



Rotbuchen aus dem Glas

Der Klimawandel bedroht die Rotbuche. Innovative biotechnologische Ansätze können helfen, die Baumart zu erforschen und ihre genetische Diversität zu erhalten. Am Thünen-Institut für Forstgenetik wurden Verfahren zur *In-vitro*-Kultur der Rotbuche entwickelt, um Klone vegetativ zu kultivieren und zu vermehren

TEXT: VIRGINIA ZAHN, FRANKA THIESEN, MATTHIAS FLADUNG, TOBIAS BRÜGMANN

Die Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) steht in Deutschland im Fokus einer Vielzahl von Forschungsprojekten. Die Gründe dafür liegen auf der Hand: Die Rotbuche ist eine der wichtigsten Baumarten in deutschen Wäldern, zugleich aber durch den fortschreitenden Klimawandel sehr stark bedroht. Die Waldzustandserhebung von 2024 hat an 46 % der deutschen Rotbuchen eine deutliche Kronenverlichtung ermittelt [1]. Weitere 36 % der Rotbuchen sind in den Warnstufen mit 15 bis 25 % Entlaubung eingeordnet. Nur 18 % der Rotbuchen zeigen keine Kronenverlichtung. Von Herkunftsversuchen ist bekannt, dass unterschiedliche Rotbuchen-Herkünfte unterschiedlich sensibel auf Umweltbedingungen reagieren [2]. Diese Unterschiede sind, neben anderen Faktoren wie beispielsweise dem Mikrobiom (siehe Infobox), in der genetischen Ausstattung begründet.

Das Wissen um die genetischen Grundlagen, um unterschiedlich auf Umweltbedingungen zu reagieren, kann helfen widerstandsfähigere Buchenbestände zu identifizieren, gezielt zu erhalten und zu vermehren. Moderne biotechnologische Methoden bieten Möglichkeiten, genetische Anpassungsmechanismen besser zu verstehen und gezielt zu untersuchen. Durch die beschriebene Risikolage hat die biotechnologische Forschung an der Rotbuche eine neue Bedeutung erhalten, nachdem das Interesse nach den ersten Studien aus den 1980er und 1990er Jahren abgeklungen war [3, 4]. Als grundlegende biotechnologische Technik gilt die *In-vitro*-Kultur (*in vitro* = im Glas). Hiermit können einzelne Individuen als sogenannte Klone vegetativ kultiviert und vermehrt werden. Die *In-vitro*-Kultur ermöglicht ein breites biotechnologisches Methodenspektrum, darunter die

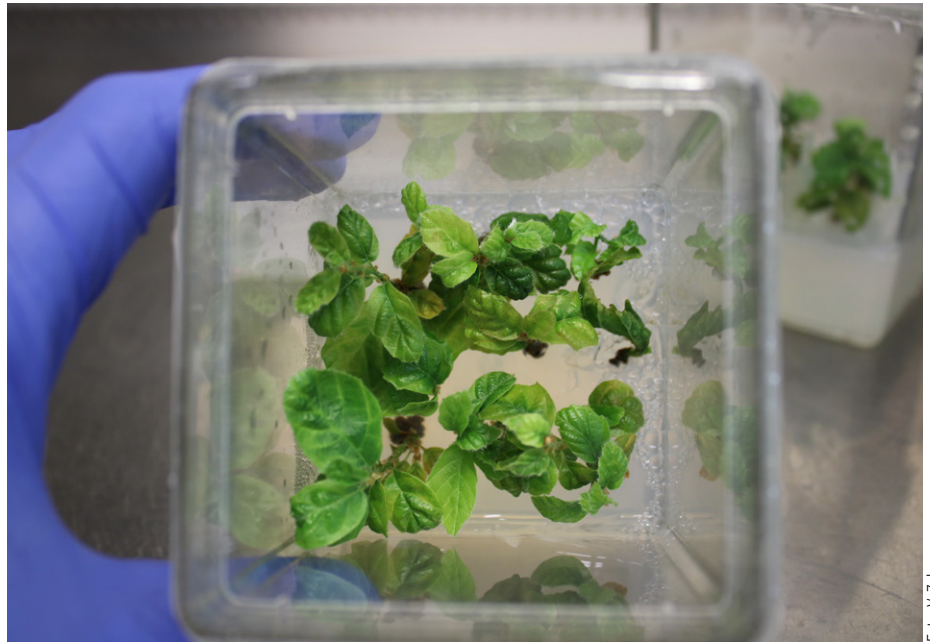


Abb 1: In-Vitro-Rotbuchen aus dem Thünen-Institut für Forstgenetik

genetische Transformation und die Genomeditierung, z. B. mit der Genschere CRISPR/Cas [5, Infobox]. Die Protoplastenisolation erlaubt als besonders ausgefeilte Technik sogar die Untersuchung von Einzelzellen, die enzymatisch aus Gewebe herausgelöst werden. Zudem ist mit einem funktionierenden *In-vitro*-System der Grundstein für eine Langzeitlagerung von Pflanzenmaterial durch Kryokonservierung gelegt. All diese Techniken können der genetischen und physiologischen Untersuchung der Rotbuche und ihrer Fähigkeit, sich an den Klimawandel anzupassen, helfen.

Von der Erde ins Glas

Am Thünen-Institut für Forstgenetik wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem junge Buchen-Keimlinge in die *In-vitro*-Kultur überführt werden können [6]. Bucheckern werden in Erde oder

Tonsubstrat ausgesät und in einem Klimaschrank bei 18-22 °C zur Keimung gebracht. Im Klimaschrank werden Schwankungen der Umweltbedingungen vermieden und das Risiko minimiert, dass die Keimlinge im Freiland oder Gewächshaus übermäßig mit Mikroorganismen verunreinigt werden. Insbesondere mikroskopisch kleine Pilze würden bei der Überführung von Pflanzen in die *In-vitro*-Kultur hinderlich sein.

Nach dem Austrieb der initialen Sprossachse, der Keimblätter und der nachfolgenden Primärblätter wird das sogenannte Epikotyl, also der Sprossbereich über den Keimblättern, abgeschnitten. Zudem werden die Primärblätter vom Spross entfernt (Abb. 2a bis d). Der verbleibende Spross trägt auch ohne die Blätter kleine Wachstumsanlagen an der Sprossspitze, aus denen neue Sprosse und Blätter gebildet werden können. Dieses Explantat wird ste-



Fotos: V. Zahn

Abb 2a: Vorbereitung zur Sämling-Entnahme

Fotos: V. Zahn

Abb 2b: Einsatz in Nährboden

Fotos: V. Zahn

Abb 2c: Umsetzen Woche 4

Fotos: V. Zahn

Abb 2d: Ergebnis Woche 12

rilisiert: Ein Bad mit Spülmittel, dann in 70-prozentigem Alkohol und in 5-prozentigem Natriumhypochlorid sowie eine Antibiotikum-Mischung beseitigen anhaftende Bakterien und Mikropilze.

Anschließend ist das Buchen-Explantat bereit für die In-vitro-Kultur: Unter sterilen Bedingungen wird es in einen gelartigen Nährboden gesteckt. Der Nährboden hat eine speziell auf Bäume abgestimmte Rezeptur: Makronährstoffe wie Stickstoff, Phosphor, Kalium und Magnesium sind darin enthalten; ebenso die in niedrigeren Konzentrationen verwendeten Mikronährstoffe, wie Zink, Bor und Mangan, sowie Vitamine. Einen großen Anteil von 2 % macht Zucker aus, der die jungen Keimlinge mit Energie versorgt. Die Mixtur wird mit Wasser angerührt und mit Agar-Agar, einem pflanzlichen Geliermittel aus Rotalgen, verfestigt. Auf diesem Nährboden werden die Explantate im Kulturschrank bei 18-22 °C für vier Wochen kultiviert. An-

schließend werden die Explantate auf ein Nährmedium überführt, das die pflanzlichen Hormone Benzylaminopurin (BAP) und 1-Naphthyllessigsäure (NAA) enthält, um das Wachstum und die Regeneration der Explantate anzuregen.

Unsere Versuche ergaben Sprossbildungs-raten an den Explantaten zwischen 38 und 94 %. In verschiedenen Ansätzen wurde die Zugabe von pflanzlichen Hormonen (Phytohormonen) ins Kulturmedium getestet. Hierbei kam heraus, dass Medium ohne Phytohormone in den ersten acht Wochen der In-vitro-Kultivierung die Blattbildung an den Sprossspitzen verbessert. Für die Kultivierung über einen längeren Zeitraum und die Sprossvermehrung (multiple Sprossbildung an einem Explantat) werden allerdings Phytohormone benötigt. Für die Langzeitkultivierung wurden zusätzlich Eisen und Magnesium ins Medium gegeben, um das Verblässen der Blätter (Chlorose) zu vermeiden.

In diesem In-vitro-System konnten die kleinen Sprossstecklinge bereits seit über drei Jahren kultiviert und vermehrt werden (Abb. 3). Die vegetative Vermehrung *in vitro* basiert auf der Totipotenz von Pflanzenzellen. Das bedeutet, dass alle Pflanzenzellen (zumindest theoretisch) die genetische Kapazität haben, sich in vollständige Pflanzen und damit verbunden in jeden Gewebetypen zu entwickeln. Alle Pflanzenzellen haben also grundsätzlich ein Regenerationspotenzial, das ähnlich von menschlichen Stammzellen bekannt ist. *In vitro* können demnach Stecklinge, und sogar noch kleinere, als Kallus bezeichnete Zellhaufen, bewurzeln und oberirdisch ihre Sprossachse verlängern. Die neu gebildete Sprossachse kann wiederum als neuer Steckling verwendet und selbst vermehrt werden.

Schneller ÜBERBLICK

- » **Hoher Forschungsbedarf:** 46 % der Rotbuchen zeigen deutliche Kronenverlichtung – genetische Anpassungsmechanismen rücken in den Fokus
- » **In-vitro-Kultur etabliert:** Erfolgreiche Klonvermehrung junger Keimlinge; Sprossbildungs-raten bis 94 %, stabile Kultur über Jahre möglich
- » **Herkunftsabhängige Reaktionen:** 13 von 22 europäischen Herkünften erfolgreich kultivierbar – deutliche Unterschiede in Spross- und Bewurzelungsleistung
- » **Grundlage für Zukunftszüchtung:** *In vitro* ermöglicht CRISPR/Transformation, Kryolagerung und Bioreaktorvermehrung – essenziell für die Auswahl klimastabiler Genotypen

Freund oder Feind?

Kontaminationen mit Mikroorganismen können das Wachstum und die Sprossbildung von Pflanzen im Glas behindern oder gar zu deren Absterben führen. Das übermäßige Wachstum von Bakterien ist deshalb hinderlich für die In-vitro-



Foto: F. Thiesen

Abb. 3: In vitro kultivierte Rotbuchen bei der Vermessung

Kultur, da die Bakterien mit den Pflanzen um Nährstoffe konkurrieren und somit das Pflanzenwachstum behindern, zudem die In-vitro-Pflänzchen unter Stress setzen oder schlicht pathogen wirken können. Durch die Verwendung von Antibiotika konnte das Wachstum von Mikroorganismen aber unterbunden und die Erfolgsquote bei der initialen Sprossbildung von Buchenpflänzchen in der In-vitro-Kultur deutlich erhöht werden.

Allerdings gehören Bakterien als sogenannte Endophyten zum natürlichem Mikrobiom von Pflanzen und haben häufig positive Auswirkungen auf die Pflanzen und deren Wachstum [7]. Selbst den Sterilisierungsprozess überleben Bakterien in den In-vitro-Pflänzchen. Für eine erfolgreiche In-vitro-Kultur ist es wichtig, eine Balance zwischen nützlichen Bakterien innerhalb der Pflanzen und dem Vermeiden von übermäßigem Bakterienwachstum zu finden. Mit einem Wechsel zwischen zuckerhaltigem und zuckerfreiem Medium konnte das Überwachsen mit Bakterien reduziert werden. Ob ein regelmäßiger Wechsel zwischen den Medien notwendig ist und welche Auswirkung zuckerfreies Medium auf das Wachstum der Rotbuchen hat, ist weiterhin zu erforschen.

Überführung der Großen

Während die Etablierung der In-vitro-Kulturen von Keimlingen sehr zuverlässig funktioniert, ist die Kultivierung von erwachsenen Bäumen, die auf Außenflächen wachsen, eine größere Herausforderung. Wissenschaftliche Arbeiten aus den 1990er Jahren berichten, dass dieses Pflanzenmaterial durch die Außeninflüsse stärker mit Mikroorganismen verunreinigt ist. Zudem ist bei sehr alten Bäumen eine reduzierte Wüchsigkeit von *in vitro* überführten Stecklingen

ein bekanntes Problem [3]. Allerdings wurden bislang keine unterschiedlichen Herkünfte der Buche in die Untersuchungen einbezogen.

Daher wurden in einem neuen Überführungsansatz Rotbuchen verschiedener europäischer Herkünfte, die auf der Versuchsfläche „Klimawald Berlin“ (betreut von PD Dr. Manfred Forstreuter, Freie Universität Berlin) wachsen, auf ihre Kultivierbarkeit *in vitro* getestet. Diese Bäume waren zwischen drei und 24 Jahren alt. Im Februar und Mai wurden Zweige geerntet, deren Blätter noch nicht ausgetrieben waren. Die Knospen wurden durch Licht und Wärme zum Austrieb gebracht. Dieser Austrieb geschah in abgeschirmten Kammern, um die Kontamination der Triebe zu reduzieren. Die neu gebildeten Triebe wurden abgeschnitten, sterilisiert und präpariert.

Von insgesamt 22 unterschiedlichen Herkünften aus zwölf Ländern wurden junge Triebe in die In-vitro-Kultur überführt. Nach zwölf Wochen *in vitro* war in 13 Herkünften die Bildung neuer Sprossachsen am Explantat zu beobachten. Innerhalb der einzelnen Herkünfte lag diese Erfolgsrate zwischen drei und 80 % [6]. Der Überführungsversuch ergab, dass Zweige, die im Februar geerntet wurden, weniger Kontaminationen aufwiesen. Hingegen war die Sprossbildung bei den Explantaten, die von im Mai geernteten Zweigen gewonnen wurden, höher. Zudem hatte die ursprüngliche Herkunft der Buchen einen signifikanten Einfluss. Die Versuchspflanzen waren zwischen drei und 24 Jahren alt – also für Buchen noch vergleichsweise jung – sodass für das Alter keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden. Als Herausforderung bleibt allerdings die langfristige Kultivierung dieser alten Explantate: Über einen Zeitraum von zwei Jahren konnte nur ein einziger Klon, eine einzelne polnische Herkunft

„Kontaminationen mit Mikroorganismen können das Wachstum behindern.“

VIRGINIA ZAHN

MIKROBIOM

Das Mikrobiom bezeichnet die Gesamtheit aller Mikroorganismen, die in und auf einem Organismus leben. Bei Bäumen umfasst das Mikrobiom eine Vielzahl von Bakterien, Pilzen und anderen Mikroorganismen, die in der Rhizosphäre (der Umgebung der Wurzeln), auf der Rinde, in den Blättern und im Inneren des Baumes leben. Diese Mikroorganismen spielen eine wichtige Rolle für die Vitalität und das Wachstum des Baumes, indem sie beispielsweise Nährstoffe bereitstellen, Schadstoffe abbauen und Pathogene abwehren. Das Mikrobiom scheint auch mit der Fähigkeit von Bäumen verbunden zu sein, sich an Umweltbedingungen wie den Klimawandel anzupassen. Zahlreiche Forschungsprojekte widmen sich der engen Interaktion zwischen Bäumen und Mikrobiom und der Frage, wie es auch aktiv genutzt werden kann, um Bäume widerstandsfähiger zu machen.

(Oleszyce) mit 14 Jahre alten Bäumen, kultiviert werden. Dies weist auf weiteren Forschungsbedarf hin, da die initiale Kultivierbarkeit von einzelnen Klonen nicht bedeutet, dass diese Kultur nachhaltig beständig ist. Für diese sogenannte Stabilisierung wäre auch die Bewurzelung der Kulturen hilfreich, weil dann Nährstoffe aufgenommen werden, wie es physiologisch vorgesehen ist, und nicht nur durch ungerichtete Diffusion der Nährstoffe aus dem Medium in das Zellgewebe.

An die frische Luft

Die In-vitro-Kultur der Rotbuche stellt zwar ein effektives System zur vegetativen Vermehrung dieser wichtigen Waldbaumart dar, ist jedoch mit erheblichem Arbeits- und Ressourceneinsatz verbunden. Dauerhaft in Kultur gehaltene Pflanzen erfordern eine regelmäßige Pflege: Nährmedien müssen regelmäßig hergestellt, Kulturen umgesetzt und auf Kontaminationen überprüft werden. Da die verwendeten Medienbestandteile wie Mikro- und Makronährstoffe sowie Phytohormone kostenintensiv sind, ist es ökonomisch wie ökologisch sinnvoll, die Pflanzen langfristig in Erde zu kultivieren. Dieser Übergang stellt jedoch eine erhebliche physiologische Her-

TRANSFORMATION UND GENOMEDITIERUNG

Die genetische Transformation ist die Übertragung von ausgesuchter Erbinformation (DNA) in die Zellen von Zielorganismen. Hierdurch können neue Gene in die Erbinformation von Pflanzen eingebaut werden. Die Genomeditierung mittels Genschere, wie CRISPR/Cas, verfolgt in der Forschung zumeist das gegenteilige Ziel, nämlich das Ausschalten ausgewählter Gene. Mit diesen beiden sich ergänzenden Methoden

lassen sich Studien durchführen, um die Funktion von bestimmten Genen in Pflanzen aufzuklären. Die resultierenden Erkenntnisse unterstützen die Grundlagenforschung und können in Züchtungsprozessen berücksichtigt werden. Vor der Verwendung dieser Labortechniken sind artspezifische Anpassungen nötig. Auch für die Rotbuche werden derzeit erste Transformations- und Editierungsstudien durchgeführt.

ausforderung dar. Die Pflanzen müssen Wurzeln entwickeln, die zur Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus festem Substrat befähigt sind. Im ersten Schritt wird daher die Bewurzelung *in vitro* durch Zugabe des Phytohormons Indol-3-Buttersäure (IBA) induziert. In Bewurzelungsversuchen von sechs verschiedenen Klonen wurden durchschnittlich 73,1 % Bewurzelung erzielt. Anschließend wurden die Pflanzen in Substrat überführt und unter kontrollierten Bedingungen schrittweise an eine niedrigere Luftfeuchtigkeit gewöhnt. Diese Akklimatisierung stellt eine besonders sensible Phase dar, in der sorgfältiges Vorgehen entscheidend ist. Erste erfolgreiche Ansätze belegen die prinzipielle Machbarkeit und ein belastbares, standardisiertes Protokoll befindet sich derzeit in vielversprechender Entwicklung.

Upscaling im Bioreaktor

Für systematische Untersuchungen, z. B. zur genetischen Transformation oder Akklimatisierung, werden zahlreiche Individuen (Rameten) pro Klon benötigt. Die Vermehrung in Einzelgefäßen ist dabei äußerst arbeitsintensiv. Abhilfe schaffen temporäre Immersionssysteme (TIS), eine Form von Bioreaktoren, die eine Skalierung der Produktion ermöglichen. In diesen Systemen wachsen die Explantate auf festen Trägern und werden periodisch mit flüssigem Nährmedium überflutet. Dadurch lassen sich im Vergleich zur klassi-

schen Kultur in Gläsern bis zu siebenmal mehr Sprosse pro Gefäß kultivieren. Erste Versuche zeigten zudem eine signifikant erhöhte Vermehrungsrate von bis zu dem Faktor 2,5. Neben der höheren Stückzahl war auch die Qualität der Sprosse verbessert: Längere Internodien und größere Blätter deuten auf eine bessere Nährstoffversorgung hin. Die Etablierung solcher Bioreaktorsysteme ist daher ein vielversprechender Schritt hin zu einer ressourceneffizienten und standardisierbaren Produktion von Pflanzenmaterial für weiterführende molekularbiologische und physiologische Studien.

Grundlage weiterer Forschung

Offensichtlich ist die In-vitro-Kultur ein gutes Werkzeug zur vegetativen Vermehrung von einzelnen Buchenklonen, was bei dieser Baumart mit Steckholzvermehrung nicht effizient funktioniert. Somit können besonders interessante Klone, die z. B. besonders widerstandsfähig oder wüchsig sind, vermehrt werden. Sollen solche Pflanzen als forstliches Vermehrungsgut verwendet werden, ist es notwendig eine große Anzahl unterschiedlicher Klone *in vitro* kultivieren zu können, um keine Klonplantagen zu errichten. Die vorgestellten Ergebnisse und weitere Optimierungsarbeiten unterstützen die Kultivierbarkeit unterschiedlicher Klone.

Die beschriebenen Versuche zur In-vitro-Kultivierung von Rotbuchen bedingen weitere Forschungsarbeiten. Für die molekularbiologische Grundlagenforschung sind gentechnische Veränderungen ein probates Mittel zur Charakterisierung von Genen und ihrer Funktion. So können beispielsweise per CRISPR/

Cas Gene ausgeschaltet oder durch künstliche, konstitutive Expression in ihrer Ausprägung gesteigert werden [5]. Die Funktion von Genen lässt sich dann ermitteln, indem die veränderten mit unveränderten Pflanzen im Labor oder im Gewächshaus verglichen werden, beispielsweise unter Trockenstress [8]. Zusammen mit genomischen Informationen, also der Entschlüsselung der Gesamt-Erbinformation der Rotbuchen, entsteht damit Grundlagenwissen über die Stressreaktion von Rotbuchen. Anhand solcher Informationen sollen sich zukünftig Bäume identifizieren lassen, die beispielsweise für Trockenheit besser gewappnet sind.

Abschlussinformation

Die Forschungsarbeiten wurden im Projekt TreeEdit (2219NR359) und BucheTIG (2219WK60A4) durchgeführt, gefördert vom Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat via der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR). Für die Bereitstellung von Probenmaterial danken die Autoren Dr. M. Forstreuter (Freie Universität Berlin), Dr. M. Liesebach (Thünen-Institut für Forstgenetik), Dagmar Schneck (Landesstelle für forstliches Vermehrungsgut Brandenburg), Ute Tröber (Staatsbetrieb Sachsenforst) und Prof. Pawel Chmielarz (Institute of Dendrology PAS, Kórnik, Polen).



Virginia Zahn

virginia.zahn@thuenen.de

ist Doktorandin am Thünen-Institut für Forstgenetik in Großhansdorf. Sie forscht in der Nachwuchsgruppe „Genetische Technologien“, die von **Dr. Tobias Brüggmann** geleitet wird. **Franka Thiesen** ist wissenschaftliche Mitarbeiterin im Thünen-Institut für Forstgenetik in Waldsiedersdorf. **Dr. Matthias Fladung** leitete bis Mai 2024 den Arbeitsbereich „Genomforschung“.

Literaturhinweise:

Download des Literaturverzeichnisses unter www.forstpraxis.de/downloads