

# Schlussbericht

## zum Vorhaben

Thema:

**Untersuchung von genetischer, epigenetischer und phänotypischer Variation in Douglasien-Nachkommenschaften aus deutschen Saatguterntebeständen und aus Originalherkünften**

Kurztitel: **Genetische und epigenetische Effekte auf die Wuchsleistung**

Akronym: **EPIGEN**

**Teilvorhaben 1: Untersuchung von genetischer und epigenetischer Variation in Douglasien-Nachkommenschaften**

Zuwendungsempfänger: **Georg-August-Universität Göttingen**

Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie, Abteilung Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Prof. Dr. Oliver Gailing, Tel.: 0551 / 39-33536, Fax: 0551 / 39-8367, E-Mail: ogailin@gwdg.de

Förderkennzeichen: **2220NR037A**

Laufzeit: **01.07.2020 - 30.03.2024**

**Teilvorhaben 2: Untersuchung von phänotypischer Variation in Douglasien-Nachkommenschaften**

Zuwendungsempfänger: **Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (NW-FVA),**

Abteilung Waldgenressourcen, Dr. Wilfried Steiner, Tel.: 5541 / 7004-48, Fax: 5541 / 7004-73, E-Mail: Wilfried.Steiner@nw-fva.de. Daniel Schmidt (vorherig A. Hischer)-

Förderkennzeichen: **2220NR037B**

Laufzeit: **01.12.2020 - 30.11.2022**

Monat der Erstellung: **Juni 2024**

Datum der Veröffentlichung: **21.01.2025**

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Kurzbericht .....</b>	<b>2</b>
1.	Aufgabenstellung .....	2
2.	Planung und Ablauf des Vorhabens .....	2
3.	Resümee der wesentlichen Ergebnisse .....	3
	a) Arbeitspakete und Meilensteine .....	3
	b) Zusammenfassung .....	4
<b>II.</b>	<b>Ausführliche Darstellung der Ergebnisse .....</b>	<b>5</b>
1.	Erzielte Ergebnisse .....	5
	1.1. AP1: Pflanzenproben .....	5
	1.2. AP2: Der Identifizierung genetischer und epigenetischer Varianten, die mit der Wuchsleistung im Zusammenhang stehen .....	6
	1.3. AP3: Potenzielle Korrelationen zwischen SNPs und methylierungsbezogenen DNA-Varianten (MRDs) .....	7
	1.4. AP4: Assoziationsanalyse von Baumleistungsmerkmalen in Douglasien-Herkunftsversuchen .....	8
	1.5. AP5: Bestimmung bzw. Validierung des geographischen Ursprungs von 'deutschen' Saatgutbeständen .....	9
	1.6. AP6: Auswahl von Plusbäumen und Provenienz .....	10
2.	Verwertung .....	11
	a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen .....	11
	b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende .....	12
	c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende .....	12
	d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit .....	12
	e) Stand der Erreichung der in der Vorhabenbeschreibung aufgeführten Verwertungsoptionen, Forschungsdaten .....	12
3.	Erkenntnisse von Dritten .....	12
4.	Veröffentlichungen .....	12
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>13</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>14</b>
	1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens .....	14
	2. Bearbeitete Arbeitspakete .....	14
	3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens .....	15

# I. Kurzbericht

## 1. Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit untersucht die genetischen und epigenetischen Grundlagen der Wuchsleistung bei Douglasien (*Pseudotsuga menziesii*), um die Auswahl von Hochleistungsbäumen und -herkünften für die Forstwirtschaft zu optimieren. Dabei stehen folgende Forschungsfragen im Mittelpunkt:

1. Inwieweit unterscheiden sich deutsche Saatguterntebestände und Originalherkünfte hinsichtlich genetischer und epigenetischer Variation in Bezug auf Wuchsleistung?
2. Lassen sich genetische und epigenetische Marker identifizieren, die mit der Wuchsleistung assoziiert sind und für die markergestützte Selektion genutzt werden können?
3. Welchen Einfluss haben Umweltfaktoren auf die epigenetische Variation und somit auf die Wuchsleistung von Douglasien?

Die Beantwortung dieser Fragen soll neue Erkenntnisse über die genetische und epigenetische Kontrolle der Wuchsleistung bei Douglasien liefern und dazu beitragen, die Effizienz der Züchtung und die Anpassungsfähigkeit an zukünftige Umweltbedingungen zu verbessern.

## 2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Arbeitspakete /Jahr	2020		2021				2022				2023				2024			
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	
Auswahl der Versuchsflächen und Probennahme	√	√	√															
Aufnahme der Wuchsleistung und assoziierter Merkmale				√	√			√	√									
Identifizierung genetischer und epigenetischer Varianten, die mit der Wuchsleistung im Zusammenhang stehen				√	√	√	√	√	√	√	√	√	√					
Assoziationskartierung in Douglasien-Herkunftsversuchen							√	√	√	√	√	√	√	√				
Bestimmung des geographischen Ursprungs „deutscher“ Saatguterntebestände									√	√	√	√	√	√	√	√		
Zwischenberichte, Abschlussbericht und Vorstellung der Ergebnisse in Fachzeitschriften und Tagungen		√				√				√	√							
Identifikation zusätzlicher DMR-assoziierter SNPs													√	√	√	√		
SNP Markerentwicklung														√	√	√	√	
SNP-Genotypisierung und Assoziation mit phänotypischen Merkmalen														√	√	√	√	
Plusbäume und Provenienzauswahl																√	√	
Abschlussbericht und Vorstellung der Ergebnisse in Fachzeitschriften und Tagungen																√	√	

### 3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse

#### a) Arbeitspakete und Meilensteine

Arbeitspakete (AP)	Zielerreichung
<p><b>AP 1:</b> Identifizierung genetischer und epigenetischer Varianten, die mit der Wuchsleistung im Zusammenhang stehen</p>	<p>Für die genomweite Charakterisierung genetischer (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) und epigenetischer Variation (Single Methylation Variants, SMVs) werden 160 ausgewählte Individuen mithilfe der Methylomsequenzierung basierend auf der RADseq-Methode untersucht. Es wurden 125 Individuen von vier nordamerikanischen Herkünften mit jeweils zwei Samenjahrgängen und zusätzlich 33 Individuen zweier deutscher Herkünfte im Herkunftsversuch Iloo und Harsefeld ausgewählt.</p> <p>Über 1000 DNA-Proben wurden für die NGS-Sequenzierung, MassArray-Genotypisierung und SSR-Analyse vorbereitet.</p> <p>Das RADseq und das methylRADseq-Protokoll werden für die Douglasie optimiert, da diese Methoden bislang nicht bei Douglasien angewendet wurden.</p>
<p><b>AP 2:</b> Assoziationsanalysen in Douglasien-Herkunftsversuchen</p>	<p>Die Validierung der im Arbeitspaket 1 identifizierten SNPs und SMVs erfolgt mittels Assoziationsanalysen. Um anpassungsrelevante genetische und epigenetische Variationen zu charakterisieren, werden wir sowohl Assoziationen mit Klimavariablen als auch mit Wachstumseigenschaften untersuchen.</p> <p>Die Assoziationskartierung wird an 2 Standorten durchgeführt, an denen dieselben Herkünfte repräsentiert sind, um Genotyp-Umwelt Interaktionen zu charakterisieren. 854 Proben wurden von beiden Standorten (Iloo and Harsefeld) für Assoziationsanalysen gesammelt.</p> <p>Es wurden 120 SNP-Marker in Genen für die Trockenstresstoleranz basierend auf Literaturstudien ausgewählt und mit dem MassArray System getestet.</p>
<p><b>AP 3:</b> Bestimmung bzw. Validierung des geographischen Ursprungs „deutscher“ Saatgutbestände</p>	<p>Die DNA von insgesamt 1047 Individuen aus beiden Douglasien-Herkunftsversuchen Standorten (Iloo and Harsefeld) wurde extrahiert und sowohl an nuSSRs im Labor untersucht und anschließend ausgewertet.</p>
<p><b>AP 4:</b> Identifikation zusätzlicher DMR-assoziierter SNPs</p>	<p>Um die genetische Kontrolle der mit dem Baumwachstum assoziierten differentiellen Methylierungsmuster zu untersuchen, wurden Assoziationsanalysen zwischen den identifizierten DMRs und genomweiten SNPs durchgeführt. Dies ermöglichte die Identifizierung zusätzlicher SNPs, die mit Veränderungen im Methylierungsgrad an spezifischen Loci zusammenhängen und somit möglicherweise eine regulatorische Funktion auf die epigenetische Variation und das Baumwachstum ausüben.</p>
<p><b>AP 5:</b> SNP Markerentwicklung, Genotypisierung und Assoziation mit phänotypischen Merkmalen</p>	<p>Wir haben mehrere hundert SNPs untersucht, die mit der Leistungsfähigkeit und wachstumsbezogenen DNA-Methylierungsmustern von Bäumen in Zusammenhang stehen. Wir haben eine neue Projektskizze (GENOCHIP) eingereicht, um die genetische Charakterisierung und Züchtung von Douglasien in Deutschland zu verbessern.</p>

<b>AP 6:</b> Plusbäume und Provenienzauswahl	Protokoll zur Auswahl von Plusbäumen und Zielprovenienzen mit markergestützte Selektion und der phänotypischen Bewertung erfolgen
--	---

<b>Meilenstein (M)</b>	<b>Zielerreichung</b>
<b>M1:</b> Genomweite Sequenzierung (RADSeq) und das methylRADseq	Die Sequenzierungsanalyseplattform für RADSeq und methylRADseq wurde zum ersten Mal für die Douglasie etabliert. Das Manuskript wurde bereits veröffentlicht (Vu <i>et al.</i> , 2024).
<b>M2:</b> Wachstumsleistungsassoziierte genetische und epigenetische Varianten	Es wurden 652 epigenetische Loci identifiziert, die mit dem Baumwachstum assoziiert sind. Darüber hinaus konnte die genetische Variation, die diese epigenetischen Modifikationen steuert, charakterisiert werden.
<b>M3:</b> Des geographischen Ursprungs „deutscher“ Saatgutbestände	Die Analysen ergaben, dass die "deutschen" Saatbestände in den untersuchten Herkunftsversuchen ihre genetisch nächstliegende Verwandtschaft zu Beständen aus Washington, USA, aufweisen.
<b>M4:</b> Übersicht bisheriger Publikationen der Daten in praxisnahen deutschsprachigen und internationalen Fachzeitschriften	<p><b>1. Manuskript</b> Vu, G.T.H., Cao, H.X., Hofmann, M., Steiner, W. &amp; O. Gailing. 2024. Uncovering epigenetic regulation of growth in Douglas-fir: Identification of differential methylation regions in mega-sized long intron genes. <i>Plant Biotechnology Journal</i> 22:863-875. doi: 10.1111/pbi.14229.</p> <p><b>2. Manuskript</b> (in Bearbeitung) G.T.H. Vu, H.X. Cao, D. Schmidt, M. Hofmann, W. Steiner, O. Gailing (in preparation - a). Genetic identification of SNP markers and candidate genes associated with growth performance traits in (<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco)</p> <p><b>3. Manuskript</b> (in Bearbeitung) G.T.H. Vu, M. Hofmann, W. Steiner, O. Gailing (in preparation - b). Erforschung der epigenetischen Variation in Douglasien für eine klimagerechte Baumzucht. <i>AFZ-DerWald</i></p> <p><b>4. Manuskript</b> (in Bearbeitung) G.T.H. Vu, M. Hofmann, W. Steiner, O. Gailing (in preparation - c). Assignment of German Douglas-fir provenances to their geographical origin.</p>

## b) Zusammenfassung

Dieses Projekt untersuchte die genetischen und epigenetischen Grundlagen der Wuchsleistung bei Douglasien (*Pseudotsuga menziesii*) in Deutschland, um die Auswahl von Hochleistungsbäumen und -herkünften für die Forstwirtschaft zu optimieren.

Hierfür wurden umfangreiche phänotypische Daten in zwei deutschen Herkunftsversuchen (Harsefeld und Neumünster) erhoben, darunter Baumhöhe, Brusthöhendurchmesser (BHD), Kronendichte, Austriebsverhalten und Frostschäden. Die Analysen des Austriebsverhaltens zeigten eine breite Variation zwischen und innerhalb der Provenienzen, die auf unterschiedliche genetische und epigenetische Veranlagungen hindeutet.

Parallel dazu wurden mittels modernster Sequenzierungsmethoden (ddRAD-Sequenzierung und methylierungs-sensitive ddRAD-Sequenzierung) genetische (SNPs) und epigenetische (DMLs) Varianten in 160 Bäumen charakterisiert und genomweite Assoziationsstudien durchgeführt. Es konnten 652 epigenetische Loci identifiziert werden, die mit dem Baumwachstum assoziiert sind. Darüber hinaus wurden mehrere hundert SNPs identifiziert, welche die Methylierung an diesen epigenetischen Loci potenziell steuern. Des Weiteren wurden SNPs in Kandidatengenomen identifiziert, die mit phänotypischen Merkmalen, insbesondere der Baumhöhe, assoziiert sind.

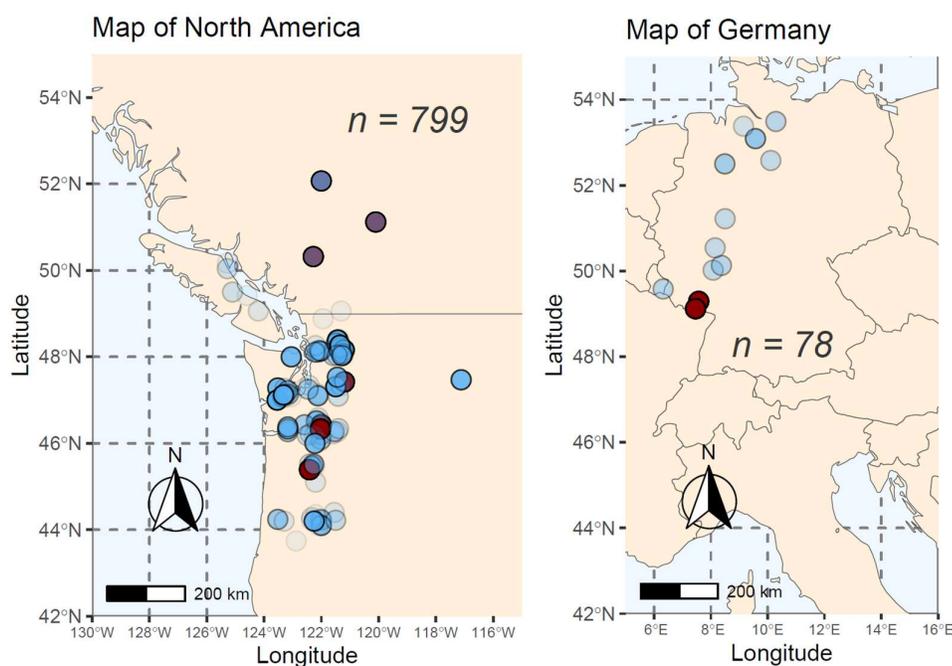
Die Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss genetischer und epigenetischer Faktoren auf die Wuchsleistung von Douglasien. Die Kombination von phänotypischen Daten mit genomischen Analysen ermöglicht die Identifizierung von Plusbäumen und -herkünften mit überdurchschnittlicher Wuchsleistung und Anpassungsfähigkeit. Dieser Ansatz bietet die Grundlage für eine effizientere Züchtung und ein nachhaltiges Management von Douglasienbeständen in Deutschland.

## II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

### 1. Erzielte Ergebnisse

#### 1.1. AP1: Pflanzenproben

In einer Provenienzversuchsserie, die im Jahr 1984 angelegt wurde, wurden an zwei Standorten (Forst Iloo, Schleswig-Holstein und Harsefeld, Niedersachsen) verschiedene Samenjahrgänge von Douglasien-Nachkommenschaften verglichen, die aus deutschen Saatguterntebeständen und den Originalherkünften stammen. Insgesamt wurden für unsere Studie 843 Individuen aus 147 nordamerikanischen Provenienzen (aus British Columbia und Washington) und 12 deutschen Provenienzen im Herkunftsversuch Iloo und Harsefeld gesammelt (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Untersuchungsproben zur Ermittlung genetischer, epigenetischer und phänotypischer Variationen in Douglasien-Nachkommenschaften aus deutschen Saatguterntebeständen und Originalherkünften. Die für die Sequenzierung ausgewählten Herkünfte sind dunkelrot gekennzeichnet.

Darüber hinaus haben wir zusätzlich 174 Bäume unbekannter Herkunft einbezogen, sodass insgesamt 1051 Bäume analysiert wurden (Abbildung 1.2). Von diesen Proben haben wir 160 Bäume sequenziert (davon 158 Bäume mit bekannter Herkunft), eine SSR-Analyse von 1047 Bäumen (873 mit bekannter Herkunft) und eine MassArray-Analyse von 960 Bäumen (843 mit bekannter Herkunft) durchgeführt.

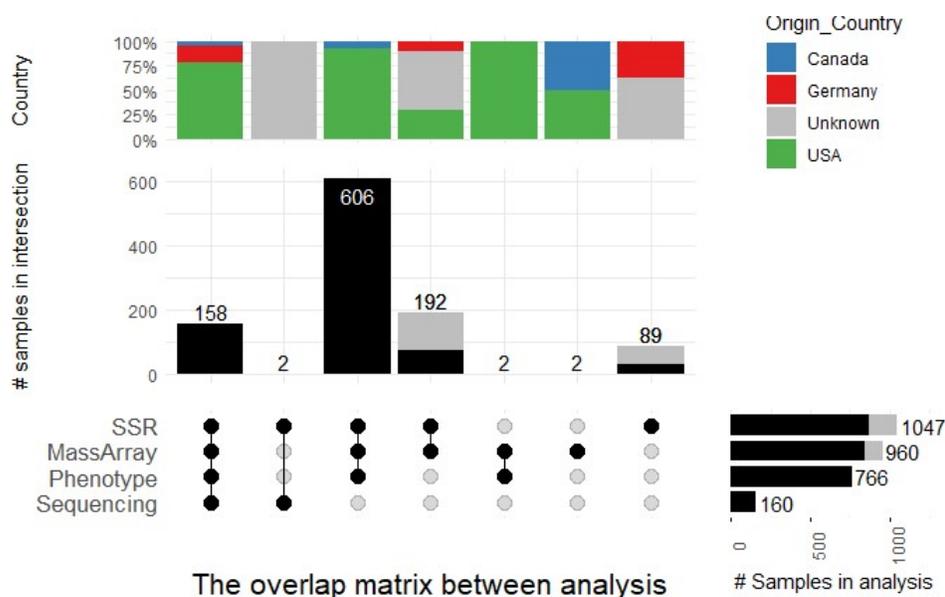


Abbildung 1.2: Untersuchungsproben mit Angabe des Herkunftslandes und der jeweils durchgeführten Analyse. Insgesamt wurden 1051 Bäume untersucht, davon 960 mittels MassArray, 1047 mittels SSR-Markern, 766 phänotypisch und 160 mittels Sequenzierung. Bäume unbekannter Herkunft sind grau dargestellt.

## 1.2. AP2: Der Identifizierung genetischer und epigenetischer Varianten, die mit der Wuchsleistung im Zusammenhang stehen

160 Proben aus nordamerikanischen und deutschen Herkünften im Herkunftsversuch Iloo und Harsefeld wurden für ddRAD und methyl-ddRAD-Sequenzierung ausgewählt, um die genomweite genetische und epigenetische Variation zu charakterisieren (Abbildung 2.1). Drei Proben wurden aufgrund potenzieller Fehler bei der Probennahme ausgeschlossen (zwei nicht verifizierte Bäume und ein weiterer Baum, der aufgrund seiner einzigartigen genetischen Konstellation innerhalb seiner Provenienz als Ausreißer identifiziert wurde). Die Sequenzen von 157 ddRAD-Bibliotheken erlaubten die Identifizierung von 2,2 Millionen raw single nucleotide polymorphisms (SNPs). Nach Filterung wurden 395.131 high-confident SNPs in 53.768 ddRAD-Loci erhalten.

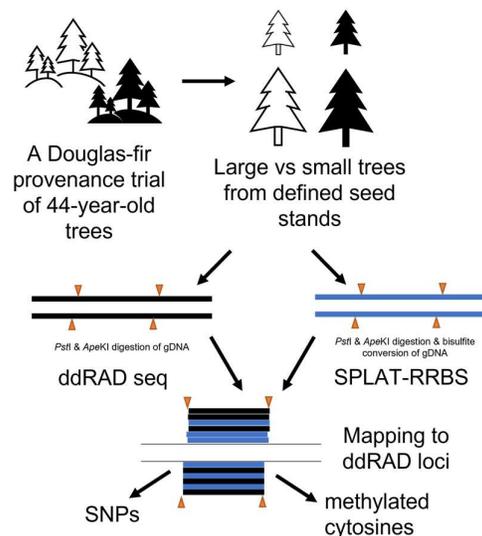
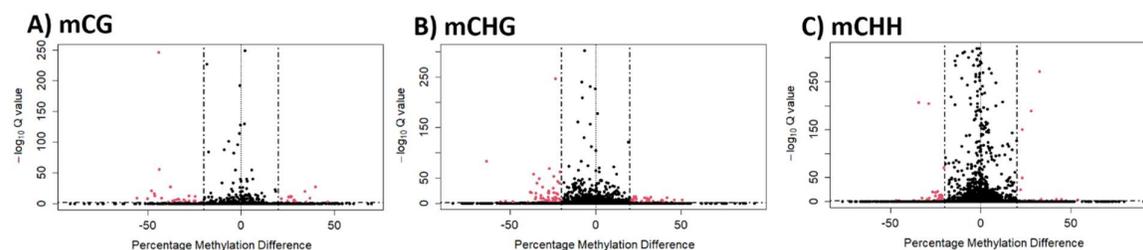


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns zur Identifizierung von wachstumsassoziierten DNA-Methylierungsmustern in Populationen der Douglasie

Die Daten der SPLAT-RRBS-Analyse aus 16 Bibliotheken wurden genutzt, um die Pipeline zum Nachweis der Methylierung aller genomischen Cytosine in drei verschiedenen Kontexten (CG, CHG, und CHH) einzurichten (Vu et al., 2024). Da methylierte Cytosine dazu neigen, sich in funktionellen Regionen anzusammeln, wurde die Tendenz von methylierten Cytosinen bewertet, gemeinsam entlang genomischer Blöcke von 100 bp mit einer Schrittgröße von 10 bp aufzutreten, die mindestens 3 methylierte Cytosine umfassen. Für jeden der drei Sequenzkontexte (mCG-DMR, mCHG-DMR und mCHH-DMR) wurden die Differenziell Methylierten Regionen (DMRs) identifiziert, die mit dem Baumwachstum assoziiert sind. DMRs wurden durch MethylKit-Paarvergleiche zwischen großen und kleinen Bäumen (gemessen als Brusthöhendurchmesser, BHD) bestimmt, wenn sich die Gesamtmethylierung von mindestens drei Cytosinen innerhalb einer 100-bp-Region um 20% mit korrigierten p-Werten (Q-Werten) von weniger als 0,05 unterschied (Abbildung 2.2). Schließlich wurden die DMRs von jedem ddRAD-Loci zur Annotation und anschließenden Assoziationsanalyse zusammengefasst.

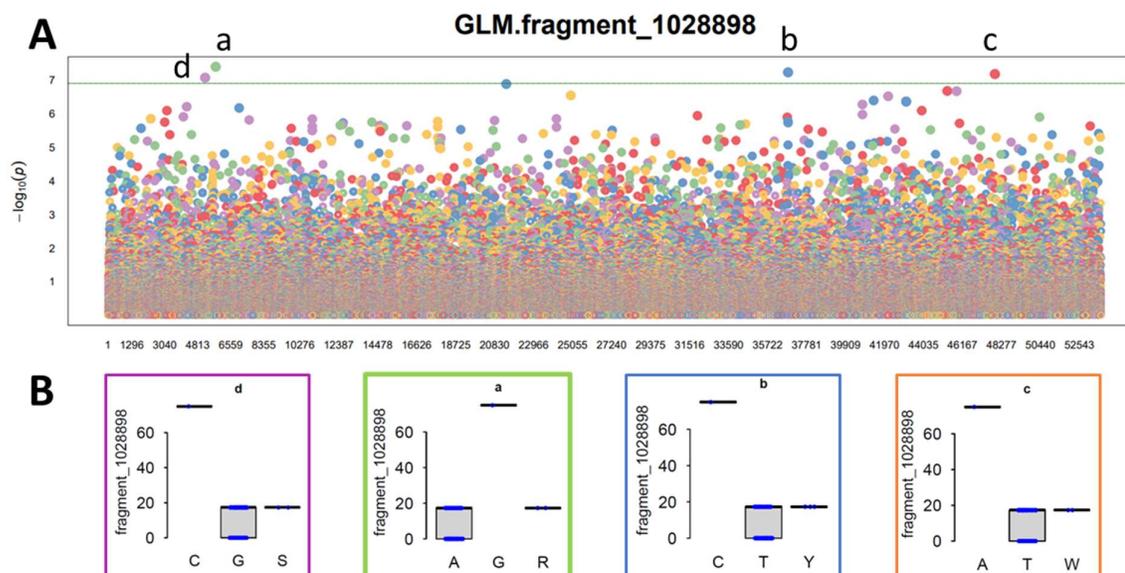


**Abbildung 2.2: Methylierungsanalyse an Douglasienadeln von Bäumen mit unterschiedlichem Wachstum:** (A - C) Vulkankurven zeigen die unterschiedlich methylierten CG-, CHG- und CHH-Regionen (DMRs) zwischen großen und kleinen Bäumen mit Hilfe des logistischen Regressionstests, wobei das Jahr der Aussaat, die Ursprungspopulation und der Standort des Baumes einbezogen wurden, um den Einfluss dieser Kovariaten auf das Wachstum des Baumes zu trennen. Die gestrichelten Linien zeigen die Signifikanzgrenzen an, die einen Methylierungsunterschied von  $>20\%$  und ein Benjamini-Hochberg FDR-bereinigtes  $p < 0,05$  aufweisen. Daten aus Vu et al. (2024).

Für die vergleichende Analyse wurde ein einheitlicher Datensatz von 157 Bäumen erstellt. Dieser Datensatz beinhaltet Informationen über die Methylierung von über 4 Millionen Cytosinen, darunter 0,35 Millionen mCG-, 0,6 Millionen mCHG-, und 3 Millionen mCHH-Stellen (H = A, C oder T). Diese verteilen sich auf 43.000, 69.000 bzw. 97.000 untersuchte ddRAD-Loci im Douglasien genom. Die Analyse identifizierte differenziell methylierte ddRAD-Loci (DMLs), welche mit dem Baumwachstum assoziiert sind, für jeden der drei Sequenzkontexte (mCG-DML, mCHG-DML und mCHH-DML, Vu et al., in Vorbereitung - a).

### 1.3. AP3: Potenzielle Korrelationen zwischen SNPs und methylierungsbezogenen DNA-Varianten (MRDs)

Die Assoziationsanalyse untersucht potenzielle genetische Einflüsse auf Methylierungsvariationen. Grundlage hierfür bilden ddRAD- und methyl\_ddRAD-Sequenzierungsdaten von 157 Bäumen (Abschnitt 2). Zur Bewertung der Signifikanz der beobachteten Assoziationen wird das GAPIT3-Paket (Wang and Zhang, 2021) mit verschiedenen Modellen (GLM, MLM, FarmCPU, Blink) eingesetzt. Dieser Ansatz erlaubt die Identifizierung genetischer Faktoren (Abbildung 3), die die Methylierung beeinflussen und mit klassischen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) nicht erfasst werden können (eine zugehöriger FNR-Antrag GENOCHIP).



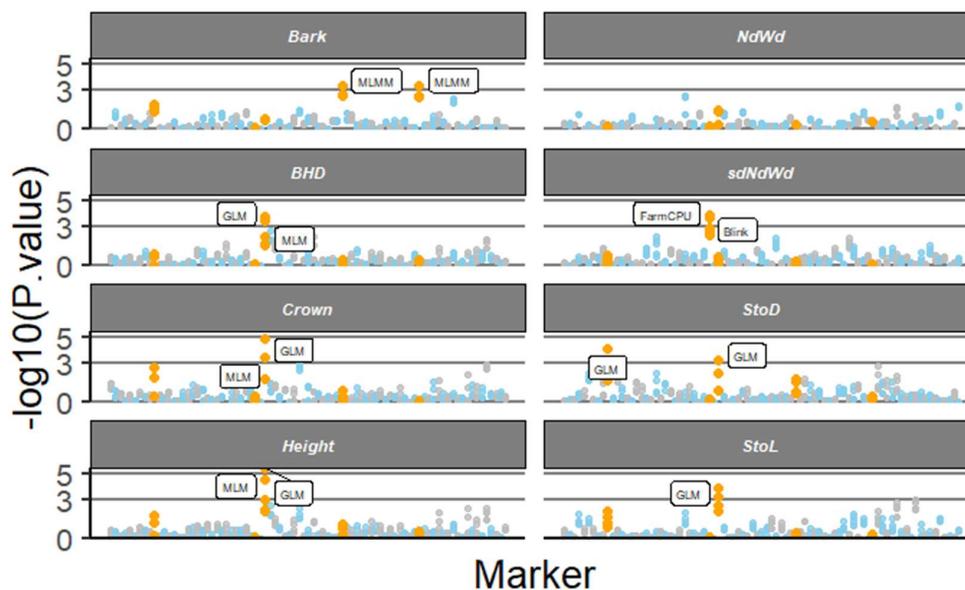
**Abbildung 3:** Assoziationsanalyse zwischen SNPs und dem Methylierungsgrad eines differentiell methylierten CHH-Locus (#1.028.898). (A) Manhattan-Plot der genomweiten Assoziationsstudie (GWAS), analysiert mit dem General Linear Model (GLM). Dargestellt sind SNPs an vier verschiedenen ddRAD-Loci (#114.901 a; #688.995 b; #894.011 c; #1094344 d), sortiert nach ihren p-Werten. (B) Methylierungsmuster von Individuen mit homozygoten Genotypen für die alternativen Allele an den assoziierten SNPs. Es zeigt sich eine Hypermethylierung der Cytosine im CHH-Kontext am ddRAD-Locus #1.028.898.

#### 1.4. AP4: Assoziationsanalyse von Baumleistungsmerkmalen in Douglasien-Herkunftsversuchen

Um anpassungsrelevante genetische und epigenetische Variationen zu charakterisieren, untersuchen wir Assoziationen sowohl mit klimatischen Variablen als auch mit Wachstumsmerkmalen. Wir haben ein genetisches Screening von 405 Douglasienproben (die von 20 Provenienzen) durchgeführt und dabei 83 SNP-Marker (Single Nucleotide Polymorphism) verwendet. Diese Marker wurden auf der Grundlage ihrer Position in Kandidatengenomen ausgewählt, die an der Reaktion auf Umweltstress und an der Wachstumsleistung beteiligt sind. Anschließend wurden für jedes Individuum stomatäre und wachstumsbezogene phänotypische Merkmale bewertet. Zu den bewerteten stomatären Merkmalen gehörten die Stomata-Dichte (StoD), die Anzahl der stomatären Linien (StoL), die Nadelbreite (NdWd) und die Plastizität der Nadelbreite (sdNdWd). Zu den wachstumsbezogenen Merkmalen, die in Zusammenarbeit mit der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (NW-FVA) bewertet wurden, gehörten Rindenstruktur, Brusthöhendurchmesser (BHD), Kronendichte und Baumhöhe. Die Assoziationsanalyse zwischen den untersuchten Merkmalen und 83 Kandidatengen-SNPs wurde mit GAPIT v3 (Wang and Zhang, 2021) und fünf verschiedenen implementierten Modellen (GLM, MLM, MLMM, FarmCPU und BLINK) durchgeführt (siehe Abbildung 4). Um das Risiko falsch positiver Assoziationen zu minimieren, wurden aus der Populationsstrukturanalyse abgeleitete Q-Werte und die durch die Verwandtschaft (K) zwischen Individuen definierte Varianzstruktur als Kofaktoren eingeführt.

Die Assoziationsanalyse ergab, dass unter den 83 analysierten SNPs fünf SNPs, die in fünf verschiedenen Kandidatengenomen liegen, eine signifikante Assoziation mit den Merkmalen aufwiesen (Abbildung 4). Diese signifikanten SNPs erklärten einen relativ hohen Anteil der phänotypischen Variation (PVE) von bis zu 40,75 %. Interessanterweise war einer der SNPs (M004) mit mehreren Merkmalen assoziiert und befand sich in der kodierenden Region eines Plastid-Lipid-assoziierten Proteins, was zu einer nicht-synonymen Substitution

führte (Glu -> Lys). Die übrigen vier assoziierten SNPs (M048, M016, BR24, M069) befanden sich ebenfalls in kodierenden Regionen, führten jedoch zu synonymen Substitutionen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die identifizierten Kandidatengene und assoziierten SNPs eine Rolle bei der Reaktion auf Umweltstress und der Wachstumsleistung der Douglasie spielen könnten, was wichtige Auswirkungen auf die Bewirtschaftung und Zucht dieser wirtschaftlich und ökologisch wichtigen Baumart haben könnte.



	Marker	Gene	Model	P-value	MAF	Effect	PVE (%)
Bark Structure	M048	PP2C	MLMM	4,70E-04	0,01	1,08	28,36
Bark Structure	M016	PMT23	MLMM	4,47E-04	0,31	0,25	1,69
Breast Height Diameter (BHD)	M004	PAP	GLM, MLM	3,79E-04	0,07	-6,32	21,92
Crown Density	M004	PAP	GLM, MLM	3,28E-04	0,07	0,43	14,22
Tree Height	M004	PAP	GLM, MLM	3,25E-05	0,07	-4,64	40,75
Nr stomata lined (StoL)	M004	PAP	GLM	1,39E-04	0,07	-0,52	30,47
Stomatal Density (StoD)	BR24	GIGANTEA	GLM	8,32E-05	0,05	0,75	8,29
Stomatal Density (StoD)	M004	PAP	GLM	5,93E-04	0,07	-0,54	1,32
Needle Width Plasticity (SD)	M069	CPK9	FarmCPU, Blink	1,91E-04	0,27	-9,55	4,94

MAF: Minor Allele Frequency

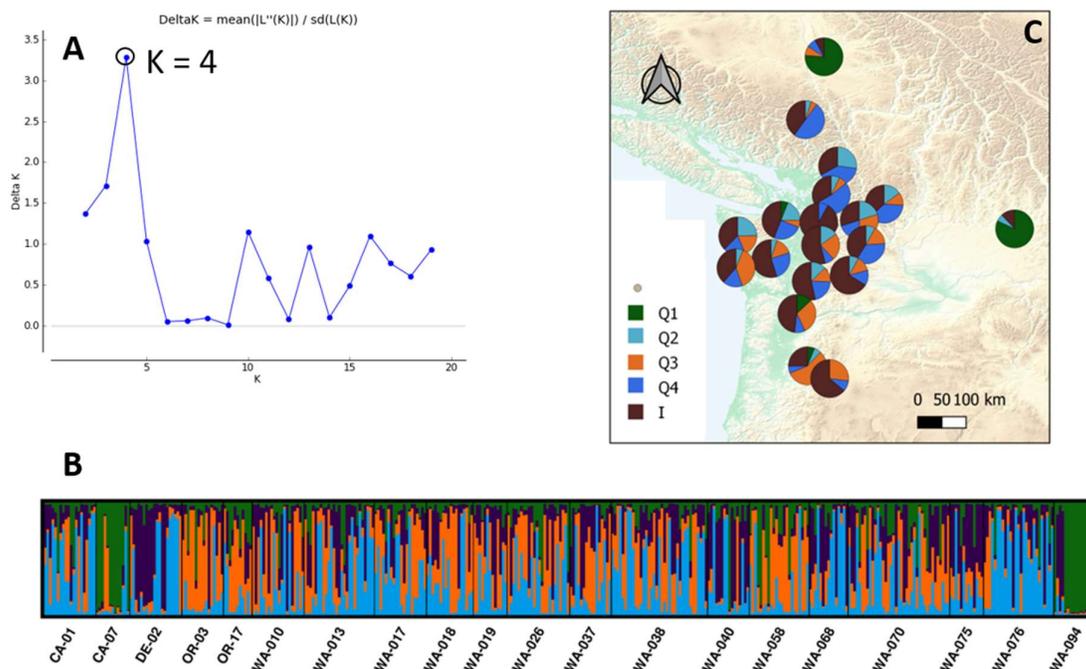
PVE: Phenotype Variance Explained

**Abbildung 4:** Manhattan-Plots der Marker-Merkmal-Assoziationen für die Wachstumsleistung und die stomatären Merkmale der Douglasie. Die Assoziationen wurden für die Rindenstruktur, den Brusthöhendurchmesser (BHD), die Kronendichte, die Baumhöhe, die Nadelbreite (NdWd), die Plastizität der Nadelbreite (sdNdWd), die stomatäre Dichte (StoD) und die Anzahl der stomatären Linien (StoL) anhand von 83 ausgewählten SNP-Markern analysiert. Die horizontale Achse zeigt die Markerpositionen, und die vertikale Achse stellt die  $-\log_{10}(\text{P-Werte})$  der Assoziationen dar. Die Assoziationen wurden anhand von fünf verschiedenen Modellen analysiert, nämlich dem allgemeinen linearen Modell (GLM), dem gemischten linearen Modell (MLM), dem gemischten linearen Modell mit mehreren Loci (MLMM), dem festen und zufälligen Modell Circulating Probability Unification (FarmCPU) und dem Bayes'schen Informations- und Linkage-Disequilibrium Iteratively Nested Keyway (Blink) Modell (Vu et al., in Vorbereitung a).

### 1.5. AP5: Bestimmung bzw. Validierung des geographischen Ursprungs von 'deutschen' Saatgutbeständen

Zu diesem Zweck wurden insgesamt 405 Individuen, die 20 Provenienzen (11 - 39 Individuen pro Provenienz) repräsentieren, charakterisiert. Die genetische Struktur wurde durch die Genotypisierung von 9 Kernmikrosatelliten (nuSSR)-Markern bestimmt, die eine eindeutige Bewertung haben und jeweils einen Locus

repräsentieren. Die mit der Software STRUCTURE durchgeführte Strukturanalyse ermöglichte es uns, die Provenienzen entweder der Küsten- oder der Inlandvarietät zuzuordnen (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** STRUCTURE-Ergebnisse der hierarchischen Bayes'schen Clusteranalyse für 405 Douglasien-Individuen aus 19 nordamerikanischen Provenienzen und einem deutschen Saatguterntebestand. (A) Die DeltaK-Statistik identifiziert die optimale Anzahl der varietätsinternen genetischen Cluster K mit StructureHarvester. (B) Der DISTRIBUTE-Plot zeigt die genetische Struktur ( $K = 4$ ) für 405 Individuen gruppiert nach Populationen. (C) Verteilungskarten der Douglasienprovenienzen nach ihrer Herkunft und Zuordnung zu vier mit STRUCTURE geschätzten genetischen Clustern. Ein Individuum wurde einem Cluster mit einem Q-Wert (Zugehörigkeitskoeffizient)  $> 0,6$  und einer intervarietalen Mischung (Gruppe I) mit allen Q-Werten unter  $0,6$  zugewiesen. Die Populationen CA-07 und WA-094 bestehen überwiegend aus Individuen der Varietät Rocky Mountains und können der Inland-Douglasie zugeordnet werden (grüne Farbe).

Um die Zuordnung der "deutschen" Herkünfte zu ihrem potenziellen Herkunftsgebiet in Nordamerika zu bestimmen und zu validieren, haben wir 843 Individuen aus 147 nordamerikanischen Herkünften (aus British Columbia und Washington) und 11 deutschen Herkünften in den Herkunftsversuchen Iloo und Harsefeld (Abbildung 1.1) mit dem 9 nuSSR-Markern genotypisiert. Wir führten modellbasierte Clusteranalysen der genetischen Daten zur neutralen genetischen Variation und Differenzierung durch, um die Herkunftsregionen mithilfe der Programme STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) und GENECLASS2 (Piry et al., 2004) zuzuordnen (Vu et al., in Vorbereitung - c).

### 1.6. AP6: Auswahl von Plusbäumen und Provenienz

Eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) unter Verwendung des MLM-Modells (GAPIT v3) mit den sequenzierten Bäumen aus den Provenienzversuchen zeigte einen SNP, der mit der Baumhöhe assoziiert ist (d.h. stark mit dem Brusthöhendurchmesser (BHD) korreliert, Abbildung 6). In Kombination mit der phänotypischen Bewertung kann die markergestützte Selektion unter Verwendung dieses mit dem Wachstum assoziierten SNPs sowie wachstumsbezogener differentiell methylierter Loci (DMLs) zur Identifizierung von Plusbäumen für die spätere Einrichtung von Klon-Saatgutplantagen genutzt werden. Die Auswahl der Plusbäume erfolgt in enger Zusammenarbeit mit unserem Projektpartner (NW-FVA). Im zukünftigen

GenoCHIP-Projekt soll die Plusbaumauswahl in Douglasienbeständen auf Basis der hier generierten genetischen Daten (55k SNP-Chip) und der phänotypischen Bewertung erfolgen.

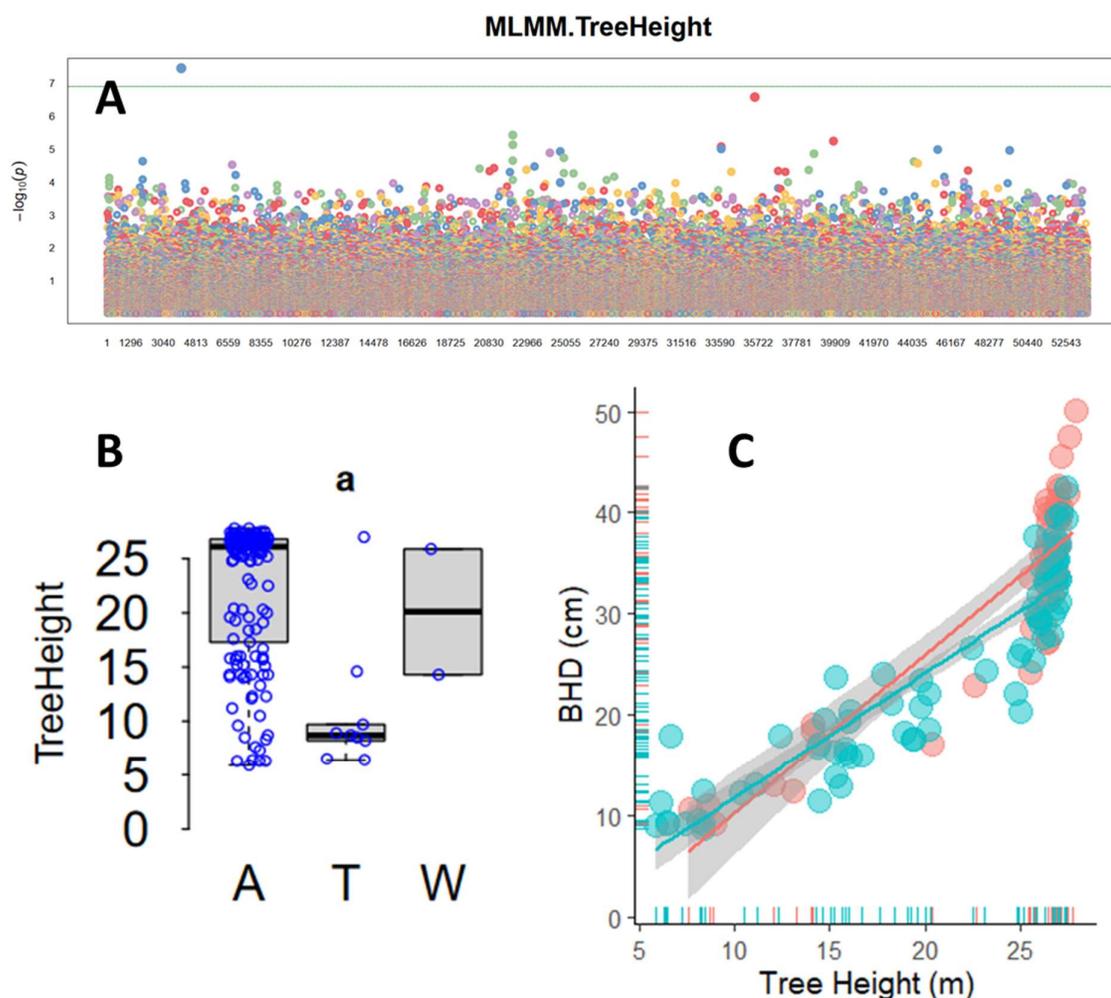


Abbildung 6: Auswahl von Plusbäumen durch Charakterisierung ausgewählter Marker. (A) Manhattan-Plot der genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) für die Baumhöhe in Douglasie. Die GWAS wurde unter Verwendung des MLM-Modells (GAPIT v3) mit den sequenzierten Bäumen aus den Provenienzversuchen durchgeführt. Dargestellt ist der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes ( $-\log_{10} p$ -Wert) der Assoziation zwischen der Baumhöhe und der genomischen Position der SNPs (x-Achse) in ddRAD-Loci. (B) Ein signifikanter SNP (blau markiert in A) zeigt eine starke Assoziation mit der Baumhöhe und korreliert stark mit dem Brusthöhendurchmesser (BHD, in C). Hierbei führt das alternative Allele T an der SNP-Position zu einer negativen Selektion der Plusbäume.

## 2. Verwertung

### a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Im Rahmen des Projekts wurden keine Erfindungen im patentrechtlichen Sinne und keine Schutzrechtsanmeldungen eingereicht. Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse, insbesondere die identifizierten genetischen Marker (SNPs) und differentiell methylierten Loci (DML) im Zusammenhang mit der Wuchsleistung, stellen jedoch wertvolle wissenschaftliche Erkenntnisse dar, die für die Forstpflanzenzüchtung und das Management von Douglasienbeständen relevant sind.

**b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende**

Praxisempfehlungen zur Etablierung von Douglasien-Beständen mit dem Ziel der Ertragssteigerung, insbesondere

- Einschätzung der genetischen Grundlagen für ertragssteigernde Merkmale
- Identifizierung von Plusbäumen und -herkünften für die Samengewinnung

**c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende**

- Umgesetzte markerunterstützte Selektion zur Verbesserung der Wachstumsleistung bei der Douglasie.
- Publikation der Methoden und Ergebnisse in hochrangigen internationalen Fachzeitschriften
- Publikation der Resultate in der deutschsprachigen forstlichen Fachpresse

**d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit**

- Verwendung der Ergebnisse in Hinblick auf die Herkunftsempfehlungen der Bundesländer
- Auswahl von Plusbäumen zur Etablierung von Klonsamenplantagen
- Übertragung der Methoden auf andere Baumarten
- Anschlussprojekte

**e) Stand der Erreichung der in der Vorhabenbeschreibung aufgeführten Verwertungsoptionen, Forschungsdaten**

- **Identifizierung von SNPs für die markergestützte Selektion:** Es wurden mehrere hundert SNPs identifiziert, die mit der Wuchsleistung und der adaptiven genetischen Variation in Douglasien assoziiert sind. Diese Marker bilden die Grundlage für die Entwicklung von Werkzeugen zur markergestützten Selektion, um die Züchtung von Douglasien mit verbesserter Wuchsleistung und Anpassungsfähigkeit zu unterstützen.
- **Genetische und epigenetische Variation:** Die Analysen der genetischen und epigenetischen Variation im Zusammenhang mit dem Wachstum liefern wertvolle Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, die der Wuchsleistung zugrunde liegen. Die gewonnenen Daten tragen zum besseren Verständnis der genetischen Architektur komplexer Merkmale bei Douglasien bei.
- **Zusammenstellung von SNP- und Wachstumsleistungsdaten:** Die umfangreichen Daten zu SNPs und Wachstumsmerkmalen wurden in einer Datenbank zusammengestellt, die als wertvolle Ressource für zukünftige Forschungsarbeiten und Züchtungsprogramme dienen wird. Diese Daten bilden die Grundlage für weiterführende Analysen, z.B. zur Entwicklung genomischer Selektionsmodelle.
- **Entwicklung eines SNP-Chips:** Basierend auf den Projektergebnissen wurde eine Skizze für ein Folgeprojekt (GenoCHIP) eingereicht, um einen 55k SNP-Chip für die genetische und epigenetische Charakterisierung von Douglasien zu entwickeln. Dieser Chip wird ein leistungsstarkes Werkzeug für die Forstpflanzenzüchtung und das Management von Douglasienbeständen darstellen.

**3. Erkenntnisse von Dritten**

-

**4. Veröffentlichungen**

Vu, G.T.H., Cao, H.X., Hofmann, M., Steiner, W. & O. Gailing. **2024**. Uncovering epigenetic regulation of growth in Douglas-fir: Identification of differential methylation regions in mega-sized long intron genes. *Plant Biotechnology Journal* 22:863-875. doi: 10.1111/pbi.14229.

## Literaturverzeichnis

- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A. (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, **95**(6), 536-539.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**(2), 945-959.
- Vu, G.T.H., Cao, H.X., Hofmann, M., Steiner, W., Gailing, O. (2024) Uncovering epigenetic and transcriptional regulation of growth in Douglas-fir: identification of differential methylation regions in mega-sized introns. *Plant Biotechnology Journal*, **22**, 863-875.
- Wang, J. and Zhang, Z. (2021) GAPIT Version 3: Boosting Power and Accuracy for Genomic Association and Prediction. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **19**(4), 629-640.

## ANHANG

### Teilvorhaben 2: Untersuchung von phänotypischer Variation in Douglasien-Nachkommenschaften

#### 1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Ziel des Projektes ist es, zum ersten Mal sowohl die genetischen als auch epigenetischen Grundlagen der Wuchsleistung bei der Douglasie mithilfe moderner Sequenzier- und Genotypisierungsmethoden zu bestimmen. Die Quantifizierung von genetischen und umweltbedingten Effekten auf die Wuchsleistung bei dieser ökologisch und ökonomisch wichtigen Waldbaumart wird durch die Untersuchung unterschiedlicher Samenjahrgänge aus deutschen Saatguterntebeständen und Originalherkünften aus derselben Ursprungsregion an zwei verschiedenen Standorten ermöglicht. Dieses Projekt eröffnet insbesondere bei der Auswahl und Zusammenstellung von zugelassenen Erntebeständen und Zuchtpopulationen (Samenplantagen) neue Möglichkeiten der Erzeugung von HochleistungsSaatgut mit lokal gewünschten Anpassungseigenschaften.

Die Ziele des Teilvorhabens der NW-FVA bestehen darin, an zwei verschiedenen Standorten für ausgewählte Individuen umfangreiche phänotypische Messungen durchzuführen (Höhe, Brusthöhendurchmesser, Kronendichte, Austrieb, Frostschäden, Stomatadichte, Rindenstruktur). Jährliche Aufnahmen erfolgen für die Merkmale Austrieb, Kronendichte, Frostschäden und Rindenstruktur.

#### 2. Bearbeitete Arbeitspakete

Im Folgenden werden die Arbeitsschritte beschrieben, die bei der Durchführung der jeweiligen Arbeitspakete notwendig waren und umgesetzt wurden. Es wird auch auf Probleme und Schwierigkeiten eingegangen, die sich bei der Bearbeitung ergeben haben. Die nachfolgende Berichterstattung kann aufgrund eines Personalwechsels erst ab April 2021 erfolgen. Vorhergegangene Datenauswertungen, Flächenbereisungen und Aktenarbeit bezüglich der zu untersuchenden Versuchsflächen erfolgten von A. Hischer und können im Folgenden nicht näher beschrieben werden. Relevante Informationen wurden im Austausch mit dem Projektpartner erarbeitet und befinden sich im Zwischenbericht des Jahres 2021.

#### Arbeitspaket 2: Messung phänotypischer Merkmale in den Herkunftsversuchen

Die Messung phänotypischer Merkmale (Arbeitspaket 2) in den Herkunftsversuchen gliedert sich in mehrere Teilbereiche auf. Im April 2021 und 2022 wurde mit der Aufnahme des Austriebsverhaltens begonnen. Dabei konnte auf eine umfangreiche Ausarbeitung („Common protocols and reference standards for selected traits and species“) des Austriebsverhaltens der Douglasie zurückgegriffen werden, welche im Projekt „Trees 4 Future – Designing Trees For The Future“ erstellt wurde. In Absprache mit dem Projektpartner fiel die Auswahl auf dieses Boniturschema, welches sich in fünf Stufen gliedert und mit den ruhenden Knospen im Winterstadium beginnt. In der zweiten Stufe schwellen die Knospen an und vergrößern ihr Volumen sichtbar. Ein farblicher Unterschied lässt sich in der dritten Stufe beobachten, dort öffnen sich die Knospen und der erste grüne Farbton ist schemenhaft zu erkennen. Die ersten kleinen Nadeln zeigen sich in der vierten Stufe, welche schlussendlich ihre volle Größe und Form in der fünften Stufe erreicht haben. Aufgrund des Alters und der Größe der Bäume in den Herkunftsversuchen war die Aufnahme des Austriebsverhaltens der Knospen in der Oberkrone nur mittels Fernglas möglich. Durchgeführt wurden die Aufnahmen lediglich auf der Versuchsfläche bei Neumünster. Diese fanden an einem Tag in der Woche über einen Zeitraum von acht

Wochen statt.

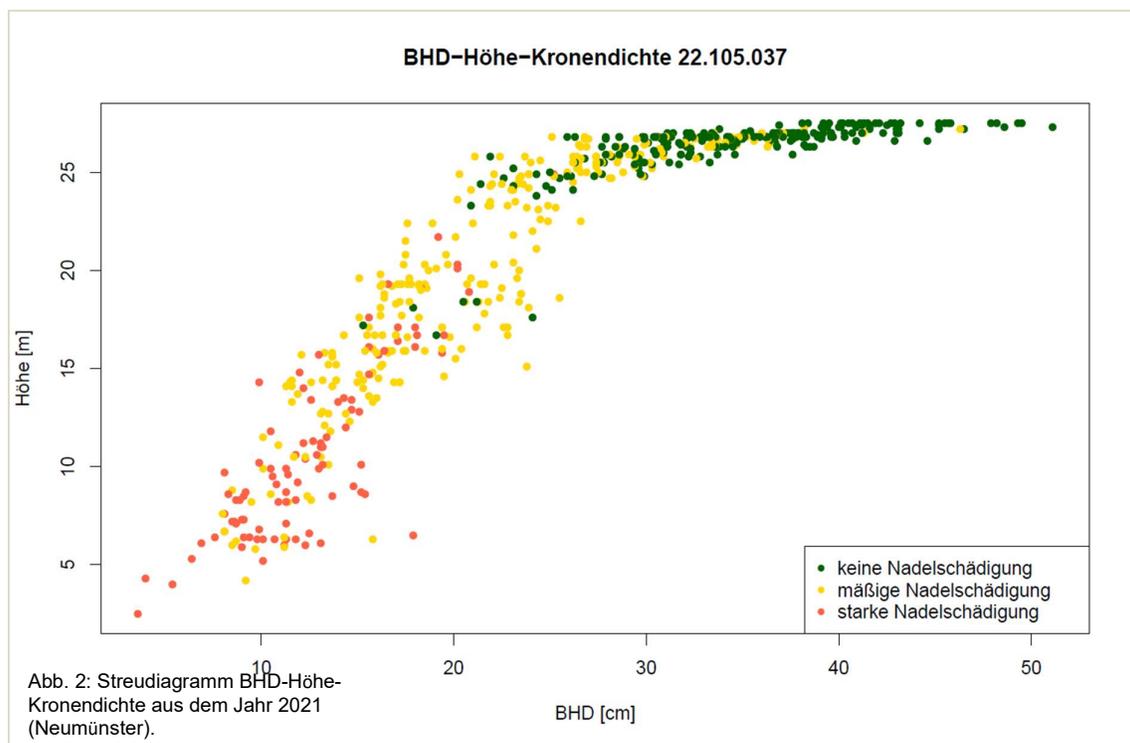
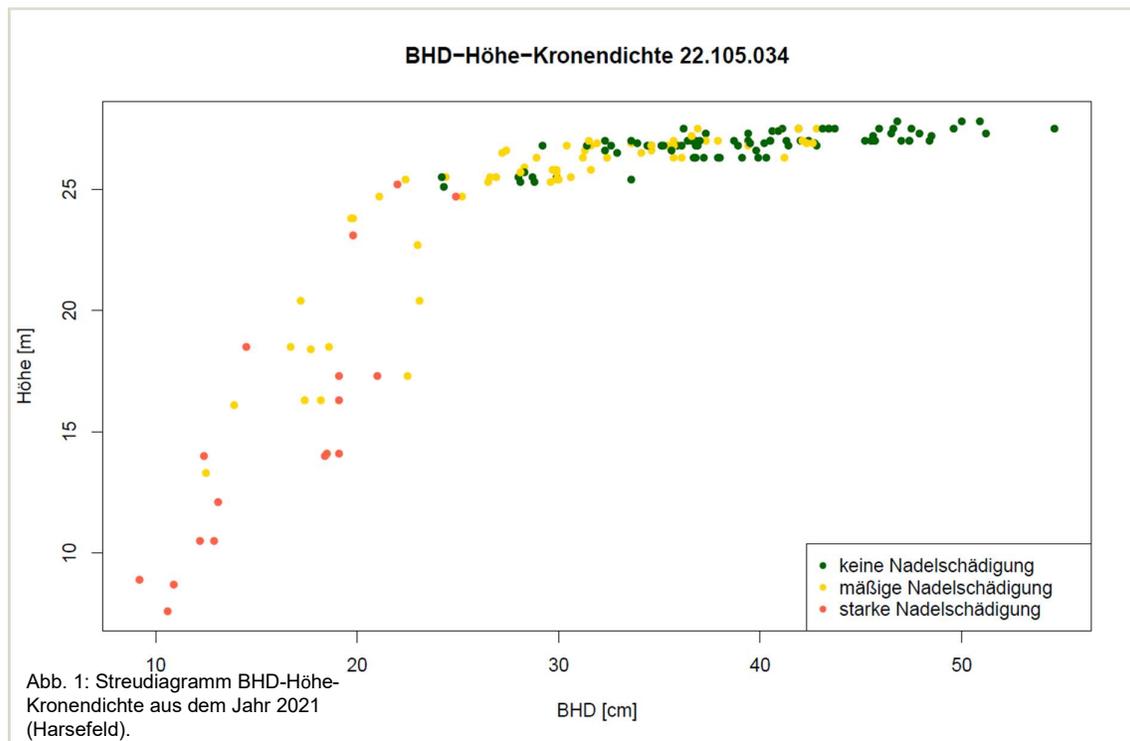
Im November 2021 konnte mit der Messung des BHD und der Baumhöhe in beiden Herkunftsversuchen begonnen werden. Der BHD ließ sich mittels Umfangbandmaß auf 1,3 Meter Höhe feststellen. Eine weitere Aufgabe bestand darin, baumfremden Bewuchs wie zum Beispiel das Gewöhnliche Efeu (*Hedera helix*) oder andere Arten bei der Messung zu berücksichtigen und wenn nötig zu entfernen. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Baumhöhe mittels eines „TruePulse 200“ Lasermessgerätes. Dabei galt der jeweilige Standpunkt im Bestand als wichtige Komponente, um etwaige Messungenauigkeiten zu minimieren. Einerseits musste die Kronenspitze aber auch der Stamm und Wurzelanlauf zu sehen sein. Andererseits durfte die Entfernung zum zu messenden Baum nicht zu gering sein, diese sollte mindestens der jeweiligen Baumhöhe entsprechen. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme der Borkenstruktur, der Kronendichte und eventuell vorhandenen Frostschäden. Die Borkenstruktur ließ sich dabei in fünf Punkte gliedern, von glattrindig über extreme Rauborkigkeit bis hin zum Ausfall der Bonitur aufgrund von Schäden (1 = glattrindig, wenige Harzblasen. 2 = glattrindig, viele Harzblasen. 3 = gesunde Rauborkigkeit. 4 = extreme Rauborkigkeit. 5 = keine Bonitur aufgrund von Fäll- und Fegeschäden etc.). Für die Kronendichte fand die Aufnahme nach einem drei Punkte Schema statt. Zu Beginn sind nur geringe bis keine Nadelschäden vorhanden, die Krone ist dicht und lichtundurchlässig. Im zweiten Punkt sind Nadelschäden / Schütte vorhanden, die Krone ist lichtdurchlässig mit 2 bis 3 Nadeljahrgängen. Die größte Beeinträchtigung findet sich in der letzten Stufe. Hier sind schwere Nadelschäden / Schütte sichtbar. Die Krone ist kaum benadelt und sehr lichtdurchlässig, es ist nur ein Nadeljahrgang vorhanden. Frostschäden wurden aufgenommen sobald diese erkannt wurden.

### **3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens**

#### **Arbeitspaket 2: Messung phänotypischer Merkmale in den Herkunftsversuchen**

Unter Berücksichtigung der bereits genannten Kriterien (Material und Methoden) wurden vom Projektpartner in Verbindung mit Herrn Hischer zwei Flächen der Serie 034 – 039 ausgewählt, welche den Anforderungen des Projektes am ehesten entsprachen. Dabei handelt es sich um die Versuchsflächen bei Harsefeld (22.105.034) sowie bei Neumünster (22.105.037).

Mit Hilfe der aufgenommenen Daten erfolgte eine Wachstumsanalyse der beiden Versuchsflächen. Die Grafiken stellen den Entwicklungszustand des BHDs, der Baumhöhe und der Kronendichte der verschiedenen Prüfglieder im November des Jahres 2021 dar (Abb. 1 + Abb. 2). Zu Beginn fällt der unterschiedliche Stichprobenumfang der beiden Versuchsflächen auf. So umfasst die Versuchsfläche in Harsefeld (22.105.034) ca. 160 und die in Neumünster (22.105.037) etwa 600 für das Projekt relevante Pflanzen. Dargestellt wird dies über die verschiedenen Punkte in den Grafiken.



Dabei steht jeder Punkt für eine Versuchspflanze der beiden Flächen. Die Höhe (m) der jeweiligen Pflanzen lässt sich auf der Y-Achse erkennen und der dazugehörige BHD (cm) auf der X-Achse. Unterschiedliche Farben kennzeichnen den Kronenzustand über den auch eine Vitalitätsansprache erfolgen kann. So haben Bäume, die keinerlei Nadelschädigung in der Oberkrone aufweisen, einen grünen Farbton und damit eine vergleichsweise gute Vitalität. Einen gelben Farbton haben Bäume, deren Kronenzustand als mäßig geschädigt beschrieben werden kann. Letztlich folgen Bäume, die eine starke Nadelschädigung in der

Oberkrone aufweisen und daher auch eine verminderte Vitalität zeigen. Gut erkennbar ist der Zusammenhang zwischen Baumhöhe, BHD und Kronenzustand. So weisen Bäume der herrschenden Klasse (Baumhöhe > 25 m) überdurchschnittlich oft keine bis mäßige Nadelschädigungen auf. Stark geschädigte Bäume kommen hauptsächlich im Bereich des BHD < 25 cm vor, wohingegen bei der Baumhöhe ein breites Spektrum von etwa 5 - 25 m abgedeckt wird. Auf der Versuchsfläche in Harsefeld liegt bei etwa der Hälfte der Bäume (51 %) keine Nadelschädigung vor. Wohingegen eine mäßige Nadelschädigung bei 39 % und eine starke Schädigung bei 10 % der Bäume festgestellt werden konnte. Im Vergleich dazu weisen lediglich 38 % der Bäume in Neumünster keine Nadelschädigung auf. Gestiegen ist die Anzahl der Bäume bei denen eine mäßige (46 %) und starke (16 %) Nadelschädigung festgestellt wurde. Diese Unterschiede lassen sich wahrscheinlich durch den etwa vierfach höheren Stichprobenumfang der Versuchsfläche in Neumünster erklären.

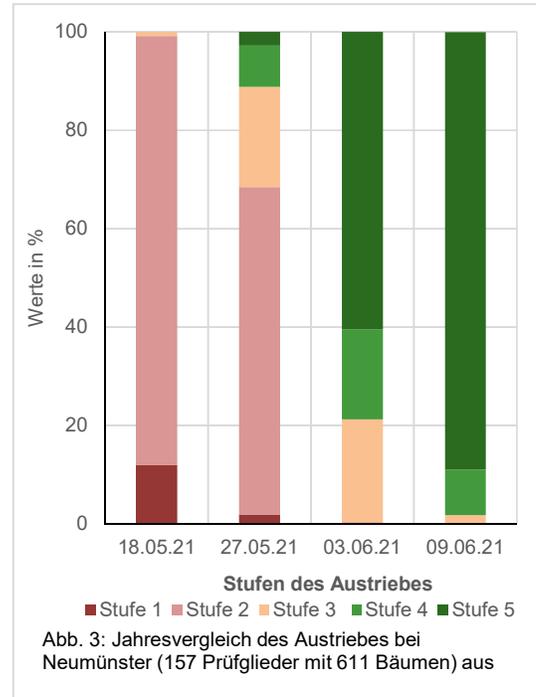


Abb. 3: Jahresvergleich des Austriebes bei Neumünster (157 Prüfglieder mit 611 Bäumen) aus

Im April 2021 und 2022 konnte mit der Bonitur des Austriebsverhaltens begonnen werden (Abb. 3). Dabei ließen sich zu Beginn kaum größere Unterschiede im Austriebsverhalten zwischen den einzelnen Aufnahmejahren feststellen. Somit hatten die Witterungsverhältnisse im April 2021, dieser Monat gilt mit 12 Frosttagen als kältester April seit mehr als 40 Jahren, anscheinend keinen großen Einfluss auf das Austriebsverhalten der Douglasien bei Neumünster. Die anschließende Auswertung der erhobenen Daten des Austriebes zeigt eine breite Differenzierung der unterschiedlichen Herkünfte. So konnten am 27.05.21 alle fünf verschiedenen Stadien des Austriebes festgestellt werden. Über 60 % der Bäume befanden sich noch nahezu im Winterstadium (Stufe 1 - 2), wohingegen erste grüne Nadeln bis zur vollen Ausprägung in Form und Größe (Stufe 4 - 5) bei über 10 % der Bäume festgestellt wurden. In den

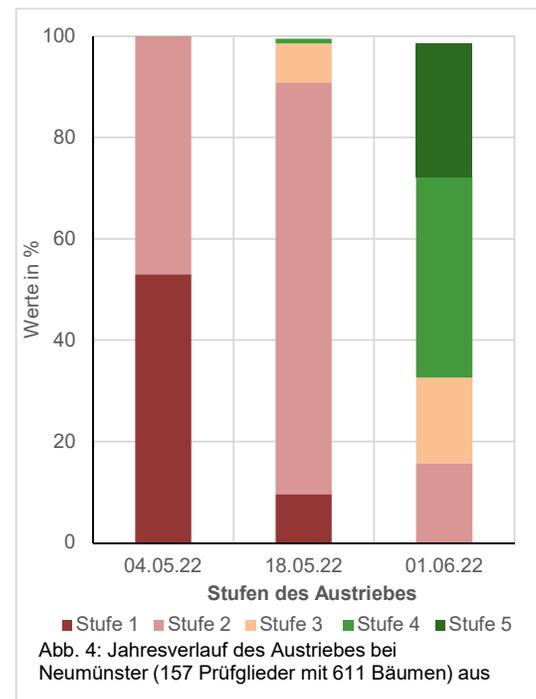
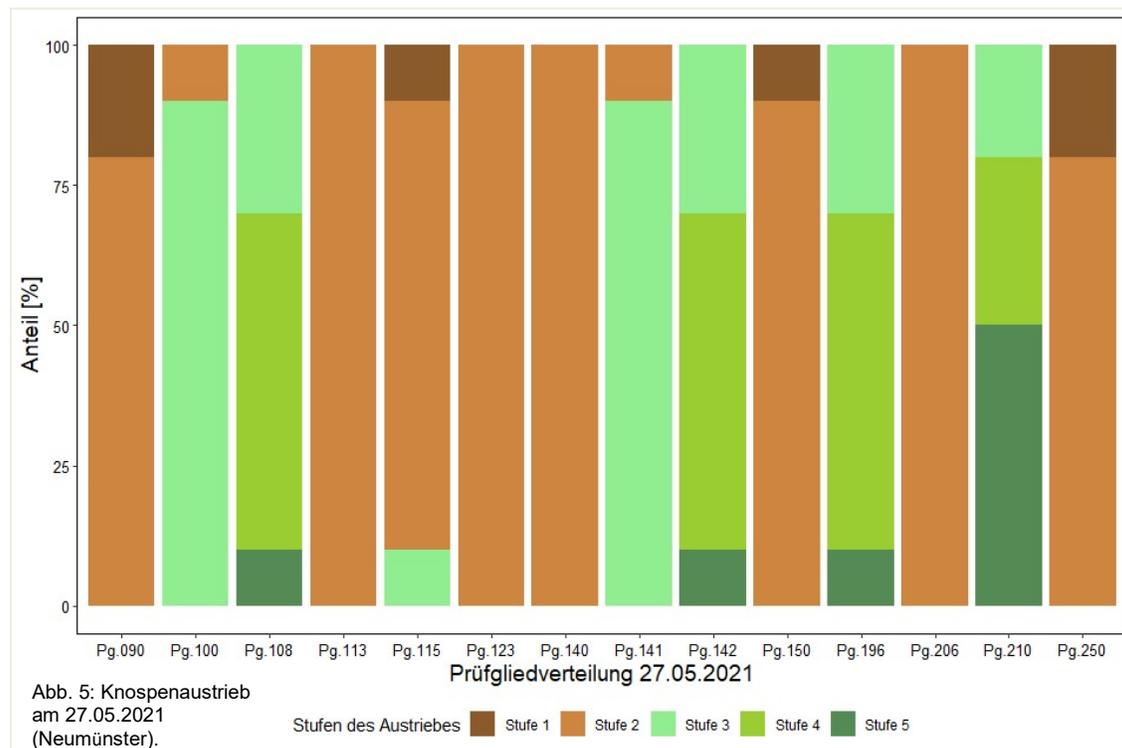


Abb. 4: Jahresverlauf des Austriebes bei Neumünster (157 Prüfglieder mit 611 Bäumen) aus

Darstellungen wurden nur relevante Aufnahmetage ausgewählt, bei denen ein Unterschied festgestellt werden konnte. Allgemein lässt sich festhalten, dass das Blühverhalten der Douglasie dem Austrieb zuvorkommt. So konnten jeweils im April beider Aufnahmejahre keine großen Veränderungen an den Knospen festgestellt werden, wohingegen männliche wie weibliche Blüten bereits zu erkennen waren. Im Jahr 2022 konnte leider die Aufnahme gegen Ende Mai nicht stattfinden, sodass der Austrieb an nur drei Aufnahmetagen dokumentiert werden konnte (Abb. 4). Im Vergleich zum Vorjahr kam die Aufnahme am 18.05.2022 zu einem nahezu

ähnlichen Ergebnis, lediglich die Anzahl der Bäume der Stufe 3 hat sich leicht erhöht. Insgesamt befanden sich etwa 90 % (98 % im Vorjahr) der Bäume noch im Winterstadium (Stufe 1 - 2). Die restlichen Bäume hatten bereits mit dem Austrieb begonnen.

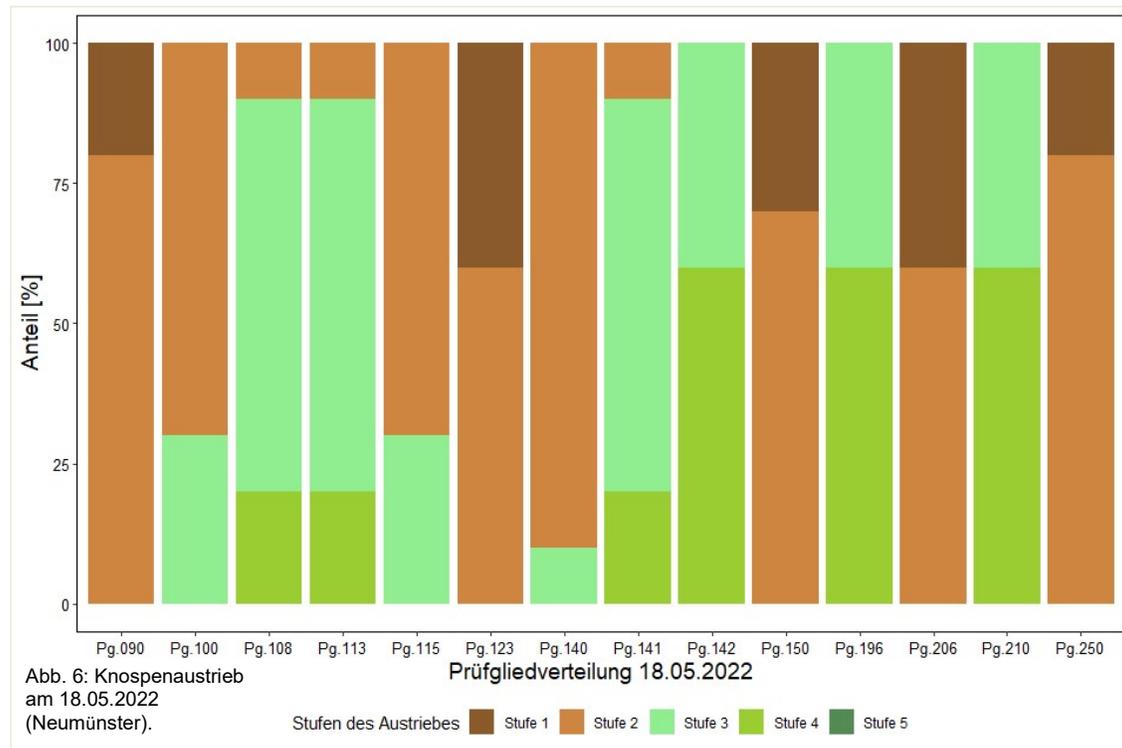
Für eine tiefgreifendere Betrachtung der Daten wurden anschließend Vergleiche des Austriebes der jeweiligen Prüfglieder zu einem festgelegten Zeitpunkt analysiert. Im Jahr 2021 bot sich beispielsweise der 27.05. als ein



Datum großer Differenzierung an (Abb. 5). Hier zeigte sich die breite Spannweite der verschiedenen Prüfglieder. Aus den über 100 Prüfgliedern wurden, aus Gründen der besseren Darstellung, im Folgenden 14 aussagekräftige Prüfglieder ausgewählt. Auf der einen Seite gab es Prüfglieder (108, 142, 196, 210), deren Austrieb als weit fortgeschritten beschrieben werden kann. Andererseits befanden sich die Knospen der Prüfglieder 090, 113, 123, 140, 150, 206, 250 weiterhin im Winterzustand (Stufe 1 + 2). Die verbliebenen Prüfglieder nahmen Positionen zwischen diesen beiden beschriebenen Stadien ein. Es wurde auch deutlich, dass selbst innerhalb eines Prüfgliedes die Bäume teilweise einen durchaus unterschiedlichen Austrieb aufweisen konnten. So kamen im Prüfglied 115 jeweils Bäume vor, deren Knospen noch tief im Winterstadium waren oder sich aber auch schon mitten im Blattaustrieb befanden.

Im Jahr 2022 ließ sich bereits am 18.05. eine große Differenzierung der jeweiligen Prüfglieder feststellen (Abb. 6). Ähnlich wie im Vorjahr (Abb. 5) zeigten sich die Prüfglieder 090, 123, 150, 206, 250 weiterhin als die Prüfglieder mit dem spätesten Beginn des Austriebes. Am weitesten fortgeschritten war der Austrieb bei den Prüfgliedern 108, 113, 142, 196, 210, welche ebenfalls im Vorjahr zu den frühesten Prüfgliedern zählten. Auch die deutliche Differenzierung innerhalb einiger Prüfglieder wurde wieder sichtbar. Prüfglied 141 wies drei verschiedenen Stufen des Austriebes auf. Zu Verschiebungen kam es bei Prüfglied 113. Dieses gehörte im Jahr 2021 zu den Prüfgliedern, welche einen langsamen Austrieb aufwiesen. Jedoch zeigte dieses Prüfglied

im Jahr 2022 einen komplett gegenteiligen Verlauf, sodass es nun zu der Gruppe der weit fortgeschrittenen Prüfglieder des Austriebes zählte.



## Fazit

Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte eine breite Differenzierung zwischen und innerhalb der verschiedenen Herkünfte festgestellt werden. So erwiesen sich die Prüfglieder 108, 113, 142, 196, 210 über beide Betrachtungsjahre stets als die Prüfglieder mit dem frühesten Austrieb. Im Gegensatz dazu zeigten die Prüfglieder 090, 123, 150, 206, 250 über beide Betrachtungsjahre stets den spätesten Austrieb. Generell konnte festgestellt werden, dass der Prozess des Austriebes durchaus dynamisch verläuft. So lassen die ersten beiden Stufen des Austriebes, in denen die Winterknospen allmählich anschwellen, aber noch geschlossen sind, vermuten, dass in dieser Zeit ein Reaktionspotential seitens des Baumes auf plötzliche Temperaturschwankungen vorhanden ist. Im Jahr 2021 wurde dies an den ungewöhnlich niedrigen Temperaturen im April deutlich. So erreichten die angeschwollenen Knospen vieler Bäume ihre maximale Ausprägung (Stufe 2) und verharrten aufgrund der niedrigen Temperaturen daraufhin einige Tage bis Wochen in diesem Stadium. Dieser Prozess wiederholte sich solange, bis fast 90 % aller Bäume im zweiten Stadium des Knospenaustriebes angekommen waren und die Temperaturen im Mai allmählich milder wurden. Ebenfalls konnte ein Zusammenhang zwischen Wachstumseigenschaften und der Vitalität der einzelnen Bäume festgestellt werden. So gehörten die wüchsigsten Bäume in Bezug auf die Baumhöhe und den BHD sehr häufig zu den Bäumen, deren Kronenzustand als nahezu unbeschädigt beschrieben werden kann. Interessant wird die Verknüpfung dieser phänologischen Daten mit den genetischen Analysen der Projektpartner.