züchtungsvorhaben. Insbesondere vor dem Hintergrund der Langfristigkeit traditioneller forstlicher Forschungs- und Entwicklungsarbeiten und dem zunehmenden Veränderungsdruck durch die Dynamik des Klimawandels ist dies von besonderer Bedeutung.

d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die NW-FVA gewährleistet die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit durch die Erhaltung der *In-vitro*-Klonsammlung verschiedener Kultivare, Arten und Herkünfte der Gattung *Juglans*. Diese stehen der Züchtung aber auch der weiteren Forschung zur Verfügung. Es werden teilweise Methoden der Langzeitlagerung über Cryokonservierung angewendet. Es wurde eine Kollektion von herausragenden Walnusskultivaren in Form eines Klonarchivs verschiedener Herkünfte zusammengestellt.

Die hier durchgeführte Studie bildet aber auch die Grundlage für weitere physiologische Untersuchungen an anderen Baumarten (Eichen, Birken, Elsbeeren, Pappeln, Weiden etc.). Denn die universell einsetzbare und nicht-invasive Detektion der Fotosynthese-Effizienz über die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz ermöglicht nicht nur die Entwicklung von physiologischen Ertragsschätzern sondern auch von Stress-Indikatoren, die künftig im Klimawandel von Bedeutung sind. Die Auswirkungen verschiedener Klimamodelle sowie edaphischer und anthropogener Stressoren auf die Fotosynthese als

zentraler Energietransformator einer Pflanze werden auch in anderen Forschungsbereichen (Agrarwissenschaft etc.) vermehrt über die Detektion der Chlorophyll-Fluoreszenz analysiert.

Die Ergebnisse dieses Projektes bilden auch die Basis für die zukünftige Erzeugung von forstlichen Versuchspflanzen. Diese wurden bislang meist vegetativ über die Veredelung auf bestimmte Unterlagen vermehrt. Die hier angewandten *In-vitro*-Verfahren erlauben die Anzucht von Versuchsgliedern in unbegrenzter Menge, in standardisierter Qualität und unter Ausschluss von Effekten, die durch Veredlungsunterlagen entstehen (direkt durch Wundeffekt oder indirekt aufgrund des abweichenden Genotyps). Die gesamte Pflanze besteht somit aus demselben Genotyp und es können physiologische, phänologische und biometrische Auswirkungen der Stressoren an einem Individuum in reproduzierbarer Wiederholung gemessen werden.

3. Erkenntnisse von Dritten

Uns liegen keine Erkenntnisse von Dritten vor, die Einfluss auf die Durchführung des Projekts sowie auf die Interpretation der Ergebnisse gehabt hätten.

4. Veröffentlichungen

Folgende Veröffentlichungen / Präsentationen sind aus dem Projekt entstanden:

- HÖLTKEN A.M., OPFERMANN N. und FEHRENS S. (2023) Hybridisierung und genetische Introgression: Bedeutung für Waldbau, Forstpflanzenzüchtung und Naturschutz. In: Liesebach M. (Hrsg.), Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen: 7. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung vom 12. bis 14. September 2022 in Ahrensburg: Tagungsband, Thünen Report, Bd. 105. Braunschweig, S. 134–152.
- FEHRENS S. und HÖLTKEN A.M. (2023) Physiologische Untersuchungen an der Gattung *Juglans*: Von der Sterilkultur bis zum fertigen Prüfglied. Präsentation auf dem Workshop „Gehölzphysiologie in Deutschland – Forschungsschwerpunkte und Perspektiven“, Gotha, 13.-14.06.2023.

Weitere Veröffentlichungen sind in Bearbeitung:

- FEHRENS S. und HÖLTKEN A.M. (in Bearbeitung) Cross-species micropropagation in the genus *Juglans*. *Journal of Biological Methods*.

Ferner ist geplant, *In-vitro*-Protokolle für wissenschaftliche aber auch für anwenderorientierte Zwecke auf Online-Plattformen zu publizieren.