THÜNEN

Forstpflanzenzüchtung für die Praxis

6. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung vom 16. bis 18. September 2019 in Dresden

Tagungsband

Mirko Liesebach (ed.)

Thünen Report 76

Bibliografische Information:
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikationen in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet unter www.dnb.de abrufbar.

Bibliographic information:
The Deutsche Nationalbibliothek (German National Library) lists this publication in the German National Bibliography; detailed bibliographic data is available on the Internet at www.dnb.de

Bereits in dieser Reihe erschienene Bände finden Sie im Internet unter www.thuenen.de

Volumes already published in this series are available on the Internet at www.thuenen.de

Zitationsvorschlag – *Suggested source citation:*
Liesebach M (ed) (2020) Forstpflanzenzüchtung für die Praxis : 6. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung vom 16. bis 18. September 2019 in Dresden : Tagungsband. Braunschweig: Johann Heinrich von Thünen-Institut, 296p,
Thünen Rep 76, DOI:10.3220/REP1584625360000

Die Verantwortung für die Inhalte liegt bei den jeweiligen Verfassern bzw. Verfasserinnen.

The respective authors are responsible for the content of their publications.

THÜNEN

Thünen Report 76

Herausgeber/Redaktionsanschrift – *Editor/address*

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

thuenen-report@thuenen.de
www.thuenen.de

ISSN 2196-2324
ISBN 978-3-86576-209-2
DOI:10.3220/REP1584625360000
urn:nbn:de:gbv:253-202003-dn062169-3

Erste Experimente zum Einfluss von *Sphinx ligustri* L. auf das In-vitro-Wachstum und den Hormonhaushalt in den Blättern von *Fraxinus excelsior* L.

FRANZISKA PAST, BEN BUBNER und INGA MEWIS

Zusammenfassung

Die Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior* L.) ist durch das Eschentriebsterben, ausgelöst durch den Pilz *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya, in ihrem Bestand als Forstbaum bedroht. Eine Möglichkeit zu ihrer Erhaltung ist es, Genotypen mit Feldtoleranz gegenüber dem Triebsterben vegetativ durch In-vitro-Kultur zu vermehren. Problematisch erweist sich im Fall der Esche der Umstand, dass ein für die Vermehrung unzureichendes Streckungswachstum vorliegt.

Eine Zufallsbeobachtung ließ vermuten, dass das In-vitro-Streckungswachstum sich verbessert, wenn die Mutterpflanzen durch den Fraß des Ligusterschwärmers (*Sphinx ligustri* L.) entlaubt wurden.

Es wurde zunächst angenommen, dass durch den Fraß Veränderungen im Phytohormonhaushalt ausgelöst wurden, die sich eventuell positiv auf das spätere In-vitro-Wachstum auswirkten. Zur Ergründung des Effekts wurden zwei Versuchskomplexe konzipiert. Im ersten Versuchskomplex zum Streckungswachstum wurde ein Gewächshausexperiment angelegt, in dem die Auswirkung von drei Faktoren (Raupenfraß, mechanische Verletzung, Kontrolle) auf das Austriebverhalten der Mutterpflanzen und Streckungswachstum der In-vitro-Stecklinge ermittelt wurde. Im zweiten Versuchskomplex wurde der Phytohormonhaushalt der Esche nach Raupenfraß näher betrachtet. In zwei Experimenten (Zeitpunkt/Zeitreihe) wurden Blattproben der Eschen entnommen und die Phytohormone mittels HPLC-MS analysiert.

Im Versuchskomplex zum Streckungswachstum zeigte sich, dass sich im Vergleich zur Kontrolle sowohl Raupenfraß und mechanische Verletzung bei den Mutterpflanzen im Gewächshaus als auch bei den In-vitro-Stecklingen positiv auf das Austriebsverhalten bzw. das Längenwachstum auswirkten. Dieser Umstand konnte aber durch die durchgeführten Experimente zum Phytohormonhaushalt, bei denen nur vereinzelt Signifikanzen auftraten, nicht erklärt werden. Im Zeitreihenexperiment konnte keine signifikante Erhöhung der Jasmonsäurekonzentration in Blättern innerhalb der ersten 240 min nach Verletzung nachgewiesen werden.

Schlüsselworte: HPLC, Jasmonsäure, Regurgitant, Salicylsäure, Zeitreihe

Abstract

Initial experiments on the effects of *Sphinx ligustri* L. on the in vitro growth and the hormone balance in the leaves of *Fraxinus excelsior* L.

The common ash (*Fraxinus excelsior* L.) is threatened as a forest tree by ash dieback caused by the fungus *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya. One way to preserve ash is to propagate genotypes with field tolerance to ash dieback vegetatively through in vitro culture. In vitro culture of ash is complicated by the restricted shoot elongation of explants which makes propagation difficult.

A chance observation suggested that shoot elongation of the explants is improved when the mother plants were defoliated by the feeding of the privet hawk moth (*Sphinx ligustri* L.).

It was initially assumed that the feeding triggered changes in the phytohormone balance, which might have had a positive effect on later in vitro growth of explants. Two experimental complexes were designed to investigate the effect. In the first experimental complex on growth, a greenhouse experiment was set up in which the effect of three factors (caterpillar feeding, mechanical injury, control) on the sprouting behaviour of the mother plants and elongation growth of the in vitro cuttings was determined. In the second experimental complex, the phytohormone balance of ash after caterpillar feeding was examined more closely. In two experiments (steady state/time series) leaf samples of ash were taken and the phytohormones were analysed by HPLC-MS.

In the experimental complex on elongation growth, it was shown that, compared to control, both caterpillar feeding and mechanical injury in the mother plants in the greenhouse and in vitro cuttings had a positive effect on sprouting behaviour and length growth. However, this fact could not be explained by the experiments carried out on the phytohormone balance, in which only sporadic significant changes occurred. Especially in the time series no jasmonate burst could be observed within 240 min after injury.

Keywords: HPLC, jasmonate burst, regurgitant, salicylic acid, time series

Einleitung

Die Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior* L.) gehört zu den wichtigsten Laubbaumarten Europas. Sie nimmt nicht nur in der skandinavischen Mythologie eine wichtige Rolle ein, sondern ist auch eine nützliche Baumart für das Ökosystem Wald und aufgrund der Holzeigenschaften ein begehrter Rohstoff für die Möbelindustrie. (HEIZMANN 2002, MITCHELL et al. 2014, GROSSER 2002).

Der Eschenbestand aber ist gefährdet, besonders durch den Pilz *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya bzw. seiner Nebenfruchtform *Chalara fraxinea*. Dieser aus Asien stammende Schaderreger trat in Europa 1990 das erste Mal in Polen auf (KOWALSKI 2006). In den folgenden Jahren breitete sich dieser Erreger über das Baltikum, Skandinavien und Mitteleuropa weiter aus (SCHUMACHER et al. 2007). Untersuchungen zum Eschentriebsterben in Baden-Württemberg 2015 ergaben, das nur 6,7 % des untersuchten Eschenvorrats potentiell langfristig überlebensfähig sind. 39,2 % der dort untersuchten Eschen wird vermutlich in den nächsten Jahren aufgrund mangelnder Vitalität genutzt werden müssen oder stehend absterben (ENDERLE et al. 2015).

In diesen Befallsgebieten finden sich jedoch immer wieder Einzelbäume, die scheinbar resistent gegen diesen Erreger sind und keinerlei Symptome zeigen (ENDERLE et al. 2015). Einige Forschungsprojekte, unter anderen das BMEL geförderte Projekt „ResEsche“, konzentrieren sich aus diesem Grund darauf, die Ursache für diese Resistenz zu finden und die entsprechenden Individuen gezielt vegetativ weiter zu vermehren. Eine moderne Methode, die vergleichsweise wenig Pflege bedarf, hohe Vermehrungsanzahlen ermöglicht und zudem auch gesundes Pflanzengut hervorbringt, ist die Vermehrung von Pflanzen in der In-vitro-Kultur (SCHWAIGER 2011).

Die Pflanzen werden unter sterilen Bedingungen im Glas auf einem Nährmedium etabliert, durch Achselschnitte vermehrt, bewurzelt und in vivo akklimatisiert. Die Steuerung der einzelnen Wachstumsabschnitte übernehmen die im Medium hinzugefügten Phytohormone. In der Zierpflanzen- und Baumschulproduktion, besonders in der Orchideenproduktion, wird das System schon lange erfolgreich angewendet (HEß 2008). Verfahren zur Produktion von Esche in vitro hingegen sind bisher kaum in der Praxis etabliert.

In den letzten Jahren gab es einige Versuche und Publikationen mit unterschiedlichen Ansätzen zur In-vitro-Vermehrung der Esche. Viele stützen sich auf die Bildung von Adventivsprossen aus somatischen Kallusgewebe. Das Problem bei der durch Kallus entstandenen neuen Sprossen ist die hohe Wahrscheinlichkeit von Mutationen, wie beispielsweise die Polyploidisierung im Chromosomensatz. Diese Pflanzen können dann veränderte Phänotypen mit anderen Eigenschaften aufweisen-(LEE et al. 2017).

Eine andere praktizierte Möglichkeit der In-vitro-Kultivierung von Jungpflanzen ist die Aussaat unter sterilen Bedingungen. Diese Variante hat den positiven Effekt, dass einzelne Nachkommen unter kontrollierten Laborbedingungen kultiviert und geprüft sowie später vegetativ vermehrt werden können. Der Nachtteil dieser Methode ist der relativ hohe Aufwand bei geringer Ausbeute und genetisch unterschiedliche Individuen mit unterschiedlichen Eigenschaften (BEASLY 2013, SCHÖNWEIß 2005).

Die Vermehrung über Mikrostecklinge erbringt uniforme Pflanzen mit geringer Mutationswahrscheinlichkeit bei akzeptablem Arbeitsaufwand. Sie erweist sich im Falle der Esche aber ebenfalls als schwierig, da die Explantate ein sehr gedrungenes Wachstum mit nur kurzen Internodien aufweisen (SCHÖNWEIß 2005). Dies erschwert eine erfolgreiche Vermehrung der Pflanzen, die als Grundlage für die Resistenzforschung dringend benötigt werden. Durch entsprechende Anpassung der gängigen Etablierungsprotokolle konnte eine vergleichsweise effektive Methode zum Beispiel von SCHÖNWEIß (2005) entwickelt werden. Sie erlaubt dennoch keine mit anderen Kulturen vergleichbare, wirtschaftliche Produktion von Eschen.

Eine Einzelbeobachtung an *Fraxinus mandshurica* (Rupr.), die während der Etablierungsversuche im Jahr 2015 am Johann Heinrich von Thünen-Institut in Waldsieversdorf gemacht wurde, ließ allerdings vermuten, dass die Explantate ein besseres Streckungswachstum zeigen, wenn die Mutterpflanzen vom Ligusterschwärmer (*Sphinx ligustri* L.), befallen wurden. Das Raupenstadium dieses Schädlings besiedelt bevorzugt Liguster (*Ligustrum vulgare* L.), Esche (*F. excelsior*) und Spierstrauch (*Spiraea* L.) und ernährt sich hautsächlich von den Blättern, so dass die Pflanzen nahezu komplett kahlgefressen werden (LEPIDOPTEROLOGEN ARBEITSGRUPPE 1997, FORSTER & WOHLFAHRT 1960). Je nach Befallszeitpunkt treiben die Pflanzen neu aus. Eben diese Neuaustriebe von *F. mandshurica* wurden als Explantate für die Etablierung genutzt und sie zeigen bis heute ein verbessertes In-vitro-Wachstum mit einer guten Internodialstreckung.

In der Folge wurde dieses Phänomen näher untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die Raupen durch ihren Fraß und bestimmte Inhaltsstoffe reproduzierbar das In-vitro-Wachstum der Esche beeinflussen und ob man den Fraß mit selben Ergebnis auch mechanisch simulieren kann. Des Weiteren wurde zur Klärung der Ursache dieses Phänomens der Hormonhaushalt der Eschen näher analysiert.

Die Fragestellungen stützen sich auf ein bereits bekanntes Modellsystem, bei dem der spezielle Einfluss von Insektenfraß als Auslöser verschiedener Reaktion der Pflanze bereits beschrieben werden konnte: der Fraß von *Manduca sexta* (L.) an *Nicotiana attenuata* (Torr. ex. S. Watson). *Manduca sexta* ist wie *Sphinx lingustri* ein Vertreter der Schwämer (Familie Sphingidae). Diese eignen sich für Experimente zur pflanzlichen Reaktion auf Insektenfraß, weil durch die Größe der Raupen das Regurgitant (Verdauungssekret) separat gewonnen und gelagert werden kann. Das lässt eine Durchführung von Experimenten unabhängig vom Lebenszyklus des Schwärmers zu. So kann durch eine mechanische Verletzung und die gleichzeitige Applikation von Regurgitant der Raupenfraß imitiert werden. Es ist aber auch möglich, die Wirkung der mechanischen Verletzung und des Regurgitants separat zu untersuchen. Experimente mit dem Modellsystem *Manduca sexta*/*Nicotiana attenuata* haben ergeben, dass durch Raupenfraß drei verschiedene Pflanzenreaktionen ausgelöst: Emittierung von verschiedenen Mono- und Sesquiterpenen, Veränderung der Aktivität der regurgitantabhängigen mRNA und Anstieg des Jasmonsäuregehaltes (HALITSCHKE et al. 2000, KAHL et al. 2000, HERMSMEIER et al. 2001, SCHITTKO et al. 2001, MCCLOUD & BALDWIN 1997, SCHITTKO et al. 2000).

Der Anstieg des Jasmonsäuregehaltes ist durch die Signalkaskaden bedingt (SCHRÖDER 1998, WASTERNACK UND HAUSE 2014). Jedoch unterscheiden sich die Pflanzenreaktionen bei tatsächlichem Raupenfraß von der mechanischen Verwundung mit anschließender Applikation von Regurgitant. Beide Varianten führen innerhalb weniger Minuten zu einem erhöhten Jasmonsäuregehalt („jasmonate burst“) auf Grund der Verwundung (MCCLOUD & BALDWIN 1997, SCHITTKO et al. 2000). Die darauffolgende Nicotinansammlung, welche eng mit dem Jasmonsäuregehalt gekoppelt ist, wird hingegen bei der Insektenfraßvariante aufgrund von einem Ethylenburst durch den Fraß unterdrückt (BALDWIN 1988, BALDWIN et al. 1994, 1997; MCCLOUD & BALDWIN 1997, KAHL et al. 2000). Als obligater Auslöser all dieser Reaktionen werden von

HALITSCHKE et al. (2001) einige Fettsäure- Aminosäure-Konjugate im Regurgitant des Insekts verantwortlich gemacht.

Ausgehend von den Erkenntnissen bei der krautigen Pflanze *Nicotiana attenuata*, ergibt sich die Frage ob es auch bei Bäumen zu kurzfristigen Änderungen im Hormonhaushalt kommt (jasmonate burst). Es wäre möglich, dass dieser jasmonate burst nicht nur Abwehrmechanismen auslöst, sondern auch zu Wachstumsveränderungen führt (Sprossverlängerung), die bei der In-vitro-Kultur von Mikrostecklingen für ein verbessertes Streckungswachstum ausgenutzt werden können. In Bezug auf die Gemeine Esche werden in der vorliegenden Arbeit zwei Fragekomplexe untersucht.

1. Führt der Raupenfraß dazu, dass Explantate, die aus den Neuaustrieben gewonnen werden, ein verbessertes Streckungswachstum bei der In-vitro-Kultur zeigen?
2. Führt der Raupenfraß zu Veränderungen im Hormonhaushalt?

Dieser zweite Fragenkomplex wurde nochmal unterteilt in zwei Anliegen:

a) Zeitpunktversuch: Wie hoch ist die Phytohormonkonzentration nach mehreren Tagen Raupenfraß?
b) Zeitreihenversuch: Wie verändert sich die Phytohormonkonzentration innerhalb von 4 Stunden nach simulierten Raupenfraß.

Mit der Frage 2b soll geklärt werden, ob es analog zu den Verhältnissen bei *Nicotiana* auch einen jasmonate burst bei verholzenden Pflanzen nach Fraß durch Schwärmerraupen gibt.

Material und Methoden

Fragenkomplex 1 Neuaustriebe

Pflanzenbehandlung

Für diesen Versuch wurden ein *Fraxinus mandshurica* Genotyp (FM) und fünf *Fraxinus excelsior* Genotypen (P2, 358/3, 245/1, W3, P4) ausgewählt. Diese Genotypen wurden in Vorexperimenten über In-vitro-Kultur vermehrt und in Erde überführt. Für jeden Genotyp standen Pflanzen zur Verfügung, die für zwei bis drei Jahre im Freiland in Töpfen kultiviert wurden. Diese Pflanzen dienten als Quelle für Explantate zur In-vitro-Etablierung. Mit der Verwendung von klonierten Pflanzen sollte die Reproduzierbarkeit durch den gleichen genetischen Hintergrund der Behandlungsvarianten gewährleistet werden. Pro Genotyp wurden 12 Rameten ausgewählt, an denen in vier Wiederholungen drei Behandlungsvarianten durchgeführt wurden.

- Behandlung 1 – Blattverletzung durch Raupenfraß: Für die Raupenbehandlung standen *Sphinx ligustri*-Eier von zwei Firmen aus Großbritannien zur Verfügung (Devon Butterflies UK, Worldwide Butterflies UK). Sie wurden jeweils zu zehnt in Plastikgefäßen mit Zellstoff und jungen Eschenblättern aufgezogen. Im zweiten bis dritten Larvenstadium – etwa 10 Tage nach Schlupf – wurden die Raupen auf die vier für Behandlung 1 vorgesehen Pflanzen gesetzt, jeweils auf ein Fiederblatt des obersten vollausgebildeten Blattpaares.
- Behandlung 2 – Mechanische Blattverletzung: Es wurden ca. 2/3 der Blattflächen mittels Schere entfernt. Ein Blatt des obersten, vollständig ausgebildeten Blattpaares wurde nicht verletzt, da dieses als systemische Probe für die Phytohormonmessung unverletzt gebraucht wurde. Diese mechanische Verletzung wurde nach 4 Wochen nochmals verstärkt, in dem alle Fiederblättchen vollständig von Hand entfernt wurden, so dass nur die Mittelrippe noch vorhanden war.
- Behandlung 3 – Kontrolle: Die Pflanzen der Kontrollvariante wurden nicht weiter behandelt.

Bonitur *in vivo*

Jede Versuchspflanze im Gewächshaus wurde zu zwei Zeitpunkten bonitiert. Boniert wurde, ob ein Neuaustrieb stattgefunden hatte oder nicht. Die Pflanzen waren nach den Etablierungsschnitten erneut wieder ausgetrieben und wurden erneut auf Neutriebsbildung bonitiert. Hier wurde zusätzlich die Länge des neu ausgebildeten Triebes am einjährigen Holz von der Basis bis zur längsten Blattspitze gemessen.

Etablierungsmethode

Die Behandlungsvarianten 1 und 2 sollten einen Neuaustrieb induzieren, welcher später in vitro etabliert wurde. Bei den Pflanzen der Kontrollvarianten wurden diesjährige Triebe als Explantatquelle genutzt.

Pro Variante und Klon wurde versucht, 30 Explantate zu werben. Diese Anzahl konnte aufgrund des teilweise zu geringen Pflanzenausgangsmaterials nicht immer erreicht werden. Die geschnittenen Segmente wurden mit Aqua dest. vorgespült und die Desinfektion erfolgte mit einer Silbernitratlösung (0,05 %, 10 Minuten). Anschließend wurden die Explantate dreimal mit autoklavierten Aqua dest. gespült. Nach dem Neuanschnitt der Basis wurden die Explantate auf ein steriles Nährmedium Rug5 (Tabelle 1) im Glas aufgesetzt.

Tabelle 1: Nährmedium Rug5 (pH-Wert 5,7)

Quantität	Ingredienzien
4,032 g/l	Rugini Trockenpulver
0,02 g/l	Thidiazuron
0,5 mg/l	Zeatin
0,01 mg/l	IBA
30 g/l	Glucose
8 g/l	Phytoagar

Bonitur *in vitro*

Bonitiert wurden die Neuaustriebe der Explantate ca. 20 – 22 Tage nach der In-vitro-Überführung. Es wurde die Länge des Neuaustriebes von der Basis bis zur Blattspitze des längsten Blattes aufgenommen. Jeder Trieb am Explantat wurde einzeln erfasst und später ausgewertet.

Fragenkomplex 2 Phytohormone

Zeitpunkt-Versuch (Untersuchung des Hormongehalts zu einem definierten Zeitpunkt nach der Behandlung)

Die Pflanzen für die Phytohormonanalyse, waren dieselben wie für die Wachsstumsversuche. Die Proben wurden am Tag 8 nach Besatz der Eschenpflanzen mit den Raupen entnommen, d.h. in der Behandlungsvariante 1 waren die Pflanzen bereits acht Tage mit Raupen besetzt. Die Behandlungsvariante 2 mit der mechanischen Verletzung wurde am Tag 8 durchgeführt und die Proben für die Phytohormonuntersuchung zwei Stunden nach der mechanischen Behandlung entnommen.

In der Behandlungsvariante 1 (Raupenfraß) wurde pro Pflanze ein Blättchen vom befressenen Blatt entnommen (lokale Reaktion) und ein Blättchen von einem Blatt, das sich einen Knoten unterhalb der Behandlung befindet (systemische Reaktion, Abbildung 1).

In der Behandlungsvariante 2 (mechanische Verletzung) wurde ein Blättchen vom unverletzten Blatt des obersten Blattpaares als systemische Probe entnommen; ein Blättchen von einem der angeschnittenen Blätter darunter wurde als lokale Probe entnommen.

In der Behandlungsvariante 3 (Kontrolle) wurde nur ein Blättchen als Probe genommen, weil hier eine Unterscheidung zwischen lokaler und systemischer Reaktion nicht möglich war.

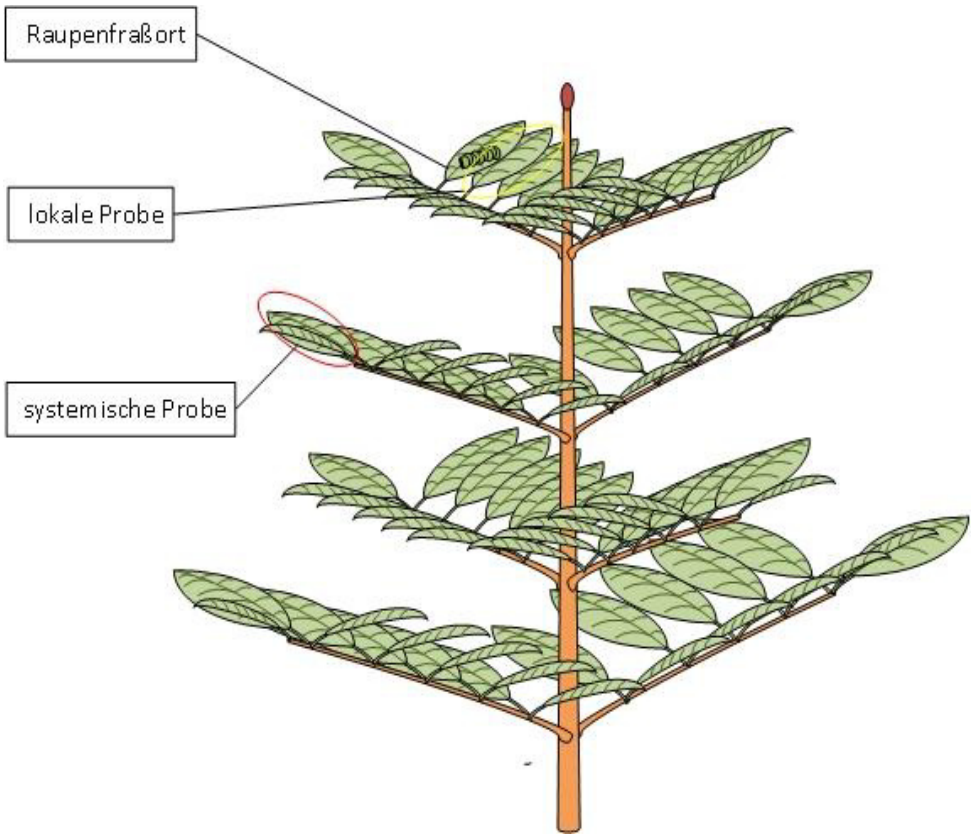


Abbildung 1: Schema zur Blattprobennahme der Raupenvariante

Zeitreihenversuch (Untersuchungen des Hormongehalts nach einer Behandlung über eine Zeitreihe hinweg)

Für diesen Versuch wurden acht Pflanzen desselben Genotyps (71/4, nicht Teil der zuvor beschriebenen Experimente) ausgewählt und am Tag vor dem Versuch im Foliengewächshaus untergestellt. Eventuelle mechanische Verletzungen durch das Umstellen und dadurch ausgelöste Veränderungen im Hormonhaushalt sollten durch das frühe Umstellen verhindert werden.

Für den Versuch musste zunächst Regurgitant von den Raupen gewonnen werden. Dazu wurden die Raupen im letzten Larvenstadium mittels 50 µL Kapillarpipetten (Roth, Karlsruhe) gemolken Für den Versuch wurde eine fünffache Verdünnungslösung des Regugitants mit Reinstwasser hergestellt. Als Kontrolle diente Reinstwasser.

Für den Versuch wurden fünf Fiederblättchen der einen Blatthälfte des obersten vollständigen Blattpaares verletzt (Abbildung 2). Die Verletzung wurde punktförmig durch viermaliges Rollen (zwei Reihen pro Blättchenhälfte) mit einem Kopierrädchen über das Blättchen mit Abstand von ca. 3 - 5 mm zwischen den Reihen vollzogen. Kopierrädchen ist ein Werkzeug für Schneidereibedarf, dass in der Regel dazu benutzt, wird um Schnittmuster auf Schnittbögen zu übertragen.

Dann wurde mit der Pipette 20 µl der Versuchslösung aufgenommen und auf das verletzte Blatt appliziert. Mit dem behandschuhten Finger wurde die Lösung über das gesamte Blättchen gleichmäßig verteilt. Als Probenmaterial wurden einzelne Blättchen 0, 30, 60, 90 und 240 Minuten nach der Behandlung entnommen (Abbildung 2). Der Versuch wurde mit vier Wiederholungen durchgeführt.

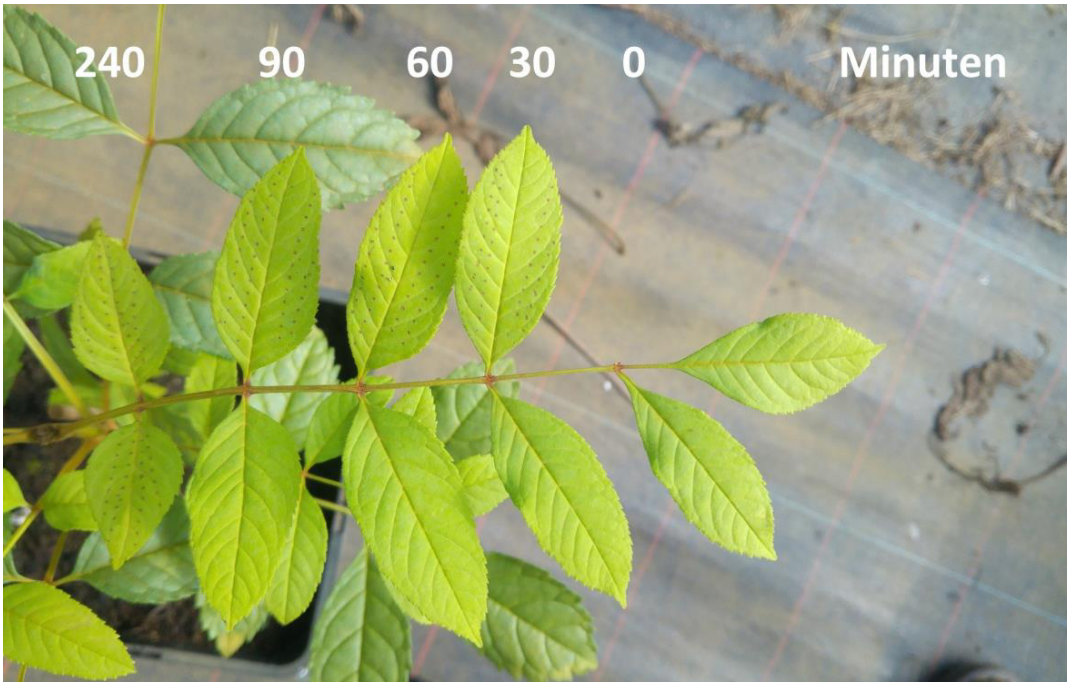


Abbildung 2: Verletztes Versuchsblatt mit Zeitmarkierung (Probe 0 schon entnommen)

Probenaufbereitung und Analyse

Im Experiment der Hormonmessung zu einem Zeitpunkt, wurden aus Kapazitätsgründen nur die Proben zweier Klone aufbereitet und näher untersucht. Die Proben des Zeitreihenversuchs wurden komplett aufbereitet. Alle Proben wurden zunächst gekühlt homogenisiert und 50 mg des Materials für die Extraktion und Analyse eingewogen. Die Extraktion der Phytohormone erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll von PAN et al. (2010). Analysiert der Proben erfolgte mittels HPLC-MS. Es wurden externe Standardkurven für Salicylsäure, Indol-3-Essigsäure, Jasmonsäure und Zeatin angelegt.

Statistik

Neuaustriebe

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels des Statistikprogramms SAS („Statistical Analysis System“) in der Version 9.3. Als Auswertungsmethode wurde je nach Datenlage die ANOVA-Typ Statistik oder der Kruskal Wallis-Test ausgewählt. Als signifikant wurden die Unterschiede betrachtet, deren Fehler, ggf. korrigiert nach Holm (multiple Mittelwertvergleiche), kleiner als 5 % war ($p < 0{,}05$).

Phytohormongehalte

Die Auswertung der Phytohormongehalte erfolgte ebenfalls mit dem Statistikprogramm SAS. Als Auswertungsmethode wurde bei dem Zeitreihenversuch und beim Zeitpunktversuch von Klon P2 eine Varianzanalyse durchgeführt. Da bei Klon 358/3 des Zeitpunktversuchs zum Teil keine Normalverteilung vorlag, wurden entsprechende nicht parametrische Tests bzw. paarweise parametrische Vergleiche

durchgeführt. Als signifikant wurden auch hier Unterschiede betrachtet, deren Fehler kleiner als 5 % ($p < 0,05$) waren.

Ergebnisse

Fragenkomplex 1 Neuaustrieb

Raupenfraß

Im Experiment zum Wachstum nach Raupenfraß zeigte sich, dass sich die Larven des Ligusterschwärmers leicht für Experimente aufziehen lassen. Die Schlupfrate in Plastikboxen mit Eschenblättern betrug 84 % und auch die weitere Aufzucht der Raupen auf Futterpflanzen war unproblematisch. Nach dem Umsetzen auf die Versuchspflanzen war der Blattverlust in den ersten Tagen gering. Im letzten Larvenstadium wurden die Versuchspflanzen der Behandlungsvariante 1 innerhalb weniger Tage von einer einzelnen Raupe pro Pflanzen komplett kahlgefressen, so dass nur die Blattstiele stehen blieben (Tabelle 2, Abbildung 3a, b).

Tabelle 2: Ablauf des Experiments zum Pflanzenwachstum nach Raupenfraß

Datum	Ereignis
22.06.17	*Sphinx ligustri* Eier gelegt beim Lieferanten Devon Butterflies (UK)
28.06.17	Eier (59) erhalten und in Plasteboxen mit Eschenblättern kultiviert
30.06.17	44/59 Larven geschlüpft, Transfer auf Zwischen-Futterpflanzen, Eschen-Genotyp 245/1
05.07.17	51/59 geschlüpft, finale Schlupfrate (84 %)
10.07.17	Umsetzen der Larven auf Versuchspflanzen der Behandlungsvariante 1
18.07.17	Blättchenkürzung für Behandlungsvariante 2, Probennahmen für Phytohormon-messung des Zeitpunktversuchs
21.07.17	Gewinnung von Regurgitant („Raupenmelken“)
03.-08.08.17	Kompletter Kahlfraß der Behandlungsvariante 1, Raupen im letzten Larvenstadium
14.08.17	Behandlungsvariante 2 wird verstärkt, Entfernung aller Blättchen
18.08.07	1. Bonitur des Neuaustriebs im Gewächshaus
21.-31.08.17	Explantatgewinnung für In-vitro-Etablierung
13.09.17	Bonitur des Neuaustriebs in der In-vitro-Kultur
20.09. 17	2. Bonitur des Neuaustriebs im Gewächshaus

Neuaustrieblängen im Gewächshaus

Das Ergebnis der ersten Bonitur des Neuaustriebs (18.08.2017) war eindeutig. Alle Pflanzen der Raupenvariante hatten mindestens einen und bis zu vier Neuaustriebe gebildet bzw. erste juvenile Blätter traten aus den Knospen heraus (Abbildung 3). Sowohl die Pflanzen der Kontrollvariante als auch die mechanisch verletzten Pflanzen zeigten keinen Neuaustrieb.

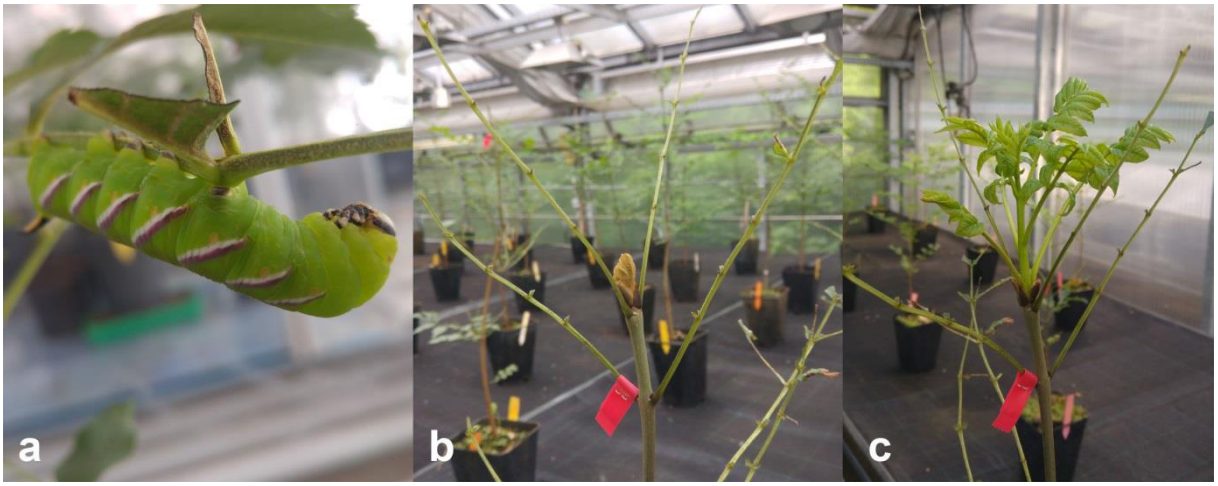


Abbildung 3: Raupenfraß und Neuaustrieb: a) Raupe im letzten Larvenstadium 02.08.17, b) Kahlgefressene Pflanze mit beginnendem Neuaustrieb 03.08.17, c) Neuaustrieb 07.08.17

Weniger eindeutig war die Verteilung des Neuaustriebes zum zweiten Boniturtermin (13.09.2017). Nach Schnitt der Explantate für die In-vitro-Kultur konnte beobachtet werden, dass der Neuaustrieb diverser verteilt war. Auch Pflanzen der Behandlungsvariante 2 und der Kontrollvariante bildeten neue Triebe. Bei der Betrachtung der Variantemittelwerte bei Klon W3, der als einziger Klon mehr als einen Neutrieb in der Kontrollvariante gebildet hat, fällt auf, dass durch Fraß oder mechanisch verletzte Pflanzen mit im Mittel mehr als 15 cm längere Neutriebe bildeten als die Kontrollpflanzen mit im Schnitt 5 cm. Die anderen *F. excelsior* zeigten eine ähnliche Verteilung der Messwerte, aber mit geringeren Wiederholungen (Daten nicht aufgeführt). Der *F. mandshurica*-Klon zeigte ein anderes Austriebsverhalten. Er bildete in der Kontrollvariante die längsten Neutriebe mit 18 cm, gefolgt von der mechanischen Variante. In der Raupenvariante wurden hier die kürzesten Triebe erfasst (Abbildung 4).

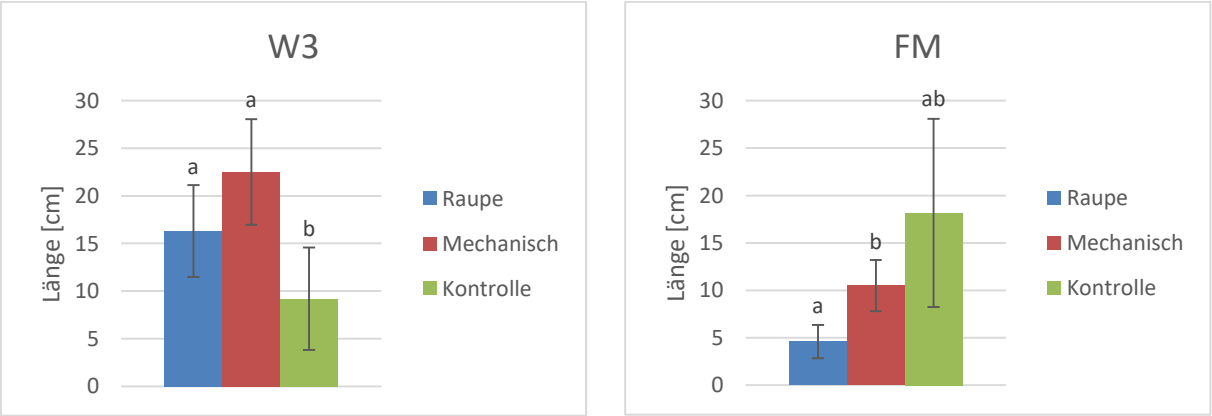


Abbildung 4: Mittlere Neutriebslänge ausgewählter Gewächshausgenotypen mit Standardabweichung, 20.09.2017 (n=4, Kruskal-Wallis-Test, $p < 0{,}05$)

Messungen der Neutriebslängen der In-vitro-Etablierung

Für die Etablierung konnten pro Genotyp und zwischen 20 und 30 Explantate in die Etablierungsphase gebracht werden. Fast alle Explantate, bis auf einzelne der Raupenbehandlung, trieben wieder aus (Abbildung 5). Zum Termin der Neutriebslängen-Messung am 13.09.2017 überlebte annähernd die Hälfte der Explantate. Der häufigste Grund für die Aussortierung der Explantate war eine Besiedelung mit Pilzen.

Besiedelungen mit Bakterien traten ebenfalls häufig auf, diese wurden aber im Bestand belassen auf Grund des möglichen harmlosen Charakters endophytischer Bakterien.

Abbildung 5: In vitro-Explantate mit Neutriebe der Behandlungsvariante 2 (mechanische Verletzung)

Es konnte keine signifikante Erhöhung der In-vitro-Trieblängen nach Raupenfraß im Vergleich zur mechanischen Verletzung festgestellt werden. Allerdings bringen Verletzungen durch Schnitt oder Raupenfraß im Schnitt bessere Trieblängen hervor im Vergleich zur Kontrollvariante. Statistisch signifikant sind diese Unterschiede jedoch nur bei den Klonen P2, 358/3 und 254/1. Bei W3 unterscheiden sich nur Raupenfraß (25,6 mm) und Kontrolle (20,3 mm) signifikant. Bei P4 gibt es keine signifikanten Unterschiede. Eine Ausnahme stellt der *F. mandshurica*-Klon (FM) dar. Hier zeigte sich, dass der Raupenfraß die Trieblänge signifikant verkürzt (21,2 mm). Es ist auch ein Unterschied in der mittleren Trieblänge zwischen der mechanischen Behandlung (33,6 mm) und der Kontrolle (40,6 mm) zu erkennen, dieser ist aber statistisch nicht signifikant (Abbildung 6).

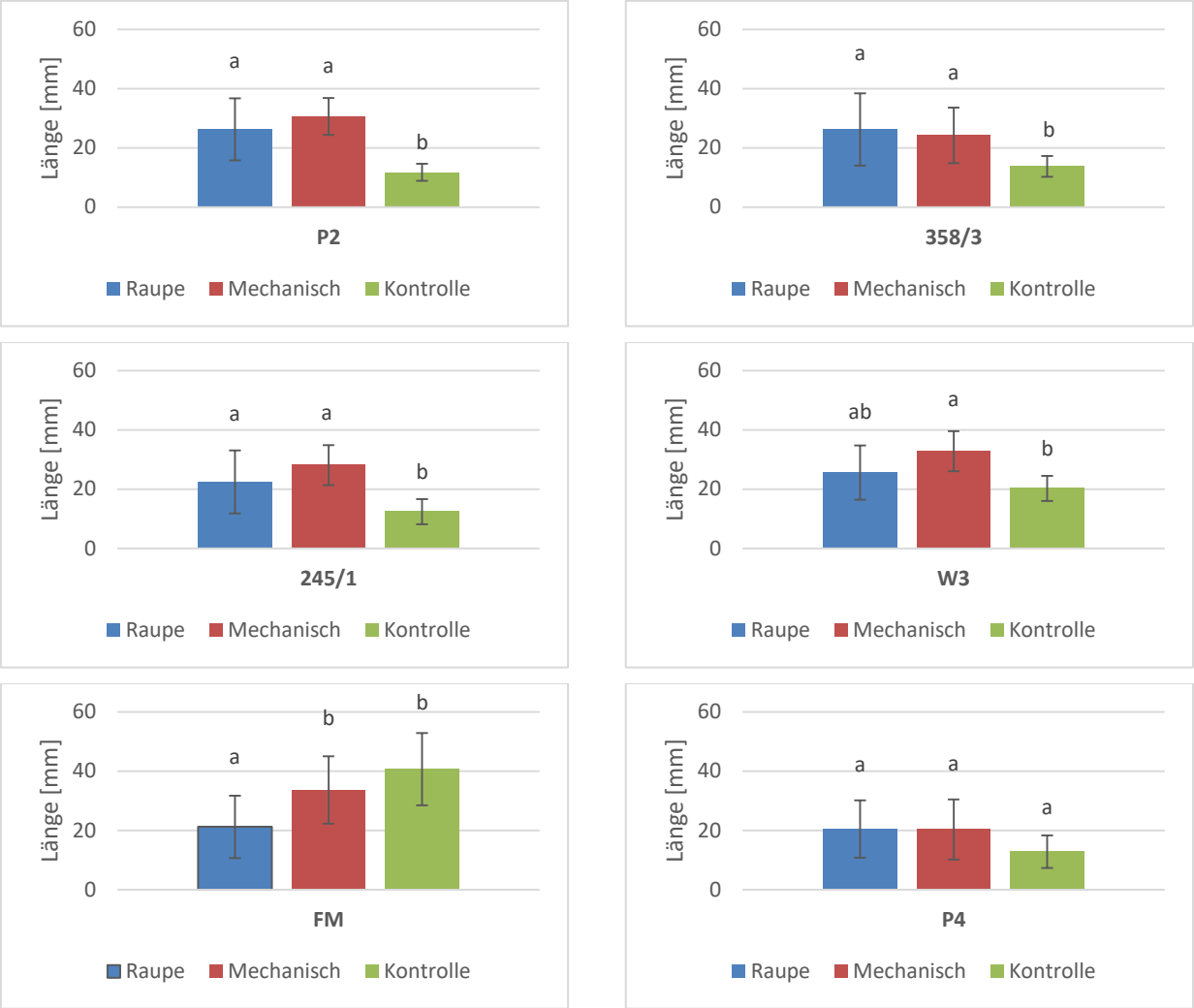


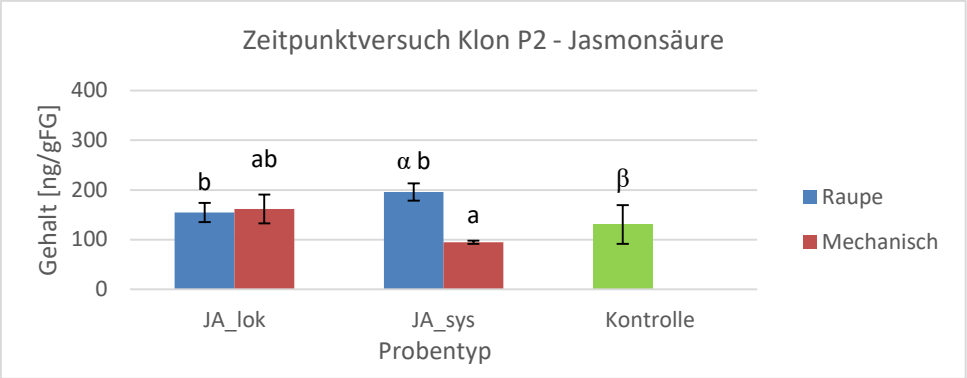
Abbildung 6: Mittlere Trieblänge und Standardabweichung der einzelnen In-vitro-Kulturen (Signifikanz nach Korrektur der P-Werte nach Holm bei $p < 0,05$)

Fragenkomplex 2 Phytohormone

Nach der Analyse mittels der HPLC-MS konnten im Spektrum in beiden Versuchen nur die Phytohormone Jasmonsäure und Salicylsäure nachgewiesen werden. Zeatin und Indol-3-Essigsäure konnten nicht beobachtet werden.

Zeitpunktversuch

Die Messung der Phytohormonkonzentration am 18.07.2017 wurde nur für die Genotypen P2 und 358/3 durchgeführt. Nach der Durchführung der Varianzanalyse konnten statistisch gesicherte, signifikante Unterschiede im Jasmonsäuregehalt des Eschengenotypen P2 zwischen der Raupenvariante (Mittelwert 195,7 ng/gFG) und der mechanischen Variante (Mittelwert 94,9 ng/gFG) bei den systemischen Proben festgestellt werden. Ebenfalls gab es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Mittelwert der systemischen-mechanischen Probe (94,9 ng/gFG) und dem Mittelwert der lokalen Raupenprobe (154,5 ng/gFG). Tendenziell ist ein Unterschied zwischen der lokalen und der systemischen Raupenprobe erkennbar ($p < 0,0628$; Abbildung 7). Im Vergleich zur Kontrolle gibt es nur einen signifikanten Unterschied



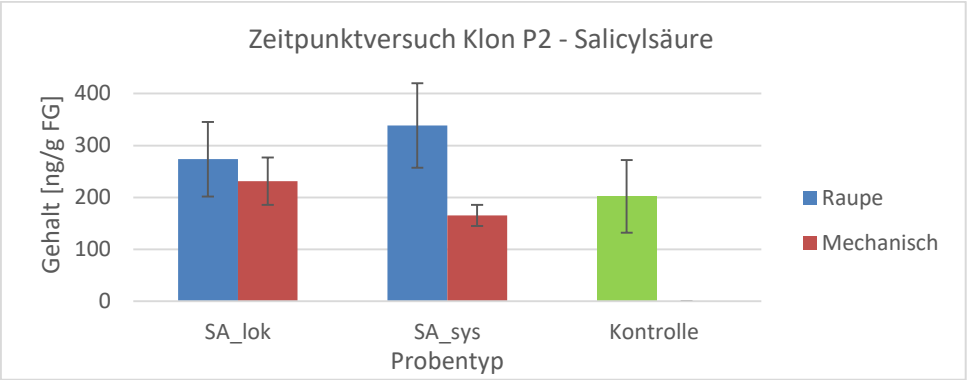
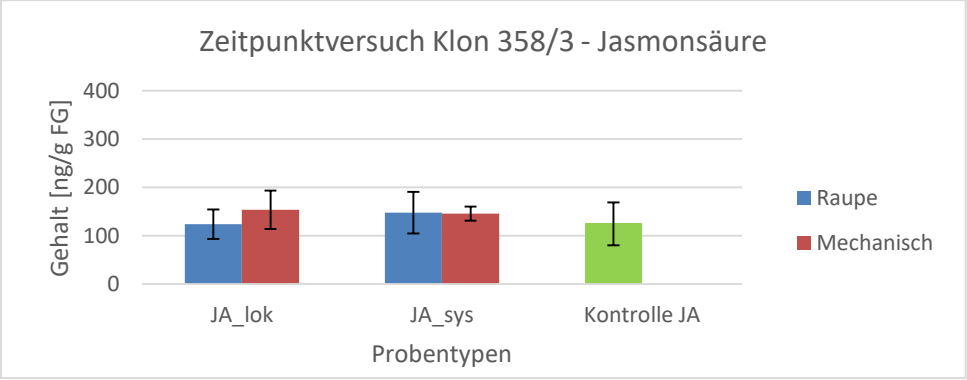


Abbildung 7: Mittlere Phytohormongehalte und Standardabweichung von Klon P2 (n=4, $p < 0,05$)



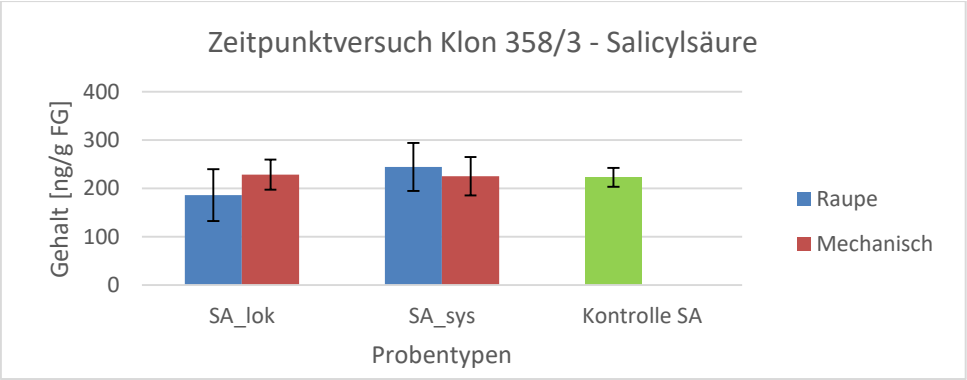


Abbildung 8: Mittlere Phytohormongehalte und Standardabweichung von Klon 358/3 (n=4, $p < 0,05$)

zwischen ihr und der systemischen Raupenprobe (mit griechischen Buchstaben gekennzeichnet). Alle anderen Probenvarianten unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrolle. Die Salicylsäuregehalte bei dem Eschenklon P2 unterschieden sich in allen Varianten nicht signifikant. Es sind lediglich Tendenzen eines Unterschiedes erkennbar. Die systemische Raupenprobe ist tendenziell zu der systemisch-mechanischen Probe und der Kontrolle verschieden.

Bei dem Klon 358/3 sind keine statistisch gesicherten Unterschiede zu finden sowohl zwischen den Varianten als auch im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 8).

Zeitreihenversuch

Im Falle des Verlaufs der Jasmonsäure über den Zeitraum von vier Stunden konnte nur ein einzelner signifikanter Unterschied in der Kontrollvariante festgestellt werden: zwischen t30 mit einem mittleren Gehalt von 163,42 ng/gFG und t60 mit einem mittleren Gehalt von 189,95 ng/gFG. Alle anderen Varianten unterschieden sich nicht (Abbildung 9).

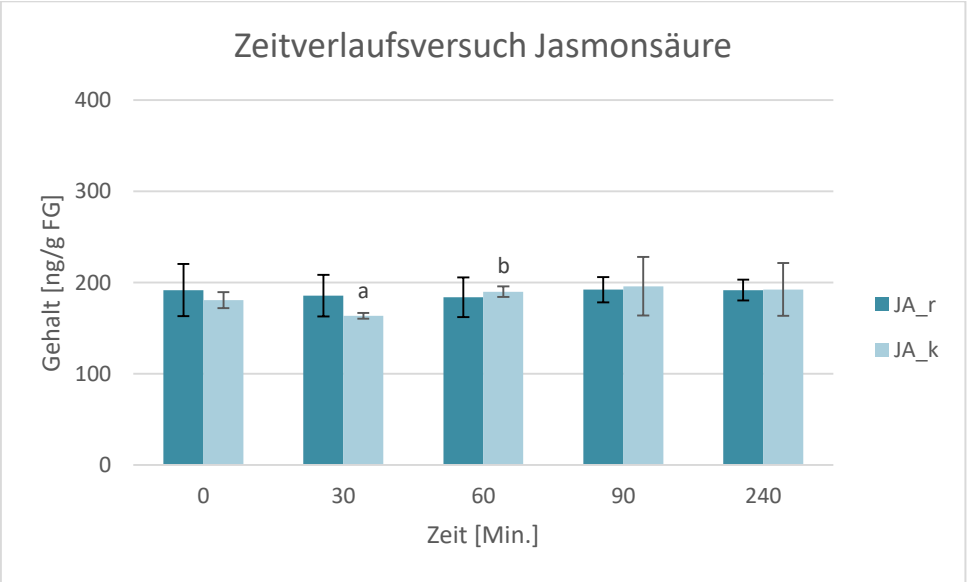


Abbildung 9: Mittlere Jasmonsäuregehalte für den Genotyp 71/4 über einen Zeitraum von vier Stunden (n=4 $p < 0,05$)

Die Ergebnisse der mittleren Salicylsäuregehalte ließen keine statistische Auswertung zu. Weder die Prüfsubstanz noch die Zeit bzw. eine Kombination der Effekte hatten einen Einfluss auf die Hormongehalte (Abbildung 10).

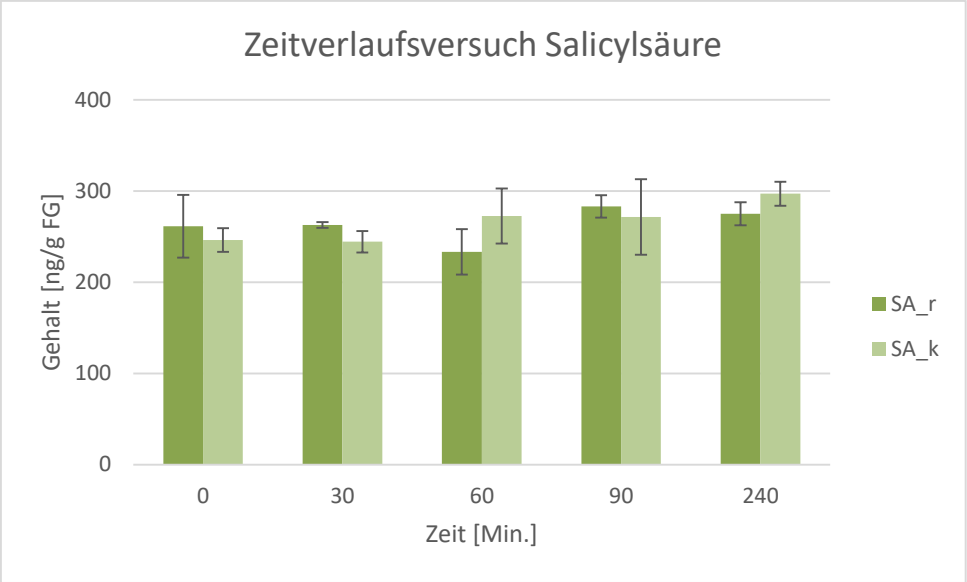


Abbildung 10: Mittlere Salicylsäuregehalte für den Genotyp 71/4 über einen Zeitraum von vier Stunden (n=4 $p < 0,05$)

Diskussion

Fragenkomplex 1 Neuaustrieb

Neuaustrieblängen im Gewächshaus

Die Bonitur der Versuchspflanzen im Gewächshaus zum ersten Boniturtermin scheint ein eindeutiges Ergebnis hervorzubringen: nur der Fraß durch die Raupen induzierte einen Neuaustrieb der Versuchspflanzen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bestimmte Inhaltstoffe im Regurgitant der Raupen die Pflanze zum Neuaustrieb animiert hatten. Die Interaktion zwischen dem Regurgitant von Herbivoren und einer spezifischen Pflanzenreaktion sind vielfältig beschrieben worden. Beispielsweise beginnt *Nicotiana attenuata* mit der Freisetzung von volatilen Blattduftstoffen, wenn *Manduca sexta*-Raupen mit ihrer Fraßaktivität beginnen. Diese volatilen Blattduftstoffe locken in der Folge Fraßfeinde an (HALITSCHKE et al. 2000, KAHL et al. 2000). Ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen Kahlfraß und Neuaustrieb durch Regurgitant wäre im gegebenen Fall ebenfalls vermutbar.

Allerdings ist es auch möglich, dass das Signal zum Neuaustrieb doch hauptsächlich vom Blattverlust ausgeht. Nach Raupenfraß waren die Pflanzen komplett kahl, während in der Variante mit der mechanischen Verletzung nur zwei Drittel der Photosynthesefläche entfernt worden sind. Möglicherweise war der Blattverlust nicht stark genug um als Signal für einen Neuaustrieb zu dienen. Aus diesem Grunde wurde vier Tage vor dem ersten Boniturtermin noch einmal die mechanische Verletzung verstärkt, in dem alle Blättchen entfernt wurden und nur die Spindel stehen gelassen wurden. Dies hatte noch keinen messbaren Einfluss auf die erste Bonitur. Möglicherweise aber auf die zweite Bonitur, die fünf Wochen später stattfand. Zu diesem Zeitpunkt trieben auch die Ramets der mechanischen Behandlung aus. Ein kombinierter Effekt aus Blatt- und Triebverlust (durch Explantatwerbung) ist ebenfalls denkbar und eine mögliche Erklärung für die Neutriebsbildung in der Kontrollvariante, da diese Pflanzen ebenfalls austrieben, wenn auch vergleichsweise nicht so stark wie die Pflanzen der Behandlungsvarianten.

Statistisch konnte diese subjektive Einschätzung bei einigen Klonen verifiziert werden. Bei der Interpretation ist aber zu beachten, dass sehr unterschiedliche Wiederholungszahlen vorlagen. Beispielsweise waren für die Werte P4 nur drei Werte in der Raupenvariante vorhanden. Bei 358/3 in der Kontrollvariante ebenso wie bei 245/1 in beiden Behandlungsvarianten lag nur ein Wert vor, was eine statistische Auswertung nicht zuließ. Trotz dessen fällt bei der Betrachtung der Mittelwerte über alle

F. excelsior-Klone auf, dass durch Fraß oder mechanisch verletzte Pflanzen längere Neutriebe bildeten als die Kontrollpflanzen. Eine Ausnahme stellt der *F. mandshurica*-Klon dar. Dieser bildete in der Kontrollvariante die längsten Neutriebe, gefolgt von der mechanischen Variante. In der Raupenvariante wurden hier die kürzesten Triebe gebildet. Es kann also ein Artunterschied in der Neutriebsbildung nach Biomasseverlust vermutet werden.

Des Weiteren lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass ein erheblicher Biomasseverlust, sei es aufgrund von Kahlfraß durch Herbivoren oder durch Entfernen des kompletten Laubes per Hand, einen Neuaustrieb induziert. Der Austrieb der Kontrollpflanzen kann mit dem Schnitt für die Etablierung begründet werden, durch die ebenfalls ein Biomasseverlust verursacht wurde, aber nicht im dem signifikanten Maße wie bei den Pflanzen der Behandlungsvarianten. Dieser Effekt des-Neuaustriebes nach Blattschnitt wird besonders in der Pflege von Bonsais genutzt, um neue junge Triebe und kleine Blätter zu induzieren. Ein unvollständiges Entfernen der Blätter führt auch hier nicht zu einem ausreichenden Neuaustrieb (KASTNER 2013, KIPP 2013).

Neuaustriebe nach In-vitro-Etablierung

Die Ergebnisse der In-vitro-Etablierung lassen darauf schließen, dass eine mechanische bzw. Raupen-Behandlung der *F. excelsior*-Pflanzen im Gegensatz zur Kontrolle einen Effekt zu haben scheinen. Biochemisch könnte der Fraß bzw. Schnitt also einen Prozess in der Pflanze aktiviert haben, der das Längenwachstum in vitro verbessert. Bei *F. mandshurica* hatte die Behandlung einen gegenteiligen Effekt, der durch die andere Art bedingt sein könnte. Eventuell könnte die statistische Auswertung durch die recht unterschiedliche Anzahl an Individuen je Variante und Klon ein wenig verzerrt sein. Sie ist somit mit Vorsicht zu interpretieren.

Das trotzdem ein verhältnismäßig geringes Streckungswachstum und damit entsprechende geringe Vermehrungszahlen vorhanden waren, kann durch die jeweiligen Kulturmedien bedingt sein. In der Literatur sind viele verschiedene Varianten von Medien beschrieben, die entsprechend der Versuchsfrage entwickelt wurden, es gibt kein einheitliches Medium für die Esche. Selbst für die unterschiedlichen Explantatherkünfte gibt es speziell zusammengestellte Medien (LEE et al. 2017). Der wichtigste Faktor sind die zugesetzten Phytohormone, deren Rollen und Funktionen bisher nicht komplett aufgeklärt werden konnten. Dementsprechend gibt es eine Vielzahl von getesteten Medien und Untersuchungen zu den Effekten einzelner Phytohormone und deren Kombinationen auf Pflanzen (LEE et al. 2017, BEASLY 2013, SCHÖNWEIß 2005, MITRAS et al. 2008, CHALUPA 1990). Des Weiteren kann bspw. der Anteil an Phytoagar und die Form des Kultivierungsgefäßes einen Einfluss auf das In-vitro-Wachstum der Pflanzen haben (SCHÖNWEIß 2005). So eben können auch bei den hier durchgeführten Versuchen all diese nicht detailliert beobachteten und bewerteten Effekte einen Einfluss auf das Wachstum gehabt haben, welche nicht durch die beschrieben Versuchsvarianten bedingt sein müssen.

Fragenkomplex 2 Phytohormone

Einfluss der Gerätekonfiguration

Ein auffälliges Ergebnis der Phytohormon-Messung ist der fehlende Nachweis von Zeatin und Indol-3-Essigsäure in den Blattproben. Aufgrund der Neuinstallation der HPCL-MS-Kombination können Gerätefehler nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund mussten mehrere Testläufe gemacht werden, bis angemessene Ergebnisse vorhanden waren. Durch die begrenzte Zeit und die vorhandenen Probenvolumina war ein umfangreiches Testen und Optimieren der Läufe nicht vollständig möglich. Eventuell wären höhere Phytohormongehalte bzw. auch Zeatin oder Indol-3-Essigsäure bei einem optimalen abgestimmten Probendurchlauf nachzuweisen gewesen. Möglich wäre ebenfalls, dass die Mengen an Indol-3-Essigsäure bzw. Zeatin zu gering in den Blättern von Gehölzen sind, als dass sie mit der

verwendeten Methode detektiert werden konnten. In der Literatur konzentrieren sich die Untersuchungen zu diesen beiden Phytohormonen im Bereich der Gehölze bspw. auf deren Menge im Kambium und deren Einfluss auf die Holzbildung von *Cryptomeria japonica* (D. Don) (KIJIDANI et al. 2014; 2016).

Vergleich der Phytohormonkonzentration über alle Versuche

Die ausgewerteten und quantifizierten Phytohormongehalte über alle Versuche (Zeitpunkt und Zeitreihe) verglichen, lassen auf einen möglichen Kloneffekt bezüglich der Phytohormonmengen rückschließen. Bei Genotyp 71/4 des Zeitreihen-Versuchs konnte ein höherer Phytohormongehalt festgestellt werden als bei P2. Des Weiteren kennzeichnete P2 einen hohen Salicylsäuregehalt, der von keinem anderen Klon erreicht wurde. Klon 358/3 hatte im Vergleich dazu mittlere Phytohormongehalte.

Der Gehalt am Phytohormon Jasmonsäure ist bei anderen Pflanzenarten sehr unterschiedlich. In Sojabohne wurden in unverletzten Blättern zwischen 10 und 90 ng/gFG gemessen (CREELMAN und MULLET 1995). In *Nicotiana tabacum* wurden 10 ng/gFG in unverletzten Blättern gemessen (BALDWIN et al. 1997). Die gemessenen Mittelwerte für unbehandelte Esche waren 120 ng/FG für Genotyp 358/3, 130 ng/g FG für Genotyp P2 und 195 ng/gFG für 71/4. Diese im Vergleich zu den genannten krautigen Pflanzen hohen Werte sind möglicherweise typisch für Bäume. Bei der Messung des Jasmonsäuregehaltes in *Populus nigra* (L.) wurde bei unverletzten Pflanzen ein Wert von 90 ng/gTG (ULLAH et al. 2019).

Für den Salicylsäuregehalt sind die beobachteten Schwankungen noch größer. In Blättern verschiedener krautiger Pflanzen wurden Werte zwischen 37190 ng/gFG (*Oryza sativa* L.) und <10 ng/gFG (z.B. *Brassica napus* L., *Nicotiana tabacum* L. und *Cassia obtusifolia* L.) gemessen, wobei die niedrigen Werte weiter verbreitet sind (RASKIN et al. 1990). Die Salicylsäuregehalte unverletzter Eschenblätter schwankte zwischen 200 und 300 ng/g FG für die drei untersuchten Genotypen. Auch hier könnte die Diskrepanz zwischen den Messwerten und den älteren Literaturwerten den Unterschied zwischen krautigen Pflanzen und Gehölzen widerspiegeln. Bei der Messung von Salicylsäure an *Populus nigra* wurde an unverletzten Blätter Werte zwischen 325 und 600 ng/gTG gemessen (ULLAH et al. 2019).

Zeitpunktversuch

Bei den Phytohormonmessungen im Gewächshaus wurde zwischen lokalen und systemischen Proben unterschieden. Lokal bedeutet, dass die Pflanze direkt am Fraßort auf das Stresssignal antwortet. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Stresssignal an nicht betroffene Pflanzenteile weitergeleitet wird und dort systemisch zu einer Stressantwort kommt, die mit einer Veränderung der Hormonkonzentration verbunden ist (PEDRAZANI & VIGLIOCCO 2017). Für Jasmonsäure und Salicylsäure konnten kaum Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle nachgewiesen werden. Beim Genotyp P2 gab es einen Unterschied in der Jasmonsäurekonzentration bei der systemischen Reaktion auf Raupe oder mechanische Verletzung. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war aber nur die Raupenbehandlung. Allerdings war die Jasmonsäurekonzentration nur etwa 50 % höher nach dem Raupenfraß mit einem durchschnittlichen Wert von 200 ng/gFG. Dies steht im Gegensatz zu einer Beobachtung bei Schwarzpappel für die Behandlung mit den Raupen des Schwammspinners (*Lymantria dispar* L.). Hier betrug die Jasmonatkonzentration nach 40 Stunden Raupenfraß 9000 ng/gTG (EBERL et al. 2018) was etwa einer 30-fachen Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle entspricht. Eine mögliche Erklärung ist, dass in unserem Versuch nur Jasmonsäure gemessen wurde und bei dem Pappelversuch eine Summe für alle gemessenen Jasmonate, inklusive verschiedener Jasmonsäure-Isoleucine. Es ist also möglich, dass in dem gewählten Versuchsaufbau Jasmonsäure-Isoleucin die aktive Substanz ist und dementsprechend bei weiteren Untersuchungen an Esche auch Jasmonsäure-Isoleucin analysiert werden muss.

Zeitreihenversuch

Innerhalb des gemessenen Zeitraums von 240 Minuten konnte kein Anstieg der Jasmonsäure- und der Salicylsäurekonzentration in Eschenblättern nachgewiesen werden. Dies ist speziell bei der Jasmonsäure im Gegensatz zu den Erkenntnissen bei krautigen Pflanzen. Hier ist Jasmonsäure ein Stresshormon, dessen Produktion innerhalb weniger Minuten nach Stress induziert wird. Dies führt zu einer reversiblen Erhöhung der Jasmonsäurekonzentration. Bei Versuchen zu Wasserstress in Sojabohne kam es zu einem fünffachen Anstieg der Jasmonsäure nach zwei Stunden, der nach vier Stunden wieder auf das Niveau der Kontrolle sank (CREELMAN & MULLET 1995). Die Verletzung von Tabakblättern führte innerhalb von 90 Minuten zu einer Verzehnfachung der Jasmonsäurekonzenztration (99,1 ng/gFG verglichen zu 10 ng/gFG vor Verletzung, BALDWIN et al. 1997). Es bleibt festzuhalten, dass dieser als jasmonate burst bezeichnete reversible Anstieg bei der der Esche nicht zu beobachten war. Dies lässt die Vermutung zu, dass es keinen kurzfristigen Jasmonsäureanstieg bei Gehölzen nach einer Verletzung gibt bzw. mit den hier verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine mögliche Erklärung für den methodischen Einfluss ist die Art und Weise der mechanischen Verletzung. Die bei der Esche verwendete Verletzung mittels Kopierrädchen ist möglicherweise nicht ausreichend um einen Fraßschaden zu imitieren. Vor einem ähnlichen Problem standen MITHÖFER et al. (2005) bei Experimenten zum Fraß von *Spodoptera littoralis* (B.) an Limabohne. Sie vermuteten, dass eine flächenmäßig kleine Verletzung, die in der Natur beispielsweise durch einen Hagelschlag ausgelöst sein könnte, nicht den energetisch aufwändigen Prozess des Startens einer Stressantwort über eine Phytohormonsignalkette auslöst. Deshalb entwickelten sie eine mechanische Raupe die mit einem Metallstift (0,5 mm Durchmesser) bis zu 12000 Verletzungen pro Blatt durchführen kann (MITHÖFER et al. 2005). Dieser Aspekt sollte bei zukünftigen Versuchen zu Fraßschäden an Gehölzen Berücksichtigung finden.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Raupe mit ihrer Fraßaktivität und ihrem Regurgitant zwar einen signifikanten Einfluss auf das In-vitro-Wachstum im Vergleich zur Kontrolle hat, aber die mechanische Verletzung zu einer noch besseren Durchschnittslänge der In-vitro-Triebe führte. Der Umstand des Raupenfraßes führt zu einem Neuaustrieb der Pflanze im geschützten Raum, und sorgt für eine bessere In-vitro-Etablierung und bessere Überlebenschancen. Dieser Umstand ist bereits schon von SCHÖNWEIß (2005) publiziert worden.

Des Weiteren hat nicht das Regurgitant einen Effekt auf den Hormonhaushalt in den Gehölzen, sondern vermutlich nur die Verletzung. Ein Jasmonsäureanstieg konnte hier nicht nachgewiesen werden. Es kann also vermutet werden, dass es keinen Jasmonsäureanstieg bei Gehölzen gibt, der mit den der krautigen Pflanzen vergleichbar wäre. Die genaueren Umstände und Ausmaße sollten für gesicherte Aussagen nochmals umfangreich untersucht werden.

Danksagung

Wir danken Paul Reim, Denise Mettke und Petra Knauer für die exzellente technische Unterstützung. Das Projekt „ResEsche“ in dessen Rahmen, die hier vorgestellten Arbeiten stattfanden, wurden durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft gefördert (FKZ: 22019915)

Literatur

BALDWIN IT (1988) The alkaloidal responses of wild tobacco to real and simulated herbivory. Oecologia 77: 378–381.

BALDWIN IT (1994) Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in Nicotiana sylvestris. J Chem Ecol. 20: 2139–2157.

BALDWIN IT et al. (1997) Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in Nicotiana sylvestris. Planta 201: 397–404.

BEASLY R et al. (2013) Regenration of Plants from Fraxinus nigra Marsh. Hypocotyls. HortScience Vol. 48 (7): 887-890.

CHALUPA V (1990) Micropropagation of Hornbeam (C*arpinus betulus* L.) and Ash (*Fraxinus excelsior* L.). Biologia Plantarum 32 (5): 332-338.

CREELMAN R, MULLET J (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4114 – 4119.

EBERL F et al. (2018) Leaf rust infection reduces herbivore-induced volatile emission in black poplar and attracts a generalist herbivore. New Phytologist 220: 760-772.

ENDERLE R et al. (2015) Eschentriebsterben. In Waldzustandsbericht 2015 für Baden-Württemberg; Forstliche Versuchs- und Forschungsantstalt Baden-Württemberg, Ed.; Forstliche Versuchs- und Forschungsantstalt Baden-Württemberg: Freiburg, Germany, pp. 46–54.

FORSTER W, WOHLFAHRT T (1960) Die Schmetterlinge Mitteleuropas, Band III Spinner und Schwärmer (*Bombyces und Sphinges*). Franck'sche Verlagshandlung W. Keller & Co, Stuttgart, S. 110.

GROSSER D (2002) Das Holz der Esche – Eigenschaften und Verwendung. In: Beitrage zur Esche – Fachtagung zum Baum des Jahres 2001, Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft.

HALITSCHKE R et al (2000) Eco-physiological comparison of direct and indirect defenses in Nicotiana attenuata. Oecologia 124: 408–417.

HALITSCHKE R et al. (2001) Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty Acid-Amino Acid Conjugates in Herbivore Oral Secretions Are Necessary and Sufficient for Herbivore-Specific Plant Responses. Plant Physiol. 125 (2): 711–717.

HEIZMANN W (2002) Die Esche als Weltenbaum in der mythischen Überlieferung der Nordgermanen. In: Beiträge zur Esche – Fachtagung zum Baum des Jahres 2001, Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft.

HERMSMEIER D et al. (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta*(Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. Plant Physiol. 125: 683–700.

HEß D (2008) Pflanzenphysiologie: Grundlagen der Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen. 11. Auflage, Ulmer, Stuttgart, S. 56.

KAHL J et al. (2000) Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. Planta 210: 336–342.

KASTNER J (2013) Bonsai ziehen, gestalten und pflegen. Gräfe und Unzer, München, S. 48- 49 ,78-79.

KIJIDANI Y et al. (2014) Variation of indole acetic acid (IAA) amounts in cambial-reagion tissues in 7- and 24-old sugi (*Cryptomeria japonica*) tress. J Wood Sci 60: 177-185.

KIJIDANI Y et al. (2016) Effects of applikation of *trans*-zeatin on trachid differentiation in mature sugi (*Cryptomeria japonica*) trees. J Wood Sci 62: 370-376.

KIPP O (2013) Asiatische Gärten gestalten. Gräfe und Unzer, München, 130 S.

KOWALSKI T (2006) Chalara fraxinea sp. nov. associated with dieback of ash (Fraxinus excelsior) in Poland. In: Forest Pathology. Band 36, Nr. 4.SKI, T. (2006) Chalara fraxinea sp. nov. associated with dieback of ash (Fraxinus excelsior) in Poland. Forest Pathology. Band 36, Nr. 4.

LEE HJ et al. (2017) Adeventious shoot regenration from in vitro leaf explants. Plant Cell Tiss Organ Cult 130: 335-345.

LEPIDOPTEROLOGEN ARBEITSGRUPPE (1997) Pro Natura – Schweizerische Bund für Naturschutz, Schmetterlinge und ihre Lebensräume, Band 2. Verlag CH-8132 Egg, S. 525ff.

MCCLOUD ES, BALDWIN IT (1997) Herbivory and caterpillar regurgitants amplify the wound-induced increases in jasmonic acid but not nicotine in Nicotiana sylvestris. Planta 203: 430–435.

MIETHÖFER A et al. (2005) Effects of feeding Spodoptera littoralis on lima bean leaves. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. Plant Physiology 137.

MITCHELL RJ et al. (2014): The Potential Ecological Impact of Ash Dieback in the UK. Joint Nature Conservation Committee Reports. Nr. 483.

MITRAS D et al. (2009) *In vitro* propagation of *Fraxinus excelsior* L. by epicotyls. J. Biol.. Res.-Thessalon 11: 37-48.

PAN X et al. (2010) Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracs by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Nature Protocols Vol 5 No.6: 986-992.

PEDRAZANI H, VIGLIOCCO A (2017) Evaluation of jasmonic acid and salicylic acid levels in abiotic stress tolerance: Past and present. Mechanisms Behind Phytohormonal Signalling and Crop Abiotic Stress Tolerance. Nova Science Publishers: 329-370.

RASKIN I et al. (1990) Salicylic Acid Levels in Thermogenic and Non-Thermogenic Plants. Annals of Botany 66: 369-373.

SCHITTKO U et al. (2000) Eating the evidence? *Manduca sexta* larvae can not disrupt specific jasmonate induction in *Nicotiana attenuata* by rapid consumption. Planta 210: 343–346.

SCHITTKO U et al. (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: II. Accumulation of plant mRNAs responding to insect-derived cues. Plant Physiol. 125: 701–710.

SCHÖNWEIß K (2005) Etablierung neuer Methoden zur *in vitro* Kultivierung der Baumart *Fraxinus excelsior* L. und Entwicklung von Verfahren zur Kryokonservierung von *in vitro* Sprosspsitzen. Dissertation am Institut für Biologie, Kassel.

SCHRÖDER F (1998) Induzierte chemische Abwehr bei Pflanzen. Angew. Chem. 110, Nr. 9: 1271-1274.

SCHUMACHER J et al. (2007) Erster Nachweis von Chalara fraxinea T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eschen. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. Band 59, Nr. 6.

SCHWAIGER M (2011) Einige Aspekte der in-vitro Vermehrung von Pflanzen. Unter: https://bit.ly/2Ow6WTK (aufgerufen am 18.09.2018)

ULLAH C et al. (2019) Salicylic acid activates poplar defense against the biotrophic rust fungus Melampsora larici-populina via increased biosynthesis of catechin and proanthocyanidins. New Phytologist 221: 960-975. doi: 10.1111/nph.15396

WASTERNACK C, HAUSE B (2014) Blütenduft, Abwehr, Entwicklung: Jasmonsäure – ein universelles Pflanzenhormon. Biologie Unserer Zeit 44: 165-171.

Autoren

FRANZISKA PAST, Dr. BEN BUBNER:
Thünen-Institut für Forstgenetik, Eberswalder Chaussee 3a, 15377 Waldsieversdorf
franziska.past@thuenen.de

Dr. INGA MEWIS
Humboldt-Universität zu Berlin, Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin

THÜNEN

Thünen Report 76
Herausgeber/Redaktionsanschrift

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

www.thuenen.de

ISBN 978-3-86576-209-2
9 783865 762092