Schlussbericht zum
Verbundvorhaben

Thema:

Genetik und Züchtung der Esche (FraxGen)
Verbundvorhaben innerhalb des Demonstrationsvorhabens: „Konzertierte Aktion zum langfristigen Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart (FraxForFuture)“;

Zuwendungsempfänger:

Teilvorhaben 1: Thünen Institut für Forstgenetik (TI)
Teilvorhaben 2: Bayerisches Amt für Waldgenetik, Teisendorf (AWG)
Teilvorhaben 3: Forstliche Versuchsanstalt Baden-Württemberg (FVA-BW)
Teilvorhaben 4: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (NW-FVA)
Teilvorhaben 5: Staatsbetrieb Sachsenforst, Graupa (SBS)
Teilvorhaben 6: Universität Göttingen Göttingen (UGoe)
Teilvorhaben 7: Humboldt-Universität zu Berlin (HUB)

Förderkennzeichen:

Teilvorhaben 1: 2219WK21A4
Teilvorhaben 2: 2219WK21B4
Teilvorhaben 3: 2219WK21C4
Teilvorhaben 4: 2219WK21D4
Teilvorhaben 5: 2219WK21E4
Teilvorhaben 6: 2219WK21F4
Teilvorhaben 7: 2219WK21G4

Projektlaufzeit:

01.07.2020 bis 31.05.2024

Monat der Erstellung:

05/2024

Veröffentlichung

14.11.2024

Waldklimafonds

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

SCHLUSSBERICHT[1]

I. Ziele

Seit dem Erstnachweis in Deutschland im Jahr 2002 hat sich das durch den Pilz Eschen-Stängelbecherchen (*Hymenoscyphus fraxineus*, Nebenfruchtform: *Chalara fraxinea*) verursachte Eschentriebsterben in ganz Deutschland sowie in weiten Teilen Europas flächendeckend ausgebreitet. Das Vorkommen der Gemeinen Esche im deutschen Wald geht kontinuierlich drastisch zurück. Neben dramatischen finanziellen Einbußen für Forstbetriebe aufgrund von Qualitäts-verschlechterungen des Holzes, Mortalität der Bäume und erhöhtem Aufwand für Kontrollen und Maßnahmen im Rahmen der Verkehrssicherungspflicht ist die forstliche Zukunft der Gemeinen Esche ungewiss, v.a. da Neuanpflanzungen nicht empfohlen werden.

Der Verlust der Esche aus der ohnehin beschränkten Palette einheimischer Waldbaumarten würde die künftige Risikostreuung in der Waldbewirtschaftung zusätzlich einschränken und wäre bei unvermindert grassierendem Verlauf zudem mit einem weitgehenden Verlust der auf die Esche spezialisierten Arten- und Lebensgemeinschaften verbunden.

Seit dem Auftreten des Eschentriebsterbens in Deutschland wird intensiv dazu geforscht. Dies erfolgt durch verschiedene Forschungseinrichtungen, z. T. verknüpft mit einem Erfahrungsaustausch auf europäischer Ebene. Als hinderlich stellt sich die Tatsache dar, dass die Forschungsanstrengungen in den einzelnen Bundesländern zwar auf der Verwendung ähnlicher Methoden, aber unterschiedlicher Skalen beruhen. Das erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sowie die Ableitung einheitlicher und gebündelter Handlungsempfehlungen. Die Notwendigkeit einer koordinierten Vorgangsweise zum Umgang mit dem Eschentriebsterben wurde einstimmig von Fachleuten in einem multidisziplinären, auf Anregung der der BLAG-FGR durchgeführten, Workshop aufgezeigt (Fussi et al. 2017). Dieser lieferte wertvolle Anregungen für die Entwicklung einer nationalen Strategie, wie sich Forstpraxis, Politik und Forschung gemeinsam und effektiv für die Esche einsetzen können.

Die Ziele des Verbundvorhabens orientieren sich an denen des Demonstrationsvorhabens FraxForFuture. Gesamtziel des Demonstrationsvorhabens ist ein abgestimmtes und koordiniertes Vorgehen gegenüber dem Eschentriebsterben unter Einbeziehung aller relevanten Fachdisziplinen. Basis des gemeinsamen Vorgehens werden über das gesamte Bundesgebiet verteilte Monitoringflächen unterschiedlicher Beobachtungsebenen sein. Repräsentativ verteilte Intensiv-Monitoringflächen werden als gemeinsame Arbeitsplattform für die beteiligten Institutionen unter Anwendung des gesamten Methodenkataloges mit standardisierten Verfahren dienen.

Auf diesen gemeinsamen Flächen werden augenscheinlich vitale Eschen ausgewählt. Die Auslese gesunder Plusbäume wird darüber hinaus auch in weiteren Gebieten mit hohem Befallsdruck durchgeführt. Die selektierten Bäume werden vegetativ vermehrt und in Klonsammlungen gesichert. Grundsätzlich werden alle in Deutschland erfassten Eschen unter Anwendung des zur Verfügung stehenden Methodenkatalogs mit standardisierten Verfahren phäno- und genotypisiert. Es werden Nachkommenschaftsprüfungen angelegt, um die genetischen Ursachen einer möglichen Resistenz zu ermitteln. Ebenfalls werden die molekular-genetischen Ursachen von Anfälligkeit und Resistenz untersucht. Ebenso werden Biomarker und Möglichkeiten der vegetativen Vermehrung durch Gewebekulturtechniken analysiert. Die erhaltenen, umfangreichen Informationen werden für die Entwicklung zielgerichteter molekular-genetischer Markersysteme verwendet.

1. Aufgabenstellung

Meilensteine (M) in den Arbeitspaketen (AP)		
Nr.	Name	Verantwortliche Partner
AP 1 Koordinierung der Verbundprojekts		
M 1.1	Auftaktveranstaltung	TI
M 1.2	Berichte fertigen	alle
M 1.3	Abschlussveranstaltung	TI
AP 2 Plusbaumauswahl und Phänotypisierung		
M 2.1	Plusbäume auswählen und registrieren	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
M 2.2	Plusbäume phänotypisieren	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
AP 3 Genotypisierung der Plusbäume		
M 3.1	Entwicklung einer standardisierten Methode für Genotypisierung	TI, AWG
M 3.2	Plusbäume genotypisieren	TI, AWG
M 3.3	Bewertung der Genotypisierung	TI, AWG
AP 4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Samenplantagen und Klonsammlungen		
M 4.1	Reiserernte	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
M 4.2	Pfropfarbeiten	TI, FVA, NW-FVA, SBS
M 4.3	Resistenztests Plusbäume	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
M 4.4	Beginn Anlage Samenplantagen	TI, AWG, FVA, NW-FVA, SBS
AP 5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfungen		
M 5.1	Saatguternte und Aussaat	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
M 5.2	Merkmalsaufnahmen in Baumschule	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
M 5.3	Beginn Anlage Nachkommenschaftsprüfungen	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
M 5.4	Vorläufige Bewertung der Plusbäume und ihrer Nachkommenschaften	TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA, SBS
AP 6 In-vitro-Vermehrung		
M 6.1	Vermehrung resistenter Unterlagen	TI, SBS
M 6.2	Vermehrung resistenter Genotypen (Altbäume)	HUB, SBS
M 6.3	Verfahren zur somatischen Embryogenese	HUB
M 6.4	Reaktivierung von Pflanzen aus der Kryokonservierung	NW-FVA
AP 7 Validierung und Anwendung von bekannten Resistenzmarkern		
M 7.1	Methodenetablierung bereits entwickelter Marker	AWG
M 7.2	Validierung der Marker	AWG
M 7.3	Untersuchung ausgewählter Bäume mit dem validierten Markerset	AWG

AP 8 Identifizierung von Resistenzmarkern mittels Transkiptomanalyse (Uni Göttingen)		
M 8.1	Sammlung und Aufbereitung Probenmaterial	U Goe
M 8.2	RNA-Extraktion, cDNA-Bibliotheken und Illumina Sequenzierung	U Goe
M 8.3	Identifizierung und Validierung von Kandidatengenen	U Goe
M 8.4	Identifizierung und Charakterisierung von diagnostischen SNPs	U Goe
AP 9 Genetische Architektur (Genomanalyse)		
M 9.1	Generierung von genomweit charakterisierten Vollgeschwisterfamilien	TI
M 9.2	Phänotypisierung der Jungpflanzen, QTL	TI
M 9.3	Entwicklung molekularer Marker	TI
AP10 Biomarker und Sekundärstoffwechsel		
M 10.1	Phenolscreening von Eschenklonen (Differenzchromatogramme)	HUB
M 10.2	Identifizierung von Phenolen als Resistenzmarker	HUB
M 10.3	Korrelation von Phänotyp und Genotyp zur Resistenzabschätzung	HUB, TI
AP11 Genetische Charakterisierung der Bestände des Intensivmonitorings (Core-Bestände) mit SNPs und Mikrosatelliten		
M 11.1	Sammlung des Pflanzenmaterials aus natürlichen Beständen und phänotypische Charakterisierung der beprobten Bäume aus der Naturverjüngung	FVA-BW
M 11.2	DNA Extraktion, PCR, Fragmentanalyse und Auswertung cp-DNA und nukleare Mikrosatelliten	FVA-BW
M 11.3	Anwendung adaptiver Marker nach Harper et al (2016), Genotyspisierung der Core-Bestände anhand neu entwickelten SNPs	FVA-BW
M 11.4	Empfehlungen für die Auswahl toleranter Herkünfte und toleranter Genotypen der Esche	FVA-BW
AP 12 Genetische Struktur von *Hymenoscyphus fraxineus* – Populationen		
M 12.1	Etablierung PCR-Multiplex-Assay Pilz	TI
M 12.2	Alleltabellen	TI

2. Stand der Technik

Das Eschentriebsterben wurde in Europa erstmalig 1992 in Polen und kurz darauf auch in Litauen, Lettland und Estland festgestellt. Sich über Osteuropa ausbreitend, erreichte der Pilz im Jahr 2002 Deutschland (Schumacher et al. 2007). Zeitgleich wurden erste Funde aus Schweden bekannt. Die Ausbreitung des Eschentriebsterbens setzte sich in den folgenden Jahren rasant über Tschechien, Dänemark (2004), Österreich (2005), Norwegen (2006), Ungarn, Slowenien (2007), Frankreich

(2008), Kroatien und Italien (2009) fort. Gegenwärtig sind mindestens 24 Länder in Europa und fast das gesamte Verbreitungsgebiet von Fraxinus excelsior L. von dem aggressiven Pilz betroffen (COST 2011).

Beobachtungen einzelner gesunder, nicht oder wenig geschädigter Eschen neben stark befallenen Bäumen in Waldbeständen, Samenplantagen und auf Versuchsflächen geben jedoch Anlass, von einer baumindividuellen, genetisch bedingten Resistenz auszugehen (Pliura et al. 2011, Kjær et al. 2012, Metzler et al. 2012, Enderle et al. 2013, NW-FVA 2013, McKinney et al. 2014). So konnten bei Untersuchungen an Pfropflingen in Samenplantagen in Dänemark (McKinney et al. 2011, 2014), Schweden (Stener 2013), Österreich (Kirisits und Freinschlag 2012, Freinschlag 2013) und Süddeutschland (Fussi et al. 2016) deutliche Unterschiede im Befall und Schädigungsgrad durch das Eschentriebsterben zwischen den Klonen beobachtet werden. Dass diese Unterschiede zu einem großen Teil genetisch bedingt sind, belegen die Ergebnisse der Auswertung von Nachkommenschaftsprüfungen in Dänemark (Kjaer et al. 2012, Lobo et al. 2014, McKinney et al. 2014) und Litauen (Pliura et al. 2011) sowie von Herkunftsversuchen aus Deutschland (Enderle et al. 2013). In diesen Untersuchungen konnte die genetische Bedingtheit der Resistenz teilweise quantifiziert werden. So lag die Heritabilität im engeren Sinne für den Befallsgrad in dänischen Nachkommenschaftsprüfungen zwischen 0,18 und 0,53 (Kjær et al. 2012, Lobo et al. 2014). Die aufgeführten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zumindest eine geringe Anzahl von Eschen-Genotypen eine ausreichend hohe Resistenz aufweist, um sich langfristig gegen das Eschentriebsterben behaupten zu können.

Eine partielle Resistenz und deren genetische Veranlagung können Grundlage für Erhaltungsmaßnahmen der Esche darstellen. Eine Maßnahme ist die In-situ-Erhaltung, welche in Form der Erhaltung und Förderung gesunder oder schwach geschädigter Bäume in sonst stark geschädigten Beständen erfolgen kann (Freinschlag 2013). Die spätere Verjüngung dieser Individuen kann dazu beitragen, den Anpassungsprozess der Eschenpopulationen an den Krankheitserreger zu unterstützen.

Eine Förderung und Beschleunigung des bereits begonnenen Selektionsprozesses kann durch Ex-situ-Maßnahmen in Form der Anlage von Samenplantagen unter Verwendung von Eschen mit nachgewiesener Resistenz erfolgen (Freinschlag 2013, McKinney et al. 2014, Stener 2013). Ein solcher Ansatz wird in Österreich mit dem Projekt „Esche in Not“ seit 2015 verfolgt (http://www.esche-in-not.at). Neben der Selektion und Pfropfung vitaler Alteschen mit erhöhter Resistenz werden auch Nachkommenschaftsprüfungen mit dem Saatgut dieser Bäume angelegt. Die Jungpflanzen werden bereits in der Baumschule einem hohen Infektionsdruck ausgesetzt. Ziel dabei ist es, den Erbwert bezogen auf die Krankheitsresistenz dieser Bäume zu bestimmen. Weiterhin sollen die überlebenden Bäume für Sämlingssamenplantagen genutzt werden.

Eine Untersuchung der genetischen Diversität der Esche hat Unterschiede zwischen süddeutsche Herkünfte gezeigt (Hebel et al 2006). Die gleiche Untersuchung hat Hinweise auf den Ursprung der Esche bezüglich ihrer Rückwanderung nach Mitteleuropa ergeben.

Untersuchungen zur genetischen Diversität der Gemeinen Esche in Süddeutschland und zu möglichen genetischen Unterschieden zwischen Bäumen mit unterschiedlicher Anfälligkeit gegenüber dem Eschentriebsterben mit Hilfe von Kern- und Chloroplasten-Mikrosatelliten kamen zu dem Ergebnis, dass es sowohl zwischen als auch innerhalb der untersuchten Bestände eine hohe genetische Variation gibt (Fussi und Konnert 2014). Für die Gruppe der Bäume mit geringer Krankheitsanfälligkeit wurde ein höherer Heterozygotiegrad festgestellt als bei den anfälligen Bäumen. Generell wurde innerhalb dieser Gruppe eine ausreichend hohe genetische Vielfalt als Grundlage für zukünftige Züchtungsaktivitäten nachgewiesen.

Die Klonidentifizierung mit Genmarkern bei Pflanzenmaterial, das vegetativ vermehrt wird, stellt eine wichtige Komponente in allen Züchtungsprojekten dar. Morphologische Merkmale reichen zur Unterscheidung von Klonen nicht aus und werden außerdem nicht nur vom Genotyp, sondern auch von Umweltfaktoren und vom Alter beeinflusst. Durch die Kombination von mehreren hochvariablen nuklearen Mikrosatellitenmarkern können hohe Aussagesicherheiten erreicht werden. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für die zufällige Identität von zwei Proben an den untersuchten Markern so gering sein muss, dass die Zugehörigkeit zu einem Klon als sicher gelten kann. Um das angemessen beurteilen zu können, muss zuvor die typische Größenordnung der Variationsparameter der entsprechenden Art bekannt sein. Für die Baumart Esche wurden solche Marker bereits vor längerer Zeit entwickelt (Brachet et al. 1999, Lefort et al. 1999) und in verschiedenen populationsgenetischen Studien eingesetzt (Höltken et al. 2003, Bacles et al. 2005, Gerard et al. 2006, Hebel et al. 2007, Bacles und Ennos 2008, Fussi und Konnert 2014). Neuere EST-Marker ergänzen dies (Gérard et al. 2013).

Bereits seit den 1980er Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Entwicklung von Gewebekultur-Methoden bei verschiedenen Eschen-Arten, meist mit juvenilem Sämlingsmaterial (Tonon et al. 2001, Du und Pijut 2008, Palla und Pijut 2011). In den Fällen, wo mit adultem Ausgangsmaterial gearbeitet wurde (Hammatt 1996, Schoenweiss und Meier-Dinkel 2005, Douglas und Pliura 2013), kamen die Autoren übereinstimmend zu der Schlussfolgerung, dass die Bewurzlungskompetenz bei adultem Material nach einer wiederholten Subkultivierung in vitro durch eine dann erreichte partielle Rejuvenilisierung gesteigert wird. Darüber hinaus weisen viele Bearbeiter immer wieder auf die Genotyp-Abhängigkeit der In-vitro-Vermehrbarkeit hin („TCA- tissue culture ability“).

Die Erforschung der genetischen Architektur von Pflanzen mit Hilfe genetischer Marker begann in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts (Tanksley 1993). Durch die Erstellung genetischer Karten, also die sequentielle Anordnung genetischer Marker entlang von Chromosomen, konnten sogenannte quantitative Eigenschaftsorte (Quantitative Trait Loci = QTL) identifiziert und deren Einfluss auf das untersuchte Merkmal bestimmt werden (Koornneef et al. 2004). Es zeigte sich relativ schnell, dass einige Merkmale durch eine begrenzte Anzahl an QTL mit großem Effekt bedingt werden, während sich andere Eigenschaften durch eine sehr komplexe genetische Architektur auszeichnen (Buckler et al. 2009).

Seit einer bedeutenden Machbarkeitsstudie haben auch in der quantitativen Pflanzengenetik genomweite Assoziationsstudien (GWAS) in natürlichen Populationen immer mehr an Bedeutung gewonnen (Atwell et al. 2010). Eine solche GWAS wurde auch zur Untersuchung der genetischen Grundlagen der Variation des Eschentriebsterbens durchgeführt. Hierfür wurden die Transkriptome von 182 dänischen Eschen sequenziert (Harper et al. 2016). Durch die Assoziation der Expression und der Sequenz aller exprimierten Gene wurden mehrere potentielle molekulare Marker identifiziert (Harper et al. 2016; Sollars et al. 2017). Allerdings scheinen diese Marker nur begrenzt einsetzbar zu sein, da die Ergebnisse in Folgeuntersuchungen nicht bestätigt werden konnten (Enderle et al. 2017). Dies könnte an der relativ geringen statistischen Teststärke der ursprünglichen Untersuchung liegen oder an der verhältnismäßig geringen Aussagekraft der einzelnen Marker. Für eine verlässliche Aufklärung komplexer Merkmale mittels GWAS wird eine sehr große Anzahl von Individuen benötigt (Altshuler et al. 2008; Weissbrod et al. 2018).

Ein alternativer Ansatz zur Aufklärung der genetischen Architektur, der sich besonders mit Pflanzen gut durchführen lässt, ist die Analyse von Nachkommenschaften aus Kreuzungen genetisch definierter Eltern, also die ‚klassische‘ QTL-Analyse. Dieser Ansatz zeichnet sich durch eine sehr hohe statistische Teststärke aus (Brachi et al. 2010) und die Anzahl der benötigten Individuen ist um ein Vielfaches geringer als bei einer GWAS (Hall et al. 2016). Aufgrund der Segregation von Chromosomenabschnitten in Blöcken ist außerdem die Genotypisierung deutlich vereinfacht. Durch

den Einsatz moderner molekularbiologischer Methoden können Vollgeschwister-Populationen aus den Nachkommen offen abgeblühter Einzelbäume herausgefiltert werden, wodurch der Aufwand von gelenkten Kreuzungen entfällt (El-Kassaby et al. 2011). Dies ist besonders bei Bäumen von Bedeutung, da sich wegen ihrer Größe und teilweise auch ihrer Blütenbiologie schwer kreuzen lassen.

Während die Identifizierung der kausalen Genvarianten, welche einem QTL zugrunde liegen, lange Zeit sehr aufwendig war, kann die Integration von zusätzlichen genomischen Datensätzen die Suche erheblich erleichtern (Jimenez-Gomez et al. 2010; Müller et al. 2016; Müller et al. 2018). Auch für die Esche sind inzwischen vielfältige genomische Ressourcen vorhanden: ein qualitativ hochwertiges Referenzgenom, Re-sequenzierungsdaten verschiedener natürlicher Akzessionen und umfangreiche Transkriptomdaten stehen online zur Verfügung (Sollars et al. 2017). Mit weiteren Daten kann in naher Zukunft gerechnet werden, wie der OpenAshDieBack Website (http://oadb.tsl.ac.uk/) zu entnehmen ist.

Arten sowie Klone von Pflanzen weisen qualitative sowie quantitative Unterschiede in ihrem sekundären Pflanzeninhaltsstoffprofil auf. So konnte z. B. für die Gattung Salix gezeigt werden, dass sich die Profile an phenolischen Verbindungen, insbesondere Salicylaten, stark unterscheiden (Förster 2010). Im Laufe der Evolution haben sich die Pflanzen insbesondere mit sekundären Inhaltsstoffen gegen mikrobielle, pflanzliche und tierische Konkurrenten behaupten können. Phenolischen Inhaltsstoffen wird so z. B. eine fungizide Wirkung zugesprochen (z. B. potentiell fungizide Wirkung phenolischer Extrakte von *Salix caprea*, Julkunen-Tiitto 1992; Gebhardt 1992). Eine unterschiedliche Rostpilzanfälligkeit von Weidenklonen wurde daher auf ein unterschiedliches Profil an phenolischen Verbindungen in der Pflanze zurückgeführt. So stellte sich heraus, dass Pflanzenphenole aus der Gruppe der Flavanoide und der Phenol-Carbonsäuren besonders geeignet waren, um z. B. Bläuepilze zu bekämpfen (Blaeser et al. 2002; Kunz et al. 1995; Wegen et al. 1998). Auch für F. excelsior wurde bereits nachgewiesen, dass das Holz des Baumes phenolische Verbindungen wie Phenolsäuren oder Oleuropein, welche verantwortlich für einen bitteren und scharfen Geschmack ist, aufweist. Es ist daher anzunehmen, dass die Krankheitsanfälligkeit von Eschen gegenüber H. fraxineus durch die Analyse des sekundären Inhaltstoffprofils vorhergesagt werden kann. Mögliche relevante Sekundärmetabolite für die Pilzabwehr werden identifiziert.

Literatur

- Altshuler D, Daly M, Lander ES (2008) Genetic mapping in human disease. Science 322: 881-888.
- Atwell S *et al.* (2010) Genome-wide association study of 107 phenotypes in Arabidopsis thaliana inbred lines. Nature 465: 627-631.
- Bacles CFE, Burczyk J, Lowe AJ, Ennos RA (2005) Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. Evolution 59: 979-990.
- Bacles CFE, Ennos RA (2008) Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. Heredity 101: 368-380.
- Blaeser P, Steiner U, Dehne H-W (2002) Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung. Landwirtsch. Fak. d. Uni. Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL 97.
- Brachet S, Jubier MF, Richard M, Jung-Muller B, Frascaria-Lacoste N (1999) Rapid detection of microsatellite loci in the common ash *Fraxinus excelsior* using 5' anchored PCR. Mol Ecol 8: 160-163.

- Brachi B, Faure N, Horton M, Flahauw E, Vazquez A, Nordborg M, Bergelson J, Cuguen J, Roux F. (2010) Linkage and Association Mapping of Arabidopsis thaliana Flowering Time in Nature. *PLOS Genetics* 6, e1000940.
- Buckler ES *et al.* (2009) The genetic architecture of maize flowering time. Science 325: 714-718.
- COST (European Cooperation in Science and Technology) (2011) Memorandum of Understanding for the implementation of a European Concerted Research Action designated as COST Action FP1103: *Fraxinus* dieback in Europe: elaborating guidelines and strategies for sustainable management (Fraxback) http://w3.cost.eu/fileadmin/domain_files/FPS/Action_FP1103/mou/FP1103-e.pdf
- Douglas GC, Pliura A (2013) Common ash (*Fraxinus excelsior* L.) - Vegetative propagation and cryopreservation. In: Pâques LE (ed.) Forest Tree Breeding in Europe. Springer, 450-462.
- Du N, Pijut P (2008) Regeneration of plants from *Fraxinus pennsylvanica* hypocotyls and cotyledons. Scientia Horticulturae 118: 74-79.
- El-Kassaby YA, Cappa EP, Liewlaksaneeyanawin C, Klapste J, Lstiburek M (2011) Breeding without breeding: is a complete pedigree necessary for efficient breeding? *PLoS One* 6, e25737.
- Enderle R, Peters F, Nakou A, Metzler B (2013) Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. European Journal of Forest Research 132: 865–876.
- Enderle R, Dounavi A, Karopka M, Kleinschmit J, Metzler B (2017) Untersuchungen zu genetischen Grundlagen der Resistenz gegenüber dem Eschentriebsterben in Südwestdeutschland. In: *Workshop "Strategien zur Erhaltung forstlicher Genressourcen bei Esche angesichts des Eschentriebsterbens"* Teisendorf.
- Förster N (2010) Eignung unterschiedlicher salicylathaltiger *Salix*-Klone für die Arzneimittelindustrie. Berliner ökophysiologische und phytomedizinische Schriften, Band 7, Der Andere Verlag, Tönning, Lübeck und Marburg.
- Freinschlag C (2013) Untersuchungen zum Eschentriebsterben in Eschen-Samenplantagen in Österreich. Masterarbeit, Universität für Bodenkultur Wien.
- Fussi B, Konnert M (2014) Genetic analysis of European common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations affected by ash dieback. Silvae Genetica 63: 198-212.
- Fussi B, Enderle R, Karopka M, Zollner A, Baier R, Konnert M. 2016. Ansätze zur Resistenzzüchtung gegenüber dem Eschentriebsterben. AFZ/DerWald 8: 16-21.
- Gebhardt K (1992) Grundlagen und Methoden der Züchtung pharmazeutisch wertvoller Weiden. Die Holzzucht 46(1-4): 9-14.
- Gerard PR, Fernandez-Manjarres JF, Frascaria-Lacoste N (2006) Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. Mol Ecol 15: 3655-3667.
- Gérard PR, Temunović M, Sannier J, Bertolino P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N, Fernández-Manjarrés JF (2013) Chilled but not frosty: understanding the role of climate in the hybridization between the Mediterranean *Fraxinus angustifolia* Vahl and the temperate *Fraxinus excelsior* L. (Oleaceae) ash trees. Journal of Biogeography 40: 835-846.
- Hall D, Hallingbäck HR, Wu, HX (2016) Estimation of number and size of QTL effects in forest tree traits. Tree Genetics & Genomes 12: 110.
- Hammat N (1996) *Fraxinus excelsior* L. (Common Ash) in: Bajaj YPS. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 35, Trees IV, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 172-193.

- Harper AL *et al.* (2016) Molecular markers for tolerance of European ash (Fraxinus excelsior) to dieback disease identified using Associative Transcriptomics. Sci Rep 6, 19335.
- Hebel I, Haas R, Dounavi A. (2006) Genetic variation of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations from provenance regions in southern Germany by using nuclear and chloroplast microsatellites. Silvae Genetica 55(1): 38-44.
- Hebel I, Aldinger E, Haas R, Karopka M, Bogenrieder A, Dounavi A (2007) Untersuchungen zur Pollenverbreitung und Pollenkontamination in einer Eschen-Samenplantage (*Fraxinus excelsior* L.). Allgemeine Forst- u. Jagdzeitung 178: 44-49.
- Höltken AM, Tähtinen J, Pappinen A (2003) Effects of Disconinuous Marginal Habitats on the Genetic Structure of Common Ash (*Fraxinus excelsior* L.). Silvae Genetica 52: 206-212.
- Jimenez-Gomez JM, Wallace AD, Maloof JN (2010) Network analysis identifies ELF3 as a QTL for the shade avoidance response in Arabidopsis. PLoS Genet 6, e1001100.
- Julkunen-Titto R (1992) Analyse und Verteilung phenolischer Glycoside (Salicinderivate). In: Weiden (*Salicaceae*), Die Holzzucht 46(1-4): 2-5.
- Kirisits T, Freinschlag C (2012) Ash dieback caused by Hymenoscyphus pseudoalbidus in a seed plantation of Fraxinus exelsior in Austria. Journal of Agricultural Extension and Rural Development 4: 184-191.
- Kjaer E, McKinney L V, Nielsen L, Hanse L., Hansen J (2012) Adaptive potential of ash (*Fraxinus excelsior*) populations against the novel emerging *pathogen Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Evolutionary Applications 5: 219–228.
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D (2004) Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. Annu Rev Plant Biol 55: 141-172.
- Kunz B, Weidenbörner M, Adams S, Strohmeyer M, Wüstenhöfer B, Wegen HW (1995) Chancen und Möglichkeiten der Entwicklung umweltschonender Holzschutzmittel. Proc. der 20. Holzschutztagung der DGfH.
- Lefort F, Brachet S, Frascaria-Lacoste N, Edwards KJ, Douglas GC (1999) Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). Mol Ecol 8: 1088-1089.
- Lobo A, Hansen JK, McKinney LV, Nielsen LR, Kjær ED (2014) Genetic variation in dieback resistance: growth and survival of *Fraxinus excelsior* under the influence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Scandinavian Journal of Forest Research 29: 519-526.
- McKinney LV, Nielsen LR, Hansen JK, Kjaer ED (2011): Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (*Oleracea*) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. Heredity 108: 788-797.
- McKinney LV, Nielsen LR, Collinge DB, Thomsen IM, Hansen JK, Kjaer ED (2014) The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long term solution. Plant Pathology 63: 485-499.
- Metzler B, Enderle R, Karopka M, Töpfner K, Aldinger E (2012) Entwicklung des Eschentriebsterbens in einem Herkunftsversuch an verschiedenen Standorten in Süddeutschland. Allgemeine Forst- und Jagdzeitung 183: 168–179.
- Müller NA *et al.* (2016) Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. Nat Genet 48: 89-93.
- Müller NA, Zhang L, Koornneef M, Jimenez-Gomez JM (2018) Mutations in EID1 and LNK2 caused light-conditional clock deceleration during tomato domestication. Proc Natl Acad Sci USA, 115: 7135-7140.
- NW-FVA (Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt) (2013): Eschentriebsterben. Praxis-Information Nr.4 – April 2013.

- Palla KJ, Pijut PM (2011) Regeneration of plants from *Fraxinus americana* hypocotyls and cotyledons. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 47: 250-256.
- Pliura A, Lygis V, Suchockas V, Bartkevičius, E (2011) Performance of twenty four European *Fraxinus excelsior* populations in three Lithuanian progeny trials with a special emphasis on resistance to *Chalara fraxinea*. Baltic Forestry 17: 17–34.
- Schoenweiss K, Meier-Dinkel A (2005) In vitro propagation of selected mature trees and juvenile embryo-derived cultures of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Propagation of Ornamental Plants 5: 137-145.
- Schumacher J, Wulf A, Leonhard S (2007) Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eschen. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst 59: 121-123.
- Sollars ES *et al.* (2017) Genome sequence and genetic diversity of European ash trees. Nature 541: 212-216.
- Stener LG (2013) Clonal differences in susceptibility to the dieback of *Fraxinus excelsior* in southern Sweden. Scandinavian Journal of Forest Research 28: 205–216.
- Tanksley, SD (1993) Mapping polygenes. Annu Rev Genet, 27: 205-233.
- Tonon G, Capuana M, Di Marco A (2001) Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by in vitro shoot organogenesis. Scientia Horticulturae 87: 291-301.
- Wegen HW, Hiller JC, Höllbach G, Grohs B-M, Kunz B (1998) Entwicklung von biologischen Holzschutzmitteln auf der Basis von Pflanzeninhaltsstoffen, Proc. der 21. Holzschutztagung der DGfH.
- Weissbrod O, Rothschild D, Barkan E, Segal E (2018) Host genetics and microbiome associations from the lens of genome wide association studies. PeerJ Preprints: 6, e26615v26611.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Am Verbundprojekt sind Arbeitsgruppen aus sieben Institutionen beteiligt. Es wurden 12 Arbeitspakete bearbeitet. Die Koordinierung des Verbunds (AP 1) übernimmt das Thünen-Institut.

Zu den Arbeitspaketen 2, 4 und 5 trugen die Partner Thünen, AWG, FVA-BW, NW-FVA und SBS mit verschiedenen Anteilen bei. Alle fünf Partner haben in Ihrem Verantwortungsbereich vitale Plusbäume ausgelesen, Pfropfreiser gewonnen, die Pfropfarbeiten durchgeführt und ggf. eine Klonsammlung angelegt. Die Pfropfungen der bayerischen Bäume übernahm die FVA. Weiterhin haben diese fünf Partner von den von ihnen ausgelesenen Bäumen soweit möglich Saatgut geerntet, Pflanzen angezogen. Dem Verbund FraxPath wurden akklimatisierte Pflanzen aus der In vitro-Kultur für entsprechende Untersuchungen z.B. Virulenztests oder Infektionsversuche zur Verfügung gestellt.

Die Genotypisierung aller ausgewählten Plusbäume (AP 3) wurde vom AWG und dem Thünen-Institut durchgeführt.

Mit der In-vitro-Vermehrung (AP 6) beschäftigten sich die HUB, SBS, die NW-FVA und das Thünen-Institut. Die Humboldt-Universität hat die Verfahren zur Meristemkultur und somatischen Embryogenese der Esche weiterentwickeln und optimiert, um eine weitere Möglichkeit der Vermehrung von Eschen mit erhöhter Resistenz zu schaffen. Die Baumschulen Oberdorla hat als Unterauftragnehmer von SBS ausgewählte Eschenklone vermehren. Im Thünen-Institut wurden bereits in Kultur befindliche Klonlinien mit erhöhter Resistenz als Unterlagen für die Pfropfarbeiten weiter vermehrt. Zusätzlich wurden einige hoch anfällige Klone als Positivkontrollen anderen Partnern zur Verfügung gestellt. Die NW-FVA hat kryokonservierte Genotypen aus der Zeit vor dem

Eschentriebsterben wieder in die Vermehrung genommen sowie resistente Plusbäume als zusätzliche Sicherung neben der Pfropfung neu in die Meristemkultur etablieren.

In einem eigenen Arbeitspaket (AP 7) wurden vom AWG bereits aus der Literatur bekannte Resistenzmarker auf ihre Verwendbarkeit für die Selektion in Süddeutschland getestet.

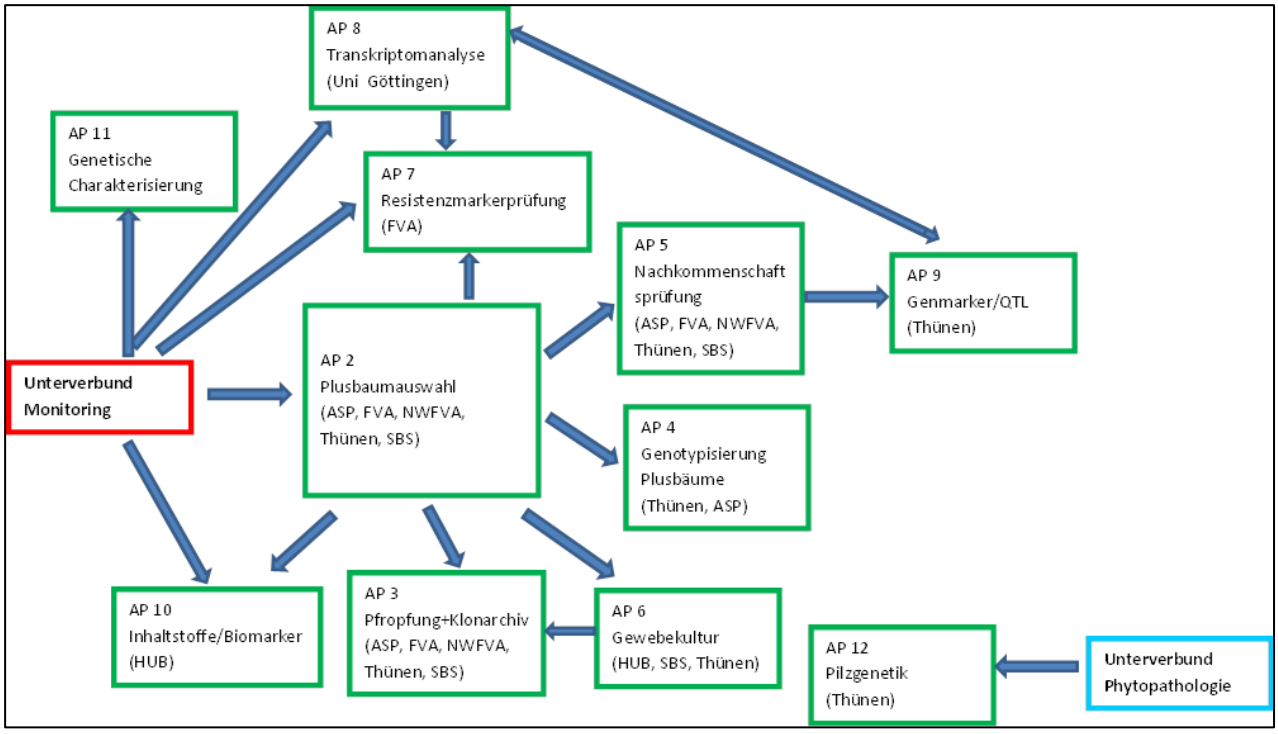
In den Arbeitspaketen 8 und 9 wurden mit zwei verschiedenen Ansätzen (Transkriptom- und Genomanalyse) potentielle Resistenzmarker detektiert. Für eine Assoziationsstudie werden hierfür die Bestände des Intensivmonitorings des Unterverbunds Monitoring genutzt. Der zweite Ansatz baute auf Nachkommenschaften auf, die bereits im Projekt ResEsche erzeugt worden sind. Diese Nachkommenschaften bildete die Grundlage für die Identifizierung von mit der Anfälligkeit gegenüber dem Eschentriebsterben verbundenen QTL.

Im Arbeitspaket 10 wurde durch die Humboldt-Universität zu Berlin untersucht, inwieweit sich die Profile an Phenolen von anfälligen und toleranten/resistenten Eschenklonen qualitativ und quantitativ unterscheiden. Weiterhin wurden Analysen zur Akkumulation sekundärer Inhaltsstoffe nach dem Befall des Baumes mit *H. fraxineus* durchgeführt. Auch wurde ein Teilkollektiv der Plusbäume mit erhöhter Resistenz mit einem physiologischen Biomarkerset (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Makroelemente etc.) durch das LFE untersucht (Kostenplanung im Unterverbund Monitoring). Die Ergebnisse zu den unterschiedlichen Phenolprofilen in verschiedenen Eschenklonen wurden mit diesen Befunden sowie auch mit genetischen Resistenzmarkern korreliert.

Das Arbeitspaket 11 beschäftigte sich mit der genetischen Analyse der Bestände des Intensivmonitorings und stellt somit eine wichtige Schnittstelle zum Verbund FraxMon dar.

Eng verzahnt mit dem Verbund FraxPath war das Arbeitspaket 12. Hier untersuchte das Thünen-Institut *Hymenoscyphus fraxineus*-Stämme mittels molekular-genetische1 Methoden.

Unabhängig von den Arbeitspaketen im Verbund FraxGen war SBS im Verbund FraxMon an der Auswahl, Einrichtung und Betreuung von bis zu 2 Monitoringflächen sowie an der Erhebung und Bereitstellung von erforderlichen Daten nach Vorgabe durch den Koordinator unmittelbar beteiligt.



Schema der Vernetzung zwischen den Arbeitspaketen und mit den anderen Verbünden des Demonstrationsvorhabens FraxForFuture

Für die Realisierung des Projekts wurden auch bestehende internationale Kontakte und Kooperationen genutzt. Sowohl die Uni Göttingen als auch das Thünen-Institut hatten bereits Kontakte zu internationalen Arbeitsgruppen. Von Seiten der Uni Göttingen besteht eine lange vertrauensvolle Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern aus Österreich (Prof. Dr. Thomas Geburek, Bundesforschungszentrum für Wald, Institut für Waldgenetik, Wien) und Dänemark (Prof. Dr. Erik Dahl Kjaer, Department of Geosciences and Natural Resource Management, University of Copenhagen).

Das Thünen-Institut für Forstgenetik hat Kontakte zu Dr. Lene Rostgaard-Nielsen (Department of Geosciences and Natural Resource Management, University of Copenhagen, Denmark), die eine GWAS auf Basis des European Diversity Panels durchführt. Es wurde vereinbart, Forschungsergebnisse auszutauschen. Weiter bestehen Kontakte zu Dr. Richard Buggs (Kew Botanical Garden). So nahm ein Mitarbeiter des Instituts an einem Workshop zu Ash Genomics, der von Dr. Buggs ausgerichtet wurde.

Das AWG ist mit einer Klonfläche an der dänischen GWAS Studie (Dr. Lene Rostgaard-Nielsen, Department of Geosciences and Natural Resource Management, University of Copenhagen) beteiligt. Die daraus entwickelten SNP Marker werden im Arbeitspaket 7 angewandt.

Die Abteilung Waldgenressourcen der NW-FVA hat internationale Kontakte zu verschiedenen Organisationen. Zu den Partner des o.g. Forschungsprojekt (EU, Improving Ash producitivity – RAP) bestehen nach wie vor Kontakte (Dr. Gerry Douglas, Irland)

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

AP 1 Koordinierung des Unterverbunds Genetik/Züchtung

Im Arbeitspaket 1 wurden die Arbeiten im Verbund FraxGen koordiniert. Wichtige Instrumente dafür waren die Initiierung, Organisation und Durchführung von Treffen und Besprechungen im Verbund (Tabelle 1 und Tabelle 2). Weiterhin nahm die Verbundleitung an allen Verbundleiterbesprechungen teil, die von FraxConnect organisiert wurden.

Tabelle 1 Onlinetreffen

Datum	Thema	Ergebnis
13.01.2021	FraxGen - Plusbaumkriterien	Liste der Plusbaumkriterien für die Bonitur (Tabelle 3)
18.02.2021	FraxGen – Resistenztest-Abstimmung	Austausch von Methodenprotokollen
29.04.2021	FraxGen – Verbundtreffen 2	Protokoll
23.09.2021	FraxGen – Verbundtreffen 3 Planungstreffen FraxForFuture-Tagung	Protokoll
05.11.2021	FraxForFuture Tagung: Unterverbund FraxGen	Vorträge
01.12.2021	FraxGen – Verbundtreffen 4	Protokoll
14.12.2021	FraxGen Design von Klon- und Sämlingssamenplantagen	Protokoll
20.01.2022	FraxGen - Veredlungsworkshop	Methodenaustausch
18.02.2022	FraxGen trifft Esche in Not (Österreich)	Methodenaustausch, Datenverknüpfung, Austausch von Pflanzen
24.02.2022	FraxForFuture -Datenbankplanung FraxGen	Methodenaustausch
29.04.2022	FraxGen - Unterverbundbesprechung	Methodenaustausch
13.05.2022	FraxForFuture - Abgleich Boniturauswertung	Methodenaustausch
17.08.2022	FraxGen - Saatgutbesprechung	Methodenaustausch/Planung
19.10.2022	FraxGen - Unterverbundbesprechung	Protokoll
09.11.2022	FraxForFuture Vortragsreihe - FraxGen	Vorträge
17.11.2022	FraxGen - Kernaussagen FraxForFuture	Planung
19.01.2023	FraxGen - Kernaussagen FraxForFuture	
20.01.2023	*Datenbank*	
10.03.2023	Aufstockungsanträge?	

16.02.2023	Datenbank	
19.09.2023	Aufstockungsplanung?	
18.12.2023	Treffen wegen Folgeantrag	

Tabelle 2 Präsenztreffen

Datum	Thema	Ergebnis
05 – 06.07.2021	FraxGen-Arbeitstreffen zum Sommerboniturverfahren an der NW-FVA in Hann. Münden	Schulung der TeilnehmerInnen
16. – 17.11.2021	FraxGen-Arbeitstreffen zum Winterboniturverfahren an der NW-FVA in Göttingen	Schulung der TeilnehmerInnen
17.+18.05.2022	FraxForFuture – Verbundtagung in Kassel	Protokoll, Austausch
10.06.2022	FraxGen – InVitro Treffen an der HU Berlin	Methodenaustausch
10. – 11.01.2023	Projekttreffen für Aufstockung an der NW-FVA Göttingen	Protokoll
26. – 27.09.2023	Projekttreffen und Tagung in Göttingen	Tagungsband und Protokoll

AP 2 Plusbaumauswahl und Phänotypisierung

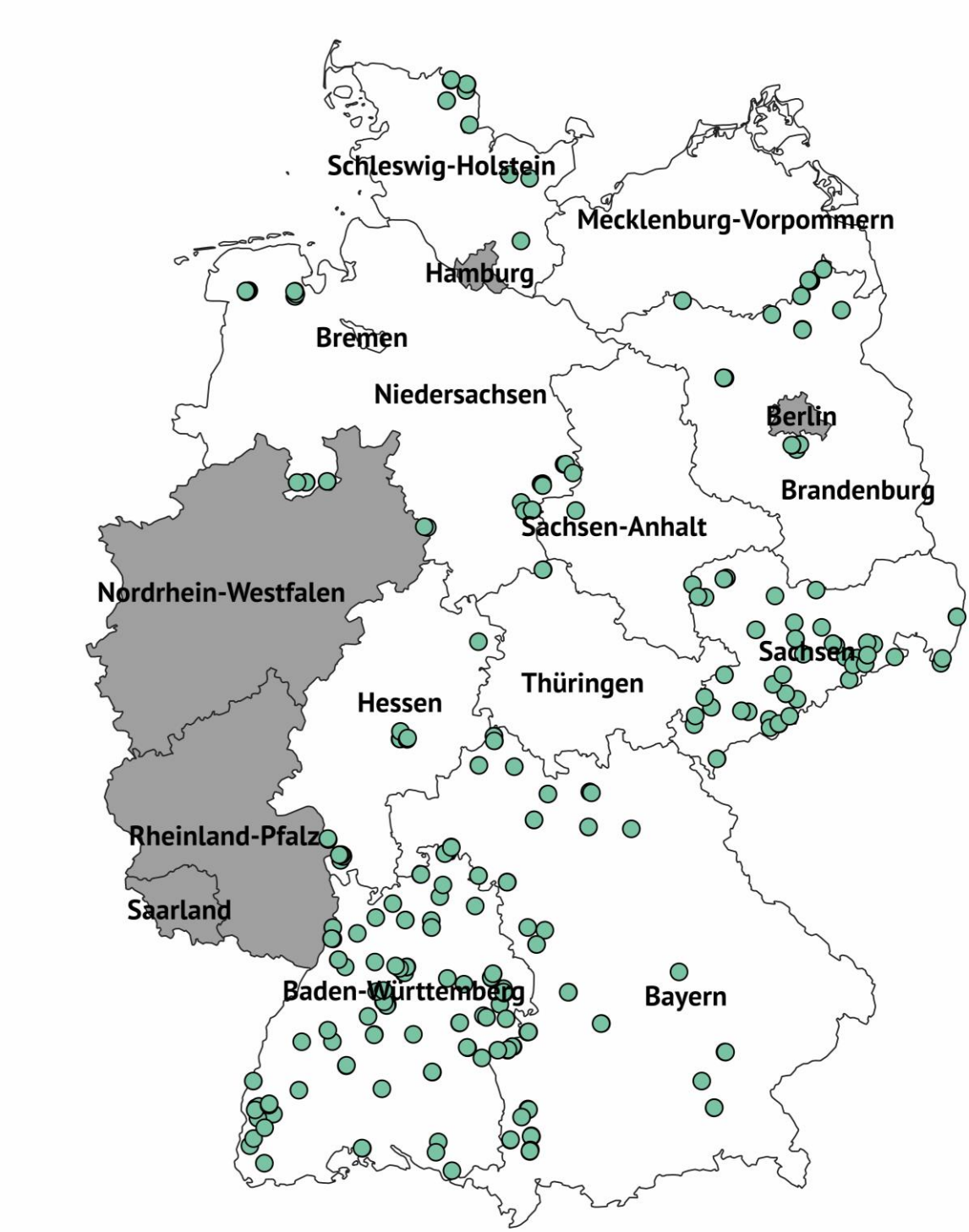


Abbildung 1: Plusbaumverteilung in Deutschland

Die Auswahl der Plusbäume auf der Basis des FraxForFuture Boniturschlüssels (Peters et al. 2021) und verbundintern festgelegter Qualitätskriterien wurde im Jahr 2022 abgeschlossen. Der Fokus bei der Selektion wurde auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Eschentriebsterben gelegt, welche anhand des Boniturschlüssels maßgeblich anhand des Kronenzustands, eines gesunden Stammfußes sowie weiterer Kriterien (u.a. Insektenbefall), einheitlich beurteilt werden konnte. Darüber hinaus wurden Kriterien, die für die qualitative forstliche Eignung aussagekräftig sind, berücksichtigt und erhoben. Bundesweit wurden final aus allen einheitlich erfassten Plusbaumkandidaten 643 Plusbäume selektiert und für Infektionstests zur Verfügung gestellt (Abbildung 1).

Das angestrebte Ziel war es, ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis unter den Plusbäumen zu erzielen, da die Anlage von Samenplantagen dies erfordert. Die Geschlechtsbestimmung der ausgewählten Bäume konnte aufgrund von ausbleibender Fruktifikation im Projektzeitraum meistens nicht eindeutig zum Zeitpunkt der Auswahl erfolgen. Die Daten wurden fortlaufend innerhalb der Projektlaufzeit ergänzt. Einzelbeobachtungen zeigen, dass vorwiegend weibliche und damit fruchttragende Bäume, aber auch stark männlich blühende Bäume, stärkere Vitalitätseinbußen zeigen. In der Folge scheint die Vitalität über die Zeit je nach Ausprägung der Fruktifikation stark zu schwanken. Fruchttragende Bäumen scheinen darüber hinaus insgesamt weniger wüchsig und qualitativ hochwertig zu sein, weshalb die Selektion dahingehend angepasst werden musste. Sowohl in Bezug auf die Vitalität als auch bei der Qualität wurden bei fruchttragenden Bäumen Abweichungen von den vereinbarten Kriterien toleriert um den Anteil an vorwiegend weiblichen Plusbäumen zu erhöhen.

2023 wurde in allen Teilvorhaben eine koordinierte Phänotypisierung aller erfasster Plusbäume im belaubten Zustand durchgeführt. Hierbei wurde die Stabilität der Vitalitätsmerkmale im Vergleich zu den bei der Plusbaumauswahl erhobenen Daten geprüft. Außerdem wurden Informationen über das Geschlecht der Bäume ergänzt, sofern dies noch nicht bekannt war. Die Vitalitätsbeurteilung zeigte sich über den Boniturzeitraum weitgehend konstant. Eine gleichbleibende Vitalitätsbeurteilung konnte an den Plusbäumen der FVA-BW in 85%, am AWG in über 70%, TI über 85% und an der NW-FVA in über 75% festgestellt werden. Somit konnte die erstmalige Auswahl anhand der ausgewählten Selektionskriterien in den meisten Fällen bestätigt werden.

In wenigen Fällen sind Plusbäume im Projektzeitraum ausgefallen und wurden aus der Auswahl entfernt. Hauptsächlich führten Windwurf oder ein Absterben innerhalb von zwei Jahren zum Ausschluss. Fällungen aufgrund anderer Gründe dagegen wurden nicht als Ausschlussgrund angesehen.

Tabelle 3 Übersicht zu selektierten Plusbäumen und anteilige Fruchttragende und Ausfälle

Teilvorhaben	Selektierte Plusbäume zum Projektende 2024	Davon fruchttragend	Ausfall
TI	79	19	0
AWG	113	14	0
FVA	197	41	0
NW-FVA	194	44	11
SBS	60	7	
Summe	**643**	**133**	**11**

AP 3 Genotypisierung der Plusbäume

Zur Vereinheitlichung der Genotypisierung in den Laboren des Thünen Instituts (TI), des Bayerischen Amt für Waldgenetik (AWG), der Forstlichen Versuchsanstalt Baden-Württemberg (FVA-BW) und der Universität Göttingen (GÖ) wurden 50 Kernmikrosatellitenmarker auf ihre Eignung in den einzelnen Laboren und die Vergleichbarkeit über die Labore hinweg überprüft. Zusätzlich wurde die Methode durch die Verwendung der gleichen Multiplex Kits und Farbstoffe angeglichen.

Der Vergleich der Marker zwischen den Laboren zeigte für alle Marker eine Verschiebung der Allellängen. Diese Verschiebungen waren für einige Marker konstant. Die Vergleichbarkeit dieser Marker zwischen den Laboren ist bei Kenntnis der Verschiebung gewährleistet. Andere Marker zeigten inhomogene Verschiebungen. Diese Inhomogenität könnte zum einen an modifizierten Primersequenzen oder an unterschiedlichen Herangehensweisen bei der Auswertung von nicht eindeutigen Elektrogrammen, aus denen die Allellängen abgelesen werden, liegen.

Schlussendlich konnten 12 Marker (F27, F30, Frex02, Frex06, Frex10, F6, F21, Fem11, Fem4, Fem19, FR308, ASH2429) ausgewählt und in drei Multiplex-Sets zusammengefasst werden (Tabelle 4). Diese wurden bei der Genotypisierung der Plusbäume verwendet.

Tabelle 4 Informationen zu verwendeten Markern und Multiplexsets.

Multiplex-Sets	**Name Marker**	**Locus**	**Literatur**
1	F27	Contig5418_11372_11513	Sollars et al., 2017
1	F30	Contig344_81629_81375	Sollars et al. 2017
1	Fex02	Contig1795_237744_237898	Sollars et al. 2017
1	Frex06	Contig3809_118941_119122	Sollars et al. 2017
1	Frex10	Contig87_333704_333466	Sollars et al. 2017
2	F6	M230B	Beatty et al. 2015
2	F21	Fp18437	Noakes et al. 2014
2	Fem4	Femsatl 4	Lefort et al., 1999
2	Fem11	Femsatl 11	Lefort et al. 1999
3	ASH2429	ASH2429	Bai et al. 2011
3	Fem19	Femsatl19	Lefort et al. 1999
3	FR308	FRESTSSR308	Aggarwal et al. 2011

Vom TI wurden 270 Plusbäume (79 Plusbaumgenotypen des TI, 191 Plusbaumgenotypen der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (NW-FVA)) und vom AWG 384 Plusbäume (195 der FVA-BW, 82 des Staatsbetrieb Sachsenforst (SBS) und 107 des AWG) genotypisiert (Abbildung 2). Für die DNA-Extraktion verwendete das TI eine Methode nach Brügmann et al (2022) und das AWG eine abgewandelte Methode nach Lefort und Douglas (1999).

Insgesamt wurden drei bis 49 Allele pro Locus und Plusbaumkollektiv bzw. Population gefunden. Die mittlere Anzahl von 14,5 bis 22,1 Allelen pro Locus und Plusbaumkollektiv bzw. Population deutet auf ausreichend polymorphe Kernmikrosatelliten hin, um eindeutige Genotypen der Plusbäume zu erstellen und aussagekräftige Vergleiche zwischen den Plusbaumkollektiven bzw. Populationen ziehen zu können. Die Anzahl effektiver Allele ist deutlich geringer, da an den meisten

Loci wenige häufige und viele seltene Allele vorkommen. Die beobachtete Heterozygotie liegt zwischen 0,66 und 0,70. Trotz deutlich unterschiedlicher Anzahl von Bäumen ist die allelische Vielfalt (Anzahl der Allele gewichtet nach der Anzahl der Bäume) der Plusbäume vergleichbar. Im Allgemeinen weisen die Plusbäume eine meist höhere genetische Variation und Diversität an den Kernmikrosatellitenloci auf als die beobachteten natürlichen Populationen. Von einer genetischen Verarmung in den Plusbaumkollektiven durch die Selektion der Plusbäume ist nicht auszugehen, wenn eine ausreichend hohe Zahl an Plusbäumen in der Samenplantage enthalten ist. Die hier untersuchten 70-200 Bäume scheinen ausreichend zu sein.

Die nun vorhandenen Genotypen der Plusbäume können bei der Zusammenstellung von Samenplantagen genutzt werden. Des Weiteren können sie zur Nachverfolgung der Bäume in der Samenplantage verwendet werden, um Verwechslungen bei der Anzucht und Pflanzung sowie das Durchwachsen der Veredelungsunterlage auszuschließen.

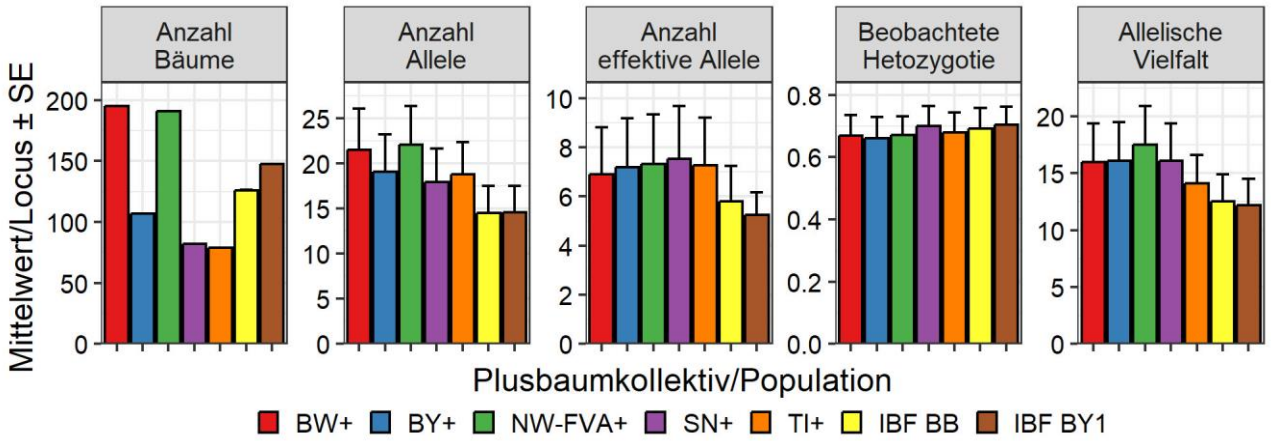


Abbildung 2 Anzahl der Bäume und Kennwerte der genetischen Vielfalt für die Plusbäume der beteiligten Partner FVA-BW (BW+), AWG (BY+), NW-FVA (NW-FVA+),SBS (SN+) und TI (TI+) im Vergleich zu zwei natürlichen Beständen der IBF Steglitz (IBF BB) Und IBF Monheim (IBF BY1).

AP 4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen

Abbildung 3: Reiserernte an einem Eschen-Plusbaum durch Bekletterung (©NW-FVA)

Zur Sicherung und Vermehrung der im AP 2 ausgewählten Plusbaumgenotypen wurden während der gesamten Projektlaufzeit durch die fünf beteiligten Teilprojektpartner (TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA und SBS) die erforderlichen Edelreiser in mehreren Erntekampagnen gewonnen.

Die Werbung der Plusbaumreiser wurde überwiegend durch qualifizierte externe Baumsteiger (Abbildung 3), aber auch mittels Schieß-Säge-Methode (BigShot) durch die Projektmitarbeitenden

selbst durchgeführt. Von jedem Genotyp wurden mindestens 20 Zweige geerntet, um mit Methoden der heterovegetativen Vermehrung (Veredelung) in Form von Pfropfungen und Okulationen sicherzustellten, dass ausreichend Rameten der Plusbäume für die zweistufigen ex-situ-Resistenztests und die Anlage von Klonsammlungen zur Verfügung standen.

In Abhängigkeit von der Qualität der Edelreiser wurden als Methoden der Winterhandveredelung überwiegend Kopulation, Geißfuß und „Chip-Budding“ gewählt. Zusätzlich wurde Okulation als eine im Spätsommer durchgeführte „Chip-Budding“-Veredelung angewendet. Als Pfropfunterlagen wurden vom TP4 angezogene Sämlinge von gegenüber dem Eschentriebsterben (ETS) toleranten Eltern als auch zugekaufte Pflanzen unbekannter Herkunft verwendet. Von allen Teilvorhaben konnten Veredelungen an insgesamt 665 Plusbaumgenotypen mit durchschnittlich gutem Anwuchserfolg durchgeführt werden (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht der während der Projektlaufzeit durchgeführten Veredelungen

Teilvorhaben	Anzahl veredelter Genotypen	Durchschnittlicher Veredelungserfolg
TI	79	83 % (Pfropfung)
AWG	197	74 % (gesamter Pfropferfolg, da FVA-BW beide TP veredelt hat)
FVA-BW	113	
NW-FVA	196	74 % (Pfropfung und Okulation)
SBS	82	45 % (Pfropfung und Okulation)

Zur Verifizierung der beobachteten Feldtoleranzeigenschaften der ausgewählten Plusbaumkandidaten gegenüber dem ETS wurden die erhaltenen Pfropflinge zwei ex-situ-Resistenztestverfahren (Ascosporentest und Innokulationstest) unterzogen.

Basierend auf Vorgaben des Unterverbundes FraxPath (Maia Ridley) wurde sich im Vorfeld auf die Methodik der Testdurchführung geeinigt, sie musste aber aufgrund unterschiedlicher Bedingungen an den durchführenden Instituten individuell angepasst werden. Jeweils vier Pflanzen eines Plusbaumgenotyps wurden im Inokulationstest und die übrigen Rameten im Ascosporentest geprüft. Für den Inokulationstest wurden die Pflanzen von jedem durchführenden Institut im Gewächshaus oder einer anderen, vor Sporenflug des Falschen weißen Stängelbecherchens (*Hymenoscyphus fraxineus*) geschützten Umgebung kultiviert. Mit der Infektion der Genotypen mit dem Teststamm 7 (Herkunft FraxPath, Maia Ridley) wurde im Spätsommer 2022 begonnen (siehe Abbildung 4). Als Negativkontrolle wurde ein Plusbaumgenotyp ausgewählt, der mit einem sterilen Agarstück infiziert wurde. Die Positivkontrolle bestand aus einem anfälligen Genotyp (F001_10) der mit dem Teststamm infiziert wurde. Bonitiert wurde die Nekrosenstufe nach dem Boniturschlüssel für Jungeschen (Peters et al. 2021).

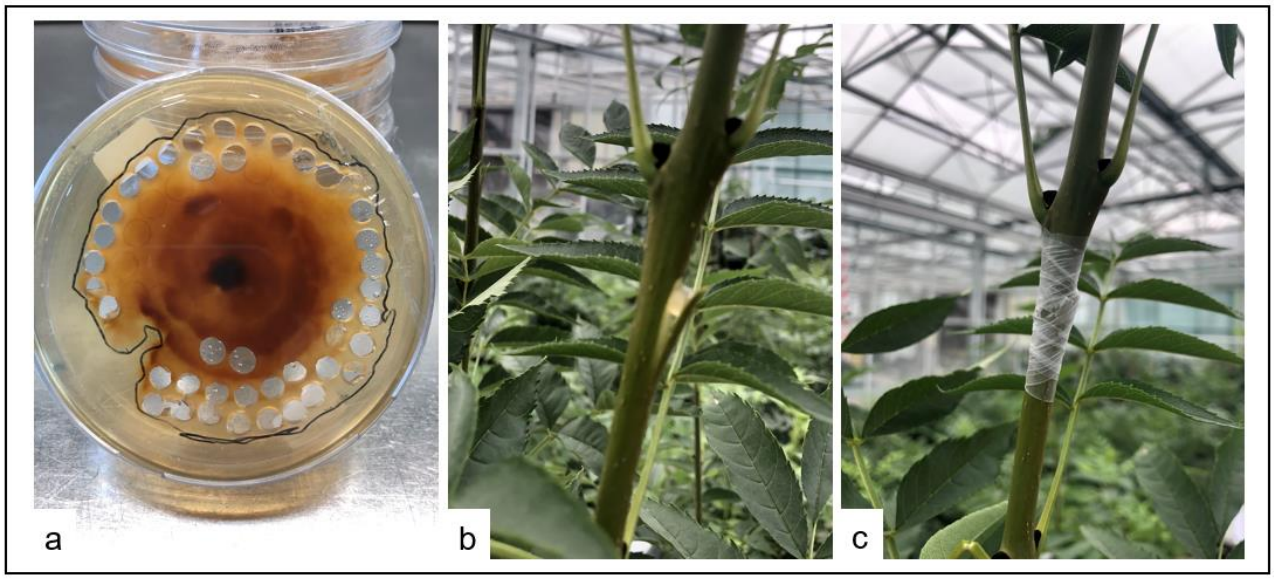


Abbildung 4: (a) mit Hymenoscyphus fraxineus bewachsene Agarplatte aus der die Plugs zur Inokulation ausgestanzt wurden; (b) Abgelöstes Kambium mit eingebrachtem Agarplug; (c) Verschluss der Wunde mit Parafilm(©NW-FVA)

Während der ersten Bonitur zeigten sich bei den meisten Teilvorhaben weniger Nekrosen als erwartet. Gründe hierfür können die hohen Temperaturen von stellenweise über 30°C während der ersten Infektion, ein Verlust der Aggressivität des Stammes aufgrund zu langer Plattenkultur, Positionierung des Chips nach Verbinden der Pflanze mit Parafilm nicht mehr optimal oder eine zugrunde liegende Reisstenz gegenüber dem Stamm sein. Aus diesem Grund wurde von allen Instituten im Herbst/Winter 2022 eine erneute Infektion mit Stamm 7 (Ausnahme TI: Infektion mit Stamm 10; Herkunft FraxPath, Maia Ridley) vorgenommen.

Für den Ascosporentest wurden im Winter 2021/2022 und Frühjahr 2022 infizierte Blattspindeln gesammelt. Diese wurden im Frühsommer zwischen die Töpfe der Plusbaumrameten und der Positivkontrolle (F001_10) ausgebracht (siehe Abbildung 5 a). Die Entwicklung des Pilzes konnte bei allen Teilvorhaben beobachtet werden (Abbildung 5 b). Eine zweite Entwicklungswelle im Spätsommer/Frühherbst war stellenweise sichtbar. Die Bonituren fanden ab Herbst bis zum Zeitpunkt der Pflanzung statt. Bonitiert wurden Blattsymptome sowie die Nekrosenentwicklung nach dem Schlüssel für Jungeschen (Boniturheft FraxForFuture). Während der gesamten Versuchsdauer befand sich eine Sporenfalle in direkter Versuchsnähe (siehe Abbildung 5 a). Die Filter dieser Fallen wurden an jedem Institut wöchentlich gewechselt. Die Analyse der Filter, die den Sporendruck quantifizierbar macht, konnte im Projektzeitraum jedoch nicht abgeschlossen werden.

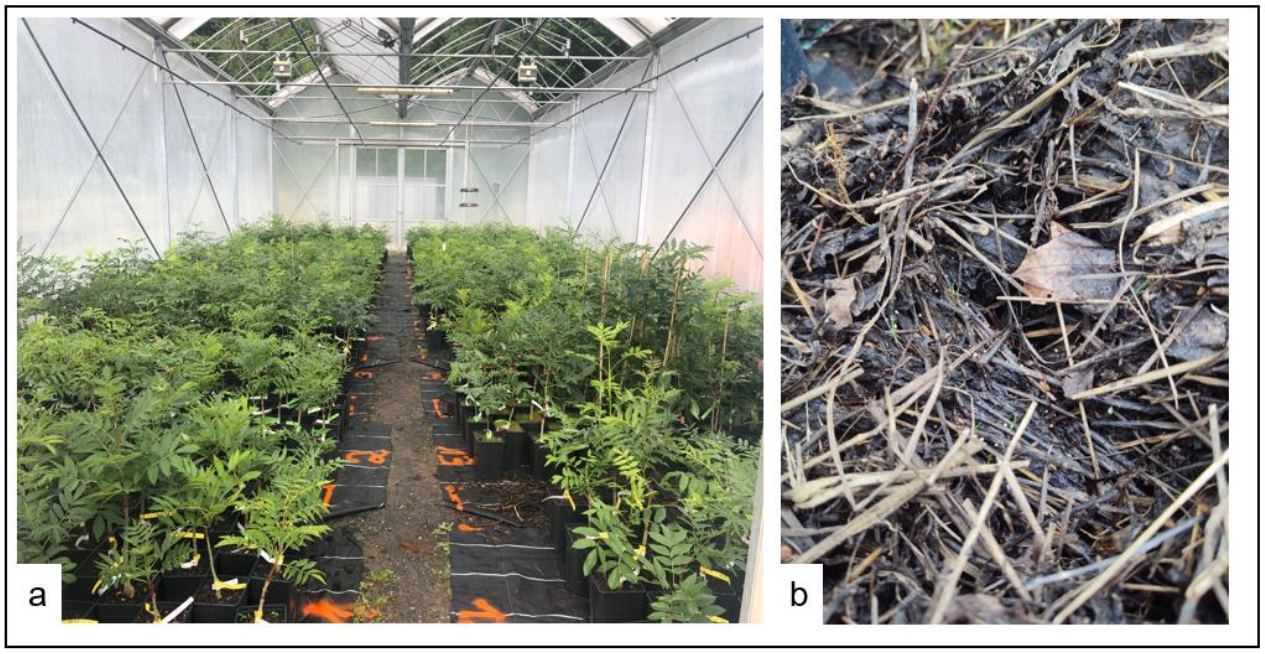


Abbildung 5: (a) Versuchsanordnung des Ascosporentests im Cabriohaus der NW-FVA mit zentral angebrachter Sporenfalle; (b) Laubstreu mit weißen Fruchtkörpern von Hymenoscyphus fraxineus (©NW-FVA)

Die beteiligten Institute konnten insgesamt 661 Klone und damit über 99 % der ausgewählten Plusbaumkandidaten den beiden ex-situ-Resistenztests unterziehen. In der ersten Prüfung 2022/2023 bestanden den Ascosporentest (Toleranzhürde von mindestens 70% symptomfreien Rameten je Genotyp) im Durchschnitt fast 52 % der Genotypen (siehe Tabelle 6). Die abschließende Bewertung der 2023 durchgeführten Resistenztests mit weiteren Genotypen steht noch aus.

Tabelle 6: Übersicht der ex-situ-Ascosporentests der beteiligten Teilvorhaben

Teilvorhaben	Anzahl getesteter Genotypen 2022	Test bestanden 2023	Anzahl getesteter Genotypen 2023	Test bestanden 2024
TI	61	92 %	18	ausstehend
AWG	34	38 %	80	ausstehend
FVA-BW	120	38 %	77	vorläufig 92 %
NW-FVA	186	54 %	-	-
SBS	54	34 %	28	ausstehend

Es zeigte sich, dass der Pilz auch während der Vegetationsruhe weitere Schäden in den Pflanzen verursachte, was durch den Anstieg höherer Nekroseschadstufen hier exemplarisch an Daten der FVA-BW und NW-FVA dargestellt ist (Abbildung 6). Ein durchgehendes Monitoring der ex situ-Testpflanzen bis zum Zeitpunkt der Flächenbegründung ist somit als notwendig zu erachten.

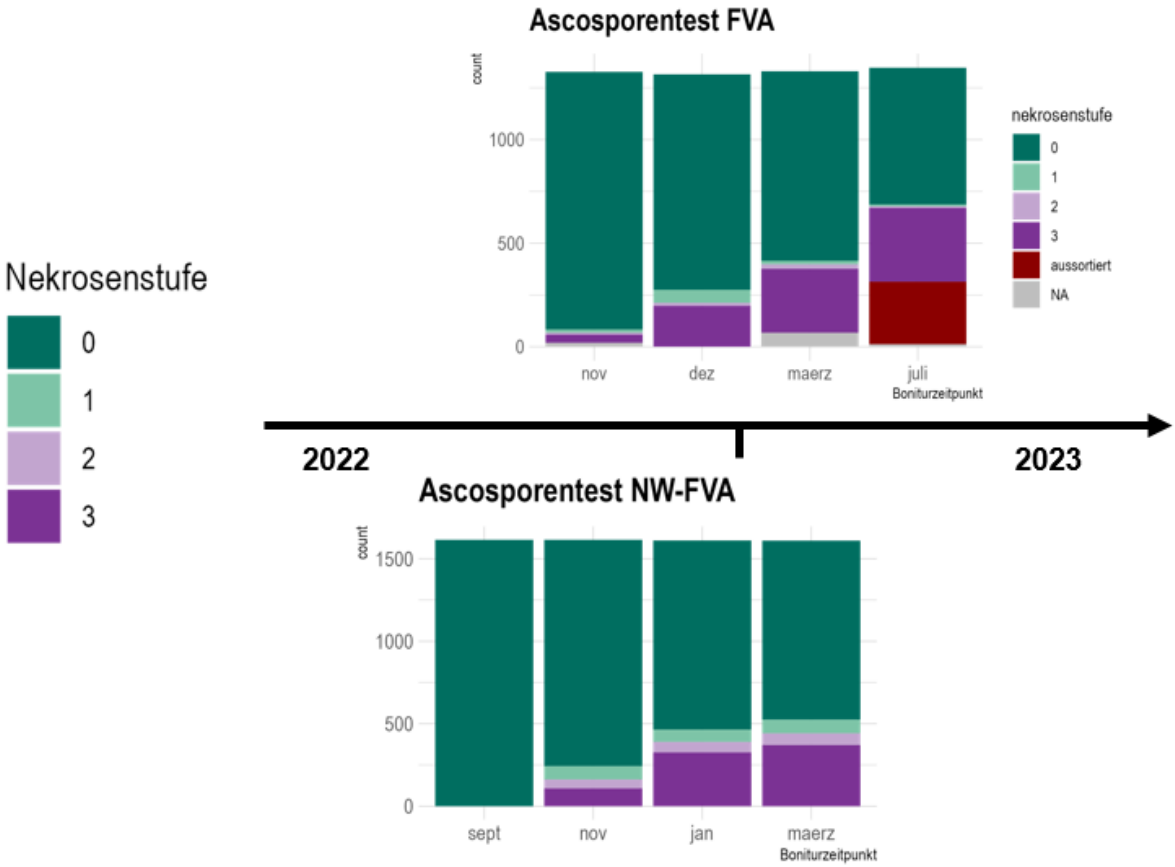


Abbildung 6: Vergleichende Nekrosenentwicklung an Genotypen der Teilvorhaben FVA-BW und NW-FVA aus der Pfropfsaison 2022 mit der Entwicklung der Symptome beginnend im November 2022 (©FVA-BW). Rot markiert (aussortiert) ist der Anteil der Pflanzen die aus dem Versuchsdesign entfernt wurden, da sie bereits abgestorben waren.

Die Auswahl der Genotypen für die Sicherung in Pfropflingssamenplantagen/Klonsammlungen basierte auf den Ergebnissen des Ascosporentests, da dieser auf dem natürlichen Infektionsweg von *Hymenoscyphus fraxineus* durch Sporenbefall der Blätter basiert. Bei den Mengen an gesammelter Laubstreu, die von den Teilvorhaben in ihren Versuchen ausgebracht wurden, kann von der Infektion der Testpflanzen mit Sporen von unzähligen verschiedenen Pilzstämmen ausgegangen werden. Beim Inokulationstest hingegen bezieht sich die Bewertung der Toleranzeigenschaften auf nur einen, wenngleich auch sehr aggressiven Pilzstamm.

Da Flächen, deren standörtliche Bedingungen für den Anbau von Esche geeignet und die gleichzeitig so isoliert von natürlichen Eschenvorkommen liegen, dass der Einfluss von Fremdbestäubung nahezu ausgeschlossen werden kann, gestaltete sich die Flächensuche für die Anlage von Pfropflingssamenplantagen/Klonsammlungen bei allen beteiligten Instituten schwieriger als erwartet. Zusätzlich ist noch nicht bei allen Teilprojekten die Erfassung von Resistenzmerkmalen *ex situ* in Form der Ascosporen- und Inokulations-Tests vollends abgeschlossen, so dass sich der Bearbeitungsstand dieses Meilensteins bis Projektende sehr unterschiedlich gestaltet.

Das TI und die NW-FVA konnten im Frühjahr 2023 mit den getesteten Genotypen bereits Flächen im Samenplantagendesign anlegen, während der SBS die bis dahin getesteten Genotypen in einer vorläufigen Klonsammlung sicherte. Die Flächen des AWG und der FVA-BW befinden sich zurzeit in Vorbereitung und die Pflanzen werden bis zur geplanten Anlage der Flächen im Frühjahr 2024 in der Baumschule der FVA-BW kultiviert.

Die Flächen wurden bzw. werden mit mindestens vier, maximal jedoch 10 Pfropflingen je Plusbaumgenotyp bestückt. Die Anzahl der gepflanzten Rameten je Klon ist mehreren Faktoren, wie der Größe der zur Verfügung stehenden Fläche, dem Pflanzabstand, der Anzahl Genotypen die den Resistenztest bestanden haben sowie der durch die Veredelungsmaßnahmen insgesamt zur

Verfügung stehenden Rameten abhängig. Angaben zu den einzelnen Flächen, Pflanzabständen und deren Bestückung werden im Anhang von jedem Teilvorhaben detailliert dargestellt.

In der Projektlaufzeit war es den Teilvorhaben möglich 1.245 Pflanzen von 178 verschiedenen Eschen-Genotypen auf drei Flächen zu sichern. Im Frühjahr 2024 werden mit Pflanzen zusätzlicher Genotypen sowohl zwei neue Flächen angelegt als auch die bestehenden Flächen mit weiteren Klonen ergänzt.

Literatur:

Peters, S.; Langer, G.; Kätzel, R. (2021): Eschentriebsterben – Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), Gülzow-Prüzen, 60 Seiten, ISBN-Nr.: 978-3-942147-44-6. Online: https://www.fnr.de/fileadmin/Projekte/2022/Mediathek/Broschuere_Bonitur_RZ_WEB_NEU_logo.pdf

AP 5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfungen

Während der gesamten Projektlaufzeit wurde von den an diesem Arbeitspaket beteiligenden Projektpartnern (TI, AWG, FVA-BW, NW-FVA und SBS) mehrfach Saatgut geerntet.

Die Saatguternte gestaltete sich im Jahr 2021 für einige Teilprojekte, aufgrund von zu geringen Saatgutmengen (NW-FVA) oder gar dem gänzlichen Fehlen von Plusbäumen mit Saatgut (AWG und FVA-BW) schwierig. Da auch 2022 ein Fehlmastjahr war konnte erneut von keinem Teilvorhaben Saatgut in ausreichender Menge erhalten werden.

Da reifes Eschensaatgut zum Überliegen neigt, also meist erst zwei Jahre nach der Reife keimt (Schirmer 2002), wurde das Saatgut grün geerntet und zeitnah nach der Ernte, in der Regel ohne Lagerung, ausgebracht. Zur weiteren Erhöhung des Keimerfolgs wurde, basierend auf Saatgutversuchen der FVA-BW, das grüne Saatgut zusätzlich entflügelt (Abbildung 7a) und teilweise in unterschiedlichen Varianten ausgesät (Abbildung 7 b und c).

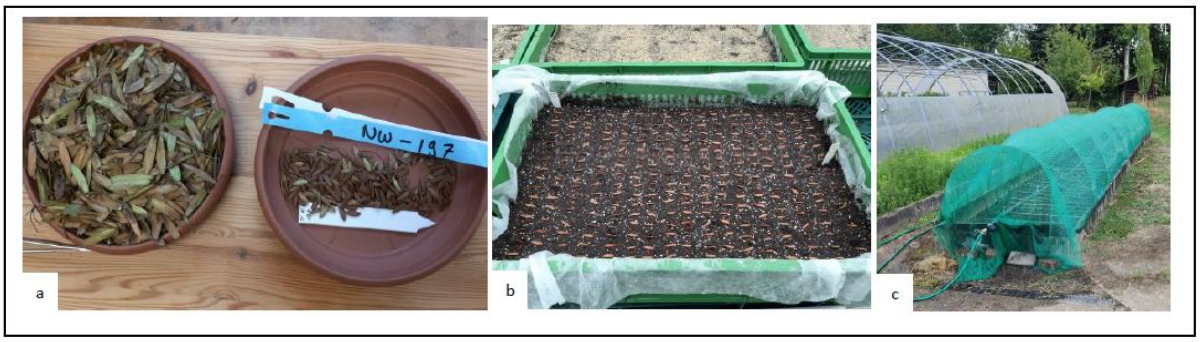


Abbildung 7(a) Varianten der Grünsaat: links unbehandeltes Saatgut, rechts entflügeltes Saatgut; (b) entflügeltes Saatgut ausgelegt in einer Aussaatkiste, noch ohne abschließende Erdbedeckung und Besandung; (c) Aussaat im Frühbeetkasten mit Bewässerung und Vogelschutznetz (© NW-FVA)

Das in der Projektlaufzeit ausgebrachte Saatgut keimte bei allen Teilvorhaben mit sehr unterschiedlichen Auflaufzahlen je Absaat und nicht in zufriedenstellenden Mengen. Eine Übersicht der erreichten Ernteerfolge und Keimraten gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Übersicht der in der Projektlaufzeit möglichen Aussaaten und erreichten Keimerfolge.

Teilvorhaben	Anzahl ausgesäter Nachkommenschaften	Durchschnittlicher Keimerrate
TI	34	23 %
AWG	14	54 % (bei einzelnen Absaaten sehr wenige Sämlinge)
FVA-BW	41	100 % (bei einzelnen Absaaten wenige Sämlinge oder nach Austrieb abgestorben)
NW-FVA	29	79 % (bei einzelnen Absaaten sehr wenige Sämlinge)
SBS	10	Unter 1 %

Weder die Anzahl der Saatgutpartien noch die Menge an erhaltenen Sämlingen je Nachkommenschaft reichten bei den beteiligten Teilvorhaben aus, um wie ursprünglich geplant, jeweils institutseigene Nachkommenschaftsprüfungen anzulegen. Zusätzlich scheinen einzelne Saatgutpartien trotz Grünsaaternte und Vorbehandlung (entflügeln) doch zu überliegen und sind bis dato noch nicht gekeimt.

Daher wurde im Unterverbund FraxGen beschlossen eine Serie von drei bis vier Flächen zur gemeinsamen Nachkommenschaftprüfung anzulegen. Auf diesen Flächen sollen alle in der Projektlaufzeit erhaltenen Nachkommenschaften vereint und zusammen mit je zwei Standardnachkommenschaften pro Partnerinstitutionen gepflanzt werden. Die 8 als Standards vorgesehenen Saatgutpartien wurden bereits zwischen den Teilvorhaben ausgetauscht und ausgesät.

Da die Sämlinge nach der Keimung mindestens eine Vegetationsperiode benötigen um für die Pflanzung geeignete Größen zu erreichen kann die Anlage dieser Flächenserie jedoch erst im Herbst 2024 realisiert werden.

Literatur

Schirmer, Randolf (2002): „Beerntung von Eschensaatgut“ In: *Beiträge zur Esche*. LWF-Wissen 34. Hg.: LWF. online: https://www.lwf.bayern.de/mam/cms04/service/dateien/w34_beitraege_zur_esche_gesamtheft_gesch.pdf

AP 6 In-vitro-Vermehrung

In diesem Arbeitspaket wurden Methoden zur vegetativen Vermehrung *in vitro* erarbeitet. Dabei wurden die unterschiedlichen Kompetenzen der beteiligten vier Institutionen genutzt und die Aufgaben innerhalb des Arbeitspaketes aufgeteilt. Die Baumschule Oberdorla (BO) beschäftigte sich als Unterauftragnehmer vom Staatsbetrieb Sachsenforst mit der Etablierung von ausgetriebenen Knospen. Am Thünen Institut (TI) in Waldsieversdorf wurden vorgetriebene Knospen sowie bereits etablierte Kulturen aus vorhergehenden Projekten bearbeitet. An der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (NW-FVA) wurden seit 20 Jahren kryokonservierte Meristeme wieder

reaktiviert und anschließend vermehrt. Zusätzlich wurden sowohl ruhende als auch frisch ausgetriebene Knospen abgepfropfter Bäume zur Etablierung genutzt. Die Humboldt Universität zu Berlin (HUB) war für die Entwicklung eines Protokolls zur Induktion der somatischen Embryogenese zuständig. Weiter erfolgten dort auch Versuche zur Inkulturnahme von ruhenden Knospen.

Die Etablierung von bereits ausgetriebenen Knospen in Oberdorla konnte trotz unterschiedlicher Vorbehandlungen keine Klone hervorbringen. Die Probenzahl belief sich auf über 400 Explantate. An vier Proben zeigte sich ein Austrieb, der sich jedoch nicht zu einer dauerhaften Kultur entwickelt konnte. Für die Experimente wurde WPM-Medium benutzt.
Die durchschnittliche Etablierungsrate der ruhenden Knospen 2021 an der NW-FVA lag bei 60%. Darauf folgte jedoch in den meisten Fällen eine Wuchsdepression, sodass zwei Klone in stabile Kulturen übergehen konnten. Aus Saatgut konnten im selben Jahr 70% der eingesetzten Embryonen zu vermehrbaren in-vitro-Pflanzen angezogen werden.
Am TI wurden 2021 Versuche unternommen, bereits *in vitro* vermehrte Genotypen (mittlerweile getopfte Bäume) wieder in der in-vitro-Kultur zu etablieren. Ende des Jahres hat sich der Zustand der In-Vitro-Kulturen sehr verschlechtert und eine Fehleranalyse zu Rettung der Pflanzen wurde begonnen. Des Weiteren war es möglich, drei in Kultur befindliche Sämlingsklone für den Projektpartner FraxPath zu bewurzeln und zu kultivieren, so dass am Ende 99 F001_3 Pflanzen, 176 F001_10 Pflanzen und 123 F001_6 Pflanzen für die Versuche FraxPaths in Braunschweig zu Verfügung standen.
An der HUB wurden ruhende Apikal- und Axillarknospen aus der Klonsammlung in Zepernick und vom TI in Waldsieversdorf entnommen für Etablierungsversuche verwendet. 10% der Knospen aus Waldsieversdorf sind ausgetrieben, erfuhren aber anschließend eine Wuchsdepression. Aus den Proben vom TI konnten 15 Klone etabliert werden. Kontamination trat bei 87% der Knospen auf. Es konnten fünf der etablierten Klone an RLP AgroScience GmbH für weiterführende Experimente versandt werden.
Ein Austausch von Protokollen und Medientypen aller mit der In-vitro Kultur beschäftigten Teilprojekte hat 2021 stattgefunden.

An der NW-FVA konnten, trotz Sanierung des in-vitro-Labors 2022 und der einhergehend fehlenden Nutzungsmöglichkeit dessen in diesem Jahr, einige die sieben etablierten Klone erhalten werden. An der HUB zeigten Knospen, welche an den Naturstandorten entnommen wurden, haben trotzt doppelter Sterilisierung eine Kontaminationsrate von ca. 85%. Von den verbleibenden Knospen treiben ca. 40% aus. Nach mehrwöchiger Kultur stagniert das Wachstum. Die Blätter verbräunen und das Explantat starb ab. Im Jahr 2022 gab es somit eine Ausfallquote von 100%.
Am TI wurde weiter an der Aufrechterhaltung bestehender Kulturen gearbeitet. Von der Humboldt–Universität wurden ein etablierter Klon und 19 sterilisierte Samen für die Vermehrung übernommen. Ende des Jahres wurden 2 Klone (gestaffelt 966 Pflanzen) für die Bewurzelung vorbereitet. Weiter wurde am Ende des Jahres ein Etablierungsversuch nach der Methode des Northern Research Station (Roslin, UK) vorgenommen, bei dem mit äußerlich gesäuberten Wintertrieben von 4 Genotypen ein Austrieb im Labor provoziert wurde. Diese Austriebe sollten später in die vitro Kultur überführt werden. Beim Großteil der Pflanzen konnten keine Erfolge bei der Etablierung erzielt werden.

An der BO konnten Weiterführende Experimente mit andrem Etablierungsmedium mangels Materials 2023 nicht durchgeführt werden, da im Sommer ein nachfolgender Austrieb witterungsbedingt zu gering war.

2023 wurden am TI 181 Plusbaumreiser auf in-vitro-Unterlagen gepfropft werden. Dies entsprach ca. 33% der eingesetzten Unterlagen. Des Weiteren wurden die Ende 2022 für die Akklimatisierung vorbereiteten Stecklinge in den Boden gebracht. Davon waren 680 Pflanzen vom HU-Klon und 140 FM-Klon Pflanzen.

Da die Etablierung aus adultem Material meist nicht erfolgreich verläuft, wurden an der NW-FVA frisch ausgetriebene Knospen von Plusbaum-Pfropflingen zur Etablierung verwendet. Daraus

konnten vier Genotypen in die in-vitro-Kultur gebracht werden. Die Kontaminationsrate lag bei 90%. Im Projektzeitraum konnten somit mehr als ein Drittel der ausgewählten Plusbäume, insgesamt 32 Genotypen sowie bereits 7 Nachkommen von diesen Plusbäumen in Meristemkultur übernommen werden.

Für die durchgeführten Untersuchungen zur Reaktivierung kryokonservierter Eschen-Klone wurden bestehende Kryoprotokolle an der NW-FVA getestet und Versuche zu deren Verbesserung durchgeführt. Dabei konnte durch drei Optimierungsschritte in insgesamt neun Versuchen mit den seit 20 Jahren in flüssigem Stickstoff eingelagerten Eschenmaterial eine Überlebensrate bei der Reaktivierung von 80 % erreicht werden. Im Projektzeitraum gelang es, 24 der insg. 27 kryokonservierten Eschen-Genotypen aus der Zeit vor dem ETS erfolgreich zu reaktivieren. Alle 24 Genotypen konnten über Meristemkultur vermehrt und auch bewurzelt werden. Bei 13 Genotypen konnte bis zum Frühjahr 2023 eine ausreichende große Anzahl von Pflanzen erhalten werden, um Versuche zur Akklimatisierung der in-vitro-Pflanzen an Freilandbedingungen durchzuführen.

Für die Entwicklung einer Methode zur Induktion von somatischer Embryogenese (sE) an der HUB, wurden 2020 erste Versuche an Proben vom TI durchgeführt. Es handelte sich um reifes, frei abgeblühtes Saatgut. Eine Charge wurde 2018 geerntet und gefroren gelagert (1494 Samen), die andere war von 2020 (1641). Daran ließen sich keine somatische Embryogenese (sE) auslösen. Dies ließ darauf schließen, dass reifes Saatgut nicht aus Ausgangsmaterial geeignet ist. Im Sommer 2021 wurden vier Bäume, in vier aufeinander folgenden Wochen, beginnend in der 30. KW beerntet. Insgesamt konnten 3493 Samen präpariert werden. An zwei Explantaten kam es zur Bildung von somatischen Embryonen. Auf den Versuchen vom Vorjahr aufbauend wurde 2022 eine angepasste Versuchsreihe angelegt. Insgesamt wurden 10980 Explantate aufgelegt. Es konnten 104 Klone durch sE induziert werden. Der Versuch wurde mit denselben Parametern auch 2023 wiederholt. Es wurden insgesamt 10125 Explantate aufgelegt. Davon wurden 157 neue Klone etabliert.

Die Rekalzitranz der Eschen in Bezug auf die Kultivier- und Vermehrbarkeit in-vitro, sowie die Schwierigkeiten bei der Etablierung konnten bis Projektende zwar deutlich verbessert, jedoch noch nicht vollständig gelöst werden.

AP 7 Validierung und Anwendung von bekannten Resistenzmarkern

Es wurde eine Literaturrecherche zu Resistenzmarkern bei Esche gegenüber dem Eschentriebsterben (ETS) durchgeführt. In vier international veröffentlichen Studien wurde ein Zusammenhang von genetischen Markern mit der Symptomausprägung des ETS nachgewiesen (Harper et al. 2016; Sollars et al. 2017; Stocks et al. 2019; Chaudhary et al. 2020). Methodisch können hierbei RNS-basierte (Harper et al. 2016; Sollars et al. 2017) und DNS-basierte Studien (Chaudhary et al. 2020; Stocks et al. 2019) unterschieden werden. Harper et al. (2016), Sollars et al. (2017) und Chaudhary et al. (2020) identifizierten spezifische Marker, wobei Stocks et al. (2019) Muster im gesamten Genom mithilfe mehrerer Tausend Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) analysierte und damit ein genomisches Vorhersagemodell entwickelte (Abbildung 8).

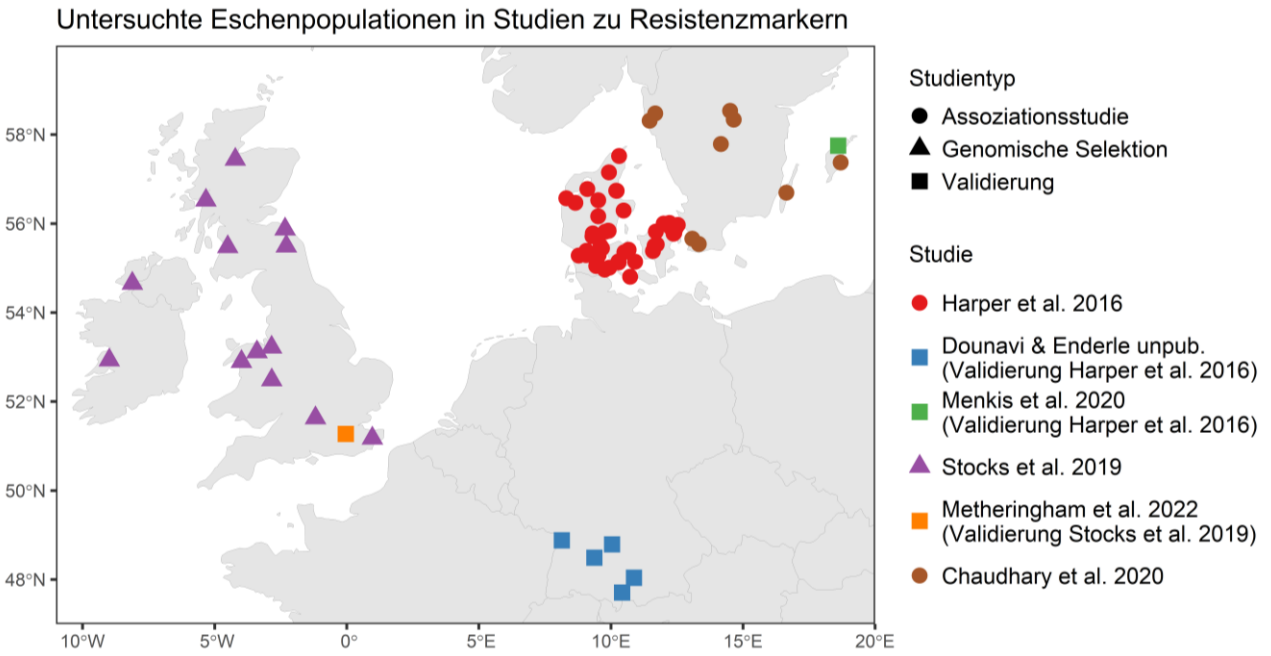


Abbildung 8 Untersuchte Eschenpopulationen in Studien zu Resistenzmarkern.

Dounavi & Enderle (unpubl.) konnten die Ergebnisse von Harper et al. (2016) und Sollars et al. (2017) in einer Pilotstudie mit gesunden und erkrankten Eschen in Süddeutschland nicht bestätigen. Auch Menkis et al. (2020) konnte die Marker in natürlichen Populationen nur unzureichend anwenden. Chaudhary et al. (2020) fand nur zwei SNPs an Eschen in Südschweden, die mit ETS in Zusammenhang stehen, und konnte die Krankheitsanfälligkeit nur zu 5% erklären. Die Anwendbarkeit der bereits veröffentlichten Marker bzw. des genomischen Vorhersagemodells scheint von der genetischen Populationsstruktur, dem Merkmal zur Bestimmung der Krankheitstoleranz, dem Standort sowie dem Alter der Bäume abzuhängen (Metheringham et al. 2022; Dounavi und Enderle unpubl.). Eine genomische Vorhersage der Widerstandsfähigkeit mit einem speziell auf die Zielpopulationen trainierten Vorhersagemodell, ähnlich der Methode von Stocks et al. (2019) scheint daher am erfolgversprechendsten, wenn ähnliche Bedingungen für die Trainings- und die Testpopulation gelten (Metheringham et al. 2022; Doonan et al. 2023).

Bei der genomischen Vorhersage werden nicht im eigentlichen Sinne bekannte Resistenzmarker validiert, sondern ein SNP-Array auf seine Eignung als Selektionswerkzeug getestet. Dieser SNP-Array (4Tree Array) trägt mehrere Tausend Einzelnukleotid-Marker (SNPs), die teilweise mit dem Eschentriebsterben assoziiert sind (Guilbaud et al. 2020). Mit diesen SNPs wird ein genomisches Modell entwickelt. In einem genomischen Modell werden Tausende von SNP-Markern verwendet, um genomische Muster aufzudecken und die Anfälligkeit gegenüber dem Eschentriebsterben vorherzusagen (Stocks et al. 2019).

Für die Analyse wurden Plusbäume und erkrankte Nachbarbäume ausgewählt (Abbildung 9). Diese 97 Baumpaare stammen aus Bayern sowie von den Projektpartnern der FVA-BW, SBS, TI und HUB. Des Weiteren wurden Individuen aus einer Nachkommenschaftsprüfung genotypisiert, deren Phänotypen seit Jahren beobachtet werden. Zusätzlich können Genotypen von den Intensivbeobachtungsflächen (IBF) des FraxForFuture-Verbundes genutzt werden, um die genomische Modellierung zu erweitern und zu überprüfen.

Die genotypisierten Individuen decken einen großen geografischen Bereich ab (Abbildung 9), wodurch die Anwendbarkeit der Methode auf verschiedenste Populationen beurteilt werden kann. Diese Methode soll Selektionsprogramme hinsichtlich der Auswahl von resistentem und genetisch variablem Vermehrungsgut unterstützen. Hierzu dient der Zuchtwert der getesteten Individuen, der sich mit dem genomischen Modell vorhersagen lässt (genetisch abgeschätzter Zuchtwert) ohne die Phänotypen bestimmen zu müssen. Ein umfangreicher und wesentlicher Beitrag bestand in der

Phänotypisierung und Bewertung der Widerstandsfähigkeit der Individuen in der verwendeten Nachkommenschaftsprüfung (Seidel et al. unpubl.). Dadurch konnten 190 Individuen aus 25 Familien mit genau bestimmtem Phänotyp für die Genotypisierung ausgewählt werden. Ein genomisches Modell wurde bisher nicht berechnet, da die Genotypisierung mittels des SNP-Array erst sehr spät im Projektverlauf durchgeführt werden konnte (siehe hierzu die Begründung im Erfolgskontrollbericht). Es konnten Daten gewonnen werden, die mit den Daten anderer europäischer Forschungsinitiativen verglichen werden können.

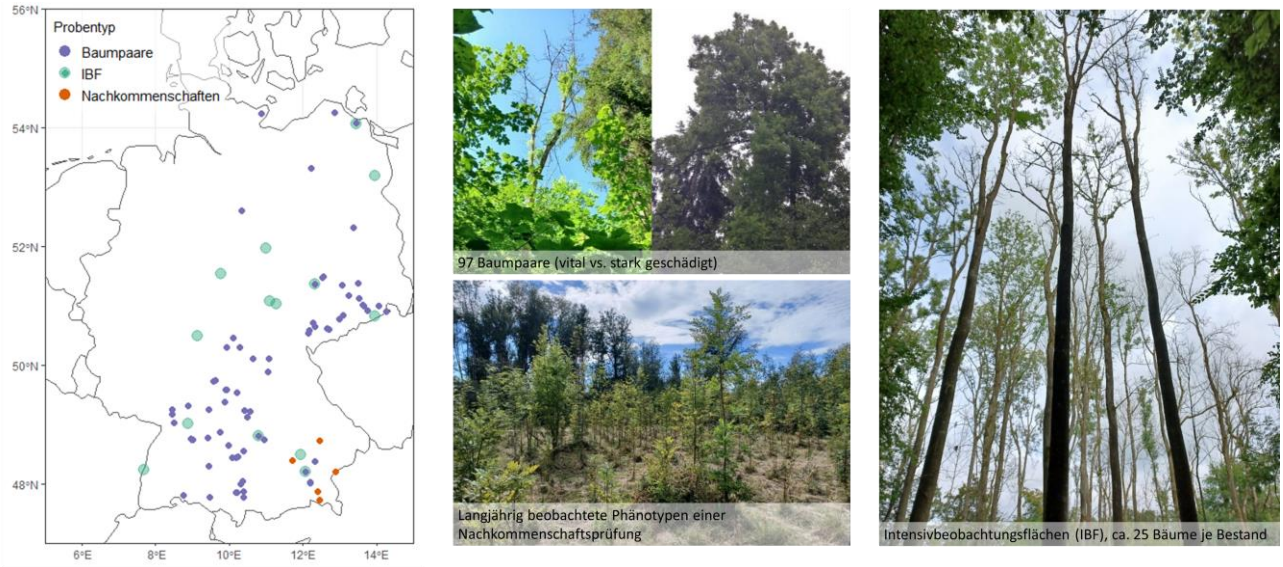


Abbildung 9 Herkunft der beprobten Individuen und Darstellung der verwendeten Probentypen.

Bis zum Berichtzeitpunkt wurde eine erste vorläufige Analyse der SNP-Daten an den Baumpaaren und Familien durchgeführt. Von den 13.406 SNPs des SNP-Arrays konnten nach einer Qualitätskontrolle zunächst 4.859 SNPs von 378 Individuen für die genomische Modellierung verwendet werden. Für die genomische Modellierung der Widerstandsfähigkeit wurde eine „Reproducing Kernel Hilbert Spaces“ Regression genutzt, die eine Gauß’sche genomische Verwandtschaftsmatrix berücksichtigt (Abbildung 10 A). Hierbei wurde die hohe Verwandtschaft der Individuen innerhalb der Familien und für Individuen aus denselben Beständen wiedergegeben. Es wurde eine Kreuzvalidierung des genomischen Models mit fünf Durchläufen durchgeführt, in der das Modell an einer Trainingspopulation trainiert und an einer Testpopulation getestet wurde. Die Trainingspopulation sollte möglichst groß sein, daher wurden 362 Individuen zufällig dafür ausgewählt. Die Testpopulation enthielt die übrigen 16 Individuen (Abbildung 10 B). Die Phänotypen der Trainingspopulationen wurden gut modelliert (Abbildung 10 B). Die Phänotypen der Testpopulationen wurden hingegen nur unzureichend vorhergesagt, da vielen Individuen mit starken Symptomen Zuchtwerte zugewiesen werden, die geringe Symptome anzeigen. Die Genauigkeit der Vorhersage wurde durch das Verhältnis von richtig vorhergesagter Widerstandsfähigkeit zu allen Vorhersagen bestimmt. Für die Trainingspopulationen betrugen die Genauigkeiten zwischen 97 % und 99%. Für die gesamte Testpopulationen betrug die mittlere Genauigkeit über fünf Durchläufe 54,5 % (37,5 % - 73 %). Die geringe Anfälligkeit wurde mit einer mittleren Genauigkeit von 51,2 % vorhergesagt. Die mittlere Genauigkeit für die Vorhersage einer hohen Anfälligkeit betrug 19,3 %.

Trotz der vielversprechenden genomischen Modellierung der Trainingspopulationen sind die Ergebnisse variabel, da die Widerstandsfähigkeit der Testpopulationen bisher nur unzureichend vorhergesagt werden konnte. Es sind allerdings bei weitem noch nicht alle Möglichkeiten der genomischen Vorhersage ausgeschöpft. In weiteren Analysen werden verschiedene Verwandtschaftsmatrizen (VanRaden, Yang) erprobt, Bayes´sche Methoden verwendet und die

genomische Vorhersage mit einzelnen Subpopulationen modelliert sowie die Individuen der IBF berücksichtigt.

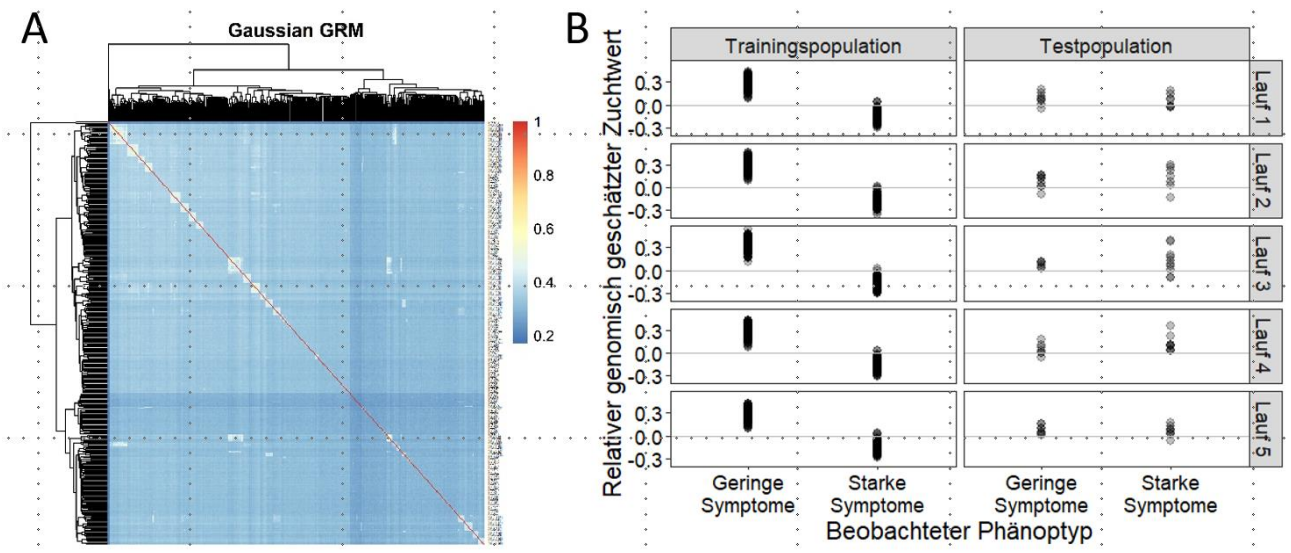


Abbildung 10 A) Genomische Verwandtschaftsmatrix, bei der die Verwandtschaft aller Individuen paarweise dargestellt ist (blau = geringe Verwandtschaft, rot = hohe Verwandtschaft). Die rote Diagonale entspricht dem Vergleich der Individuen mit sich selbst. B) Kreuzvalidierung des genmoschen Models. Werte über der Nulllinie entsprechen relativen genomische geschätzten Zuchtwerten, die eine geringe Anfälligkeit vorhersagen und Werte unter der Nulllinie sagen eine hohe Anfälligkeit vorher.

AP 8 Identifizierung von Resistenzmarkern mittels Transkiptomanalyse

Die Identifizierung der Resistenzmarker erfolgte in mehreren Inokulationsexperimenten unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammern an der Universität Göttingen. In 2021 wurde ein erstes Testexperiment mit zwei ausgewählten Genotypen (1 anfälliger, 1 toleranter Genotyp) durchgeführt. In 2022 wurden die beiden Hauptexperimente durchgeführt (Abbildung 11). In allen Experimenten wurde die Hälfte der Bäume mit Agarpfropfen mit Mycel von *Hymenoscyphus fraxineus* inokuliert, während die andere Hälfte als Kontrolle diente und für diese sterile Agarpfropfen verwendet wurden.

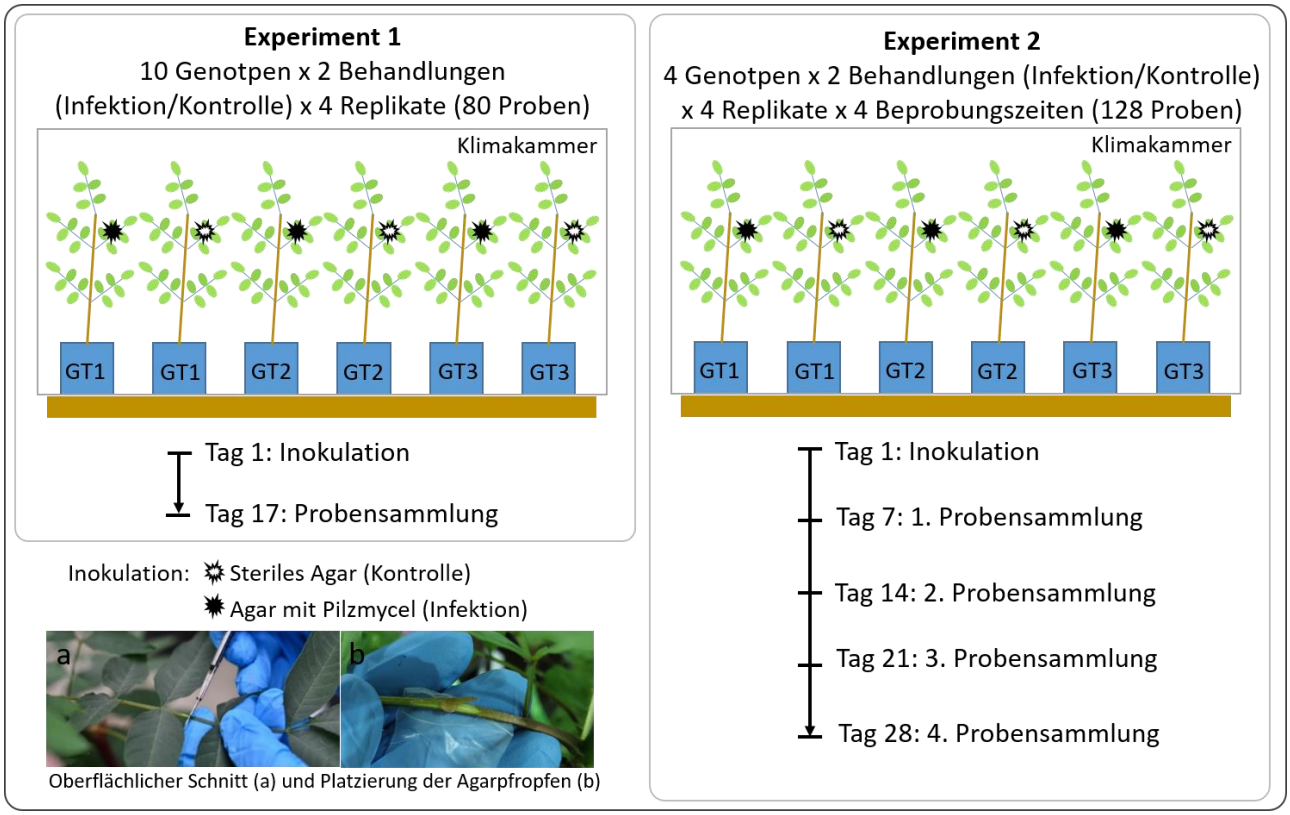


Abbildung 11 Illustration der Experimente zur differenziellen Genexpression an Fraxinus excelsior Genotypen mit unterschiedlicher Anfälligkeit für das Eschentriebsterben.

Die Experimente wurden unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus in 2021 (Testexperiment) und in Klimakammern im Frühjahr 2022 an der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt. Für die Inokulation mit *Hymenoscyphus fraxineus* wurde der Pilzstamm 7 (RH03-T2-B1-1, bereitgestellt von Maia Ridley [JKI]) verwendet. Kontrollproben wurden ebenfalls mit Agarpfropfen versehen, allerdings aus sterilem Agar ohne Pilzmyzel. Im Testexperiment wurden Proben am 7. Tag nach der Inokulation untersucht. In Experiment 1 wurden 10 Genotypen mit unterschiedlicher ETS-Anfälligkeit nach 17 Tagen nach der Inokulation verglichen, während in Experiment 2 anhand von 4 Genotypen (2 tolerante und 2 anfällige) der zeitliche Verlauf der Genexpression untersucht wurde. Dazu wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Proben gesammelt. Im Testexperiment wurde RNA von 12 Proben extrahiert und sequenziert. In Experiment 1 und 2 wurden insgesamt 208 Proben (80 Proben aus Experiment 1 und 128 Proben aus Experiment 2) gesammelt und RNA extrahiert. In diesen beiden Experimenten wurde mit Hilfe spezifischer Primer des Haushaltsgens *UBC* des Pathogens der Inokulationserfolg, bzw. die Infektionsfreiheit der Kontrollproben in einer RT-qPCR überprüft. Bei einem C_t-Wert < 30 gehen wir von einer erfolgreichen Inokulation aus, während der Pilz bei C_t-Werten > 30 als nicht nachzuweisen gilt. Die Ergebnisse der RT-qPCR bestätigten den Erfolg der kontrollierten Inokulationen und RNA von allen Proben wurde anschließend sequenziert.

Insgesamt sind vier Publikationen geplant zum Thema Markerentwicklung auf Transkriptombasis. Die erste Publikation, basierend auf dem Testexperiment aus 2021, wurde bereits im Dezember 2023 für das Special Issue an das Journal of *Plant Disease and Protection* gesendet und befindet sich zurzeit im Review-Prozess. Diese Untersuchung ergab einen ersten Hinweis darauf, dass 7 Tage nach Inokulation zwar bereits eine Expressionsantwort festzustellen ist, dass es jedoch noch ein recht früher Zeitpunkt ist. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der tolerantere Genotyp eine spezifischere Antwort auf den pathogenen Pilz zeigt, da deutlich weniger Gene differentiell exprimiert wurden im Vergleich zum anfälligen Genotyp.

Zurzeit werden die Daten aus Experiment 1 und 2 noch ausgewertet, die bereits vorhandenen Ergebnisse haben wir im Anhang beispielhaft dargestellt (Publikationen 2, 3). Des Weiteren werden zurzeit und in den kommenden Monaten, basierend auf den Ergebnissen der differentiellen

Genexpression, Primer entwickelt. Die neu entwickelten Marker werden in den Proben aus den IBF amplifiziert, um eine mögliche Assoziation der Marker mit der ETS-Anfälligkeit in den Beständen zu untersuchen (Publikation 4).

AP 9 Genetische Architektur (Genomanalyse)

Der Schwerpunkt des Arbeitspaketes sind die genetischen Grundlagen der natürlichen Variation in der Anfälligkeit der Esche gegenüber dem Eschentriebsterben. Zur Untersuchung dieser wurden die Nachkommenschaften aus dem Projekt ResEsche im März 2021 ausgepflanzt. Vier der fünf Nachkommenschaften stehen nun auf einer Fläche im östlichen Teil Brandenburgs in der Nähe von Schulzendorf/Bliesdorf, eine Nachkommenschaft wurde in Schleswig – Holstein in der Nähe von Trenthorst/Wulmenau gepflanzt. Es wurde eine gemeinsame Probennahme der Nachkommenschaft vom 14. – 16.06.2021 unternommen. Aufgrund der schwierigen Bedingungen für Pflegemaßnahmen und der Anwuchsrate konnten von 3840 ausgepflanzten Individuen, 3798 Proben genommen. Von 751 Proben wurde die DNA extrahiert, diese wurden zuvor anhand von SSR-Markern als Vollgeschwister bestimmt. Die extrahierte DNA wurde an die Firma Novogene zu Weiterverarbeitung geschickt. Alle mit SSR Markern bestimmte Vollgeschwister-Familien wurden zusätzlich mit gesamt Genome low-coverage Sequenzierung mit Illumina sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse wurden dazu verwendet, Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)) zu bestimmen. Nach einigen Filterschritten konnte der Datensatz, bestehend aus allen zugeordneten Individuen (910), 5.87 Millionen SNPs ermittelt werden. Mit Hilfe der ermittelten SNPs konnte eine Principal-Component Analyse durchgeführt werden. Mit den jeweiligen Clustern die angezeigt wurden, konnten die Ergebnisse der SNP Analyse größtenteils bestätig werden. In einigen Voll-Geschwister Familien weichen die Ergebnisse aus den SSR Ergebnissen von den SNP Ergebnissen ab. Die jeweilige Zuordnung der Familien wurde demnach angepasst (Abbildung 12 a-b). Diese Ergebnisse wurde bereits als preprint veröffentlich (Krautwurst et al. 2023).

Die in 2021 abgeschlossen Genotypsierung der Vollgeschwister-Familien wurde dazu verwendet von fünf Familien genetische Karten zu erstellen. Es wurden nur Familien genutzt die mindestens 70 Individuen enthielten. Diese genetischen Karten wiesen 23 Linkage Gruppen auf, die mit der Chromosomen Anzahl von F. excelsior übereinstimmt. Die Karten wurden für die QTL-Analysen weiterverwendet. Für die QTL-Analysen wurden zwei Phänotypen im Jahr 2022 und 2023 aufgenommen. Zum einen der Austrieb der Primärknospe und Symptome des Eschentriebsterben. Der Zeitpunkt des Blattaustriebes ist in der Literatur mit der Resistenz gegenüber dem Eschentriebsterben verknüpft. Der Blattaustrieb wurde über drei Monate an drei Tagen der Woche mit einer Kamera aufgenommen. Die Daten wurden für alle Vollgeschwister-Familien aufgenommen. Mit Hilfe der Fotos wurden später die jeweiligen Austrieb-Stufen bestimmt. Dabei wurde sich am BBCH Schema orientiert. Für die QTL wurde das Datum und die jeweilige Stufe des Austriebs verwendet. Die ETS-Symptome wurden für die gesamte Nachkommenschaft aufgenommen. Es wurde die Nekrosenbonitur nach dem Schlüssel des FraxForFuture Boniturheft (Nekrosen bei Jungpflanzen) durchgeführt. Es war möglich in der Vollgeschwister-Familie (163) von Karlsburg QTL`s für den Austrieb in bestimmter Stufe und Anzahl der Nekrosen fest zu stellen (Abbildung 12c). Das QTL Ergebnis für die Nekrosen könnte ein Hinweis für einen potentiellen Genort sein, der weniger anfällige Genotypen auszeichnet. Die Eschen sind mit zwei Jahren noch jung und weisen Unregelmäßigkeiten in der Entwicklung auf, das zu unvollständigen Daten führen kann. Der Austrieb war insbesondere betroffen, da viele Bäume seitlich austrieben oder keine Primärknospen zu bestimmen war. Anfang 2023 wurde eine neues Reference Genome für *Fraxinus excelsior* veröffentlich, welches auf Basis von Pseudo-Chromosomen ist und eine Verbesserung zum alten Reference-Genom (Sollars et al. 2017) darstellt. Für die 910 Individuen haben wir das neue Reference Genome verwendet um erneut SNPs zu generieren. Dies trägt dazu bei, die Qualität der Genetische Karten zu verbessern und weitere Genorte im Zusammenhang mit ETS zu bestimmen.

Dieser Teil ist noch nicht abgeschlossen und die Daten werden derzeit weiter ausgewertet. Mit den neu erstellten genetischen Karten, basierend auf dem neuen Reference Genom, werden wir zusätzlich die QTL-Analysen wiederholen und mit den Ergebnissen aus Arbeitspaket 8 vergleichen.

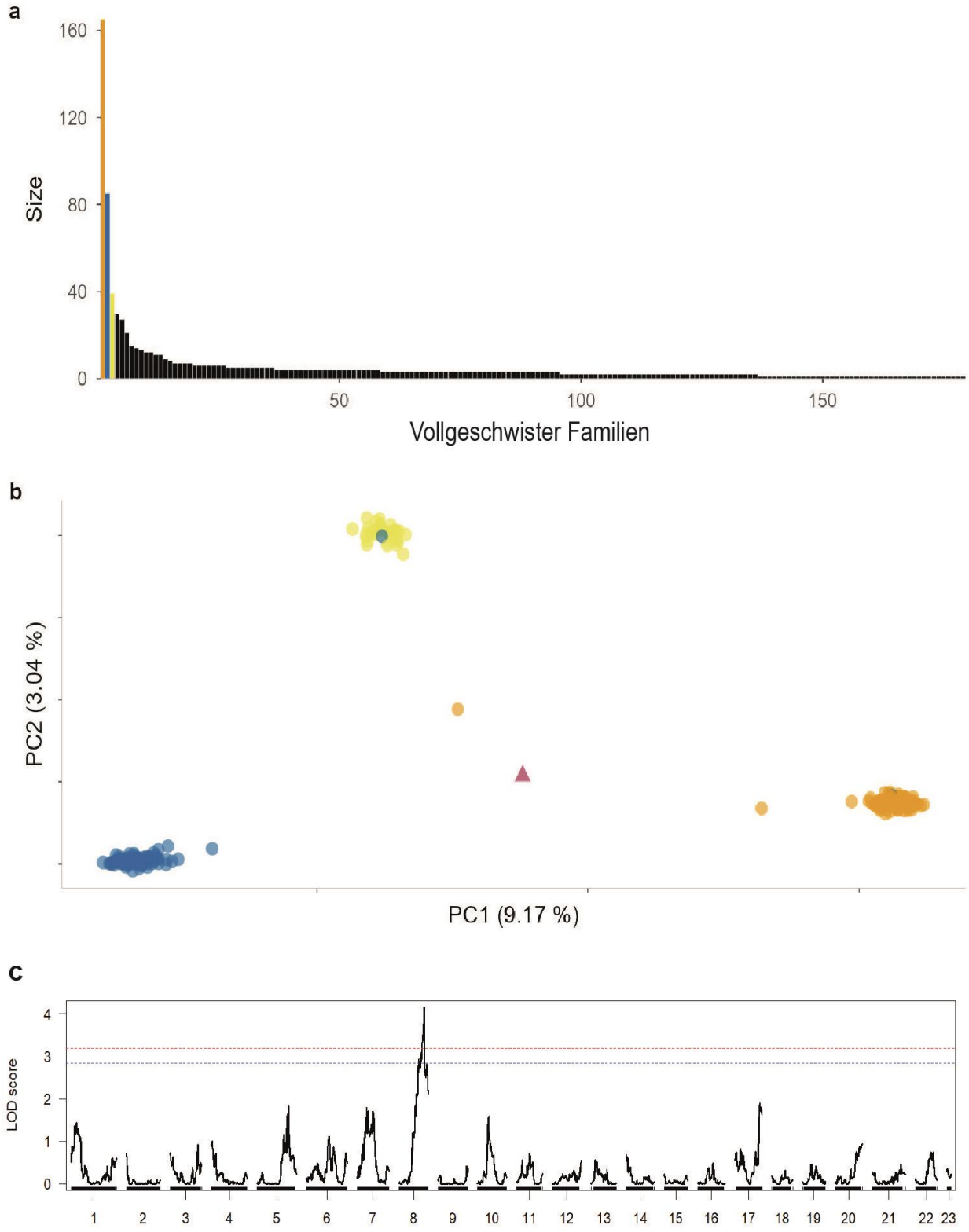


*Abbildung 12: Vollgeschwister Identifikation mit SSR- und SNP Markern und QTL Analyse für Unterschiede im Eschentriebsterben. (**a**) Das Balkendiagramm zeigt die mit SSR Markern bestimmte Familien und die jeweilige Größe dieser Familien. Die drei ausgewählten Familien, mit einer Größe von über 30 Individuen wurden farbig markiert. (**b**) Die Principal Component-Analyse (PCA) zeigt die Ergebnisse der SNP Marker, die Färbung der Kreise spiegelt die Ergebnisse der SSR Marker wider. Das rote Dreieck repräsentiert den Mutterbaum. (**c**) QTL-Analyse für Eschentriebsterben zeigt eine signifikante Genotyp-Phänotyp Assoziation auf der Kopplungsgruppe (Linkage Group) 8. Dieser Bereich scheint für die Unterschiede in der Bildung von Nekrosen von Bedeutung zu sein.*

Die Erarbeitung der fünf de novo Genome der Esche wurde das Standard Extraktions-Protokoll für hoch molekulare DNA verworfen, da es keine guten Ergebnisse erbracht hat. Ein neues DNA Extraktions-Protokoll wurde erstellt und hat zu guten Ergebnissen geführt. Die jeweilige Veröffentlichung folgt im Frühjahr 2024. Die Fertigstellung der de novo Genome, kann auf Grund der Dauer der Analyse nicht mehr innerhalb dieses Projektes fertig gestellt werden.

AP 10 Biomarker und Sekundärstoffwechsel

Im Fokus des Arbeitspakets stand die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen dem ETS und phenolischen Sekundärmetaboliten der Esche. Ein Schwerpunkt lag in der Analyse von Phenolgehalten in Blattproben von den verschiedenen IBF in mehreren Jahren. Die beprobten Bäume gehörten zu dem Probenpool, der auch von verschiedenen anderen Projektpartnern untersucht wurde. Insgesamt konnten wenig Zusammenhänge zwischen der Infektionsanfälligkeit und dem Gehalt an Phenolen hergestellt werden. Andere Faktoren scheinen einen größeren Einfluss auf die Phenolprofile zu haben. Unterschiede zwischen den Flächen zeigten sich als größter Faktor bezüglich der Variabilität der Phenole (Abbildung 13 a). Jahresunterschiede spielten ebenfalls eine Rolle. Unterschiede zwischen Boniturstufen waren zwar bei einzelnen Biomarkern und Einzelphenolen zu sehen, jedoch insgesamt gering (Abbildung b). Auch wenn im Beispiel für Fläche BB1 ein leichter Trend zu höheren Gehalten in Boniturstufe 1 vorhanden zu sein schien, waren die Unterschiede nicht unbedingt signifikant und nicht in gleicher Weise auf anderen Flächen zu beobachten, was u.a. auch an fehlenden Bäumen insbesondere in den geringeren Schadstufen lag. Generell waren die Beobachtungen Substanz-spezifisch, d.h. die einzelnen Phenole zeigten z.T. unterschiedliche Tendenzen. Die Beobachtungen hinsichtlich von Gehaltsunterschieden zwischen Boniturstufen und der Kombination von Substanzen, auf die solche Trends zutrafen, unterschieden sich jedoch im Vergleich der Flächen. Qualitative Unterschiede im Phenolprofil (Vorhandensein/Fehlen bestimmter Substanzen), die Unterschiede in der Infektionsanfälligkeit erklären könnten, wurden nicht gefunden. Auch könnten die Ergebnisse die Hinweise auf eine quantitative Resistenz gegenüber dem ETS bestätigen, welche z.B. von Sambles et al. 2017 vermutet wird. Eine Verallgemeinerung von Beobachtungen ist deshalb schwierig und bestimmte einzelne Sekundärmetabolite ließen sich auf Basis der vorliegenden Ergebnisse bisher nicht als biologische Marker zur Charakterisierung toleranter Genotypen identifizieren.

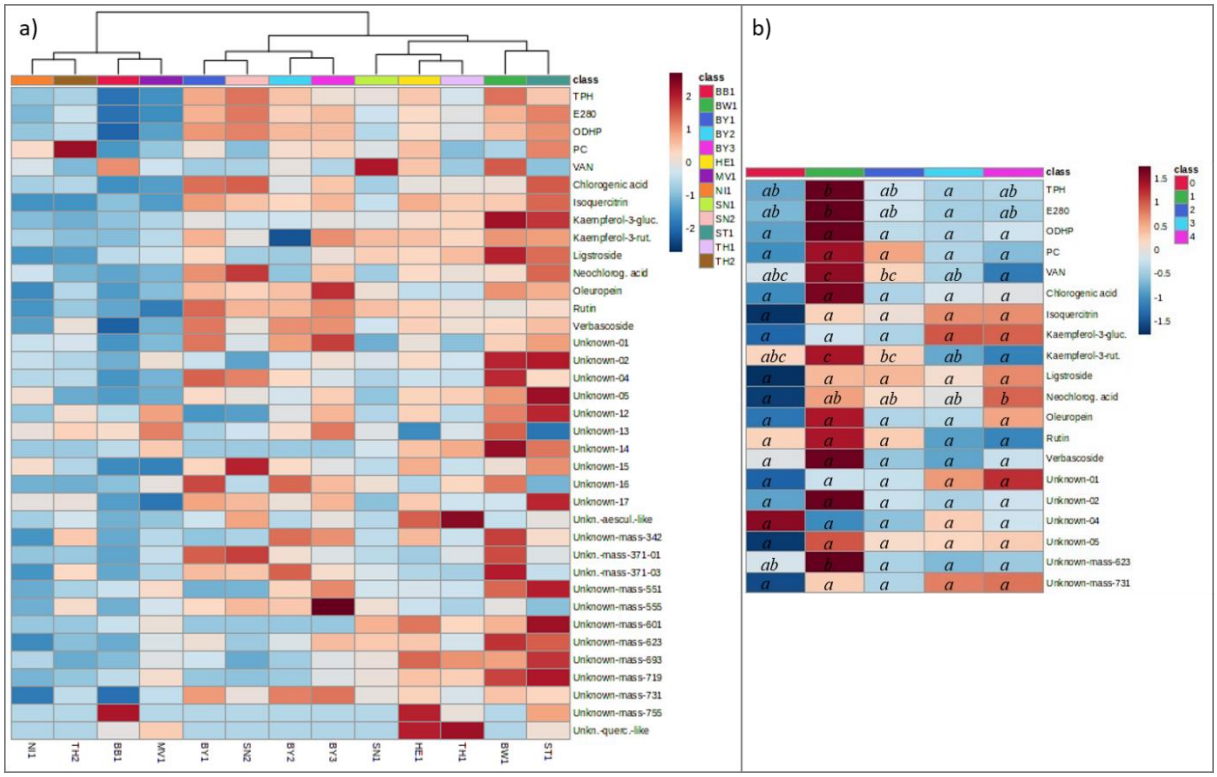
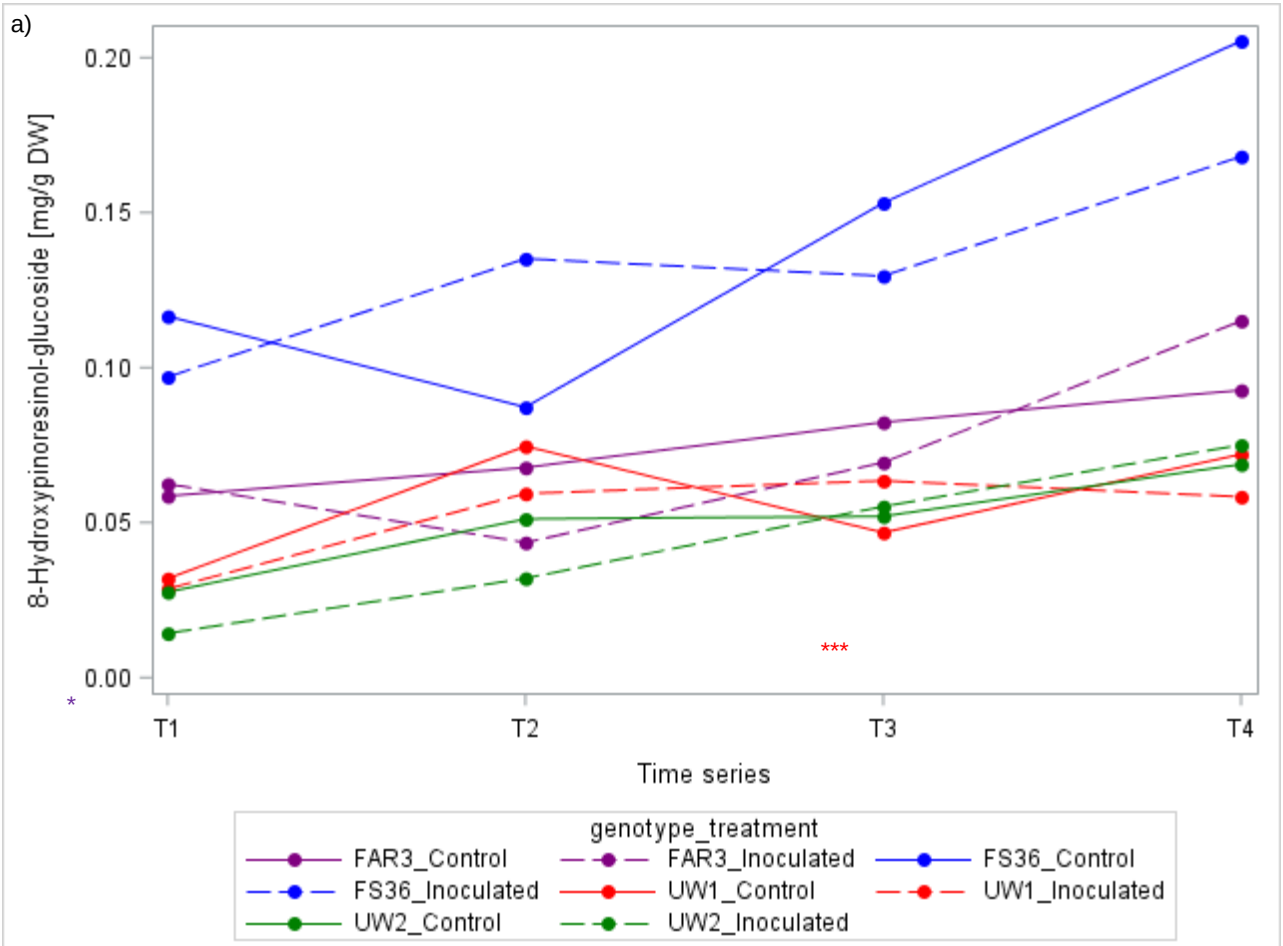
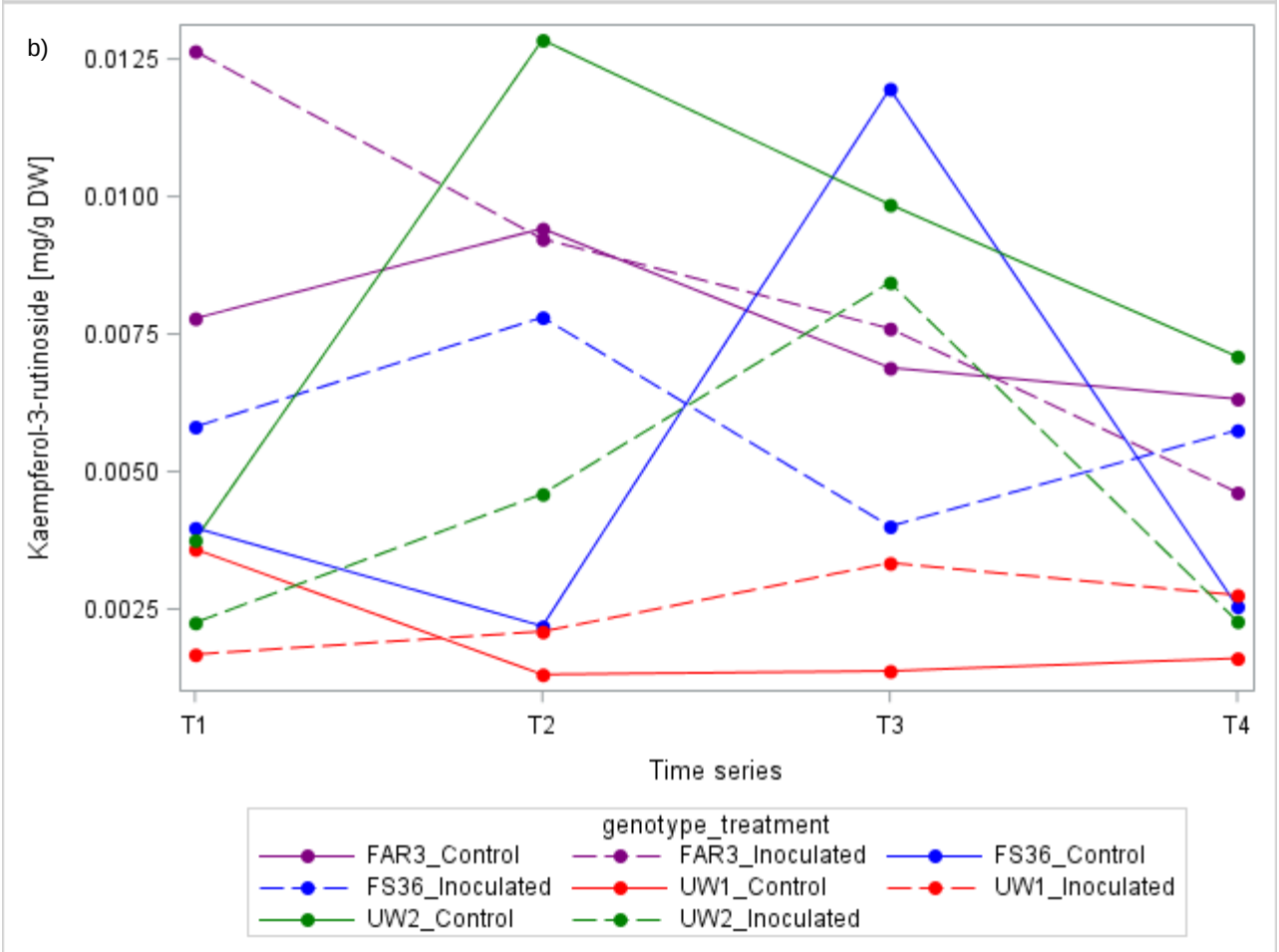


Abbildung 13 Heatmap verschiedener Phenole a) im Vergleich der IB-Flächen, b) im Vergleich der Boniturstufen 0-4. Biomarker: TPH=Gesamtphenole, E280=Extinktion bei 280 nm, ODHP=Ortho-Dihydroxyphenole. PC=Procyanidine, VAN=Vanillin-positive Verbindungen.
a) Cluster mit Mittelwerten (normalisiert) pro Fläche, Daten Blatt 2021
b) Fläche BB1, Mittelwerte (normalisiert) der Jahre 2019-2022, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Boniturstufen, Stufe 0 n=3,1 n=8, 2 n=24, 3 n=29, 4 n=11

Weiterhin wurden Blätter aus einem kontrollierten Infektionsversuch (durchgeführt an der Uni Göttingen) analysiert. Der Versuch umfasste Klone unterschiedlicher Anfälligkeit und verschiedener Herkunft (Mecklenburg-Vorpommern und Bayern). Die bayrischen Klone wurden außerdem zu vier verschiedenen Zeitpunkten beprobt. Auch hier zeigten sich keine verallgemeinerbaren Zusammenhänge zur Infektionsanfälligkeit, da die Beobachtungen spezifisch vom Klon und Einzelsubstanzen abhingen (14). Dennoch könnten Unterschiede zwischen Genotypen interessant sein, die auf eine Genotyp-spezifische Reaktion hindeuten (siehe auch Ergebnisse zur Genexpression durch Uni Göttingen). Soweit Unterschiede hinsichtlich der Phenolgehalte zwischen infizierten und Kontrollpflanzen oder zwischen stärker und geringer anfälligen Klonen ermittelt wurden, traten diese nur bei einzelnen Klonen zu einzelnen Zeitpunkten auf und betrafen je nach Klon und Zeitpunkt unterschiedliche Einzelsubstanzen. Der Faktor Herkunft schien auch hier eine Rolle zu spielen, da die bayrischen Klone mehr Substanzen mit höheren Gehalten im weniger anfälligen als im anfälligeren Phänotyp aufwiesen und die Klone aus Mecklenburg-Vorpommern mehr Substanzen mit höheren Gehalten im anfälligeren Phänotyp. Außerdem waren die Gehalte vieler Einzelphenole in den Klonen aus Mecklenburg-Vorpommern höher als in den bayrischen, was v.a. auf die jeweils stärker Anfälligen zutraf.


a)
8-Hydroxypinoresinol-glucoside [mg/g DW]
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
***
*
T1
T2
T3
T4
Time series
genotype_treatment
FAR3_Control
FAR3_Inoculated
FS36_Control
FS36_Inoculated
UW1_Control
UW1_Inoculated
UW2_Control
UW2_Inoculated


b)
Kaempferol-3-rutinoside [mg/g DW]
0.0125
0.0100
0.0075
0.0050
0.0025
T1
T2
T3
T4
Time series
genotype_treatment
FAR3_Control
FAR3_Inoculated
FS36_Control
FS36_Inoculated
UW1_Control
UW1_Inoculated
UW2_Control
UW2_Inoculated

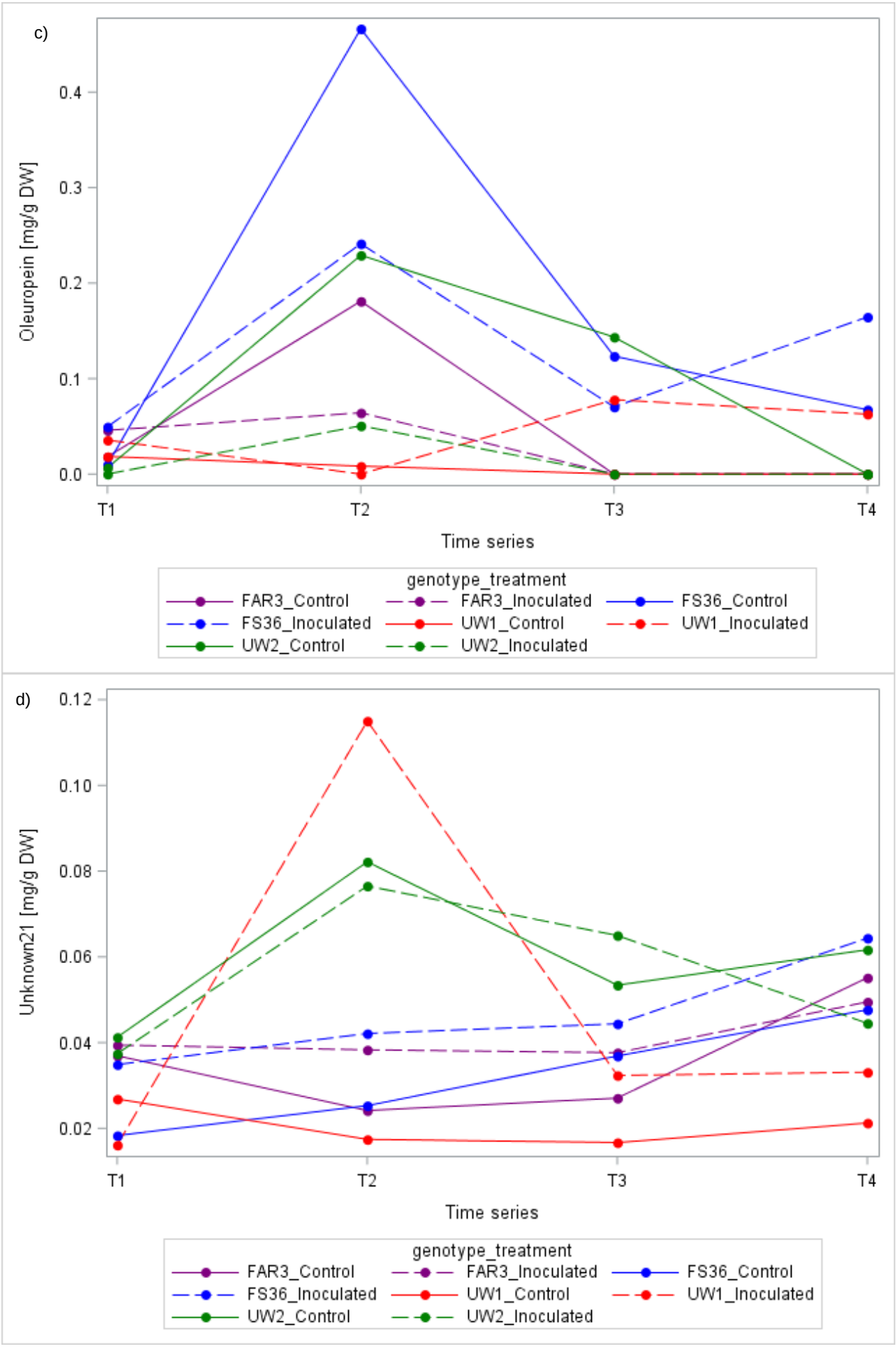


*Abbildung 4 Gehalte von a) 8-Hydroxypinoresinol-Glucosid, b) Kaempferol-3-Rutinosid, c) Oleuropein, d) Unknown21 in vier Genotypen pro Behandlung und Beprobungszeitpunkt. ***signifikant bei p<0,05, *signifikant bei p<0,1 (Wilcoxon-Rangsummertest je Genotyp und Zeitpunkt)*

Eine Auswahl von Genotypen wurde 2021 und 2022 als Pfropfungen vermehrt. Sie umfassten nach dem Beobachtungsstand zum Zeitpunkt der Reisergewinnung möglichst gesunde und möglichst geschädigte Bäume. Blattproben wurden je einmal pro Vegetationsperiode gewonnen. Konsistente Unterschiede zwischen anfälligen und weniger anfälligen Klonen hinsichtlich ihrer Phenolgehalte konnten auch hierbei nicht festgestellt werden.

Verschiedene physiologische Biomarker wurden vom LFE untersucht (siehe auch Bericht im Unterverbund FraxMon). Es wurden hohe Korrelationen zwischen den photometrisch bestimmten Biomarkern Gesamtphenole, Ortho-Dihydroxyphenole und E280 (Extinktion bei 280 nm) mit verschiedenen mittels HPLC bestimmten Einzelphenolen (u.a. Chlorogensäure, Verbascosid, Rutin, Isoquercitrin, Kaempferol-3-rutinosid) berechnet (siehe 3. Zwischenbericht). Dies zeigt, dass sich ein Teil der Ergebnisse der mit verschiedenen Methoden bestimmten Phenolgehalte miteinander verknüpfen und sich Gesamtgehalte mit der Zusammensetzung an Einzelsubstanzen ergänzen lassen.

Auch wenn sich zwischen den untersuchten Phenolen und der Infektionsanfälligkeit kein konsistenter Zusammenhang herstellen ließ, war die angewendete HPLC-Methode geeignet, um ein breites Spektrum an verschiedenen phenolischen Sekundärmetaboliten in verschiedenen Kompartimenten der Esche (Blatt, Holz aus Trieben und Stamm, Rinde) zu detektieren. Dazu gehörten Phenolsäuren, Flavonoide, Lignane, Phenylethanoidglykoside und Secoiridoidglykoside. Mithilfe der HPLC-MS-Analytik ließen sich erwartungsgemäß nicht alle Substanzen identifizieren, welches durch Ergänzung von NMR-Analytik möglich wäre.

Neben Blattproben wurden, in geringerem Umfang, auch Proben von Trieben, Stamm und Rinde untersucht. Die meisten Proben stammten dabei von den IBF. Auch hier ließen sich Phenole aus verschiedenen Gruppen detektieren, insbesondere Cumarine (siehe 2. Zwischenbericht). Klare Schlussfolgerungen zum Zusammenhang mit der Infektionsanfälligkeit waren nicht möglich. Einflüsse von Stamm- bzw. Triebnekrosen auf den Phenolgehalt im betroffenen Bereich konnten aber festgestellt werden.

Bei der Untersuchung von Verknüpfungen mit genetischen Markern an Proben der IBF wurden Zusammenhänge zwischen genetischen Clustern, denen verschiedene Herkünfte zugeordnet wurden, mit Phenolgehalten gefunden. Es zeigte sich eine ähnliche Zuordnung der Bäume anhand der Phenolgehalte wie anhand der Genpools.

Die Untersuchung von Zusammenhängen mit der Infektionsanfälligkeit wurde maßgeblich durch die Charakterisierung von Eschen als anfällig oder tolerant beeinflusst. Um rechtzeitig Pflanzen-/Probenmaterial gewinnen zu können, musste diese schon zu Projektanfang erfolgen. Da zu diesem Zeitpunkt größtenteils noch keine langfristigen Beobachtungen vorhanden waren und auch die Ergebnisse der Plusbaumselektion inklusive beispielsweise Resistenztests erst zu Projektende vorlagen, ist die Charakterisierung mit einer Unsicherheit belegt. Dies könnte die hohe Variabilität und die Uneindeutigkeit von Zusammenhängen teilweise erklären. Weiterhin fehlten bei der Analyse der Bäume von den IBF aufgrund der Fortentwicklung des ETS zunehmend Exemplare mit Schadstufe 0 und damit Vergleichsbäume zur Differenzierung zwischen geschädigten und ungeschädigten Eschen. Damit werden auch Aussagen darüber erschwert, ob unterschiedliche Phenolgehalte, soweit vorhanden, eine Ursache oder Reaktion für/auf eine Infektion sind.

Literatur:

Sambles, C. M., Salmon, D. L., Florance, H., Howard, T. P., Smirnoff, N., Nielsen, L. R., McKinney, L. V., Kjær, E. D., Buggs, R. J. A., Studholme, D. J., Grant, M.: Ash leaf metabolomes reveal differences between trees tolerant and susceptible to ash dieback disease. Scientific Data 4 (1) 2017 p. 170190.

AP 11 Genetische Charakterisierung der Bestände des Intensivmonitorings (Core-Bestände) mit SNPs und Mikrosatelliten

Auf den 14 Intensivbeobachtungsflächen wurden von je ca. 100 Individuen (50 Altbäume, 50 Bäume der Naturverjüngung, Tabelle 8) Blattproben gewonnen. Aus diesen wurde im Folgenden DNA extrahiert. Insgesamt wurden 1370 Individuen mittels Fragmentlängenanalyse genotypisiert. Hierfür wurden 12 Kern-Mikrosatellitenmarker (nSSR) und 8 Chloroplasten-Mikrosatellitenmarker (cpSSR) verwendet. Diese genetische Inventur konnte im Projekt abgeschlossen werden und beschreibt die aktuelle genetische Ausstattung der Esche auf den Intensivbeobachtungsflächen in Deutschland. Sie ist Grundlage für die zukünftige Bewertung der genetischen Entwicklung der Esche.

Tabelle 8: Anzahl beprobter Bäume je Intensivbeobachtungsfläche

Population	Altbäume	Naturverjüngung	
BB1	48	50	
BW1	52	50	
BW2	50	50	
BY1	49	50	
BY2	52	50	
BY3	47	49	
HE1	48	50	
MV1	46	51	
NI1	50	52	
SN1	28	49	
SN2	50	50	
ST1	51	50	
TH1	46	50	
TH2	50	52	
Gesamt	667	703	1370

Des Weiteren konnte somit die genetische Struktur der Esche beschrieben werden. Zusätzlich wurden 384 Individuen mittels SNP-Array (4TREE SNP-Array; Guilbaud et al. 2020) genotypisiert. Hierfür wurde qualitativ hochwertigere DNA erneut extrahiert. Somit stehen für ca. 27 Altbäume je Versuchsfläche zusätzliche Genotyp Daten von 13.407 SNPs zur Verfügung. Diese adaptiven Marker können Aussagen über möglicherweise tolerantere Genotypen liefern.

AP 12 Genetische Struktur von Hymenoscyphus fraxineus

Für das Arbeitspaket wurde eine Reihe von nukleären Mikrosatelliten-Markern getestet. Testpopulation war die DNA von 40 Isolaten aus dem Teilprojekt 2 des Verbundes FraxPath (JKI). Von den 18 getesteten Primerpaaren können 14 verwendet werden. Von den 40 Pilz-Isolaten konnten für 39 Isolate alle 14 Loci amplifiziert werden. Damit stand ein stabiles Markersystem für die Untersuchungen der genetischen Struktur zur Verfügung.

Die Arbeiten konnten erfolgreich beendet werden. Die Alleltabellen aus der Mikrosatellitenanalyse der *Hymenoscyphus*-Isolate wurden dem Teilvorhaben 4.2 (JKI, Maia Ridley, Rasmus Enderle) des Verbundes FraxPath zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden mit derselben Methode Alleltabellen für *Hymenoscyphus*-Isolate aus Stammfußnekrosen erstellt. Diese wurden dem Teilvorhaben 4.1 (NW-FVA, Sandra Peters, Gitta Langer) des Verbundes FraxPath zur Verfügung gestellt.

2. Verwertung

- AP2: Die Selektion der Plusbäume stellt die bundesweite Sicherung von 643 Eschen dar, die über den Projektzeitraum phänotypisch in Bezug auf ihre Widerstandskraft gegenüber dem Eschentreibsterben erfasst worden sind. Sie stehen als Mutterbäume der weiteren Forschung zur Verfügung und dienen dem Aufbau einer potentiell widerstandfähigen Eschenpopulation durch die Anlage von Samenplantagen (s. APs 4 und 5). Anhand der Plusbäume konnte in einem zeitlich begrenzten Rahmen die Dynamik des Eschentriebsterbens an heterogenen Waldstandorten dokumentiert werden und Erkenntnisse zur Anfälligkeit von Eschen gewonnen werden. Eine Fortführung der phänotypischen Erfassung der Plusbäume über einen längeren Zeitraum ist aus wissenschaftlicher Sicht von besonderer Bedeutung für die Validierung der gewonnenen Erkenntnisse. Die Selektionskriterien haben sich, innerhalb des Projektzeitraums von 3 Jahren, als geeignet herausgestellt.

- AP5: Die Genotypisierung der Plusbäume macht eine Zusammenstellung von Plusbaumkollektiven mit hoher genetischer Vielfalt möglich. Kenntnis über die genetische Vielfalt der selektierten Plusbäume ist Basis für die Erzeugung von hochwertigem und möglichst diversem Vermehrungsgut. Samenplantagen, die mit diesem Plusbaummaterial angelegt werden, können vielfältiges Saatgut produzieren.

- AP 7: Aufgrund der Verwendung des standardisierten SNP-Arrays konnten Daten gewonnen werden, die mit den Daten anderer europäischer Forschungsinitiativen verglichen und somit in einen übergreifenden Kontext gesetzt werden können. Zukünftige genomische Vorhersagemodelle sollten mit weiteren Populationen und genau bestimmten Phänotypen aus Dauerbeobachtungen erweitert und durch spezifischere SNP-Arrays ermittelt werden. Die genomischen Modelle werden der Selektion in Nachkommenschaftsprüfungen, der Naturverjüngung und von Saatgutpartien dienen. Durch diese Methode können weniger anfällige Eschen zukünftig einfacher, schneller sowie kostengünstiger identifiziert werden und für Generhaltungsprogrammen, Samenplantagen oder Züchtung verwendet werden.

- AP11: Die Genotypisierung der Intensivbeobachtungsflächen beschreibt den aktuellen genetischen Zustand der Esche. Dies dient zudem als Referenz für zukünftige Untersuchungen. Desweitern kann untersucht werden inwiefern sich die Plusbaumselektion zu den natürlichen Eschenpopulationen aus genetischer Sicht unterscheidet. Aktuell ist die Empfehlung möglicher toleranter Genotypen noch nicht möglich, hierzu sollten die vorläufigen Ergebnisse mit denen aus AP 7 validiert werden.

3. Erkenntnisse von Dritten

- AP8: Neue Kandidatengene assoziiert mit der Anfälligkeit für ETS wurden durch zwei genomweite Assoziationsstudien aus Großbritannien (Stocks et al., 2019) und Dänemark (Doonan et al., 2023) identifiziert. Ein kommerzieller SNP-chip (Genotypisierungstool für Einzelnukleotidpolymorphismen), genannt „4TREE array“, wurde im Rahmen des Europäischen Projekts B4EST entwickelt und kann über Thermo-Fisher genutzt werden. Bislang sind jedoch weiterhin keine Einzelnukleotidpolymorphismen mit großem Effekt auf die Anfälligkeit für ETS bekannt. Außerdem wurde eine Transkriptomstudie (Sahraei et al., 2020) veröffentlich, in der die Autoren differentielle Genexpression in Wunden verursacht durch *Hymenoscyphus fraxineus* in Ästen untersuchten. Diese Studie ist sehr hilfreich, um unsere Ergebnisse zu diskutieren. Es gibt bislang allerdings keine Studie, die die Genexpression in Blättern nach Infektion mit *H. fraxineus* beschreibt, obwohl dies der typische Infektionsweg ist.

4. Veröffentlichungen

AP2

- Fuchs, S.; Peters, S.; Beckschäfer, P.; Osewold, J.; Fey, C.; Langer, G.; Nagel, R.-V.; und Höltken, A. M. (2023): FraxForFuture: Ein Verbundprojekt zum Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart. Waldzustandsberichte 2023 der NW-FVA-Trägerländer, z.B. Niedersachsen, S. 37–39. https://doi.org/10.5281/zenodo.10082692
- Dreist, M.; Fey, C.; Höltken, A.M. (2022): Selektion von Plusbäumen zum Erhalt der Gemeinen Esche, Teilergebnisse der NW-FVA im Verbundvorhaben FraxGen des Demonstrationsprojekts FraxForFuture. Poster: Waldklimafonds-Kongress, Göttingen, 11-12 Oktober 2022
- Seidel H., Kunert G., Dounavi A., Past F., Bubner B., Budde K.B., Rentschler F., Körtels E., Dreist M., Fey C., Steinigen T., Siemokat P., Fussi B. (2023): Genetic characterisation of selected Fraxinus excelsior L. trees with low susceptibility to ash dieback. Poster, Second EVOLTREE Conference Resilient Forest for the Future, Brasov, Romania, 12-15 September 2023
- Fey, C.; Höltken, A.M.; Klippert, N.; Safranek, L.; Wagner, I.; Zander, M.; Ulrichs, C. (2023): In-vitro-Verfahren zur Sicherung von Eschen-Plusbäumen und ihren Nachkommen. Poster: Demonstrationsvorhaben FraxForFuture, Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen, 26-29 September 2023
- Seidel, Hannes et al. (in review) Hope for ash conservation and propagation - single individuals can be highly resilient to an invasive pathogen, Artikel für Sonderausgabe zu FraxForFuture in Journal of Plant Diseases and Protection
-

AP 4

- Fuchs, S.; Peters, S.; Beckschäfer, P.; Osewold, J.; Fey, C.; Langer, G.; Nagel, R.-V.; und Höltken, A. M. (2023): FraxForFuture: Ein Verbundprojekt zum Erhalt der Esche als Wirtschaftsbaumart. Waldzustandsberichte 2023 der NW-FVA-Trägerländer, z.B. Niedersachsen, S. 37–39. https://doi.org/10.5281/zenodo.10082692
- Seidel H., Kunert G., Dounavi A., Past F., Bubner B., Budde K.B., Rentschler F., Körtels E., Dreist M., Fey C., Steinigen T., Siemokat P., Fussi B. (2023): Genetic characterisation of selected Fraxinus excelsior L. trees with low susceptibility to ash dieback. Poster, Second EVOLTREE Conference Resilient Forest for the Future, Brasov, Romania, 12-15 September 2023
- Fey, C.; Höltken, A.M.; Klippert, N.; Safranek, L.; Wagner, I.; Zander, M.; Ulrichs, C. (2023): In-vitro-Verfahren zur Sicherung von Eschen-Plusbäumen und ihren Nachkommen. Poster: Demonstrationsvorhaben FraxForFuture, 63. Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen, 26-29 September 2023
- Bubner, B., Past F., Fussi B., Seidel H., Rentschler F., Körtels E., Dreist M., Fey C., Wolf H., Steinigen T., Siemokat P., Ridley M. (2023): Deutschlandweite Selektion und Testung von Eschen (*Fraxinus excelsior* L.) mit Toleranz gegenüber dem Eschentriebsterben: Ergebnisse mit Genotypen aus der Pfropfsaison 2022. Vortrag: 63. Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen, 26-29 September 2023
- Siemokat P., Bubner B., Höltken A., Fussi B., Wolf H., Meyer M., Rentschler F., Kunert G., Past F., Seidel H., Fey C., Dreist M. (2023): Plusbaumauswahl, generative Nachkommenschaften, Klonarchive & Samenplantagen. Poster: Demonstrationsvorhaben FraxForFuture, 63. Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen, 26-29 September 2023
- Dreist, M.; Fey, C.; Höltken, A.M. (2022): Selektion von Plusbäumen zum Erhalt der Gemeinen Esche, Teilergebnisse der NW-FVA im Verbundvorhaben FraxGen des

Demonstrationsprojekts FraxForFuture. Poster: Waldklimafonds-Kongress, Göttingen, 11-12 Oktober 2022

AP 5 und 7

- Teilresistente Eschen zeigen nach Jahren hohen Infektionsdrucks kaum Symptome des Eschentriebsterbens, Vortrag bei 7. Sektionstagung Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung (Seidel et al. 2022)
- 105 Eschen-Plusbäume ausgewählt und vermehrt, Artikel in LWF aktuell (Seidel und Fussi 2023)
- Ergebnisse der forstgenetischen Forschung zum Eschentriebsterben, Poster bei FowiTa (Seidel et al. 2023a)
- Genetic characterisation of selected *Fraxinus excelsior* L. trees with low susceptibility to ash dieback, Poster bei EVOLTREE (Seidel et al. 2023b)
- Multiple, single trait GWAS and supervised machine learning reveal the genetic architecture of *Fraxinus excelsior* tolerance to ash dieback in Europe, Artikel auf bioRxiv (Doonan et al. 2023)
- Seidel, Hannes; Šeho, Muhidin; Hamberger, Joachim und Fussi, Barbara (2023) Forstgenetische Aktivitäten zum Erhalt der Esche, Vortrag: 5. Wissenschaftliches Symposium – Natur- und Artenschutz bei integrativer Waldbewirtschaftung (BaySF)

AP8

- Hartung, T., Budde, K.B., & O. Gailing. 2022. Characterisation of nuclear microsatellite (SSR) markers for European ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their transferability across six related species. Silvae Genetica 71: 65-71. DOI:10.2478/sg-2022-0008
- Ferrari, R.C., Chano, V., Shrestha, K., Dominguez-Flores, T., Ridley, M., Fussi, B., Seidel, H., Steiner, W., Gailing, O. & K.B. Budde (in Review) Transcriptional profiling of *Fraxinus excelsior* leaves during the early infection phase of ash dieback. Journal of Plant Diseases and Protection.
- Ferrari, R.C., Chano, V., Shrestha, K., Dominguez-Flores, T., Ridley, M., Fussi, B., Seidel, H., Bubner, B., Past, F., Gailing, O. & K.B. Budde (in Review) Transcriptional profiling of susceptible and tolerant *Fraxinus excelsior* genotypes during the early infection phase of ash dieback.
- Chano, V., Ferrari, R.C., Shrestha, K., Dominguez-Flores, T., Ridley, M., Fussi, B., Seidel, H., Bubner, B., Past, F., Gailing, O. & K.B. Budde (in Vorbereitung)) A time series of the transcriptional response of susceptible and tolerant *Fraxinus excelsior* genotypes during the early infection phase of ash dieback.
- Shrestha, K., Häuser, H., Köhler A., Nehls, H., Kätzel, R., Budde, K.B. & O. Gailing (in Vorbereitung) Population genetic structure, ash dieback and expression of biomarkers in Northern and Central German *Fraxinus excelsior* populations.
- Chano, V., Ferrari, R.C., Budde, K.B. & O. Gailing (in Vorbereitung). Validation of new candidate gene SNP markers for ash dieback tolerance.

AP9

- Krautwurst, Melina, Past, Franziska; Kersten, Birgit; Bubner, Ben; Müller, Niels A. Identification of full-sibling families from natural single-tree ash progenies based on SSR markers and genome-wide SNPs (preprint). DOI: 10.1101/2023.07.18.549475

- Melina Krautwurst, Annika Eikhof, Sylke Winkler, Daniel Bross, Birgit Kersten, Niels A. Müller (in Vorbereitung). High-molecular-weight DNA extraction for broadleaved and conifer tree species.
- Melina Krautwurst, Franziska Past, Ben Bubner, Birgit Kersten, Niels A. Müller (in Vorbereitung). QTL analyses for ash dieback susceptibility in common ash (*Fraxinus excelsior).*
- Melina Krautwurst, Franziska Past, Ben Bubner and Niels A. Müller. QTL analyses for ash dieback tolerance and bud burst in common ash (*Fraxinus excelsior*).
  Poster: Plant and Animal Genome Conference, San Diego, USA, January 2023
- Melina Krautwurst, Franziska Past, Ben Bubner and Niels A. Müller. QTL analyses for ash dieback tolerance and bud burst in common ash (*Fraxinus excelsior*).
  Poster: EvolTree Conference, Brasov, Romania, September 2023
- Melina Krautwurst, Franziska Past, Ben Bubner and Niels A. Müller. Genetische Architektur des Eschentriebsterbens.
  Poster: Demonstrationsvorhaben FraxForFuture, 63. Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen, 26-29 September 2023

AP12

- Sandra Peters, Nina Gruschwitz, Steffen Bien, Sebastian Fuchs, Ben Bubner, Viktoria Blunk, Gitta Jutta Langer, Ewald Johannes Langer. 2024. The fungal predominance in stem collar necroses of Fraxinus excelsior: a study on *Hymenoscyphus fraxineus* multilocus genotypes Journal of Plant Diseases and Protection DOI:10.1007/s41348-024-00912-2

Qualifikationsarbeiten

- Tina Hartung 2021. Characterisation of nuclear microsatellite markers for European ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their transferability across six related species. Masterarbeit Universität Göttingen
- Viktoria Blunk 2022 Laboretablierung eines Mikrosatellitenassays für *Hymenoscyphus fraxineus*. Bachelorarbeit Berliner Hochschule für Technik Berlin
- Nina Gruschwitz 2023 Mikrosatellitenanalyse zur Unterscheidung von *Hymenoscyphus fraxineus* Multilocus-Genotypen in Stammfußnekrosen. Bachelorarbeit Technische Universität Braunschweig

ANHANG

Teilvorhaben 1 TI (2219WK21A4)

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Auslese, Charakterisierung und Erhalt vitaler Plusbäume der Esche sowie Untersuchungen zu genetischen Ursachen der Resistenz gegenüber dem Eschentriebsterben

Bearbeitete Arbeitspakete

AP1 Koordinierung des Unterverbundes Genetik/Züchtung

AP2 Plusbaumauswahl und Phänotypisierung

AP3 Genotypisierung des Plusbäume

AP4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen

AP5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfung

AP6 In-vitro-Vermehrung

AP9 Genetische Architektur

AP12 Genetische Struktur von *Hymenoscyphus fraxineus*

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

AP1 Koordinierung des Unterverbundes Genetik/Züchtung
Im Arbeitspaket 1 wurden die Arbeiten im Verbund FraxGen koordiniert. Wichtige Instrumente dafür waren die Initiierung, Organisation und Durchführung von Treffen und Besprechungen im Verbund. Weiterhin nahm die Verbundleitung an allen Verbundleiterbesprechungen teil, die von FraxConnect organisiert wurden. Details dazu sind im Hauptteil II zu finden.

AP2 Plusbaumauswahl und Phänotypisierung
Anhand des im Projekt entwickelten Boniturschlüssels (Peters et al. 2021) und der Qualitätskriterien-Auswahl konnte im Teilprojekt 1 mit der Sommer- Winterbonitur 79 Plusbäume im Raum Brandenburg selektiert werden (Tabelle 9). Da Fruchttragende Bäume in der Regel eine schlechtere Vitalität aufweisen, aber für das Projektziel fruchttragende Bäume unerlässlich sind, wurden die Boniturgrenzen verändert. Im zweiten Boniturjahr wurden auch Bäume mit schlechterer Vitalität (Note 2) selektiert, sobald diese Früchte trugen.

In Vergleich zum Zwischenbericht reduzierte sich die Anzahl von 88, da sich 9 Plusbäumen als *Fraxinus pennsylvanica* herausstellten.

In der Regel wurde im Sommer die Vitalitätsnote 1 oder 2 bei den Bonituren vergeben. In der Übersicht fällt auf, dass im Winter in der Regel eher schlechtere Noten vergeben wurde (Note 3).

Tabelle 9 Übersicht über Plusbäume Teilprojekt 1

Forstamt	**Revier**	**Plusbäume**	**Ø Vitalität Sommer**	**Ø Vitalität Winter**
Bad Wilsnack	Meyenburg	17	2,1	2,5

Schäferberg	Grünaue	7	2	3,2
Werder Hof	Templiner Stadtwald	4	2	2,5
Schönemark	Boitzenburg	8	2,6	2,25
Randowbruch	Milmersdorf	9		
Wünsdorf	Großbeeren	13		
Wünsdorf	Ludwigsfelde	3		
Boitzenburg	Schönermark	18		

AP3 Genotypisierung des Plusbäume

Für die Genotypisierung wurden Proben von 79 Plusbaumgenotypen vom Thünen-Institut und 191 Genotypen der NW-FVA. Die Extraktion der DNA aus den Blattproben erfolgte mittels „Franzosenprotokoll“ (Brügmann et al. 2022). Die Analyse erfolgte durch Kapillar-Gelelektrophorese mit dem abgestimmten Markerset. Die Genotypisierung größtenteils durchgeführt werden. Einzelne missing data konnte bis zum Projektende nicht abgeschlossen werden. Hier besteht Optimierungspotential.

AP4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen

Die Vermehrung der Plusbäume über Pfropfung verlief routiniert und brachte gute Ergebnisse. Veredelt wurde im Winter vor allem mit der Kopulationstechnik, z.T. auch mittels Geißfuß-Technik oder Anplatten. Zur Wundversorgung wurde Rebwachs verwendet. Der Pfropferfolg bewegte sich in der Regel bei > 80 %.

Die Resistenztests (Chip-Test, Ascosporen-Test) wurden an allen Genotypen durchgeführt. Im Ergebnis haben 56 von 61 Genotypen diese Tests bestanden und wurden für die Samenplantage ausgewählt. Die Ergebnisse der 18 Plusbaumgenotypen, die 2023 gepfropft wurden stehen derzeit noch aus.

Im April 2023 wurde die Pflanzung der Samenplantage mit den ausgewählten Plusbaumgenotypen begonnen. Die ca. 2 ha große Fläche liegt bei Buckow (Gemarkung: Buckow, Flur 5, Flurstücke 41, 56, 57, 58, 59, 60; Forstamt Märkisch Oderland, Revier Buckow, Waldgebiert 254 Waldsieversdorf, Abteilung 3327). Geplant wurde die Samenplantage mit dem ONA Paket der r-Statistik Software (Chaloupkova et al. 2016) mit der Verwendung von Platzhaltern für die 2023 gepfropften Genotypen. Pro Genotyp wurden max. 10 Rameten gepflanzt. Der Pflanzabstand betrug 5 m zwischen den Reihen und 3,5 m in der Reihe.

AP5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfung

Insgesamt wurden 34 Saatgutpartien geerntet. 8 Partien stellten sich als *Fraxinus pennsylvanica* heraus. Um ein Überliegen zu vermeiden wurden ausschließlich grüne Früchte und direkt nach der Ernte ausgesät. Die Auflaufzahlen waren schwankend zwischen 0 und 75 %, im Mittel bei rund 24 %. Ein Überliegen konnte trotz Grünernte und Direktsaat teilweise beobachtet werden, weswegen eine Verschulung in der Regel erst nach dem Auflaufjahr erfolgte. Eine Nachkommenschaftsprüfung konnte im Projektzeitraum nicht mehr angelegt werden.

AP6 In-vitro-Vermehrung

Die Arbeiten konzentrierten sich vor allem auf die Erhaltung, Vermehrung und Akklimatisierung bereits in Kultur befindlicher Kulturen. Es wurde auch versucht, bereits in vitro vermehrte Genotypen wieder in der In-vitro-Kultur zu etablieren. Dies gelang nur mäßig.

Ein Austausch von Protokollen und Medientypen aller mit der In-vitro Kultur beschäftigten Teilprojekte hat stattgefunden.

Des Weiteren war es möglich, drei in Kultur befindliche Sämlingsklone für den Projektpartner FraxPath zu bewurzeln und zu kultivieren, so dass am Ende 99 F001_3 Pflanzen, 176 F001_10 Pflanzen und 123 F001_6 Pflanzen für die Versuche FraxPaths in Braunschweig zu Verfügung standen.

Von der Humboldt–Universität wurden ein etablierter Klon und 19 sterilisierte Samen für die Vermehrung übernommen. Sie werden derzeit für die Bewurzelung vorbereitet. 2023 gelang die Akklimatisierung von 680 HS1/0 Pflanzen und 140 FM-Klon Pflanzen.

Für die Veredelung der Plusbaumreiser 2023 konnte bei ca. 1/3 der Unterlagen auf In vitro produzierte Pflanzen zurückgegriffen werden.

AP9 Genetische Architektur
Mithilfe der genomweiten Charakterisierung der Familien konnten wir eine Analyse von allgemeinen genetischen Strukturen durchführen. Zusätzlich zu den allgemeinen genetischen Strukturen wurde mithilfe der genomweiten Daten eine genetische Karte erstellt. Eine QTL-Analyse mit dieser genetischen Karte und dem Merkmal ETS Nekrosen zeigte bereits jetzt im frühen Stadium der Erkrankung einen signifikanten Locus.

AP12 Genetische Struktur von *Hymenoscyphus fraxineus*
Das Mikrosatellitenassay für die populationsgenetischen Analysen wurde anhand von Angaben in der Literatur entwickelt. Insgesamt 18 Loci wurden in drei Primersets getestet. Von den getesteten 18 Primerpaaren können 14 für die weiteren Arbeiten verwendet werden.

Von den 40 Isolaten vom JKI (FraxPath Teilvorhaben 2) konnten 39 Proben analysiert werden. Die Arbeiten konnten erfolgreich beendet werden. Die Alleltabellen aus der Mikrosatellitenanalyse der *Hymenoscyphus*-Isolate wurden dem Teilvorhaben 4.2 (JKI, Maia Ridley, Rasmus Enderle) des Verbundes FraxPath zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden mit derselben Methode Alleltabellen für *Hymenoscyphus*-Isolate aus Stammfußnekrosen erstellt. Diese wurden dem Teilvorhaben 4.1 (NW-FVA, Sandra Peters, Gitta Langer) des Verbundes FraxPath zur Verfügung gestellt.

Literatur:

- Chaloupková, K., Stejskal, J., El-Kassaby, Y.A. et al. (2016) Optimum neighborhood seed orchard design. *Tree Genetics & Genomes* **12**, 105. https://doi.org/10.1007/s11295-016-1067-y
- Brügmann, Tobias; Fladung, Matthias; Schroeder, Hilke (2022): Flexible DNA isolation procedure for different tree species as a convenient lab routine. In: Silvae Genetica 71 (1), S. 20–30. DOI: 10.2478/sg-2022-0003.
- Peters, S.; Langer, G.; Kätzel, R. (2021): Eschentriebsterben – Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), Gülzow-Prüzen, 60 Seiten, ISBN-Nr.: 978-3-942147-44-6.

Teilvorhaben 2 AWG (2219WK21B4)

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das AWG wählt 100 vitale Plusbäume in Bayern anhand der verbundweit festgelegten Plusbaumkriterien aus. Die Auswahl erfolgt auf repräsentativen Flächen, die eine weite Bandbreite an Standort- und Klimabedingungen abdeckt. Hierzu wurden vorrangig Bestände mit einer langen Befallshistorie und hohem Befallsdruck berücksichtigt, sodass bei vital erscheinenden Bäumen mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer geringeren Anfälligkeit ausgegangen werden kann. Von jedem Plusbaum wurden die relevanten Wachstumsparameter erfasst und eine Qualitätsansprache bezüglich Stammform, Kronenarchitektur und weiterer für die Holznutzung relevanter Merkmale durchgeführt. Insgesamt wurde der Gesundheitszustand der ausgewählten Plusbäume zwei bis drei Mal während der Projektlaufzeit bestimmt.

Das AWG übernahm gemeinsam mit dem Thünen-Institut die Genotypisierung aller im Verbundprojekt selektierten Plusbäume. Daher wurde zunächst eine standardisierte Methode zur Analyse und Auswertung der genetischen Proben entwickelt. Aufgrund der genetischen Charakterisierung der selektierten Plusbäume können Plusbaumkollektive mit hoher genetischer Vielfalt zusammengestellt werden.

Das AWG plante mit der Hilfe von Baumkletterern Pfropfreiser von 100 Plusbäumen und Saatgut von ca. 50 Plusbäumen in Bayern zu gewinnen. Die entsprechenden Pfropflinge und Sämlinge wurden durch die FVA-BW angezogen. Diese Pflanzen sollten wiederum durch das AWG auf Versuchsflächen ausgepflanzt werden, um sie mittelfristig zu Samenplantagen umbauen zu können. Auf diesen Flächen soll fortlaufend der Gesundheitszustand der Pflanzen begutachtet werden, um deren Widerstandsfähigkeit belegen zu können.

Aus der Literatur bekannte bzw. derzeit international entwickelte spezifische Toleranzmarker und unspezifische genomische Marker sollten an anfälligen und toleranten Individuen getestet werden, deren Vitalität zum Teil bereits seit mehreren Jahren beobachtet wird. Diese Marker sollten im Folgenden zur Analyse von Untersuchungsmaterial aus dem Verbundprojekt genutzt werden.

Bearbeitete Arbeitspakete

AP 2 Plusbaumauswahl und Phänotypisierung

AP 3 Genotypisierung der Plusbäume

AP 4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen

AP 5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfungen

AP 7 Validierung und Anwendung von bekannten Resistenzmarkern (AWG)

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

AP 2 Plusbaumauswahl und Phänotypisierung

Verbundübergreifend wurden allgemeine Bonituranleitungen zur Beurteilung des Gesundheitszustandes bzw. des Befallsgrades erstellt und verbundintern Qualitätskriterien erarbeitet, aus denen die Selektionskriterien der Plusbäume abgeleitet wurden.

Ausgehend von den Saatguterntebeständen der Bayerischen Staatsforsten (73 von insgesamt 108 im Erntezulassungsregister enthaltenen Beständen), den bayerischen Intensivbeobachtungsflächen

des Demonstrationsvorhabens und den Dauerbeobachtungsflächen des Bayerischen Amtes für Waldgenetik verteilten sich die Suchgebiete auf 11 der 15 Wuchsgebiete Bayerns und decken die vier großen bayerischen Herkunftsgebiete der Esche ab. In den Saatguterntebeständen ist eine sehr gute phänotypische Qualität der Bäume zu erwarten. Die 50 größten Bestände, die die Wuchsgebiete repräsentativ wiedergeben, wurden begutachtet. In 31 Beständen konnten insgesamt 105 weniger anfällige Eschen aus sieben Wuchsgebieten ausgewählt werden und repräsentieren so eine breite Klima- und Standortsamplitude.

AP 3 Genotypisierung der Plusbäume
Im Rahmen der Standardisierung der Methodik zur Genotypisierung wurden aus 50 potenziellen Mikrosatellitenmarkern 12 Marker ausgewählt und in drei Multiplexsets zusammengefasst.

Das AWG hat insgesamt 384 Plusbäume (195 der FVA-BW, 82 des Staatsbetrieb Sachsenforst und 107 des AWG) genotypisiert.

Die unterschiedlichen Plusbaumkollektive der einzelnen Partnerinstitutionen weisen eine hohe genetische Variation und Diversität auf. Von einer genetischen Verarmung der Plusbaumkollektive bei einer ausreichenden Anzahl an Genotypen (>70) ist nicht auszugehen.

Für eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse siehe II. 1. AP3

AP 4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen
Es wurden von 103 bayerischen Plusbäumen Reiser für die heterovegetative Vermehrung an der FVA-BW geerntet. Diese werden in der dortigen Baumschule einem Resistenztest unterzogen. Eine abschließende Bewertung steht noch aus. Dennoch rechnen wir bei der Anlage der Klonsammlung für die spätere Nutzung als Samenplantage mit 60-65 Klonen, die zehn Klone von einer Dauerbeobachtungsfläche (siehe hierzu auch II. 1. AP7) beinhalten.

Die Klone werden voraussichtlich bis Ende April 2024 in vierfacher Wiederholung gepflanzt. Innerhalb weiterer drei Jahre soll die Klonsammlung auf 80 widerstandsfähige Klone erweitert werden.

AP 5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfungen
Saatgut konnte nur im Jahr 2022 von 15 Bäumen geerntet werden. Dieses wurde von der FVA-BW angezogen. Das Saatgut von zwei Plusbäumen wurde den Projektpartnern als gemeinsames Standardsaatgut zur Verfügung gestellt.

Die mangelnde und späte Fruktifikation lies die Anlage einer Nachkommenschaftsprüfung zur späteren Verwendung als Samenplantage nicht zu. Bei der Anlage der Nachkommenschaftsprüfung sollten die Sämlinge aufgrund der Konkurrenz mit bestehender Vegetation mindestens zwei Jahre alt sein. In einem Folgeprojekt könnte ein Austausch von Plusbaumnachkommen mit Projektpartner und die Anlage einer Nachkommenschaftsprüfung erfolgen.

AP 7 Validierung und Anwendung von bekannten Resistenzmarkern (AWG)
In einer Literaturstudie wurden RNS-basierte und DNA-basierte Toleranzmarker identifiziert (Chaudhary et al. 2020; Harper et al. 2016; Sollars et al. 2017; Stocks et al. 2019). Diese Marker sind in natürlichen Populationen allerdings nur wenig bis gar nicht aussagekräftig (Dounavi und Enderle unpubl.; Menkis et al. 2020). Eine genomische Vorhersage der Krankheitsresistenz mit einem speziell auf die Zielpopulationen trainierten Vorhersagemodell, ähnlich der Methode von Stocks et al. (2019), schien daher am erfolgversprechendsten.

Im Rahmen der Zusammenstellung einer Trainingspopulation für das genomische Modell wurde die Widerstandsfähigkeit gegen das Eschentriebsterben für 30 Familien in einer Nachkommenschaftsprüfung durch die Berechnung eines Resistenzwertes auf der Grundlage mehrjähriger Beobachtungen bewertet (Seidel et al. unpubl.). Nachkommenschaften zeigen insgesamt einen stetigen Rückgang der Überlebensrate und der Kronenschäden, jedoch waren einzelne Individuen sehr widerstandsfähig gegen das Eschentriebsterben. Bis auf eine Familie enthielten allen anderen Familien Nachkommen (12,5% – 62,5%) mit geringer Anfälligkeit für das

Eschentriebsterben. Unterschiede bei der Mortalität und der Resistenz gegen das Eschentriebsterben zwischen Familien waren hingegen selten.

Für die genomische Modellierung wurden 97 Baumpaare aus vitalen und benachbarten stark geschädigten Individuen sowie 190 Individuen aus der Nachkommenschaftsprüfung ausgewählt. Die Trainingspopulation deckt einen weiten geografischen Bereich ab. Diese konnten mit einem standardisierten SNP-Array genotypisiert werden. Für die Erweiterung und Validierung des genomischen Modells können Genotypen des Projektpartners FVA-BW aus den IBF verwendet werden.

Ein genomisches Modell wurde bisher nicht berechnet, da die Genotypisierung mittels des SNP-Array erst sehr spät im Projektverlauf durchgeführt werden konnte (siehe hierzu die Begründung im Erfolgskontrollbericht).

Für eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse siehe II. 1. AP7

Literaturverzeichnis

Aggarwal, Ramesh K.; Allainguillaume, Joel; Bajay, M. M.; Barthwal, Santan; Bertolino, P.; Chauhan, Priti et al. (2011): Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2010-30 September 2010. In: *Molecular ecology resources* 11 (1), S. 219–222. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02944.x.

Bai, Xiaodong; Rivera-Vega, Loren; Mamidala, Praveen; Bonello, Pierluigi; Herms, Daniel A.; Mittapalli, Omprakash (2011): Transcriptomic signatures of ash (*Fraxinus* spp.) phloem. In: *PloS one* 6 (1), e16368. DOI: 10.1371/journal.pone.0016368.

Beatty, Gemma E.; Brown, James A.; Cassidy, Eamon M.; Finlay, Caroline M. V.; McKendrick, Lorraine; Montgomery, W. Ian et al. (2015): Lack of genetic structure and evidence for long-distance dispersal in ash (*Fraxinus excelsior*) populations under threat from an emergent fungal pathogen: implications for restorative planting. In: *Tree Genetics & Genomes* 11 (3), S. 1–13. DOI: 10.1007/s11295-015-0879-5.

Bruegmann, Tobias; Fladung, Matthias; Schroeder, Hilke (2022): Flexible DNA isolation procedure for different tree species as a convenient lab routine. In: *Silvae Genetica* 71 (1), S. 20–30. Online verfügbar unter https://sciendo.com/article/10.2478/sg-2022-0003.

Chaudhary, Rajiv; Rönneburg, Tilman; Stein Åslund, Matilda; Lundén, Karl; Durling, Mikael Brandström; Ihrmark, Katarina et al. (2020): Marker-Trait Associations for Tolerance to Ash Dieback in Common Ash (*Fraxinus excelsior* L.). In: *Forests* 11 (10), S. 1083. DOI: 10.3390/f11101083.

Doonan, James M.; Budde, Katharina B.; Kosawang, Chatchai; Lobo, Albin; Verbylaite, Rita; Brealey, Jaelle C. et al. (2023): Multiple, single trait GWAS and supervised machine learning reveal the genetic architecture of *Fraxinus excelsior* tolerance to ash dieback in Europe. In: *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2023.12.11.570802.

Dounavi, Aikaterini; Enderle, Rasmus (unpubl.): Test von molekularen Markern an südwestdeutschen Eschen zur Einschätzung der individuellen genetischen Resistenz gegenüber dem Eschentriebsterben. Abschlussbericht der Pilotstudie.

Guilbaud, Romane; Biselli, Chiara; Buiteveld, Joukje; Cattivelli, Luigi; Copini, Paul; Dowkiw, Arnaud et al. (2020): Development of a new tool (4TREE) for adapted genome selection in European tree species. GenTree. Avignon, 2020. Online verfügbar unter https://hal.science/hal-02928391, zuletzt geprüft am 11.01.2024.

Harper, Andrea L.; McKinney, Lea Vig; Nielsen, Lene Rostgaard; Havlickova, Lenka; Li, Yi; Trick, Martin et al. (2016): Molecular markers for tolerance of European ash (*Fraxinus excelsior*) to

dieback disease identified using Associative Transcriptomics. In: *Scientific Reports* 6 (1), S. 1–7. DOI: 10.1038/srep19335.

Lefort, François; Brachet; Frascaria-Lacoste, Nathalie; Edwards, K. J.; Douglas, Gerry C. (1999): Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*). In: *Molecular Ecology* 8 (6), S. 1088–1089. DOI: 10.1046/j.1365-294X.1999.00655_8.x.

Lefort, François; Douglas, Gerard. C. (1999): An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. In: *Annals of Forest Science* 56 (3), S. 259–263. DOI: 10.1051/forest:19990308.

Menkis, Audrius; Bakys, Remigijus; Åslund, Matilda Stein; Davydenko, Kateryna; Elfstrand, Malin; Stenlid, Jan; Vasaitis, Rimvydas (2020): Identifying *Fraxinus excelsior* tolerant to ash dieback: Visual field monitoring versus a molecular marker. In: *Forest Pathology* 50 (1), e12572. DOI: 10.1111/efp.12572.

Metheringham, Carey L.; Plumb, William J.; Stocks, Jonathan J.; Kelly, Laura J.; Gorriz, Miguel Nemesio; Moat, Justin et al. (2022): Rapid polygenic adaptation in a wild population of ash trees under a novel fungal epidemic. In: *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2022.08.01.502033.

Noakes, Andi G.; Best, Teodora; Staton, Margaret E.; Koch, Jennifer; Romero-Severson, Jeanne (2014): Cross amplification of 15 EST-SSR markers in the genus *Fraxinus*. In: *Conservation Genet Resour* 6 (4), S. 969–970. DOI: 10.1007/s12686-014-0260-2.

Seidel, Hannes; Eisen, Anna-Katharina; Jochner-Oette, Susanne; Šeho, Muhidin; Hamberger, Joachim; Fussi, Barbara (2023a): Ergebnisse der forstgenetischen Forschung zum Eschentriebsterben. Poster. In: FowiTa (Hg.): Tagungsband. Forstwissenschaftliche Tagung. Dresden, 11.-13.09.2023.

Seidel, Hannes; Fussi, Barbara (2023): 105 Eschen-Plusbäume ausgewählt und vermehrt. In: *LWF aktuell* 2023 (3).

Seidel, Hannes; Kunert, Gregor; Dounavi, Aikaterini; Franziska, Past; Bubner, Ben; Budde, Katharina B. et al. (2023b): Genetic characterisation of selected *Fraxinus excelsior* L. trees with low susceptibility to ash dieback. Poster. In: Alexandru Lucian Curtu und Elena Ciocîrlan (Hg.): Resilient Forests for the Future. Book of Abstracts. EVOLTREE. Brașov, 12.-15.09.2023. Brașov, Romania: Transilvania University of Brașov UNITBV.

Seidel, Hannes; Seho, Muhidin; Fussi, Barbara (unpubl.): Hope for ash conservation and propagation - single individuals can be highly resilient to an invasive pathogen.

Seidel, Hannes; Šeho, Muhidin; Fussi, Barbara (2022): Teilresistente Eschen zeigen nach Jahren hohen Infektionsdrucks kaum Symptome des Eschentriebsterbens. Vortrag. In: Mirko Liesbach und Ute Trüber (Hg.): Abstract-Band und Exkursionsführer. 7. Sektionstagung Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung „Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen“. Ahrensburg, 12.-14.09.2022.

Sollars, Elizabeth S. A.; Harper, Andrea L.; Kelly, Laura J.; Sambles, Christine M.; Ramirez-Gonzalez, Ricardo H.; Swarbreck, David et al. (2017): Genome sequence and genetic diversity of European ash trees. In: *Nature* 541 (7636), S. 212–216. DOI: 10.1038/nature20786.

Stocks, Jonathan J.; Metheringham, Carey L.; Plumb, William J.; Lee, Steve J.; Kelly, Laura J.; Nichols, Richard A.; Buggs, Richard J. A. (2019): Genomic basis of European ash tree resistance to ash dieback fungus. In: *Nature Ecology & Evolution* 3 (12), S. 1686–1696. DOI: 10.1038/s41559-019-1036-6.

Teilvorhaben 3 FVA-BW (2219WK21C4)

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

a. Resistenzzüchtung und Erhalt genetischer Ressourcen

Selektion von 200 Plusbäumen im Raum Baden-Württemberg nach einheitlichen Selektionskriterien auf der Basis des entwickelten Boniturschlüssels sowie einheitlicher forstlicher Qualitätskriterien. Das Ziel ist die Sicherung von genetischem Material der Baumart Esche, welches sich zum einem durch eine Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Erreger des Eschentriebsterbens und zum anderen durch dessen forstliche Eignung auszeichnet. Es werden Reiser für die Veredelung sowie Saatgut gewonnen. Die erwartete Widerstandsfähigkeit der Klone sowie ihrer Nachkommen werden in Resistenztests geprüft, bevor die so gewonnenen Pflanzen langfristig in Klon- bzw. Sämlingsammlungen überführt werden.

b. Populationsgenetische Untersuchungen

Populationsgenetische Charakterisierung der Eschen auf Intensivbeobachtungsflächen (IBF): a) Genetische Vielfalt und Untersuchung der Abstammung der Eschen mittels neutraler molekularer Marker, b) Untersuchung der Variation adaptiver genetischer Marker hinsichtlich der Toleranz und Anfälligkeit der Eschen gegenüber dem Eschentriebsterben.

Unterstützung von Züchtungsprogrammen der Esche hinsichtlich der Auswahl von tolerantem und genetisch variablem Material

Bearbeitete Arbeitspakete

AP 2: Auswahl der Plusbäume und Phänotypisierung

AP 4: Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume und Anlage von Klonsammlungen

AP 5: Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfung

AP 11: Genetische Charakterisierung der Bestände des Intensivmonitoring (Core-Bestände) mit SNPs und Mikrosatelliten

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

AP 2 Auswahl der Plusbäume, Phänotypisierung
Die Auswahl von rund 200 Eschen-Plusbäumen in Baden-Württemberg konnte erfolgreich abgeschlossen werden (Abbildung 11). Die Selektion im Jahr 2022 konzentrierte sich auf vorwiegend weibliche, d.h. fruchttragende Eschen, aufgrund des geringen Anteils fruktifizierender Individuen an der Plusbaum-Auswahl im Vorjahr. Die Veredelungsarbeiten wurden im 1. Quartal 2023 abgeschlossen.

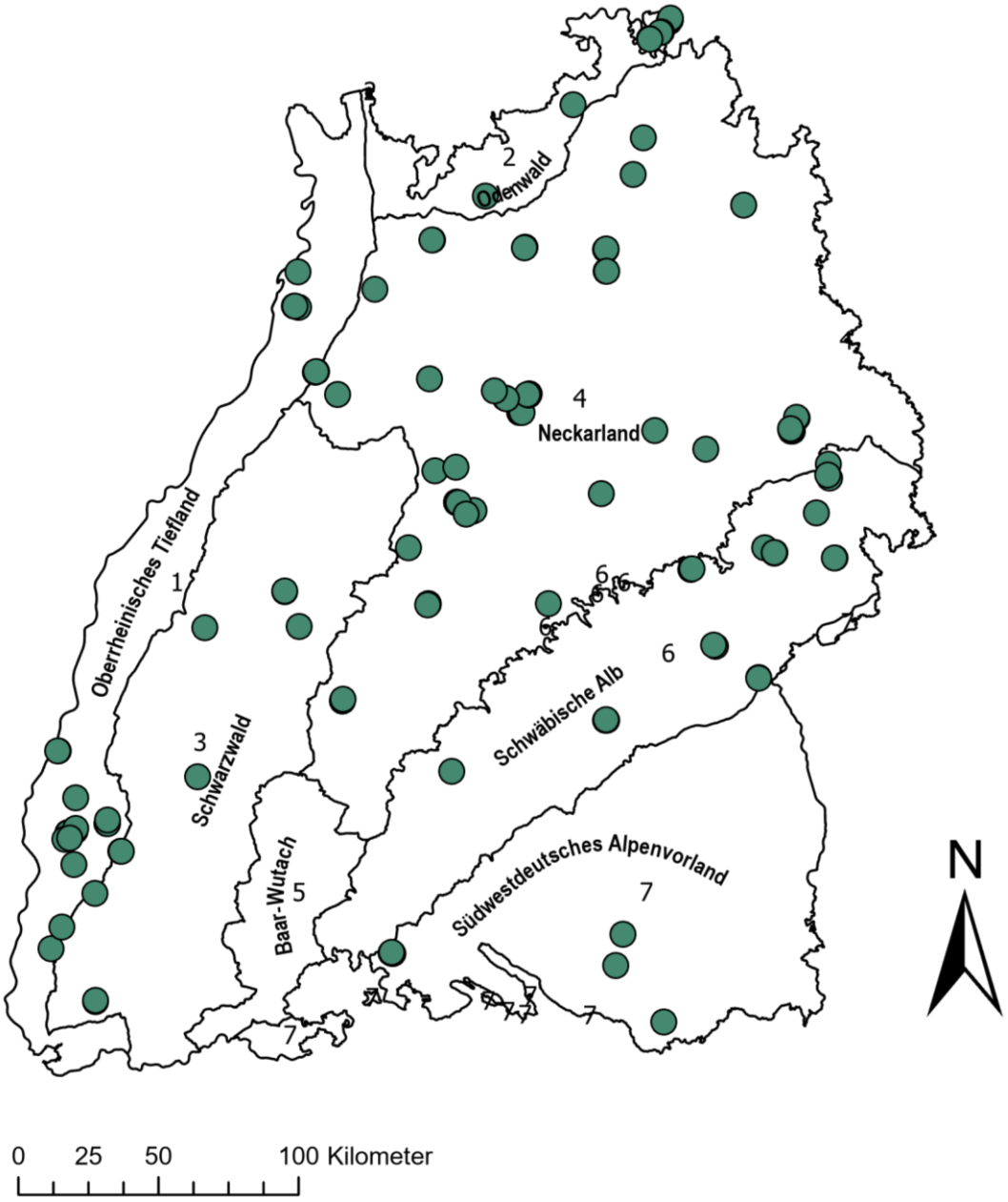


Abbildung 11 Übersichtskarte der selektierten Plusbäume in Baden-Württemberg nach Herkunftsgebieten

Die Erfassung der phänotypischen Merkmale (Vitalität und Qualität nach einheitlichen Kriterien) sind abgeschlossen. Neben der Phänotypisierung zur Plusbaumselektion erfolgte eine abschließende Datenaufnahme phänotypischer Merkmale im Sommer 2023.

AP 4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen
Die Reiserernte von 197 ausgewählten Plusbäumen jeweils im 1. Quartal 2022 und 2023 wurde erfolgreich umgesetzt. Die Veredelung von 197 Plusbäumen aus Baden-Württemberg sowie 113 Plusbäumen des Projektpartners AWG mit jeweils 20 Veredelungen pro Baum erfolgte in zwei Durchgängen anschließend an die Reiserernten 2022 und 2023. Zusätzlich wurde im Jahr 2022 die Sommerveredelung (Okulation) von Plusbäumen wegen zu geringer Anwachsquote (53%) bei der Winterhandveredelung durchgeführt. Die Anwachsquote lag im Winter 2023 bei über 90%, weshalb keine Nachveredelung notwendig war.

Alle Genotypen wurden in einem zweistufigen Testverfahren auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Eschentriebsterben getestet. Zur Durchführung der Tests siehe Zwischenbericht 2022. Die 2023 gepfropften Pflanzen standen in der Vegetationsperiode unter den gleichen Versuchsbedingungen im Test wie die Pfropflinge des Vorjahres.

Ascosporentest: Die Infektion durch H. fraxineus wurde in vier zeitlich versetzten Bonituren (Abbildung 12) auf der Basis des Jungeschenboniturschlüssels (Peters et al. 2021) im Freilandversuch erfasst. In Abbildung 3 ist die Zunahme fortgeschrittener Nekrosen zu erkennen.

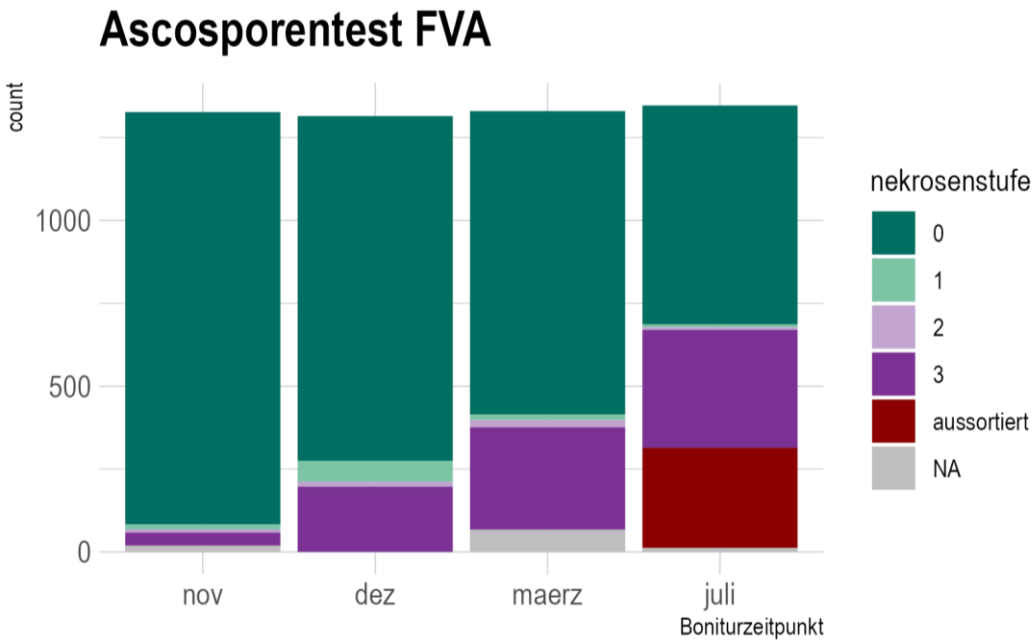


Abbildung 12 Nekrosenstufenentwicklung an Genotypen aus der Pfropfsaison 2022 mit der Entwicklung der Symptome beginnend im November 2022 bis Juli 2023

Inokulationstest: Zum Testdesign vgl. Zwischenbericht 2022.

In 2022 wurde der Inokulationstest an 120 Genotypen mit jeweils 4 Rameten durchgeführt. Ergänzend erfolgte an in 2023 veredelten Pflanzen ein weiterer Testdurchlauf im Oktober 2023. Die Auswertung des zweiten Tests steht noch aus, da Symptome vor allem mit dem Beginn des Saftstromes im Frühjahr deutlich werden. In der Abbildung 13 rechts sind die Ergebnisse der ersten Bonituren an den Testpflanzen aus 2022 dargestellt. Erkennbar ist das weitgehende Ausblieben von Symptomen in der Bonitur im Oktober 2022 aufgrund der hohen Temperaturen im Zeitraum des Tests. Abbildung 13 rechts zeigt die typische Überwallungsreaktion nach nicht erfolgter Infektion aus der Inokulation im Juli 2022. Das Ausbleiben von Symptomen erforderte die Wiederholung der Inokulation im Dezember 2022, was zu ersten Symptomentwicklung im Februar führte. Die Verwendung des stark virulenten Pilzstammes 7 führte bis zur Bonitur im Juni 2023 zu einer starken Nekrosenentwicklung an einem Großteil der getesteten Genotypen.

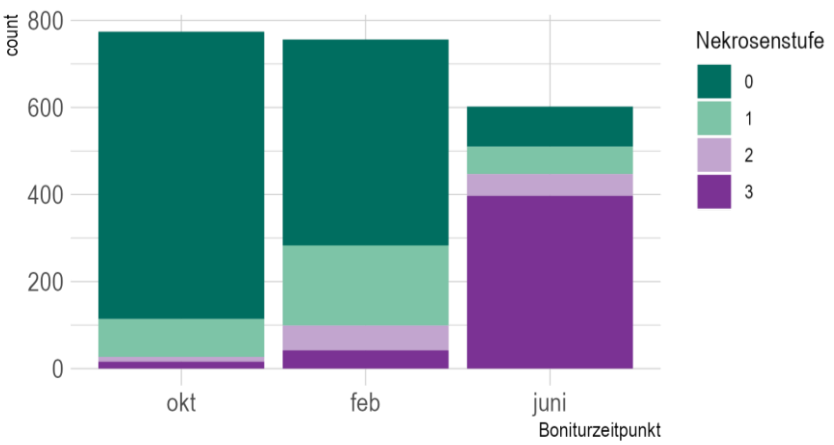


Abbildung 13 links: Nekrosenstufenentwicklung an Genotypen aus der Pfropfsaison 2022. Erste Inokulation im Juli, zweite im Dezember 2022. rechts: Überwallung an Inokulationsstelle ohne Nekrosenausbildung.

Aufgrund der hohen Infektionszahlen im Inokulationstest wurde für die Auswahl der Genotypen für die Anlage von Flächen vorrangig die Ergebnisse des Ascosporentests herangezogen. Dieser stellt im Gegensatz zum Inokulationstest eine Infektion über den natürlichen Infektionsweg dar. Anders als im Inokulationstest kann die Pflanze über Abwehrmechanismen das Vordringen des Pathogens in den Leittrieb verlangsamen oder gänzlich abwehren, was eine erwünschte Eigenschaft für widerstandsfähige Eschen ist.

Ascosporentest:
Zur Durchführung des Ascosporentests Vgl. Zwischenbericht 2022.

Nach Auswertung der Ascosporentests stehen 141 Genotypen für die Anlage von Flächen zur Verfügung. Genotypen wurden als ausreichend widerstandsfähig beurteilt, wenn weniger als 30% der jeweiligen Rameten (veredelte Klone eines Plusbaums) im Ascosporentest Nekrosen der Nekrosenstufe 2 und 3 (Vgl. Peters et al. 2021) entwickelt haben. Nekrosen der Stufe 1 wurden als nicht ausgeprägt genug erachtet. Je Genotyp stehen zwischen 4 und maximal 20 Rameten für die Anlage von Klonsammlungen zur Verfügung.

Die Suche nach einer geeigneten Fläche für die Pfropflingssamenplantage (M 4.4) erwies sich als schwierig. Inzwischen ist eine Fläche gefunden, deren standörtlichen Bedingungen für den Anbau von Esche geeignete ist und die isoliert von natürlichen Eschenvorkommen liegt, sodass der Einfluss von Fremdbestäubung nahezu ausgeschlossen werden kann. Die Räumung und Vorbereitung der Fläche für die Pflanzung kann nach Information seitens des zuständigen Forstbetriebs ForstBW jedoch witterungsbedingt erst im Laufe des Jahres 2024 erfolgen. Zum Projektende bleibt der Meilenstein 4.4 daher unvollendet. Die Pflanzung wird vorbereitet, sodass die Anlage umgehend erfolgen kann, sobald die Fläche bereitsteht.

AP 5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkonmmenschaftsprüfungen
Im Projektzeitraum wurden insgesamt 41 vorwiegend weibliche Plusbäume identifiziert und beerntet (Tabelle 10).

Die Saatguternte erfolgte in zwei Durchgängen in den Erntejahren 2022 und 2023 im Zeitfenster Mitte August bis Mitte September (Vgl. Zwischenbericht 2022). Die Ernte von Grünsaat wurde gewählt, da reifes Eschensaatgut zum Überliegen neigt, also meist erst zwei oder mehr Jahre nach der Reife keimt. Dies kann durch eine frühe Ernte im grünen Zustand und umgehende Aussaat vermieden werden (Vgl. Schirmer 2022).

Tabelle 10 Ernte und Keimung Eschensaatgut

Erntejahr	Anzahl beernteter Plusbäume	Anzahl gekeimter Partien 2023	Keimung 2024 erwartet
2022	29	22	7
2023	12	0	12

In Einzelfällen konnte nur sehr wenig Saatgut geerntet werden. Aufgrund der heißen und trockenen Vegetationsperiode 2022, reifte das Saatgutes früher als im Vorjahr und der Anteil an keimunfähigen Leersamen war teilweise recht hoch. Die Hitzeperiode in den Sommermonaten führte zudem zu einem frühen Abwurf des Saatguts.

2023 keimten erwartungsgemäß 22 von 29 Partien mit einem Keimerfolg von 50 bis 400 Sämlingen pro Partie. Bei sieben Partien scheint die Saat durch die späte Aussaat im September 2022 zu überliegen und voraussichtlich 2024 zu keimen. Die Phänotypisierung der Plusbäume im Sommer 2023 (s. AP2) ermöglichte es, 12 weitere Plusbäume anhand des Fruchtbehangs als vorwiegend weiblich zu identifizieren und im August zu beernten. Die Keimung wird 2024 erwartet. Jedes Teilvorhaben stellte den Partnerinstitutionen 2022 zudem jeweils zwei Saatgutpartien als gemeinsamen Standard zur Verfügung.

Nach Abschluss des Ascosporentests und der Bewertung der Mutterbäume stehen für die Anlage einer Nachkommenschaftsprüfung zum aktuellen Zeitpunkt 18 Partien zur Verfügung. 19 Partien sind noch nicht gekeimt.

Die Meilensteine M 5.3 Anlage Nachkommenschaftsprüfung und M 5.4 Vorläufige Bewertung der Plusbäume und ihrer Nachkommenschaften sind nicht erreicht worden. Die Anlage der Nachkommenschaftsprüfung erfolgt nach Abstimmung im Unterverbund im Herbst 2024. Der Verzug erklärt sich durch das Ausbleiben der Fruktifikation im Jahr 2021 und dem Mangel an geeigneten fruchttragenden Bäumen bei allen Teilvorhaben. Diesem Mangel konnte durch eine Nachselektion von fruchttragenden Plusbäumen teilweise entgegengewirkt werden. Die Keimung der 2023 ausgewählten und beernteten Saatgutpartien wird jedoch erst 2024 erwartet. Die Sämlinge benötigen nach der Keimung mindestens eine Vegetationsperiode um für die Pflanzung geeignete Dimensionen zu erreichen. Sind die Pflanzen zu klein dimensioniert, ist das Risiko groß, dass sie von der Begleitvegetation überwachsen werden und ausfallen oder bei Pflegearbeiten übersehen und entfernt oder beschädigt werden.

AP 11: Genetische Charakterisierung der Bestände des Intensivmonitoring (Core-Bestände) mit SNPs und Mikrosatelliten

Im Sommer 2021/22 wurde auf den 14 Intensivbeobachtungsflächen Blattmaterial von jeweils 50 Altbäumen und 50 Individuen aus der Naturverjüngung für genetische Proben gesammelt (Meilenstein 11.1). Aus diesen Blattproben wurde DNA für weitere Analysen extrahiert. Mittels PCR und Fragmentlängenanalyse wurden 1370 Proben (Individuen) mit 12 nSSR und 8 cpSSR analysiert (Meilenstein 11.2). Es konnten hiermit die Genotypen der untersuchten Bäume analysiert werden und die aktuelle genetische Ausstattung der Eschenpopulationen beschrieben werden.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Auswertung der nSSR Daten. Die untersuchte beobachtete Heterozygotie [Ho] beschreibt hierbei den Anteil der Heterozygoten (Mischerbigen) einer Population und die erwartete Heterozygotie [He] den berechneten Anteil der Heterozygoten auf Basis der Allelhäufigkeiten. Hierbei zeigt sich, dass die untersuchten Eschenpopulationen eine beobachtete Heterozygotie zwischen Ho = 0,637 (± 0,060) (BW1 Naturverjüngung) und Ho = 0,756 (± 0,056) (ST1 Altbäume) und eine erwartete Heterozygotie zwischen He = 0,629 (± 0,073) (SN2 Altbäume) und He = 0,740 (± 0,050) (BW2 Altbäume) aufweisen. Zwischen den Flächen zeigen sich die Heterozygotie betreffend keine besonderen Auffälligkeiten. Die Anzahl Privater Allele (Allele die nur in dieser Population vorkommen) je Population liegt zwischen Pa = 0 (SN1) und Pa = 5 (BW2). Wobei die Fläche SN1 Die einzige ohne

private Allele ist. In der mittleren allelischen Vielfalt über alle Loci sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Plots zu er kennen sie liegt zwischen Ar = 8,843 (± 1,426) (BY1 Naturverjüngung) und Ar = 11,081 (± 2,026) (HE1 Altbäume) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht der genetischen Vielfalt je Intensivbeobachtungsfläche für nSSR, Alt – Altbäume, NV – Naturverjüngung, [N] Probenanzahl, [Ho] beobachtete Heterozygotie, [He] erwartete Heterozygotie, [F] Fixation Index, [Pa] Anzahl Privater Allele, [Ar] Allelische Vielfalt, (± Standardfehler)

Population	Alt/NV	N	Ho	He	F	Pa	Ar
BB1	Alt	48	0,690 (± 0,081)	0,694 (± 0,069)	0,016 (± 0,040)	1	9,424 (± 1,477)
	NV	50	0,658 (± 0,066)	0,676 (± 0,067)	0,021 (± 0,014)	3	8,979 (± 1,434)
BW1	Alt	52	0,670 (± 0,059)	0,708 (± 0,060)	0,047 (± 0,032)	0	9,575 (± 1,698)
	NV	50	0,637 (± 0,060)	0,692 (± 0,063)	0,074 (± 0,025)	2	10,142 (± 1,772)
BW2	Alt	50	0,699 (± 0,054)	0,740 (± 0,050)	0,053 (± 0,028)	5	10,769 (± 1,748)
	NV	50	0,734 (± 0,075)	0,700 (± 0,073)	-0,052 (± 0,025)	2	10,167 (± 1,586)
BY1	Alt	49	0,695 (± 0,062)	0,704 (± 0,058)	0,013 (± 0,033)	2	9,597 (± 1,472)
	NV	50	0,683 (± 0,053)	0,699 (± 0,057)	0,012 (± 0,032)	1	8,843 (± 1,426)
BY2	Alt	52	0,661 (± 0,078)	0,677 (± 0,071)	0,069 (± 0,063)	4	10,077 (± 1,822)
	NV	50	0,681 (± 0,068)	0,700 (± 0,058)	0,024 (± 0,047)	0	9,964 (± 1,777)
BY3	Alt	47	0,661 (± 0,072)	0,687 (± 0,064)	0,051 (± 0,034)	0	9,920 (± 1,624)
	NV	49	0,678 (± 0,072)	0,689 (± 0,063)	0,018 (± 0,046)	3	10,202 (± 1,852)
HE1	Alt	48	0,693 (± 0,061)	0,686 (± 0,066)	-0,028 (± 0,030)	2	11,081 (± 2,026)
	NV	50	0,701 (± 0,073)	0,714 (± 0,064)	0,034 (± 0,035)	1	9,931 (± 1,750)
MV1	Alt	46	0,671 (± 0,084)	0,677 (± 0,077)	0,042 (± 0,038)	4	10,155 (± 1,746)
	NV	51	0,657 (± 0,061)	0,693 (± 0,067)	0,034 (± 0,030)	3	10,547 (± 1,789)
NI1	Alt	50	0,709 (± 0,056)	0,721 (± 0,057)	0,010 (± 0,024)	2	10,665 (± 1,919)
	NV	52	0,704 (± 0,053)	0,712 (± 0,063)	-0,008 (± 0,025)	1	10,975 (± 1,935)

SN1	Alt	28	0,741 (± 0,061)	0,712 (± 0,058)	-0,037 (± 0,021)	0	9,418 (± 1,427)
	NV	49	0,677 (± 0,067)	0,684 (± 0,063)	0,018 (± 0,027)	0	10,186 (± 1,642)
SN2	Alt	50	0,658 (± 0,089)	0,629 (± 0,073)	-0,020 (± 0,051)	1	9,700 (± 1,744)
	NV	50	0,655 (± 0,067)	0,680 (± 0,065)	0,035 (± 0,037)	2	8,591 (± 1,502)
ST1	Alt	51	0,756 (± 0,056)	0,694 (± 0,049)	-0,093 (± 0,035)	1	10,449 (± 1,805)
	NV	50	0,721 (± 0,067)	0,713 (± 0,062)	-0,014 (± 0,032)	2	8,676 (± 1,271)
TH1	Alt	46	0,700 (± 0,070)	0,689 (± 0,071)	-0,024 (± 0,019)	2	10,068 (± 1,786)
	NV	50	0,673 (± 0,065)	0,699 (± 0,065)	0,028 (± 0,033)	2	10,223 (± 1,940)
TH2	Alt	50	0,695 (± 0,066)	0,696 (± 0,066)	-0,008 (± 0,028)	1	10,144 (± 1,899)
	NV	52	0,676 (± 0,071)	0,683 (± 0,068)	0,006 (± 0,034)	0	10,743 (± 1,959)
Gesamt	Mittelwert	48,928 (± 0,831)	0,687 (± 0,012)	0,695 (± 0,012)	0,012 (± 0,007)	1,679 (± 0,252)	9,972 (± 0,122)
	Summe					47	

Zur Darstellung der genetischen Unterschiede der Untersuchungsflächen wurden genetische Distanzen zwischen den Plots berechnet. Diese sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Fläche ST1 zeigt hierbei den größten Abstand zu den anderen Untersuchungsflächen. Die Flächen SN2, MV1, BY1 Altbäume und BY3 Altbäume differenzieren sich aber auch von den übrigen Plots. Die Analyse der Molekularen Variation zeigt, dass 94,2 % der genetischen Variation innerhalb des Individuums liegt und 2,5 % zwischen den Populationen sowie 3,3 % zwischen den Individuen.

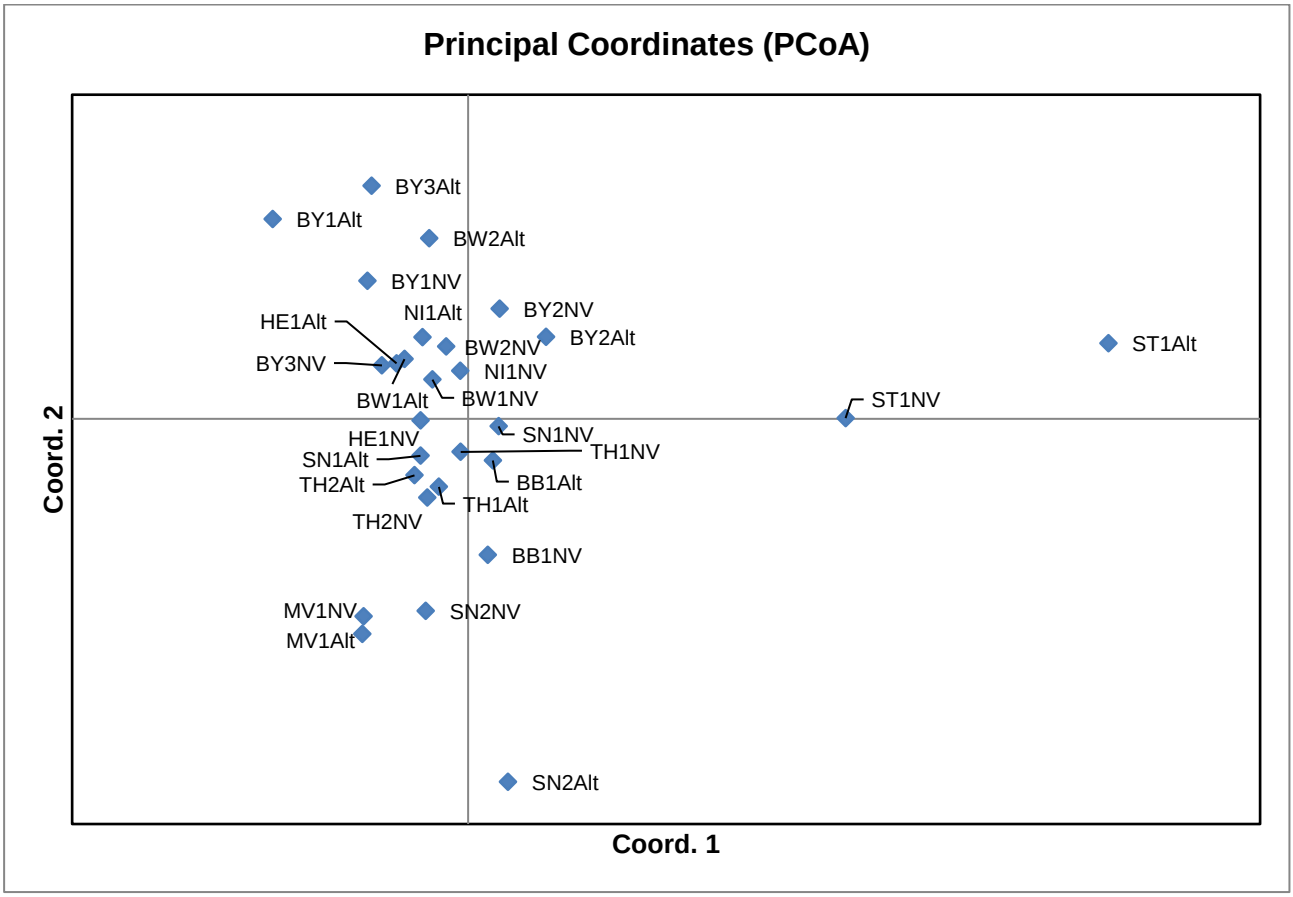


Abbildung 14: Principal Coordinates Analyse der Intensivbeobachtungsflächen (Alt - Altbäume, NV - Naturverjüngung) basierend auf Nei's genet. Distanz, erklärte Variation: Coord.1 = 19,32 %, Coord. 2 = 13,26 %

Zur Genotypisierung der Intensivbeobachtungsflächen mit adaptiven Markern wurde das SNP-Array (4TREE SNP-Array; Guilbaud et al. 2020) genutzt. Hierfür wurde DNA besserer Qualität benötigt, weswegen ca. 27 Bäume je Intensivbeobachtungsfläche erneut beprobt wurden. Die Genotypisierung von 384 Individuen erfolgte mit 13.407 SNPs (Meilenstein 11.3). Zum momentanen Zeitpunkt ist eine Empfehlung von toleranten Genotypen der Esche auf Basis der adaptiven Marker noch nicht möglich. Hierfür wird es nötig sein die gewonnenen Daten mit denen aus AP 7 zu validieren (Meilenstein 11.4).

Literatur

Schirmer, Randolf (2002): „Beerntung von Eschensaatgut“ In: *Beiträge zur Esche*. LWF-Wissen 34. Hg.: LWF. online: https://www.lwf.bayern.de/mam/cms04/service/dateien/w34_beitraege_zur_esche_gesamtheft_gesch.pdf (zuletzt geprüft: 12.1.2024)

Peters, S.; Langer, G.; Kätzel, R. (2021): Eschentriebsterben – Kriterien zur Schadensbonitur an Eschen. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), Gülzow-Prüzen, 60 Seiten, ISBN-Nr.: 978-3-942147-44-6. Online: https://www.fnr.de/fileadmin/Projekte/2022/Mediathek/Broschuere_Bonitur_RZ_WEB_NEU_logo.pdf (zuletzt geprüft: 17.02.2024)

Guilbaud, R., Biselli, C., Buiteveld, J., Cattivelli, L., Copini, P., Dowkiw, A., Esselink, D., Fricano, A., Guerin, V., Jorge, V., Kelly, L. J., Kodde, L., Metheringham C. L., Pinosio, S., Rogier, O., Segura, V., Spanu, I., Buggs, R., Gonzalez-Martinez, S. C., Nervo, G., Smulders, R., Sanchez Rodriguez, L., Vendramin, G., Faivre-Rampant, P. (2020) Development of a new tool (4TREE) for adapted genome selection in European tree species. GenTree, Jan 2020, Avignon, France. ⟨hal-02928391⟩

Teilvorhaben 4 NW-FVA (2219WK21D4)

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Ziel des Teilvorhabens 4 ist es, 170-200 Plusbäume auszuwählen, die nicht nur den im Verbundprojekt festgelegten Kriterien entsprechen, sondern auch noch möglichst heterogen über die vier Bundesländer Schleswig-Holstein, Sachsen-Anhalt, Hessen und Niedersachsen verteilt sind. Diese Leistungsträger sollen durch vegetative Vermehrung (Pfropfung) gesichert und nach der Überprüfung des ETS-Resistenzstatus in einer Samenplantage zusammengefasst werden.

Weiterhin sollen aus Saatgut ausgewählter Plusbäume (80-120) Nachkommenschaften angezogen werden. Neben der laufenden Überwachung der ETS-Befallssituation werden an diesen Pflanzen bereits in der Baumschule auch Wachstum und Phänologie erfasst. Die Leistungsträger dieser Nachkommenschaften sollen in einer Sämlingssamenplantage gesichert werden.

Ein weiteres Ziel des Teilprojekts 4 ist die Protokolloptimierung zum Kryokonservierungsverfahren. Dabei soll durch Reaktivierung der an der NW-FVA seit zwei Jahrzehnten in flüssigem Stickstoff konservierten Eschenklone sowie deren Vermehrung über In-vitro-Kultur die Eignung dieser kostengünstigen Methode für die langfristige Konservierung von zahlreichen Eschen-Genotypen verifiziert werden. Diese vom ETS noch unbeeinflussten Genotypen sind für Studien des Infektionsverlaufs von besonderem Interesse und können bei erfolgreicher Vermehrung den Partnern des Verbundprojektes zur Verfügung gestellt werden. Weiterhin sollen Protokolle und Verfahren zur Etablierung und Vermehrung feldresistenter Eschen über Meristemkultur optimiert werden. Nachfolgend soll ergänzend zur xenovegetativen Sicherung ein Teilkollektiv der Plusbäume in der In-vitro-Kultur auch mikrovegetativ gesichert und bei Bedarf vermehrt werden.

Bearbeitete Arbeitspakete

AP 2: Plusbaumauswahl

AP 4: Vegetative Vermehrung der Plusbäume

AP 5: Nachkommenschaftsprüfung

AP 6: *In-vitro*-Vermehrung

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

AP 2: Plusbaumauswahl

Zur einheitlichen Beurteilung der Vitalität von Alt- und Jungeschen wurde im Verbundvorhaben FraxPath unter Beteiligung von FraxGen ein Boniturschema erstellt und als Broschüre über die FNR veröffentlicht [https:// mediathek.fnr.de/eschentriebsterben-kriterien-zur-schadensbonitur-an-eschen.html]. Teilprojektintern (FraxGen) wurde zusätzlich ein Kriterienkatalog für die einheitliche Beurteilung der geforderten Plusbaumeigenschaften festgelegt. Dafür wurden neben den klassischen Merkmalen auch Angaben zu Standort und Lage mit aufgenommen (siehe Zwischenbericht 2021, Tab. 3). Alle Parameter wurden vom Teilprojekt zu jedem Plusbaumanwärter detailliert erfasst. Die Auswahl der Suchgebiete wurde mithilfe des Geoinformationssystems QGis und den Forsteinrichtungsdaten der beteiligten Landesforsten realisiert. Hier flossen ebenfalls Intensivbeobachtungsflächen aus dem Projekt-Überverbund „FraxForFuture“ sowie Samenplantagen der NW-FVA in Hessen und Niedersachsen ein. Einzelne Suchgebiete orientieren sich auch an WZE- bzw. BZE-Punkten. Eine Verteilung über alle vorkommenden Ausgangsgesteine, Bodentypen und Wuchsgebiete konnte somit realisiert werden.

Für die Auswahl potentieller Leistungsträger (Plusbaumkandidaten) wurden 188 verschiedene Standorte bereist (siehe Zwischenbericht 2021) und ca. 21.700 Bäume bewertet. Die erste Beurteilung während der Vegetationsruhe wurde durch eine weitere Phänotypisierung im Sommer validiert. Dadurch konnten insg. 207 Plusbaumkandidaten aus 5 Wuchsgebieten bestimmt werden. Durch fortlaufende Kontrollbonituren über den gesamten Projektzeitraum (jeweils Sommerzustand) konnte die Erstauswahl der Leistungsträger basierend auf der Feldresistenz und Phänologie zu über 95 % bestätigt werden. Der Anteil Genotypen an denen im Laufe der Jahre Saatgutproduktion beobachtet werden konnte erhöhte sich von fast 15 % auf über 22 %. Über die gesamte Projektlaufzeit zeigten 11 % der Plusbäume eine Verbesserung der Kronenvitalität, 68 % blieben stabil. Bei 21 % verschlechterte sich der Kronenzustand innerhalb des Beobachtungszeitraumes von drei Jahren. Der Anteil beobachteter Stammfußnekrosen stieg von 2 % auf 12 % an und korrelierte bei 20 % der Plusbäume mit einer Verschlechterung des Kronenzustands. Bei 16 % konnte trotz Stammfußnekrose sogar eine Verbesserung der Kronenvitalität beobachtet werden, bei 64 % blieben stabil.

2022 und 2023 wurden vom Teilprojekt 4 zusätzlich Laubaustriebs- und Blattabwurfbonituren an 50 Plusbaumgenotypen (Altbäumen) auf den Samenplantagen der NW-FVA durchgeführt. Aus diesen Informationen, die Auskunft über die Ausnutzung der Vegetationsperiode sowie daraus resultierende Früh- und Spätfrostanfälligkeiten geben, erhofft sich das TP 4 durch eine spätere Verknüpfung mit Daten von der neu Begründeten Pfropflingssamenplantage, mögliche Korrelationen zur ETS-Toleranz der ausgewählten Plusbäume zu erhalten.

Dem Teilprojekt 4 wurde zudem die Aufsicht und Zuständigkeit über die IBF-Fläche Mollenfelde zugewiesen. Hiermit verbunden waren Tätigkeiten wie die Durchführung regelmäßiger Winter- sowie Sommerbonituren nach dem Boniturschlüssel von FraxPath, Flächen/Zaunkontrolle und Instandhaltungsmaßnahmen. Ebenso wurde jeweils von April bis Oktober wöchentlich der Filter des auf der Fläche aufgestellte Sporensammlers (siehe Zwischenbericht 2021, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) für die Projektpartner der katholischen Universität Eichstätt-Ingolstadt (FraxMon) gewechselt.

AP 4: Vegetative Vermehrung der Plusbäume

Als Vorleistung der Abt. C der NW-FVA wurde Saatgut von ETS-toleranten Eltern stratifiziert und ausgesät. 10.300 dieser Sämlinge konnten durch das Teilprojekt 4 im Frühjahr 2021 im Kamp der NW-FVA verschult werden. Zusätzlich wurden 600 besonders groß gewachsene Sämlinge direkt getopft. Mit über 92 % dieser Pflanzen konnte im Sommer 2021 ein Versuch zur Methodenoptimierung der vegetativen Vermehrung ausgewählter Plusbäume mittels Okulation durchgeführt werden. Weitere 399 im Versuchskamp der NW-FVA verschulte Sämlinge wurden in den Versuch mit einbezogen und die Okulationen direkt im Feld durchgeführt. Insgesamt wurden Knospen von 59 verschiedenen Plusbaum-Klonen für diese Sommerveredelung verwendet. In diesem Versuch konnten Anwuchsraten der okulierten Knospen von 69 % bei den getopften Pflanzen und 89 % bei den im Feld verschulten Pflanzen (siehe Zwischenbericht 2021) erzielt werden. Bei beiden Okulationsvarianten trieben über 95 % der im November 2021 augenscheinlich angewachsenen Knospen in 2022 auch aus. Die Mehrheit der verschulten Sämlinge zeigten 2021 gute Wuchsleistungen und konnten die zur vegetativen Vermehrung (Pfropfung) der Plusbaumkandidaten benötigten Stärken erreichen.

Die Reiserernte an 200 ausgewählten Plusbäumen wurde von Januar bis März 2022 durchgeführt. Bei der Winterhandveredelung wurden je nach Qualität der Plusbaumreiser unterschiedliche Pfropfungsmethoden verwendet und wenn möglich je Genotyp 20 Veredelungen durchgeführt. Von 194 Plusbäumen konnten 3.900 Veredelungen angefertigt werden (siehe Zwischenbericht 2022). Insgesamt konnte das Teilprojekt 4 einen Pfropfungserfolg von 69 % erreichen. Pfropflingsausfälle konnten bei 18 Genotypen durch im Sommer 2021 okulierte Pflanzen ausgeglichen werden.

Zur Verifizierung der beobachteten Feldtoleranzeigenschaften der Plusbaumkandidaten gegenüber dem Eschentriebsterben wurden 2022 2.800 Pfropflinge von 190 verschiedenen Genotypen zwei

ex-situ-Resistenztests (Ascosporentest mit 2.000 Pflanzen, Innokulationstest mit fast 800 Pflanzen) unterzogen (Details zu Grundlagen und Durchführung der Resistenztests siehe Zwischenbericht 2022). Der Inokulationstest wurde im Spätsommer 2022 wiederholt, da aufgrund der extrem hohen Temperaturen während der ersten Beimpfung der Pflanzen mit Hyphenmaterial von *Hymenoscyphus fraxineus* der Infektionserfolg in Frage gestellt wurde. An allen Pflanzen in beiden Resistenztestvarianten wurden bis März 2023 vier Beurteilungen durchgeführt. Durch die Toleranzhürde von mindestens 70 % symptomfreien Pflanzen je Genotyp im Ascosporentest (unterstützt durch die Ergebnisse des Inokulationstests) stehen 102 Genotypen (54 %) zur Anlage von Flächen zur Verfügung.

Da der Standort einer Samenplantage mehrere Voraussetzungen (wie unter anderem Bodeneigenschaften und das Fehlen von *Fraxinus excelsior* im Umkreis und die Entfernung zur NW-FVA) zwingend erfordert, gestaltete sich die Suche nach einer geeigneten Fläche deutlich schwieriger als angenommen. Nach Reduktion der angestrebten Flächengröße konnte eine 0,7 ha große Fläche im Forstamt Liebenburg akquiriert werden (siehe Zwischenbericht 2022). Nach der Flächenvorbereitung wurde die Begründung der Fläche im März 2023 durchgeführt. Aufgrund der Flächengröße konnten 93 ETS-tolerante Genotypen mit je 5 bzw. 6 Rameten vollständig randomisiert (geplant mit ONA, Workshop Milan Lstibůrek) im Abstand von 5 x 2,2 m gepflanzt werden. Dieses Raster wurde gewählt, da einerseits von einer weitergehenden Nachselektion auf der Fläche ausgegangen werden muss, als aber auch um möglichst schnell ein Bestandesinnenklima entstehen zu lassen, wodurch die Plusbaumrameten den trockener werdenden Klimabedingungen im Frühling als auch Sommer besser entgegentreten können. Sobald sich die Plusbaumrameten behindern soll jede zweite Reihe entnommen werden um auf ein Raster von 4,4 x 5 Metern zu kommen, was die Saatguternte in der späteren Samenplantage erlaubt. Die erste Anwuchsaufnahme im Mai 2023 zeigte 15 Ausfälle (3%) eine weitere Ausfallaufnahme im Oktober ergab 11 % Ausfall. Die Nachpflanzung erfolgte Ende November. Da nicht von allen Klonen ausreichend Reservepflanzen zur Verfügung standen wurden die Fehlstellen mit einem zusätzlichen Klon aufgefüllt, so dass nun 94 ETS-tolerante Klone (mit je min. 4 Rameten, insgesamt 533 Pflanzen) auf der Samenplantage zusammengefasst sind.

AP 5: Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfung

Im Juli 2021 konnte nur von 17 Plusbäumen Saatgut geerntet und zur Grünaussaat verwendet werden. Auf Grund der sehr geringen Saatgutmengen (20 - 200 Samen/Plusbaum) konnte diese Anstrengung jedoch nur als Versuch zur Methodenoptimierung verwendet werden. Da auch 2022 ein Fehlmastjahr war, konnte das Teilprojekt 4 lediglich von 20 Plusbäumen Saatgut ernten. Die Saatgutmengen dieser Plusbäume reichen potenziell dafür aus, um auf die für die Nachkommenschaftsprüfung notwendige Zahl von Sämlingen zu kommen. Trotzdem ist die Anzahl der Saatgutpartien bei allen am Arbeitspaket beteiligten Institutionen zur Anlage einer jeweils eigenen Nachkommenschaftsprüfung nicht ausreichend. Hierfür fehlt Saatgut von weiteren Plusbaum-Genotypen. Daher wurde beschlossen die Saatgutpartien aller fünf Institute in einer Serie von Nachkommenschaftsprüfungsflächen zusammenzufassen. Durch den Austausch von Saatgut zwischen den Projektpartnern konnten 2022 an der NW-FVA 28 Saatgutpartien ausgesät werden (20 Nachkommenschaften von Plusbäumen der NW-FVA, je zwei von den vier beteiligten Projektpartnern). 16 der 20 von der NW-FVA ausgesäten Saatgutpartien stammen von Müttern, die durch die Resistenztests in ihren Toleranzeigenschaften bestätigt und in der Samenplantage ausgepflanzt wurden. So können die Ergebnisse der Nachkommenschaftsprüfungen wertvolle Hinweise zur genetischen Veranlagung der Elternbäume (Plusbäume) hinsichtlich der Krankheitsresistenz, sowie auch bezüglich anderer wichtiger Merkmale (z.B. Wuchs und Phänologie) liefern. Die Samen wurden als Grünsaat zwischen Ende August und Anfang September durch Bekletterung der Plusbäume geerntet. Die Aussaat erfolgte für jede Partie spätestens einen Tag nach Erhalt der Samen. So konnten vom TP 4 im Spätsommer 2022 rund 20.000 Samen sowohl entflügelt in Aussaatkisten als auch ohne Behandlung (mit Flügeln) im Frühbeetkasten ausgesät werden (siehe Zwischenbericht 2022). Die Auflaufraten des Saatguts der einzelnen Plusbäume

waren sehr unterschiedlich und betrugen bei der entflügelten Variante zwischen 2% und 96%, durchschnittlich 21 %. Die Keimrate des ohne Behandlung (mit Flügeln) im Frühbeetkasten ausgesäten Saatgutes betrug bisher insgesamt rund 90 %. Einzelne Nachkommenschaften scheinen jedoch zu überliegen, deren Auskeimung wird 2024 erwartet. Der durchschnittliche Keimerfolg des gesamten 2022 ausgesäten Saatgutes betrug somit 66%. Durch das Teilprojekt 4 wurden 2023 von jeder Nachkommenschaft Sämlinge in Einzeltöpfen kultiviert, insg. rund 1.470 Pflanzen. Diese sowie alle weiteren gekeimten Pflanzen der Aussaaten werden zur Vorbereitung der geplanten Flächenanlage zur Nachkommenschaftsprüfung weiterhin in der Baumschule gepflegt.

Erste Merkmalsaufnahmen in Bezug auf Phänologie, Wachstum und ETS-Status der Sämlinge wurden begonnen, konnten aber auf Grund fehlender Personalkapazität (überraschendes Ausscheiden des Technischen Mitarbeiters im Frühjahr 2023) nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden. Die Abschätzung der ersten Auflaufzahlen aller Projektpartner lassen die Möglichkeit der Anlage von 3 bis 4 Prüfungsflächen erwarten. Da die Sämlinge erst im Alter von 2 Jahren auf die Flächen gepflanzt werden sollen und trotz Grünsaat einige Partien bei allen Projektpartnern zu überliegen scheinen, war die Anlage dieser Prüfungsserie im Projektzeitraum nicht realisierbar.

AP 6: In-vitro-Vermehrung

Ergänzend zu den Arbeiten der Sicherung und Vermehrung ausgewählter Plusbäume durch Pfropfung (AP 4) wurde in diesem Arbeitspaket die Etablierung eines Teilkollektives dieser Leistungsträger in die in-vitro-Kultur bearbeitet. An der NW-FVA existierende Protokolle und Vorgaben wurden durch Kombination mit aktuellen Erkenntnissen und durch intensiven Austausch mit den am Arbeitspaket beteiligten Projektpartnern sowie den Erfahrungen der langjährigen Mitarbeiter/Innen weiter verbessert.

Im Projektjahr 2021 wurden von insgesamt 22 Klonen 615 Knospen und 100 Embryonen bearbeitet. Dem Etablierungserfolg aus ruhenden Winterknospen von durchschnittlich 60 % folgte eine Wuchsdepression und es konnten lediglich zwei Klone stabil in vitro kultiviert werden. Bei 70 % der aus Saatgut etablierten Genotypen konnten solide in-vitro-Kulturen etabliert werden.

Im Jahr 2022 wurde das gesamte in-vitro-Labor der NW-FVA kernsaniert, daher standen dem TP 4 die benötigten Arbeitsplätze und Kulturmöglichkeiten nur sehr eingeschränkt zur Verfügung. Auch wurden die Resistenztests, die die Pfropflinge der ausgewählten Plusbaumkandidaten durchlaufen mussten, erst im März 2023 abgeschlossen. Daher wurden in 2022 keine neue in-vitro-Etablierung von Eschen aus Winterknospen oder rejuvenilisiertem Pfropflingsmaterial durchgeführt. Die acht bis dahin etablierten Genotypen konnten jedoch erhalten und weiter vermehrt werden (2 Plusbaumkandidaten, 6 Nachkommen von Plusbaumkandidaten).

Die Etablierungsproblematik mit Knospen von adultem Material ist bereits aus früheren Arbeiten bekannt. Als erfolgversprechender werden die Verfahren mit durch Pfropfung rejuvenilisierten Material beschrieben (Schönweiss 2005, Nawrot-Chorabik 2023). Solches Pflanzenmaterial stand dem TP 4 in Form von abgepfropften Plusbäumen nach Beendigung der beiden Plusbaum-Resistenztests ab Frühjahr 2023 zur Verfügung und es wurden Etablierungen mit frischen Knospen ausgetriebener Plusbaum-Pfropflinge durchgeführt. Insgesamt wurden 189 Knospen von 19 Plusbaumklonen bearbeitet. Bis dato konnten davon jedoch nur 4 Genotypen in der in-vitro-Kultur erhalten werden. Die extrem hohe Kontaminationsrate der frischen Knospen von 90% konnte uns die beschriebene, bessere Etablierbarkeit von rejuvenilisiertem Pfropflingsmaterial bisher nicht bestätigt lassen. Daher wurden zusätzliche, neue Etablierungsmethoden getestet und für die Esche weiter optimiert. Weitere Etablierungen mit 313 ruhenden Pfropflings-Knospen von 29 Plusbaumklonen wurden daraufhin ab Herbst 2023 durchgeführt. Bis dato konnten alle 29 Genotypen mit einer durchschnittlichen Etablierungsrate von 79% in vitro erhalten werden. Im Projektzeitraum konnten somit mehr als ein Drittel der ausgewählten Plusbäume, insgesamt 32 Genotypen sowie bereits 6 Nachkommen von diesen Plusbäumen in Meristemkultur übernommen werden. Die Rekalzitranz der Eschen in Bezug auf die Kultivier- und Vermehrbarkeit *in-vitro* (siehe

dazu auch Zwischenbericht 2022: Medienversuch), sowie die Schwierigkeiten bei der Etablierung konnten bis Projektende zwar deutlich verbessert, jedoch noch nicht vollständig gelöst werden.

Für die in diesem Arbeitspaket ebenfalls durchgeführten Untersuchungen zur Reaktivierung kryokonservierter Eschen-Klone wurden die in den Laboren vorhandenen räumlichen und technischen Voraussetzungen angepasst, bestehende Kryoprotokolle getestet und Versuche zu deren Verbesserung durchgeführt. Dabei konnte durch drei Optimierungsschritte in insgesamt neun Versuchen mit dem seit 20 Jahren in flüssigem Stickstoff eingelagerten Eschenmaterial eine Überlebensrate bei der Reaktivierung von 80 % erreicht werden. Im Projektzeitraum gelang es, 24 der insg. 27 kryokonservierten Eschen-Genotypen aus der Zeit vor dem ETS erfolgreich zu reaktivieren und über Meristemkultur zu vermehren und zu bewurzeln.

Bei 13 Genotypen konnte bis zum Frühjahr 2023 eine ausreichende große Anzahl von Pflanzen erhalten werden, um Versuche zur Akklimatisierung der in-vitro-Pflanzen an Freilandbedingungen durchzuführen. Nach Überführung in Kultursubstrat konnte über eine schrittweise Absenkung der Luftfeuchtigkeit in Nebeltunneln gefolgt von weiterer Aufzucht unter Gewächshausbedingungen eine Gewöhnung an Freilandbedingungen bis zum Herbst erfolgreich durchgeführt werden. Die Frosttoleranz der Pflanzen kann bis Projektende jedoch noch nicht abschließend bewertet werden.

Damit wurde die Wirksamkeit des entwickelten Protokolls für die Kryokonservierung auf seine Eignung überprüft und kann als kostengünstige Methode für die langfristige Konservierung von zahlreichen Eschen-Genotypen empfohlen werden. Auch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, aus kryokonserviertem Meristemgewebe freilandtaugliche Pflanzen heranzuziehen. Somit können wertvolle Genotypen nach „Arche-Noah-Prinzip“ gesichert und erhalten werden bis z.B. wirksame Gegenmaßnahmen gegen das ETS greifen. Bei Bedarf können aus dem eingelagerten Meristemgewebe jederzeit freilandgeeignete Pflanzen zur Wiedereinbringung in geschädigte Waldökosysteme und für weitere Versuche und Untersuchungen generiert werden.

Literatur

Schönweiss K, Meier-Dinkel A (2005) In vitro propagation of selected mature trees and juvenile embryo-derived cultures of common ash (Fraxinus excelsior L.). Propagation of Ornamental Plants 5: 137-145.

Nawrot-Chorabik, K., Pluciński, B. & Latowski, D. “Indirect auxiliary organogenesis of Fraxinus excelsior L. as a tool for ash dieback control.” New Forests (2023). https://doi.org/10.1007/s11056-023-09981-x

Teilvorhaben 5 SBS (2219WK21E4)

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Im Rahmen des Verbundvorhabens „Monitoring des Eschentriebsterbens in Deutschland (FraxMon)“ beteiligte sich SBS an der Auswahl und Einrichtung von Monitoringflächen

- AP 2 Plusbaumauswahl und Phänotypisierung
- AP 4 Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen
- AP 5 Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfungen
- AP 6 In-vitro-Vermehrung

Im Rahmen der projektinternen Kommunikation nahm SBS an allen Projekttreffen teil.

Bearbeitete Arbeitspakete

Auswahl und Einrichtung von Monitoringflächen (AP 1 – FraxMon)
Die Gewöhnliche Esche (*Fraxinus excelsior* L.) tritt in Sachsen vom Tiefland bis in die oberen Berglagen auf. Als sogenannte Edellaubbaumart kommt sie vor allem in nährstoffreichen Hartholzauen-, Eichen-Hainbuchen- und Buchenwäldern vor. Des Weiteren ist sie in Schlucht-, Schatthang- und Blockwäldern sowie Quellwäldern zu finden. Obwohl die Esche frische bis feuchte Standorte mit sehr guter Nährstoffversorgung bevorzugt, kann sie auch auf trockeneren Böden als Pioniergehölz wachsen (SCHMIDT 2002).

Um die wichtigsten Vorkommensgebiete der Esche in Sachsen zu repräsentieren, erfolgte die Einrichtung von einer Intensivbeobachtungsfläche (IBF) im Leipziger Auwald und einer anderen im Osterzgebirge nach den Vorgaben des Verbundvorhabens FraxMon (Tabelle 12 und Tabelle 13).

Tabelle 12 Lage der Intensivbeobachtungsflächen in Sachsen

Id.-Nr.	Name	Forstbetrieb	Revier	Abt.	Red. Fläche	Besitzart
SN 01	Leutzsch	Stadtwald Leipzig	Leutzsch	183	1,2 ha	Kommunalwald
SN 02	Bienhof	FoB Neustadt	Berggießhübel	100a2	1,2 ha	Landeswald

Tabelle 13 Standörtliche Verhältnisse und Bestandesverhältnisse der Intensivbeobachtungsflächen in Sachsen

Id.-Nr.	Name	Höhenlage ü. NN	Alter in a	Anzahl Eschen	Abgänge bis Sommer 2023	Standort
SN 01	Leutzsch	110 m	88/157	39	2 (Windwurf)	Auengley
SN 02	Bienhof	460 m	49-66	175	5 (Entnahme FraxCollar) 7 (Windwurf)	Braunerde

Zu Beginn der Erhebungen des Kronenzustandes auf den IBF im Winterhalbjahr 2020/21 konnten keine ungeschädigten Eschen mehr festgestellt werden. Die mittlere Schadstufe betrug auf der IBF Leutzsch 3,0 und war damit eine halbe Schadensstufe besser als die der Eschen auf der IBF Bienhof mit 3,4. Im Laufe der weiteren Bonituren in den Winterhalbjahren 2021/22 und 2022/23 gingen die mittleren Schadstufen leicht zurück bzw. stagnierten (Tabelle 14).

Tabelle 14 Entwicklung des Kronenzustandes auf den Intensivbeobachtungsflächen (IBF) vom Winterhalbjahr 2020/21 bis zum Sommerhalbjahr 2023

IBF	Zeitpunkt der Aufnahme und mittlere Kronenschadstufe					
	Winter 2020/21	Winter 2021/22	Winter 2022/23	Sommer 2021	Sommer 2022	Sommer 2023
SN 01-Leutzsch	3,0	2,7	2,7	2,4	2,8	2,0
SN-02-Bienhof	3,4	3,1	3,1	2,7	3,0	2,2

In den Sommerhalbjahren waren die mittleren Schadstufen grundsätzlich niedriger als in den Winterhalbjahren. Nach einem Anstieg im Sommerhalbjahr 2022 verringerten sich die mittleren Schadstufen im Sommer 2023 und sanken unter das Ausgangsniveau (Tabelle 14).

Arbeitspaket 2: Plusbaumauswahl und Phänotypisierung

Plusbaumauswahl

Die Auswahl der Eschenplusbäume entsprechend der mit den Projektpartnern entwickelten Vorgaben erfolgte in zwei Schritten mit zunächst 54 (2021) und dann weiteren 32 Plusbäumen (2022). Die Schwerpunkte der Auswahl lagen im Bereich der sächsischen Mittelgebirge vom Vogtland über das Erzgebirge einschließlich Vorland bis zum Zittauer Gebirge (56 %) sowie des Löß-Hügellandes und der Löß-Ebenen (27 %). Die restlichen 17 % der ausgewählten Plusbäume entfielen auf die Westlausitzer Platte und Elbtalzone (10 %) und das Altmoränenland (7 %).

Die Höhenlagen der Plusbäume bewegten sich zwischen 97 m und 843 m ü. NN. Auf die Höhenlagen bis 400 m ü. NN entfielen 61 %, bis 700 m ü. NN 29 %, auf Lagen über 700 m ü. NN 11 % der Plusbäume. Die Plusbäume stockten in der Hauptsache auf mineralischem Substrat (90 %) ohne Grundwassereinfluss (92 %).

In Hinsicht auf die Herkunftsgebiete befanden sich 70 % im Südostdeutschen Hügel- und Bergland (811 06) und 30 % im Mittel- und Ostdeutschen Tief- und Hügelland (811 03).

Phänotypisierung in Hinsicht auf forstlich relevante Merkmale

Die ausgewählten Plusbäume waren überwiegend (74 %) vorherrschende und herrschende Eschen nach KRAFT, 26 % entfielen auf die KRAFT´sche Klasse mitherrschend. Die Dimensionen der Plusbäume können Tabelle 15 entnommen werden.

Tabelle 15 Kenngrößen ausgewählter forstlich relevanter Merkmale

Kenngrößen	Höhe in m	BHD in cm	Ansatz lebende Krone in m	Kronenradius in m
Minimum	22,0	32,0	5,0	3,5
Maximum	43,0	104,0	24,0	12,0
Mittelwert	31,5	55,7	14,5	6,0

Qualitativ wiesen 92 % der Plusbäume zweischnürige bzw. einschnürige Stämme mit geringem Bogen, die restlichen 8 % einschnürige Stämme mit starkem Bogen bzw. unschnürige Stämme mit geringem Bogen auf. Mit zwei Ausnahmen waren alle Plusbäume nicht drehwüchsig. 21 % der ausgewählten Plusbäume zeigten keinerlei Verzwieselung der Stämme. 62 % der Plusbäume verzwieselten in der oberen Hälfte des Stammes, während bei 16 % der Eschen Zwiesel in der unteren Hälfte bzw. in einem Prozent der Fälle Mehrfachzwiesel zu beobachten waren.

Von den Plusbäumen waren 81 % überwiegend männlichen und 19 % überwiegend weiblichen Geschlechtes.

Phänotypisierung in Hinsicht auf Resistenzmerkmale in situ

Die ausgewählten Plusbäume wiesen überwiegend (72 %) einen Abstand zwischen 20 m und 50 m (31 %) bzw. zwischen 50 m und 100 m (41 %) von der nächsten durch das Eschentriebsterben befallenen Esche auf. Unter 20 m Abstand standen 19 % der Plusbäume, während 9 % mehr als 100 m entfernt standen.

Ebenso wie bei den bonitierten Eschen auf den Intensivbeobachtungsflächen zeigte sich im Sommerhalbjahr 2022 eine Verschlechterung des Kronenzustandes der bis zum jeweiligen Erhebungszeitpunkt ausgewählten Plusbäume (Tabelle 16). Entsprechend der Auswahlkriterien erfolgte vordringlich die Berücksichtigung von Plusbäumen, die erste Symptome (Stufe 1) bis leichte Schäden (Stufe 2) in den Kronen aufwiesen.

Tabelle 16 Entwicklung des Kronenzustandes der ausgewählten Plusbäume vom Sommerhalbjahr 2021 bis zum Sommerhalbjahr 2023

Zeitpunkt	Anzahl bonitierter Plusbäume	Anteil Plusbäume an Kronenschadstufe in %					
		0	1	2	3	4	5
Sommer 2021	54	0	85	15	0	0	0
Sommer 2022	53	0	58	42	0	0	0
Winter 2022/23	78	0	81	19	0	0	0
Sommer 2023	86	1	74	23	1	0	0

Phänotypisierung in Hinsicht auf Resistenzmerkmale ex situ

Nach einer umfassenden Risikoanalyse hatte sich der SBS entschieden, an dem zweistufigen Testverfahren zur Erfassung von Resistenzmerkmalen *ex situ* in Form eines Ascosporen- und eines Inokulations-Tests teilzunehmen. Für den Ascosporen-Test standen 2022 54 Plusbaumklone aus heterovegetativer Vermehrung der Auswahl 2021 mit bis zu 15 Ramets pro Klon zur Verfügung. Die Pflanzen wurden im sogenannten Nordteil des Versuchsgeländes von SBS unter dem Schirm einer Eschen-Klonsammlung randomisiert auf Gittergestellen ausgebracht. Zur Kontrolle dienten zwei sensible Klone W 1 und W 2 mit 5 bzw. 7 Ramets pro Klon. Für die Erfassung des Infektionsdrucks wurde eine Sporenfalle, die durch den Koordinator zur Verfügung gestellt wurde, aufgebaut und in den vorgegebenen Abständen beprobt. Der Versuch begann mit der Ausbringung von infizierten Blattstielen aus einem Eschenbestand im FoB Chemnitz, Revier Zellwald, Abt. 420 im Juni 2022. Die Erfassung von Symptomen erfolgte mit Hilfe standardisierter Boniturschemata im August und Oktober 2022 sowie im März 2023.

Für die Durchführung der zweiten Stufe erfolgte die Bereitstellung von weiteren Pfropflingspflanzen von 45 Klonen mit ein bis 13 Ramets pro Klon in der Schattenhalle der Forstbaumschule Graupa des SBS. Zur Kontrolle wurde wiederum der Klon W 2 mit fünf Ramets herangezogen. Dieser Versuch begann im August 2022 mit Inokulierung von Isolaten mit Holzchips entsprechend eines standardisierten Verfahrens. Die Erfassung von Symptomen wurde wiederum mit Hilfe standardisierter Boniturschemata im November 2022 sowie im Februar, April, Juni und August 2023 im Abstand von 8 Wochen durchgeführt.

Die Aufnahmedaten der Versuchsreihen wurden ebenso wie die Proben der Sporenfallen dem Koordinator zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt.

Im Juli 2023 erfolgte die Anlage eines zweiten Ascosporen-Tests mit 28 Plusbaumklonen aus heterovegetativer Vermehrung der Auswahl 2022 mit bis zu 23 Ramets pro Klon. Auf Grund der Erfahrungen mit dem ersten Ascosporen-Test soll eine erste Erfassung von Schadsymptomen nach dem Blattaustrieb im Jahr 2024 durchgeführt werden.

Arbeitspaket 4: Heterovegetative Vermehrung der Plusbäume (Pfropfung) und Anlage von Klonsammlungen

Die für die Vermehrung der Plusbäume durch Pfropfung (Veredelung) erforderlichen Reiser wurden in drei Erntekampagnen im August 2021 (18 Plusbäume), Januar 2022 (35 Plusbäume) und Januar 2023 (29 Plusbäume) durch qualifizierte Baumsteiger gewonnen. Die Anzahl Reiser je Plusbaum

betrug an den ersten beiden Terminen 20, ab Januar 2023 30 Reiser, um die Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl von Individuen je Plusbaum in jedem Fall sicherzustellen.

Die Vermehrung erfolgte im August 2021 als Sommerveredelung, im Januar 2022 und 2023 als Winterveredelung durch private Baumschulbetriebe.

Im Zuge der Überlegungen, mit den verfügbaren Pfropflingen eine Klonsammlung anzulegen, die vom Grundsatz das Design einer Samenplantagen aufweist, hat sich SBS entschieden, zunächst nur eine Klonsammlung im klassischen Sinne aufzubauen. Der Grund dafür war, die weitere Entwicklung der ausgelesenen und vorgetesteten Plusbäume in Hinsicht auf ihre Resistenz weiter zu beobachten. Die Anlage einer Samenplantage soll dann in einem zweiten Schritt mit denjenigen Plusbäumen erfolgen, die sich als stabil in ihrem Resistenzverhalten über einen längeren Zeitraum erwiesen haben. anzulegen

Als geeignete Fläche für die Anlage der Klonsammlung wurde eine ehemalige Eschen-Samenplantage mit ungeprüften Klonen aus den 1990er Jahren identifiziert. Auf Grund der zunehmenden Auflösungserscheinungen durch Befall mit dem Eschentriebsterben erfolgte keine Zulassung nach dem Forstvermehrungsgutgesetz als Ausgangsmaterial in der Kategorie „Qualifiziert“. Die verbliebenen Eschen auf dieser Fläche können als Schirm für die neu anzupflanzenden Eschen-Pfropflinge dienen.

Die Auspflanzung der erzeugten Pfropflinge ist grundsätzlich vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängig. Des Weiteren sollen für die Anlage von Samenplantagen nur diejenigen Plusbäume verwendet werden, die weniger als 30 % befallene Individuen nach dem Durchlaufen der Resistenztests aufweisen.

Unter Berücksichtigung der genannten Vorgaben erfolgte im Frühjahr 2023 die erste Anpflanzung von 28 vermehrten Plusbäumen in der Hauptsache mit sieben Ramets je Plusbaum. In vier Fällen standen nur sechs Individuen, in einem Fall nur fünf zur Verfügung.

Arbeitspaket 5: Saatguternte, Pflanzenanzucht und Nachkommenschaftsprüfungen
Auf Grund der spärlichen Fruktifikation der Eschen in den Jahren 2021 und 2022 konnte nur sehr unterschiedliches Saatgut in Hinsicht auf Erntemenge und Qualität von jeweils fünf Plusbäumen geerntet werden. Die Ernte erfolgte 2021 in noch grünem Zustand, 2022 in reifen Zustand des Saatgutes. Unabhängig von dem Reifegrad verlief die nachfolgende Anzucht nach entsprechender Vorbehandlung in jedem Fall mit Anzuchtwerten unter einem Prozent Pflanzen je ausgebrachter Menge Saatgut äußerst unbefriedigend. Im Ergebnis steht keine ausreichende Anzahl von Pflanzen für die Anlage einer Nachkommenschaftsprüfung zur Verfügung.

Arbeitspaket 6: In-vitro-Vermehrung
SBS stellte den Baumschulen Oberdorla GmbH Vogtei in den Jahren 2021 bis 2023 jeweils ein bis drei Pfropfreiser von insgesamt 42 Plusbäumen bereit, die als Ausgangsmaterial für die Etablierung von Meristem-Kulturen dienten. Die geringe Anzahl an Pfropfreisern erklärt sich dadurch, dass der Anzucht und Lieferung von Veredelungen für die weiterführenden Arbeiten des Vorhabens (Resistenztests, Anlage von Klonsammlungen) grundsätzlich Priorität eingeräumt wurde. Nach Pfropfung der zur Verfügung stehenden Reiser auf Unterlagen und Austrieb der Reiser begannen die Baumschulen Oberdorla mit den Triebspitzen Versuche zur Etablierung der In-vitro-Vermehrung.

Die Etablierung von In-vitro-Kulturen stieß auf zwei Probleme: die notwendige Sterilisation der Explantate bei gleichzeitiger Vermeidung von Absterbeerscheinungen. Dazu wurden Varianten unterschiedlicher Vorbehandlung (Vorkultur in Ascorbinsäure zur Reduzierung der Phenoloxidation =Verbräunung) als auch Dauer und Konzentration des Sterilisationsmittels Quecksilberchlorid (0,1 % - 0,25 %, 10 – 30 Minuten auch mit Intervall) getestet. Obwohl insgesamt über 400 Explantate eingesetzt wurden, konnte auf Grund der sehr geringen Probenanzahl je Klon bzw. Variante kein optimales Verfahren gefunden werden. Zufällig zeigte sich an 4 Explantaten ein Austrieb, der jedoch nicht zu einer dauerhaften Kultur entwickelt werden konnte. Allerdings wurde nur das Grundmedium WPM für diese Experimente verwendet. Eine Wiederholung mit dem Grundmedium Rugini (Rugini

Olive Medium: Katalog-Nr. R0258 Duchefa Biochemicals), mit dem inzwischen bei anderweitig gelagerten Versuchen positive Erfahrungen gesammelt wurden, konnte mangels Materials in 2023 nicht durchgeführt werden, da im Sommer ein nachfolgender Austrieb witterungsbedingt zu gering war. Ruheknospen sind generell nicht für die Etablierung der In-vitro-Vermehrung geeignet.

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

1. Im Leipziger Auwald (Leutzsch) und im Osterzgebirge (Bienhof) konnte jeweils eine Intensivbeobachtungsfläche auf Standorten etabliert werden, die für den Anbau von Eschen von Bedeutung sind. Zu Beginn der Kronenzustandserhebungen befanden sich auf beiden Flächen keine gesunden Eschen mehr. Mit Mittel über alle Eschen waren die Kronen stark geschädigt mit einer Tendenz zum Absterben auf der Fläche Bienhof. Der Zustand der Eschenkronen hatte sich bis zum Sommer 2023 leicht verbessert. Ob es sich hierbei um eine grundsätzliche Entwicklung oder um eine witterungsbedingte Ausnahme handelte, müssen weitere Beobachtungen des Kronenzustandes zeigen.
2. Die Auswahl von Plusbäumen erbrachte insgesamt 82 Eschen, die zum Zeitpunkt der Auswahl nur erste Symptome bzw. leichte Schäden aufwiesen trotz geschädigter Eschen in ihrem Umfeld. Schwerpunkte der Auswahl lagen in den Mittelgebirgen und im Lößhügelland einschließlich der Lößebenen. Die Plusbäume entsprachen weitgehend den qualitativen Auswahlkriterien. Auch im Falle der Plusbäume konnte bis zum Sommer 2023 eine leichte Verbesserung des Kronenzustandes beobachtet werden. Auch in diesem Fall gilt das unter (1) gesagte.
3. Mit Ausnahme der Vermehrung durch Veredelung gestaltete sich die Erzeugung von Eschen-Pflanzen aus Saatgut und aus In-vitro-Vermehrung äußerst herausfordernd. Im Falle der Anzucht aus Saatgut spielten eine spärliche Fruktifikation in Kombination mit nicht mehr vorhandenem Basiswissen über die Anzuchtverfahren von Eschen in der Baumschule eine bedeutende Rolle. Im Fall der In-vitro-Vermehrung gibt es trotz vielversprechender Ansätze noch kein praxisreifes Verfahren, das eine verlässliche Anzucht von Eschen-Pflanzen ermöglicht.
4. Mit der Anlage einer Klonsammlung mit auf ihre Resistenz gegenüber dem Eschentriebsterben vorgetesteten Plusbäumen konnte ein erster Schritt in Richtung des Aufbaus einer Samenplantage mit resistenteren Eschen-Plusbäumen gegangen werden.

Teilvorhaben 6 UGoe (2219WK2F4)

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Ziel des Teilvorhabens ist die Identifizierung von Resistenzmarkern gegen das Eschentreibsterben mittels Transkriptomanalyse. Es wurden erfolgreich drei Inokulationsexperimente an Blättern ausgewählter Genotypen der Gemeinen Esche unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt und die RNA von insgesamt 220 Proben sequenziert. Die ersten Ergebnisse sind vielversprechend, da eine Vielzahl differentiell exprimierter Gene identifiziert werden konnte. Zurzeit werden Primer entwickelt, die eine spezifische Amplifikation der potentiellen Resistenzmarker erlauben und ihre Charakterisierung in den IBF Proben ermöglichen sollen.

Bearbeitete Arbeitspakete

Arbeitspakete (AP)	**Bearbeitungsstand**
AP 8.1 Probennahme für die RNA-Sequenzierung und phänotypische Charakterisierung der Bestände Meilenstein 8.1 Sammlung und Aufbereitung des Probenmaterials	Stand: abgeschlossen Es wurden insgesamt 10 Eschengenotypen, die als besonders anfällig, bzw. nicht anfällig klassifiziert wurden in Bayern (AWG) und Mecklenburg-Vorpommern (Thünen Institute) identifiziert, durch Pfropfung (Thünen Institute und NW-FVA) vervielfältigt und in drei Inokulationsexperimenten mit *Hymenoscyphus fraxineus* an der Universität Göttingen verwendet. Es wurde von insgesamt 220 Proben RNA extrahiert und diese sequenziert. Zusätzlich wurde Blattmaterial von Altbäumen und Jungbäumen in den IBF gesammelt und zur DNA-Extraktion verwendet. Alle Altbäume der IBF wurden von FraxMon phänotypisch charakterisiert.
AP 8.2 RNA-Extraktion und Transkriptom-Sequenzierung Meilenstein 8.2 RNA-Extraktion, cDNA-Bibliotheken und Illumina Sequenzierung	Stand: abgeschlossen Es wurden RNA- Extraktionen mit dem E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Bio-tek, Winooski, USA) durchgeführt. Der Inokulationserfolg wurde mit Hilfe der RT-qPCR verifiziert und 220 Proben wurden für die RNA-Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzierung wurde vom NIG (NGS-Serviceeinrichtung für Integrative Genomik der Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt und alle Sequenzdaten liegen seit Juli 2023 vor.
AP 8.3 RNA-seq-Analyse Meilenstein 8.3 Identifizierung und Validierung von Kandidatengenen	Stand: überwiegend abgeschlossen Das Testexperiment und Experiment 1 wurden bereits vollständig analysiert, zurzeit werden die Analysen des zeitlichen Verlaufs der Genexpression (Experiment 2) noch vervollständigt.
AP 8.4 SNP-Identifizierung und Charakterisierung Meilenstein 8.4 Identifizierung und Charakterisierung von diagnostischen SNPs	Stand: andauernd Basierend auf den Ergebnissen der differentiellen Genexpression und ihrer Promoterregionen werden zurzeit Primer für vielversprechende Regionen entwickelt. Diese potentiellen Resistenzmarker sollen dann in den Proben der IBF charakterisiert werden.

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Testexperiment

Das Testexperiment, durchgeführt in 2021, hat uns wichtige Informationen über den Erfolg unserer Inokulationstechnik und den Zeitpunkt der Probennahme gegeben, die wir dann für die Durchführung von Experiment 1 und 2 optimieren konnten. So erschien z.B. die Probennahme nach 7 Tagen im Testexperiment recht früh, da noch nicht alle Proben eine deutliche Expressionsantwort zeigten. Aus diesem Grunde wurden die Proben in Experiment 1 erst 17 Tage nach der Inokulation gesammelt. Der Vergleich eines besonders anfälligen (UW1) und eines weniger anfälligen Genotyps (FAR3) der Esche zeigte auch, dass vom toleranteren Genotyp deutlich weniger Gene differentiell exprimiert wurden (Abbildung 15). Dies könnte darauf hinweisen, dass dieser eine spezifischere und dadurch effektivere Antwort gegenüber dem Pathogen zeigt. Da die Bäume im Gewächshaus nach einiger Zeit von Spinnmilben attackiert wurden, haben wir entschieden die folgenden Experimente in Klimakammern durchzuführen.

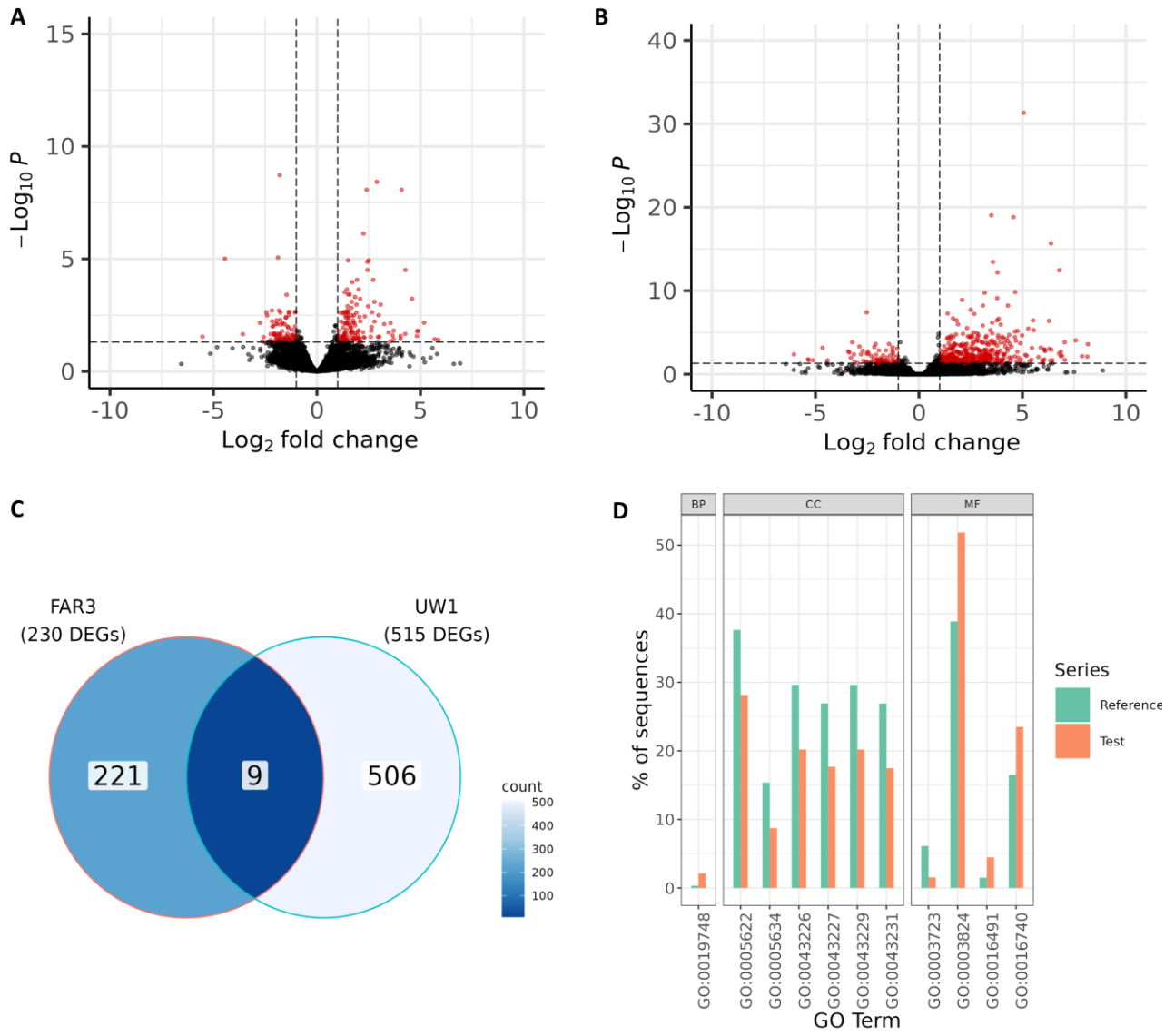


Abbildung 15 Differentielle Genexpression bei zwei Genotypen der Europäischen Esche, die mehr (UW1) oder weniger (FAR3) anfällig für das Eschensterben sind. Die Blattrachis der Bäume wurde mit sterilen oder infizierten Holzpfropfen geimpft und nach sieben Tagen beprobt. A-B Volcanoplots für FAR3 (A) und UW1 (B). Die X-Achse zeigt die log2-fachen Veränderungswerte an; die Y-Achse zeigt den -log10 der P-Werte. Rote Kreise zeigen Gene mit einem p-angepassten Wert < 0,05 und LFC > |1|. C Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene (DEGs), die mit bereinigten P-Werten von <0,05 und LFC > |1| hoch- oder herunterreguliert sind. Die blaue Farbskala zeigt die Anzahl der DEGs an. D Angereichertes Balkendiagramm für GO-Terme, die nach einer einfachen Anreicherungsanalyse (SEA) unter Verwendung

der Liste der DEGs für UW1 ermittelt wurden. Die SEA-Ergebnisse für FAR3 waren nicht signifikant und sind daher nicht dargestellt. BP = biologischer Prozess; CC = zelluläre Komponente; MF = molekulare Funktion.

Experiment 1

In Experiment 1 war unser Ziel die Genexpressionsantwort von 10 Genotypen mit unterschiedlicher ETS-Anfälligkeit in der Klimakammer zu charakterisieren. Das Inokulationsexperiment war erfolgreich und für alle Genotypen konnten differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Allerdings war die Expressionsantwort der einzelnen Genotypen sehr individuell (Abbildung 16), und es wurden bislang keine beständigen Unterschiede zwischen Genotypen unterschiedlicher Anfälligkeit gefunden.

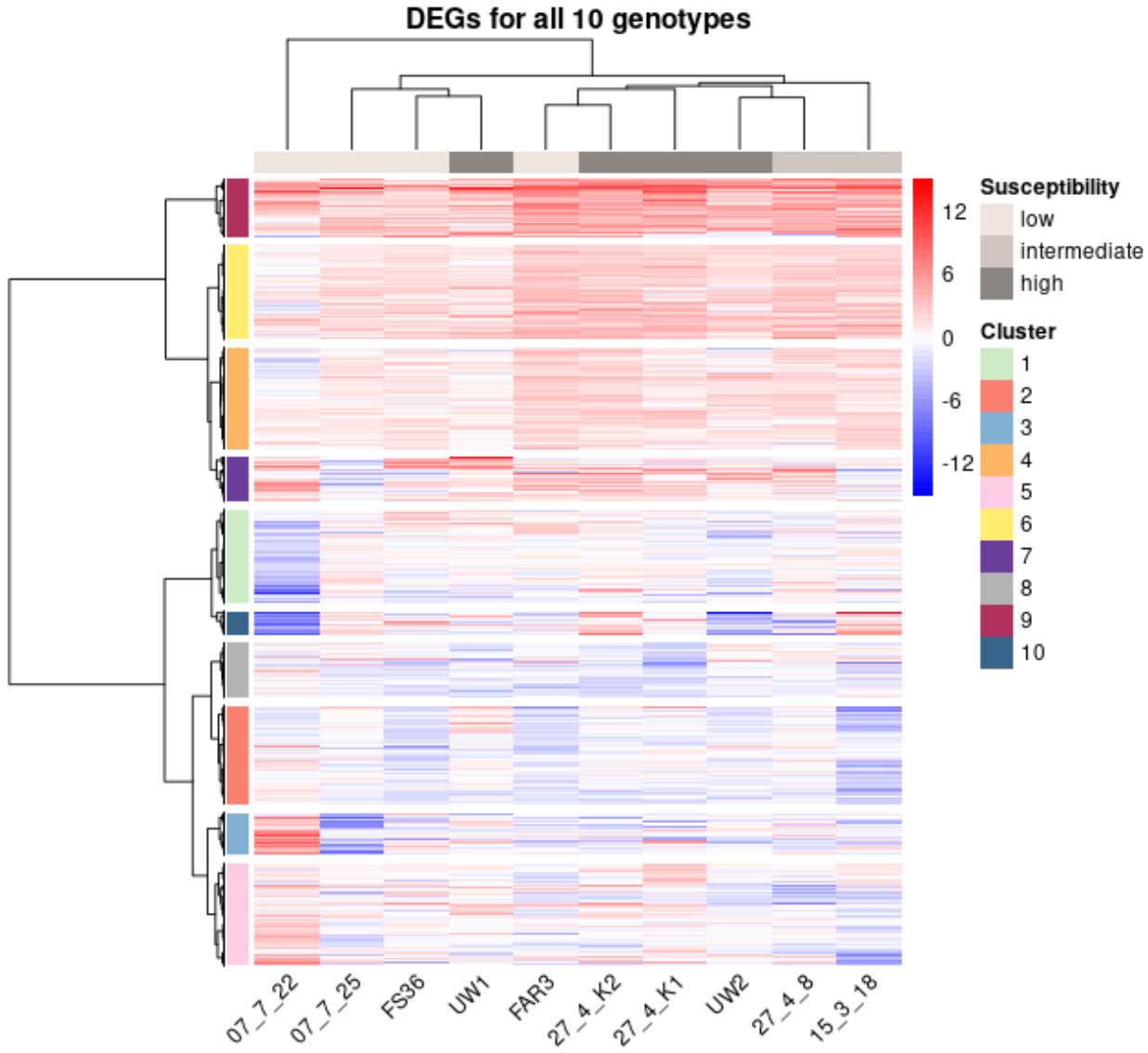


Abbildung 16 Heatmap der LFC-Werte (Veränderungswerte) von 4484 DEGs mit einem adj. pWert < 0,05 und LFC > |2| in mindestens einem der 10 analysierten Genotypen. Die Gene sind nach ihren Expressionsprofilen in 10 Clustern gruppiert (Zeilendendrogramm). Die Genotypen sind nach ihrer Anfälligkeit für ADB in 3 Clustern (Säulendendrogramm) zusammengefasst.

Experiment 2

In Experiment 2 war das Ziel den zeitlichen Verlauf der Genexpression 7, 14, 21 und 28 Tage nach Inokulation, beispielhaft anhand zweier anfälliger (UW1 und UW2) und zweier toleranter (FAR3 und FS36) Genotypen in der Klimakammer zu charakterisieren. Interessanterweise zeigte z.B. FAR 3, 7 Tage nach Inokulation eine deutlich höhere Anzahl differentiell exprimierter Gene als während des Testexperiments und auch als UW1 (anfälliger Genotyp) im selben Experiment. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zum Testexperiment und könnte darauf hindeuten, dass die Inokulation mit

Agarpfropfen (Exp. 1 und 2), statt mit Holzstückchen (Testexperiment), deutlich besser funktioniert hat und auch dass die Genexpressionsantwort in der Klimakammer, d.h. in einer deutlich stabileren Umgebung, deutlicher ausgefallen ist. Insgesamt zeigten alle 4 Genotypen eine besonders starke Expressionsantwort nach 7 Tagen, die in den beiden toleranten Genotypen mit der Zeit abnahm, während sie in den anfälligen Genotypen in den folgenden Wochen recht hoch blieb (Abbildung 17).

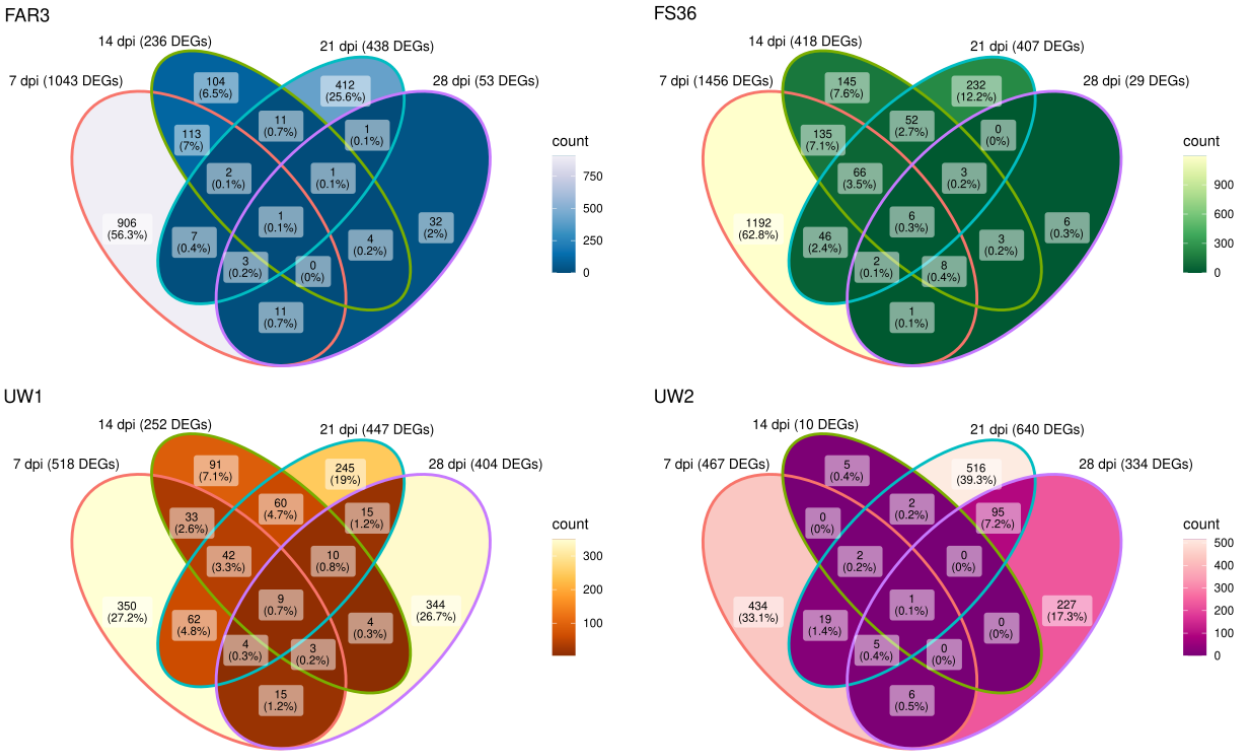


Abbildung 17 Venn-Diagramm mit der Anzahl der differentiell exprimierten Gene pro Genotyp und Zeitpunkt (7, 14, 21 und 28 Tage nach Inokulation). FAR3 und FS36 sind die beiden toleranten Genotypen, während UW1 und UW2 sehr anfällig sind. Die Stärke der Färbung spiegelt die Stärke der Genexpression (je dunkler desto mehr differentiell exprimierte Gene) wider.

Literatur

Doonan, J., Budde, K., Kosawang, C., Lobo, A., Verbylaite, R., Brealey, J., . . . Nielsen, L. (2023). Multiple, single trait GWAS and supervised machine learning reveal the genetic architecture of Fraxinus excelsior tolerance to ash dieback in Europe. *bioRxiv*, 2023.2012.2011.570802. https://doi.org/10.1101/2023.12.11.570802

Sahraei, S. E., Cleary, M., Stenlid, J., Brandström Durling, M., & Elfstrand, M. (2020). Transcriptional responses in developing lesions of European common ash (*Fraxinus excelsior*) reveal genes responding to infection by *Hymenoscyphus fraxineus*. *Bmc Plant Biology*, *20*(1), 455. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02656-1

Stocks, J. J., Metheringham, C. L., Plumb, W. J., Lee, S. J., Kelly, L. J., Nichols, R. A., & Buggs, R. J. A. (2019). Genomic basis of European ash tree resistance to ash dieback fungus [Article]. *Nature Ecology & Evolution*, *3*(12), 1686-1696. https://doi.org/10.1038/s41559-019-1036-6

Teilvorhaben 7 HUB (2219WK21G4)

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Teilvorhaben 7 umfasste die Schwerpunkte *in-vitro*-Vermehrung und Sekundärstoffwechsel.

Im Teil *in vitro* wurden zum einen Meristeme feldresistenter Eschen zur Vermehrung kultiviert. Bereits vorhandene Verfahren und Protokolle wurden überprüft und weiterentwickelt. Zum anderen wird ein Protokoll zur Induktion der somatischen Embryogenese, als alternative Massenvermehrungsmethode wertvoller Genotypen, entwickelt.

Im Teil Sekundärstoffwechsel wurden die Profile an phenolischen Inhaltsstoffen in toleranten und anfälligen Eschen qualitativ und quantitativ untersucht und mit der Infektionsanfälligkeit korreliert, um Aussagen darüber zu treffen, ob das Auftreten des ETS mit dem Vorhandensein bzw. der Menge bestimmter sekundärer phenolischer Inhaltsstoffe oder Inhaltsstoffgruppen in Verbindung steht. Die Ergebnisse wurden weiterhin mit den im Unterverbund FraxMon untersuchten physiologischen Biomarkern sowie in FraxGen untersuchten genetischen Resistenzmarkern in Verbindung gebracht.

Bearbeitete Arbeitspakete

AP 6, AP 10

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens
Teil *in-vitro*

Die Entwicklung eines Protokolls zur Induktion der somatischen Embryogenese war der Schwerpunkt der Arbeiten *in vitro* an der HU Berlin. Als Ausgangsmaterial wurden hierfür zygotische Embryonen aus Saatgut benutzt.
Erste Versuche 2020 wurden an Proben vom Thünen Institut in Waldsieversdorf durchgeführt. Es handelte sich um reifes, frei abgeblühtes Saatgut. Eine Charge wurde 2018 geerntet und gefroren gelagert (1494 Samen), die andere war von 2020 (1641). Als Medium wurde modifiziertes MS-Medium genutzt. Zur hormonfreien Kontrolle wurde eine Variante mit Zusatz von 8,8 µM 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 4,4 µM Benzylaminopurin (BAP) und eine Variante mit 26,84 µM Naphtalenessigsäure (NES) und 8,88 µM BAP. Daran ließen sich keine somatische Embryogenese (sE) auslösen. Dies ließ darauf schließen, dass reifes Saatgut nicht aus Ausgangsmaterial geeignet ist.

Um den Einfluss des Embryostadiums auf die Induzierbarkeit der sE zu untersuchen, wurden im Sommer 2021 in Berlin vier Bäume, in vier aufeinander folgenden Wochen, beginnend in der 30. KW beerntet. Insgesamt konnten 3493 Samen präpariert werden. Die Induktionsmedien basierten diesmal auf dem Woody Plant Medium (WPM), da sich WPM in der Kultur der Mikrostecklinge von *Fraxinus excelsior* bewährt hatte. Die Kombination und Konzentration der Wachstumsregulatoren wurden vom Versuch 2020 übernommen. An zwei Explantaten kam es zur Bildung von somatischen Embryonen. Diese ließen sich aber nicht weiter vermehren.

Auf den Versuchen vom Vorjahr aufbauend wurde 2022 eine angepasste Versuchsreihe angelegt. Vor Versuchsbeginn wurden drei andere Bäume in Berlin ausgewählt, da nicht dieselben fruktifiziert hatten. Anschließend wurde Saatgut in sieben aufeinanderfolgenden Wochen schon in KW 26 beginnend geerntet. Als Induktionsmedium wurden zwei Varianten WPM mit BAP und 2,4D verwendet. Insgesamt wurden 10980 Explantate aufgelegt, davon 900 Kontrolle. Die Kontrollembryos keimten zu 21,6% aus. Es konnten 104 Klone durch sE induziert werden. Das entspricht 1% der Proben. Die Kontaminationsrate war in diesem Experiment mit 22,6%

überdurchschnittlich hoch, somit sind die statistischen Auswertungen nicht komplett belastbar. Dennoch zeichnet sich KW 30 als bisher beste Erntewoche ab. Die sE-Kulturen konnten erfolgreich subkultiviert werden. Die Klone unterscheiden sich stark in ihren Wuchseigenschaften. Manche tendieren zur Spontanreifung und andere wachsen sehr langsam. Es konnten einige Klone gekeimt und auch akklimatisiert werden. Die Zugabe von Abscisinsäure zum Medium, welches die kontrollierte Reifung fördern sollte, führte zur Vitrifizierung und atypischem Wachstum.

Der Versuch aus 2022 wurde mit denselben Parametern auch 2023 wiederholt. Diesmal mussten wegen mangelnder Fruktifikation wieder neue Bäume ausgewählt werden. Die Ernte wurde diesmal auf fünf Wochen, beginnend in KW 26 beschränkt. Es wurden insgesamt 10125 Explantate aufgelegt, davon 675 auf Kontrollmedium. Die Kontrolle hatte eine niedrige Keimrate von 3,7%. Dies deutet auf eine mangelnde Keimfähigkeit des Saatgutes hin. Bei 1,7% der Proben konnte sE induziert werden. Somit wurden 157 neue Klone etabliert. Die besten Induktionsergebnisse konnten an Explantaten aus KW 28 festgestellt werden. Die Kontaminationsrate belief sich auf 3,6%.

Ein Problem bei der Kultur der somatischen Embryos bildet die Erhaltung der Kulturen. Diese konnten noch nicht synchronisiert werden. Auch können Kulturen einbrechen oder ihre Vermehrbarkeit stark sinken. Dafür sollte künftig eine Methode der Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (Kryokonservierung) entwickelt werden.

Neben der Entwicklung des Protokolls zur somatischen Embryogenese wurden auch Versuche zur direkten Vermehrung von ausgewählten Bäumen durchgeführt. Hierfür wurden Knospen von Altbäumen geerntet und deren Oberfläche sterilisiert. Anschließend wurden die Deckschuppen und äußeren Blätter abpräpariert und auf Medium gesetzt. Die Knospen auf Medium mit Gibberellinsäure zeigten einen besseren Austrieb. Trotz Sterilisierung war Kontamination ein großes Problem. Zum Teil sind 100% der Knospen eines Versuches kontaminiert. Auch erlitten viele der ausgetriebenen Explantate eine Wuchsdepression nach einigen Wochen in Kultur und starben ab. Die übrigen Proben konnten über Mikrostecklinge vermehrt und in der Kultur erhalten werden.

Andere Methoden, wie die Vermehrung über Organogenese an zuvor induziertem Kallus an Blättern oder die Thin-Cell-Layer Methode wurden wegen geringen Erfolgsaussichten nach wenigen Experimenten wieder eingestellt.

Teil Sekundärstoffwechsel

Zur Untersuchung des Sekundärstoffwechsels wurden verschiedene Proben genutzt. Dazu zählten Proben von den IBF, von abgepfropften Klonen, aus ein Inokulationsversuchen und aus Nachkommenschaften. Die schwerpunktmäßige Untersuchung der IBF-Bäume umfasste 245 Bäume von 13 IBF, die je nach Fläche in bis zu 4 Jahren analysiert wurden (im Fall von BB1). Von den Pfropflingen, bei denen der Fokus auf möglichst toleranten und möglichst anfälligen Eschen lag, standen nach zwei Veredlungsjahren insgesamt 57 Klone mit meist mehreren Individuen zur Verfügung. Ein Infektionsversuch mit 10 Genotypen wurde an der Uni Göttingen durchgeführt und der HU Blattproben zur Verfügung gestellt. Weiterhin konnten Triebproben von inokulierten Pflanzen aus einem Versuch am JKI untersucht werden. Gemeinsam mit dem TI wurden Proben in einer Vollgeschwisternachkommenschaft mit 100 Individuen genommen. Es wurden je nach Verfügbarkeit verschiedene Probenarten analysiert, welche Blätter, Triebe, Stamm und Rinde umfassten, wobei der Schwerpunkt auf Blattproben lag.

Es wurde eine geeignete Extraktions- und HPLC-MS-Methode gefunden, um die Proben auf ihr Phenolprofil zu untersuchen. Dabei wurden je nach Probenart Phenole aus dem Bereich der Flavonoide, Phenolsäuren, Phenylethanoidglykoside, Cumarine, Lignane und Secoiridoidglykoside identifiziert. Ein größerer Teil der detektierten Substanzen konnte mit der verfügbaren Methode nicht näher identifiziert werden, wurde aber genauso in die Auswertungen einbezogen.

Die Ergebnisse zeigten zwar eine hohe Variabilität der Phenolgehalte, es konnte jedoch kein klarer Zusammenhang mit der Infektionsanfälligkeit gegenüber dem ETS hergestellt werden. Tendenzen,

die für eine einzelne Fläche, Herkunft oder ein Jahr auftraten, ließen sich nicht verallgemeinern. Bei der Untersuchung der IBF-Proben hatten beispielsweise die Fläche und das Jahr einen größeren Einfluss auf die Inhaltsstoffgehalte. Trends in Bezug auf Unterschiede zwischen Boniturstufen waren inkonsistent und je nur bei einzelnen Flächen zu sehen. Es kam hinzu, dass Vergleiche zwischen stark und nicht oder wenig geschädigten Bäumen kaum möglich waren, da Bäume in Boniturstufe 0 fehlten und in Stufe 1 ebenfalls kaum Individuen vorhanden waren. Bei den Pfropflingen verschiedener Herkunft waren auch keine verallgemeinerbaren Trends zu beobachten. Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass Eschen zur Vermehrung schon zu Projektbeginn ausgewählt werden mussten. Langfristigere Daten zur Infektionsanfälligkeit inklusive Resistenztests lagen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor, was die Belastbarkeit der Daten und damit Aussagen zur Verbindung zwischen Toleranz und Inhaltsstoffgehalten einschränkt. Auch die Ergebnisse der Blattproben aus dem Infektionsversuch waren sehr Genotyp- und Herkunftsspezifisch, sodass Zusammenhänge mit dem Phänotyp (Infektionsanfälligkeit) nicht übertragbar waren.

Bei der Untersuchung von inokulierten Trieben mit Nekrosen zeigte sich, dass sich die Gehalte verschiedener Phenole zwischen dem nekrotischen Bereich und noch gesundem Triebmaterial unterschieden. Bei den meisten Substanzen davon waren die Gehalte in der Nekrose höher, bei einigen jedoch auch umgekehrt. Da das zur Verfügung gestellte Material keine uninfizierte Kontrollvariante und nur einen Klon umfasste und weitere Untersuchungen im Projektverlauf nicht möglich waren, sind die Beobachtungen nicht stärker belastbar und geben keine Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Infektionsanfälligkeit. Sie indizieren jedoch, dass Phenole in Holz und Rinde von Trieben in der Reaktion der Pflanze auf eine Infektion eine Rolle spielen können. Triebe und Stamm wurden auch an den Altbäumen auf den IBF analysiert, jedoch in geringerem Umfang als die Blattproben. Da die Phenolgehalte in den Trieben relativ gering waren, wurden durch 2022 keine Triebe mehr beprobt. Holzproben aus dem Stamm wurden u.a. bei vorhandenen Stammnekrosen untersucht, wobei abfallende Phenolgehalte in der Nekrose festgestellt wurden.

Weitere Ausführungen zu den Ergebnissen sowie Abbildungen finden sich im Teil II des Schlussberichts.