

Ulmen durch Kryokonservierung und In-vitro-Vermehrung gerettet

Bedrohte Baumart zwingt Forstgenbank NRW zu ungewöhnlichen Maßnahmen

Die Globalisierung mag für das moderne Wirtschafts- und Gesellschaftsleben viele Vorteile haben, für manche Baumarten bedeutet sie das Todesurteil. Durch schnelle Schiffe und noch mehr durch den Flugverkehr rückten die Kontinente zusammen, und plötzlich kommen fremde Arten in die Ökosysteme der Alten und Neuen Welt – teilweise mit verheerenden Folgen. In Amerika sind ganze Baumarten durch aus Europa eingeschleppte Schädlinge ausgerottet worden und vor demselben Schicksal stehen die europäischen Ulmen. Das sogenannte Ulmensterben bedroht unsere drei heimischen Ulmenarten, vor allem die Feldulme und die Bergulme, etwas weniger die Flatterulme. Berg- und Feldulme stehen am Rande des Aussterbens. Verursacht wird das Ulmensterben durch die Pilze *Ophiostoma ulmi* und *Ophiostoma novo-ulmi*, die durch die drei Ulmensplintkäferarten *Scolytus scolytus*, *Scolytus laevis* und *scolytus multistriatus* verbreitet werden. Die Pilze verschließen die Gefäße des infizierten Baumes und bringen ihn zum Absterben.



Abgestorbene Bergulmen im Stadtwald Werdohl.
Foto: E. Hübner-Tennhoff

1920 ganz Europa in mehreren Wellen überzog und die dort heimischen Ulmen an den Rand ihrer Existenz brachte.

Für die Forstgenbank ist das Ulmensterben eine ganz besondere Herausforderung. Es muss gelingen, die genetische Information möglichst vieler Ulmenindividuen zu sichern, bevor die letzten Ulmen von der rapide fortschreitenden Krankheit erfasst werden. Sonst sind die europäischen Ulmenarten unwiederbringlich verloren.

Die klassischen Rezepte der Generhaltung, die bei den übrigen Baum- und Straucharten mit Erfolg angewandt werden, stoßen hier an ihre Grenzen:

- Die Langzeitlagerung von Ulmensaatgut scheidet aus, da Ulmensaatgut nur sehr begrenzt lagerfähig ist.

- Die Anzucht von Ulmen und ihre Ausbringung in bisher von der Ulmenkrankheit verschonte Gebiete kann ein Weg sein. Aber die Gefahr, dass isoliert angebrachte Anpflanzungen doch irgendwann vom Ulmensplintkäfer gefunden werden, ist groß – ebenso groß ist die Gefahr, dass man durch solche Anpflanzungen Trittsteine schafft, über die der Krankheit isoliert gelegene und bisher noch gesunde Vorkommen erschlossen werden.

- In Samenplantagen können viele Ulmenindividuen gesichert werden, und es kann dort kontinuierlich hochwertiges Saatgut erzeugt werden. Aber auch über solchen Plantagen hängt das Damoklesschwert der tückischen Krankheit, die unberechenbar und unheilbar zugleich ist.

Alle Bemühungen, dem Ulmensterben zum Trotz den Anbau der Ulme zu forcieren, werden mit Nachdruck weitergeführt und nach Möglichkeit intensiviert, aber dennoch darf man nicht die Augen vor der Gefahr verschließen, dass wir den Wettlauf mit der Krankheit verlieren könnten.

Konservierungsverfahren

Ein einziges Verfahren bietet zur Zeit die Möglichkeit, die genetische Information von Ulmen dauerhaft zu konservieren und zugleich dem Zugriff der Krankheit zu entziehen – die Kryokonservierung mit der anschließenden In-vitro-Vermehrung (Gewerbekultur). Bei der Kryokonservierung werden kleine Pflanzenteile bei -196 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, wo sie praktisch unbegrenzt lagerfähig sind. Mit Hilfe der In-vitro-Vermehrung können aus

Durch die fehlende Ko-Evolution waren die europäischen Ulmenarten an die – vermutlich aus Asien – eingeschleppten Schädlinge nicht angepasst. Eine ganz normale Krankheit wurde unter den Bedingungen der anderen Ökosysteme zu einer Seuche, die seit etwa

Art	FA	FBB	Forstort	Eigentümer	Individuenzahl	Beerntungs-jahr
Feldulme	Arnsberg	Stemel	Melschede	Fhr. v. Wrede	4 (16)	2000
Feldulme	Arnsberg	Niedereimer	Niedereimer	Privatbesitz	1 (1)	2000/2001
Feldulme	Rüthen	Günne	Lüttringen	Gemeinde Ense	5 (10)	2001
Feldulme	Arnsberg	Neheim	Neheim	Land NRW	1 (1)	2001
Feldulme	Münster	Geisterholz	Welver	Land NRW	2 (2)	2000
Feldulme	Rüthen	Günne	Günne	unbekannt	1 (1)	2001
Feldulme	Rüthen	Lippetal	Soest, Meckingsen	Stadt Soest	5 (8)	2001
Feldulme	Rüthen	Lippetal	Soest (Soestbach)	Stadt Soest	3 (8)	2000/2001
Bergulme	Arnsberg	Uentrop	Oeventrop	Kath. Kirche	1 (1)	2001
Bergulme	Arnsberg	Uentrop	Samenplantage	FA Arnsberg	11 (168)	2000
Bergulme	Attendorf	Schönholthausen	Lenhausen	Graf Plettenberg	1 (1)	2001
Bergulme	Lüdenscheid	Werdohl	Werdohl (NSG)	Stadt Werdohl	4 (6)	2000
Bergulme	Lüdenscheid	Balve	Balve	Glasmacher	1 (1)	2000
Bergulme	Lüdenscheid	Balve	Balve	Graf Landsberg-Velen	15 (50)	2000/2001
Bergulme	Lüdenscheid	Mellen	Mellen	Stadt Balve	2 (2)	2001
Bergulme	Münster	Lüdinghausen	Kabrede	Stiftung Arenberg	1 (2)	2001
Bergulme	Olsberg	Marsberg	Leitmarer Felsen (NSG)	Stadtwald	11 (11)	2000
Bergulme	Olpe	Kirchhundem	Kirchhundem	Grunewald	3 (8)	2001
Bergulme	Paderborn	Altbödden	Ahden	Stadt Büren	1 (1)	2001
Bergulme	Rüthen	Warstein	Hirschberg	Privatbesitz	2 (2)	2002
Flatterulme	Münster	Lüdinghausen	Westerholt	Stiftung Arenberg	2 (10)	2001

Die Individuenzahlen können nur ungefähre Angaben sein, da das Ulmensterben (ausgelöst durch die Pilze *Ophiostoma ulmi* und *Ophiostoma novo-ulmi*) sehr schnell zum Absterben der Bäume führen kann. Bei der Spalte „Individuenzahl“ werden die bisher für die In-vitro-Versuche beernteten Bäume aufgeführt.

Die Zahlen in Klammern geben die „Individuenzahl“ am Standort insgesamt an.

Tabelle 1: Beerntung von Knospen und Saatgut für In-vitro-Kulturversuche zur Generhaltung einheimischer Feld-, Berg- und Flatterulmen aus der Soester Börde, dem Münsterland und dem Sauerland.

solchen Pflanzenteilen jederzeit wieder Pflanzen angezogen werden – theoretisch in unbegrenzter Menge.

Dieses Verfahren ist gegenwärtig noch außerordentlich mühsam. Aber angesichts seiner immensen Bedeutung für die Erhaltung und langfristige Sicherung der heimischen Ulmenarten hat sich die Forstgenbank NRW die Aufgabe gestellt, die Kryokonservierung der Ulme in Verbindung mit der In-vitro-Vermehrung bis zur Praxisreife zu entwickeln und auch konkret zur Generhaltung bei bedrohten nordrhein-westfälischen Ulmenvorkommen anzuwenden.

In-vitro-Vermehrung

Jede pflanzliche Zelle besitzt die Fähigkeit, sich wieder zu einer vollständigen Pflanze mit all ihren verschiedenen Geweben zu entwickeln. Diese sogenannte Totipotenz der pflanzlichen Zelle ist die Grundlage für die pflanzliche Gewebekultur. Hierzu benutzt man winzige Pflanzenteile, wie zum Beispiel Sprosse, meristematisches Gewebe, unreifes Saatgut oder Antheren. Diese Pflanzenteile entnimmt man der Pflanze unter sterilen Be-

dingungen, um sie in einem künstlichen Nährmedium zur Bildung einer neuen intakten Pflanze anzuregen. Diese Nährmedien setzen sich zusammen aus Salzen, Nährstoffen, Vitaminen und Pflanzenwachstumsstoffen, die in Wasser gelöst und durch Erhitzen mit Agar verfestigt und sterilisiert werden. Bei der Gewebekultur der Ulmen werden in der Forstgenbank Knospen und unreifes Saatgut verwendet.

Ernte der Knospen

Von Januar bis Mitte März der Jahre 2000 und 2001 wurden Reiser von 31 Feldulmen (8 Herkünfte), 24 Bergulmen (11 Herkünfte) und 5 Flatterulmen (1 Herkunft) gewonnen. Bei der Reiserengewinnung wurde möglichst unverholztes, gesundes Material mit geschlossenen Knospen ausgewählt.

Ernte des Saatgutes

Jeweils im Mai der beiden zurückliegenden Jahre konnte unreifes Saatgut von 27 Bergulmen (7 Herkünfte) geerntet werden, obwohl es bei den Bergulmen große Unterschiede in der Fruktifikation gab und nicht alle Bäume beerntet werden konnten.

Die besichtigten Feld- und Flatterulmen fruktifizierten nur unzureichend oder gar nicht und konnten somit in den weiteren Versuch nicht einbezogen werden.

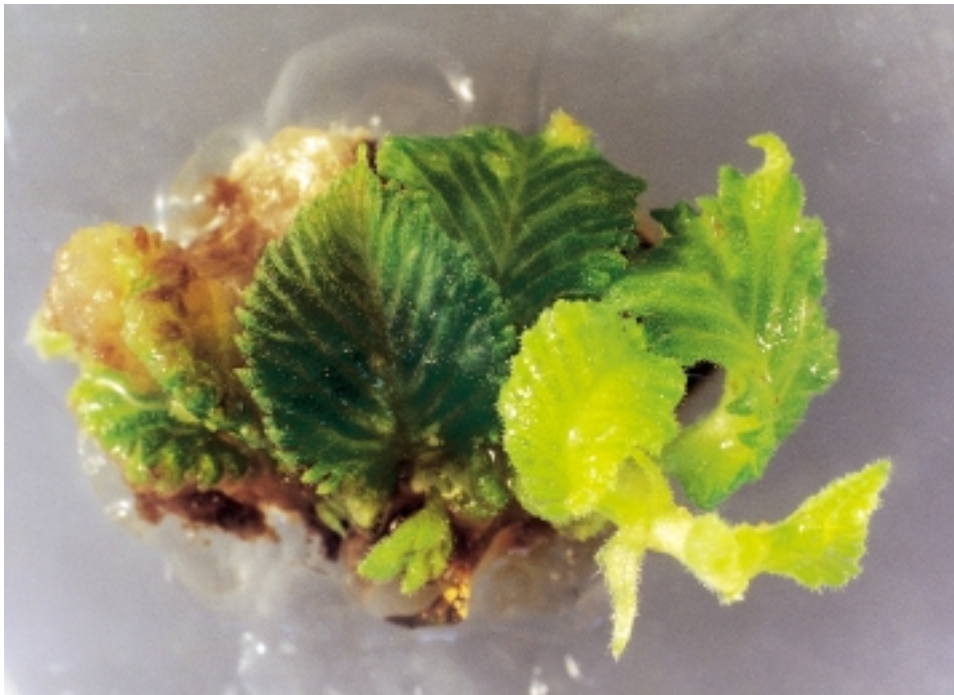
Verwendung von Knospen

Die Ulmenreiser wurden in 1 cm lange Segmente geschnitten und in einer Alkohol- und Hypochloridlösung sterilisiert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Rinde und die Knospenschuppen unter einer Stereolupe entfernt. Die freipräparierten Knospen wurden keilförmig aus dem Reiserstück heraus getrennt und auf Nährmedium aufgelegt. Diesem Nährmedium wurde ein Wachstumsstoff (6-Benzylaminopurin) zugesetzt, um eine Pflanzenneubildung anzuregen. Als Kulturgefäße dienten Petrischalen und Weckgläser. Die Kultivierung der Knospen fand in einem Kulturraum bei einer Temperatur von 25 °C und einer Lichtperiode von 16 Stunden am Tag statt. Knospen von 43 Ulmen wurden in dieser Versuchsreihe verwendet. Nach 15 bis 29 Tagen konnte bei den Knospen aller drei Ulmenarten Sprossbildung und/oder Bildung von grünem Wundgewebe (Kallus) beobachtet werden. Die An-



Feldulmenknospe in Winterruhe.

Foto: J. Heyder



Nach Kryokonservierung *in vitro* ausgetriebene Knospe.

Foto: K. Müller

wachsraten der einzelnen Arten variierten von 56,2 Prozent (Feldulme), 48,6 Prozent (Bergulme) bis 40,0 Prozent (Flatterulme). Die Sprosse, die sich entwickelt haben, wurden von der Knospe abgetrennt, auf ein Multiplikationsmedium transferiert und weiter kultiviert. Nach weiteren zwei bis vier Wochen wurden die Axillar- beziehungsweise Adventivsprosse vom Kallus abgetrennt, in 15 mm lange Segmente geteilt und wiederum auf das Multiplikationsmedium gesteckt. Durch Wiederholen dieser Vermehrungsintervalle konnte eine

hohe Anzahl von Ulmenstecklingen produziert werden.

Ulmensprosskulturen sind sehr empfindlich und anspruchsvoll. Auffallend viele Klone lassen sich nicht länger als sechs Monate kultivieren. Dieses Phänomen wurde auch in anderen forstlichen Gewebekultur Laboren beobachtet. Besonders die Kultivierung von Berg- und Flatterulme über Knospen erweist sich als sehr schwierig. Dagegen sind die vier aus Knospen etablierten Feldulmenklone bis heute stabil und konnten durch Teilung von Sprossseg-

menten und Überführung auf Multiplikationsmedium vermehrt werden. Insgesamt liegen 756 Feldulmenmikrostecklinge zur Generhaltung vor.

Verwendung unreifen Saatguts

Bei der Kultivierung von Samen ist es wichtig, sich zu verdeutlichen, dass sich alle Samen eines Mutterbaumes genetisch voneinander unterscheiden, da sie durch Befruchtung entstanden sind. Insofern ist jeder Same eines Baumes ein Klon für sich, während alle Knospen eines Baumes genetisch identisch sind und einen einzigen Klon darstellen.

Durch manuelles Aussortieren hohler, unterentwickelter und von Insekten befallener Samen wurde eine Verbesserung der Saatgutqualität erreicht. Der Vollkornanteil lag durchschnittlich bei 23,6 Prozent.

Das selektierte Ulmensaatgut wurde durch einmaliges Waschen in Alkohol sterilisiert. Danach wurde dem Saatgut die äußere Samenhülle und die grünliche Samenschale unter aseptischen Bedingungen unter der Stereolupe entfernt. Anschließend wurden die Samen auf ein Nährmedium unter Zugabe eines Pflanzenwuchsstoffes aufgelegt. 239 Ulmensamen wurden auf diese Weise präpariert und im Kulturraum kultiviert.

Nach vier Wochen fand bei einem Teil der Embryonen eine *in vitro*-Keimung statt. Bei dem anderen Teil der Embryonen kam es nicht zur Keimung, sondern zu einer Kallusbildung. Nach dem Durchlaufen dieser Kallusphase entwickelte sich erst nach vier bis zwölf Monaten aus kleinen Strukturen eine Vielzahl von jungen Sprossen. Diese Reaktionen konnten bei 48,1 Prozent der *in vitro* aufgelegten Samen beobachtet werden. Diese 48,1 Prozent stellen einen sehr guten Wert dar, da unter natürlichen Bedingungen auch nicht alle Samen keimen würden und sich zudem nicht jedes Individuum für die Gewebekultur eignet.

Aus diesem Material wurden Mikrostecklinge produziert und zwar durch Multiplikationsverfahren, wie bereits im Abschnitt über die Knospen beschrieben wurde. Es konnten 1530 Mikrostecklinge produziert werden. Obwohl die Ulmensprosskultur insgesamt problematisch ist, konnten 20 stabile Klone bei der Bergulme etabliert werden.

Bewurzelung

Zur Erzeugung von Pflanzen müssen die Mikrostecklinge bewurzelt und dann im Gewächshaus langsam an die Bedingungen akklimatisiert werden, die außerhalb des Gewebekultur Labors herrschen. Das Bewurzeln erfolgt auf einem Bewurzelungsnährmedium, dem als Wuchsstoff Indolbuttersäure zugesetzt wurde.

Insgesamt wurden 2326 Mikrostecklinge von zwei Feldulmen und drei Bergulmenklonen auf Bewurzelungsmedium gesteckt. Die nach zwei bis vier Wochen bewurzelten Pflänzchen wurden im Gewächshaus in ein Gemisch aus Pikier- und Topferde pikiert und unter einem Folientunnel bei hoher Feuchte, die nach und nach gesenkt wurde, langsam akklimatisiert.

Es fielen starke klonweise Unterschiede bei der Bewurzelung auf. Die Bewurzelungsrate variierte von 11 bis 100 Prozent. Auch bei der Überlebensfähigkeit gibt es sehr große klonabhängige Unterschiede. Versuchsweise wurden auch unbewurzelte Ulmenstecklinge pikiert, was bei einem Klon zu sehr guten Ergebnissen führte.

Zur Zeit befinden sich im Gewächshaus 695 Pflanzen zur Akklimatisierung und weiteren Anzucht, von denen ein Teil bereits eine forstübliche Größensortierung erreicht hat.



Langzeitlagerung von Ulmengewebe im Kryobehälter.

Foto: J. Heyder

Kryokonservierung

Unter Kryokonservierung versteht man die Lagerung von Geweben oder Zellen bei Tiefsttemperaturen. Diese Bedingungen, bei denen das Material nahezu unbegrenzt eingefroren bleiben kann, erreicht man bei einer Lagerung in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Für die Spross-Spitzenkultur wurden, wie oben erwähnt, Knospen in Winterruhe geerntet. Dieses Material eignet sich auch zum Einlagern in Flüssigstickstoff. Man geht folgendermaßen vor: Die frisch geernteten Zweige werden in kleine Segmente mit je einer Knospe geschnitten, diese werden in speziell für die Kryokonservie-

rung geeignete Probenröhrchen gefüllt. Von jedem beernteten Baum wurden möglichst fünf Probenröhrchen mit jeweils bis zu zehn Knospen befüllt. Dann werden die Proben schrittweise von $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ herunter gekühlt. Das vorsichtige Herunterkühlen der Proben ist unbedingt notwendig, da lebende Zellen einen Wassergehalt von 70 bis 80 Prozent haben und beim schnellen Herunterkühlen intrazelluläre Eiskristalle gebildet würden, die die Zellen regelrecht aufplatzen lassen und damit zerstören würden. Bei niedrigen Abkühlgeschwindigkeiten werden die Zellen

entwässert, sodass sich das Eis vorwiegend in den Zellzwischenräumen bildet. Dadurch wird die Zerstörung der Zellen vermieden. Nach Überwindung dieser kritischen Kristallbildungsphase wird das Material direkt in dem Behälter mit dem flüssigen Stickstoff eingelagert.

Es konnte so ein „Genpool“ von 28 Feldulmen (7 Herkünfte), 5 Flatterulmen (1 Herkunft) und 19 Bergulmen (6 Herkünfte) mit insgesamt 2100 Knospen langzeitgelagert werden. Die Probenröhrchen der einzelnen Klone sind in einer Datenbank erfasst und man kann so eine bestimmte Probe zu jeder Zeit im Behälter genau lokalisieren.

Ein Teil der Proben wurde wieder aufgetaut, um die Regenerierbarkeit der gelagerten Knospen *in vitro* zu testen. Es stellt sich ja die Frage, ob die meristematischen Zellen der Knospen den Einfriervorgang auch wirklich überlebt haben und ob sie nun auf Nährmedium genauso zum Wachstum angeregt werden können wie die Knospen, die nicht zuvor kryokonserviert wurden. Das Auftauen des Materials erfolgt am besten bei Raumtemperatur und dauert etwa 20 Minuten. Anschließend werden die Knospen genau wie frisches Material behandelt, also Sterilisation, Präparation und Aufbringen auf das Nährmedium. Von den bisher aufgetauten Proben trieben die meisten nach kurzer Zeit aus (siehe Abb. 1) und es bildeten sich Sprosse, die in Zukunft nach den Methoden der Spross-Spitzenkultur hochvermehrt und bewurzelt werden sollen.

Neben den Knospen wurden auch Versuche zur Stickstoffeinlagerung von Saatgut von elf Bergulmen durchgeführt. Samen von insgesamt 65 Proben wurden erst ste-



Ulme auf Nährmedium im Kulturgefäß.

Foto: E. Hübner-Tennhoff

Zusammenfassung

Die heimischen Ulmenarten sind un-mittelbar vom Aussterben bedroht. Deshalb ist die Sicherung der genetischen Information noch vorhandener Ulmen-vorkommen eine der vordringlichsten Aufgaben der Forstgenbank NRW.

Die Kryokonservierung in Verbindung mit der In-vitro-Vermehrung ist das einzige derzeit anwendbare Mittel, Ulmen langfristig aufzubewahren und gleichzeitig vor der Infektionsgefahr durch den Ulmensplintkäfer und die Pilze *Ophiostoma ulmi* und *Ophiostoma novo-ulmi* zu sichern.

Daher werden die Verfahren der Kryokonservierung und der in vitro-Vermehrung in der Forstgenbank NRW an die Bedingungen der Baumart Ulme adaptiert, weiter entwickelt und angewandt.

Durch die Wahl unterschiedlicher Ausgangsmaterialien ist es gelungen, Feld- und Bergulmenklone in-vitro zu etablieren. Die Feldulmenklone wurden aus Knospen etabliert, was bei den Berg- und Flatterulmen, die getestet wurden, problematisch erscheint. Für die Etablierung der Bergulme in vitro hat sich bisher die Kultivierung von Saatgut als geeignete Methode erwiesen.

Die vorhandenen Mikrostecklinge aus diesen beiden „Produktionszweigen“ sollen zum einen in weitere Bewurzelungs- und Akklimatisierungsversuche einfließen. Zum anderen werden diese Mikrostecklinge im Nährmedium bei einer Temperatur von etwa 6 °C mittelfristig kühl gelagert und stellen damit eine Stammhaltung dar, auf die man bei Bedarf zurückgreifen kann.

Mit den produzierten Pflanzen aus Gewebekultur werden Anpflanzungen im Wald und in der freien Landschaft durchgeführt, wobei die spezielle Gefährdung der Ulme durch das Ulmensterben berücksichtigt wird.

Die Lagerung von Gewebeteilen bedrohter Ulmen aus Vorkommen in Nordrhein-Westfalen wird in größerem Umfang durchgeführt und angesichts der bisherigen Erfahrungen künftig intensiviert. Denn die Auftauversuche der kryogelagerten Knospen führten zu vielversprechenden Ergebnissen. Es zeichnet sich ab, dass die Dauerkultur bei einer größeren Anzahl von Klonen möglich sein wird.

Die hier geschilderten Verfahren sind aufwendig. Wegen der außergewöhnlichen Gefährdung der Ulme ist dieser Aufwand jedoch gerechtfertigt. Damit ist die Kryokonservierung eine besonders geeignete Erhaltungsmaßnahme für die heimischen Ulmenarten.



In vitro produzierte Bergulme.

Foto: J. Heyder

rilisiert und etwas herunter getrocknet, bevor sie in einer Gefrierschutzlösung in $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Schritten von $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Einsatz eines Einfrierautomaten herunter gekühlt und in den flüssigen Stickstoff getaucht wurden. Bei Versuchen zur Regeneration dieses Materials konnte bisher nur eine Kallusbildung induziert werden.

Literatur

- FRANKE, A. (2001): Ulmensterben ohne Ende? Deutsche Baumschule 3/2001, 46–48.
- FRANKE, A., BOHNENS, J., MEIER-DINKEL, A. & WOLF, H. (1998): Ulmen-Generhaltung in Europa. AFZ / Der Wald 53 (5), 232–233.
- JÖRGENSEN, J. (1990): Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species. J. Plant Physiol. Vol. 136, 373–376.
- KADOLSKY, M., FRÜHWACHT-WILMS, U., GEBHARDT, K. (2000): Kryokonservierung von Wildbirne und Wildapfel, Tagungsabstract IAPTC Tagung, Bonn, Oktober 2000.
- KARNOSKY, D. F. & MICKLER, R. A. (1984): Propagation and preservation of elms via tissue culture systems. In: DURYEA, M. L. and BROWN, G. N. (Hrsg.): Seedling physiology and reforestation success, 29–36. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, London.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.

RÖHRIG, E. (1996): Die Ulmen in Europa. Ökologie und epidemische Erkrankungen. *Forstarchiv* 67, 179–198.

ULRICH, J. M., MICKLER R. A., FINKLE, B. J. & KARNOSKY, D. F. (1984): Survival and regeneration of American elm callus cultures after being frozen in liquid nitrogen. *Can. J. For. Res.* 14, 750–753.

Anschrift des Verfassers und der Verfasserinnen

Karin Müller
Elke Hübner-Tennhoff
Dr. Joachim Heyder
LÖBF NRW
Dezernat: Ökologischer Waldbau
und Forstgenetik
Obereimer 2 a
59821 Arnsberg
Tel.: 0 29 31/52 43-0
Fax: 0 29 31/52 43-20
E-Mail: dez41-labor@loebf.nrw.de