

Untersuchung zur Anpassung verschiedener  
Populationen von *Quercus robur* L. und *Tilia  
cordata* Mill. anhand physiologischer und  
biochemischer Reaktionen auf Frost und  
Trockenheit

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Gartenbauwissenschaften (Dr. rer. hort.)

genehmigte Dissertation

von

Malte Selig, M. Sc.

2020

Referentin: Prof. Dr. rer. hort. Heike Bohne

Koreferentin: Prof. Dr. rer. hort. Traud Winkelmann

Tag der Promotion: 28.02.2020

## **Für H<sup>2</sup>**

Wer in große Fußstapfen treten will, sollte nicht vergessen auch eigene Wege zu gehen.

---

## Zusammenfassung

Die Verbreitungsgebiete von Baumarten überspannen große geographische Areale mit sehr unterschiedlichen Umweltbedingungen. Es wird angenommen, dass diese unterschiedlichen Umweltbedingungen, insbesondere Frost- und Trockenstressereignisse, zur Ausbildung lokal angepasster Populationen innerhalb einer Baumart geführt haben. Diese weisen eine größere Fitness am Herkunftsstandort auf als gebietsfremde Populationen. Um dieser Annahme Rechnung zu tragen und die genetische Struktur der Baumpopulationen in Deutschland zu schützen, wurde das Bundesnaturschutzgesetz 2010 novelliert und im „Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze“ wurden 6 artenunspezifische Vorkommensgebiete für die Verwendung gebietseigenen Pflanzenmaterials in der freien Natur ausgewiesen. Ab dem 1. März 2020 steht die Ausbringung von Pflanzenmaterial außerhalb seines eigenen Vorkommensgebiets unter Genehmigungspflicht. Allerdings ist das Wissen über die genetische Struktur vieler Baumarten in Deutschland noch lückenhaft. Die vorliegende Arbeit soll grundlegende wissenschaftliche Informationen über mögliche Unterschiede in der lokalen Anpassung von Populationen von *Quercus robur* und *Tilia cordata* an Frost- und Trockenstress liefern. Hierzu wurden unter kontrollierten Bedingung Frühfrost-, Spätfrost-, und Trockenstressversuche mit 2-jährigen Sämlingen aus jeweils 3 verschiedenen Populationen beider Baumarten durchgeführt. Um einen größeren geographischen Rahmen abzudecken, wurde bei der Stieleiche zudem eine ungarische Population einbezogen. Neben physiologischen und biochemischen Parametern der Stressantwort wurden auch phänologische Parameter (Zeitpunkt von Triebabschluss und Austrieb) bestimmt. Es konnten nur vereinzelt schwach signifikante Unterschiede in diesen Parametern zwischen den Populationen gefunden werden, insbesondere bei der Betrachtung der deutschen Populationen. Zudem war es nur in einem Fall möglich diese Unterschiede auf die lokalen Umweltbedingungen am Herkunftsstandort zurückzuführen. Mögliche Gründe hierfür könnten die geringen Unterschiede in den Umweltbedingungen an den Herkunftsstandorten der Populationen, sowie Eigenschaften (hoher Genfluss, hohe phänotypische Plastizität, phylogeographische Geschichte) der verwendeten Baumarten sein. Die vom BNatSchG §40 angenommenen Unterschiede in der Ausbildung von Anpassungen an lokale Umweltbedingungen, welche durch die Vorkommensgebiete abgebildet werden können, konnte in dieser Studie demnach nicht bestätigt werden. Die sehr strikten und generellen Regelungen des BNatSchG §40 sollten dahin gehend geändert werden, um unnötige Kosten für die Produktion und die Bereitstellung gebietseigenen Pflanzenmaterials zu vermeiden und die Versorgung mit geeignetem Pflanzenmaterial zu gewährleisten.

**Schlagworte:** *Quercus robur*, *Tilia cordata*, Frost, Trockenheit, Population, Vorkommensgebiete, Bundesnaturschutzgesetz

## Abstract

Distribution areas of tree species in Europe cover large geographical ranges with various environmental conditions. It is assumed that these various conditions, particularly frost and drought stress events, formed local adapted populations within a species. These local adapted populations are again assumed to show higher fitness at the site of origin compared to non-local populations. To prevent loss of genetic structure of tree populations in Germany the German government amended the Federal Nature Conservation Act (BNatSchG) in 2010 and for the use of plants in free nature six species unspecific defined areas of origin have been arranged. The transfer of propagation material between them is forbidden from 1<sup>st</sup> March 2020. However, the grade of local adaptation in populations of woody species in Germany is not clearly demonstrated. The aim of this study was to investigate possible differences in the response between populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* to frost and drought stress. Therefore early and late frost stress as well as drought stress experiments were conducted under controlled conditions with plants (2-year old seedlings) of three different populations of each target tree species. To cover a bigger geographical range one Hungarian population of pedunculate oak was included. Physiological and biochemical parameters as well as phenological parameters (but set and bud break) were determined. Over all, only weakly significant differences in these parameters between populations could be pointed out. Furthermore, just in one case a correlation between these differences and the environmental conditions at the site of origin existed. Small differences in the environmental conditions between the population's sites of origin as well as species-specific life history traits (high gene flow, high phenotypic plasticity, phylogeographical history) of the investigated tree species could be the reasons. Regarding frost and drought stress response, local adaptations of German tree populations seem not to be as distinctive as the defined areas of origin assume. Taken this into account, the strong and general restrictions of BNatSchG §40 should be reconsidered to avoid unnecessary costs for production of local plant material and ensure supply of suitable local plant material.

**Keywords:** *Quercus robur*, *Tilia cordata*, frost, drought, population, areas of origin, Federal Nature Conservation Act

---

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	ii
Abstract .....	iii
Inhaltsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis .....	vi
Tabellenverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis .....	x
Danksagung.....	xiii
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Verbreitungsgebiete von Baumarten und Anpassung an Umweltbedingungen .....	1
1.2 Frost.....	3
1.2.1 Prozess der Abhärtung.....	3
1.2.2 Frosttoleranz .....	4
1.3 Trockenheit.....	6
1.3.1 Vermeidung und Toleranz von Trockenstress.....	6
1.4 Verwendung von gebietseigenen Gehölzen in Deutschland .....	7
1.5 Ziel der Arbeit .....	10
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
2.1 Experimentelles Design.....	11
2.2 Übersicht über die verwendeten Populationen .....	12
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>13</b>
3.1 Publikation I: “Early frost reactions of different populations of <i>Quercus robur</i> L. and <i>Tilia cordata</i> Mill. in Germany” .....	13
3.2 Publikation II: “Late frost reactions of different populations of <i>Quercus robur</i> L. and <i>Tilia cordata</i> Mill. in Germany” .....	35
3.3 Publikation III: “Drought stress reactions of different populations of <i>Quercus robur</i> L. and <i>Tilia cordata</i> Mill.” .....	55
<b>4 Allgemeine Diskussion .....</b>	<b>73</b>

---

4.1	Beurteilung der geringen Unterschiede in der Stressantwort zwischen den verwendeten Populationen .....	73
4.2	Beurteilung der Ergebnisse vor dem Hintergrund des Klimawandels .....	77
4.3	Beurteilung der Ergebnisse aus naturschutzfachlicher Sicht .....	80
<b>5</b>	<b>Fazit</b> .....	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>95</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Forstliche Herkunftsgebiete von <i>Tilia cordata</i> MILL. nach FoVHgV 1994.....	8
<b>Abbildung 2:</b> Forstliche Herkunftsgebiete von <i>Quercus robur</i> L. nach FoVHgV 1994 .....	8
<b>Abbildung 3:</b> Vorkommensgebiete für Gehölze zur Ausbringung in der freien Natur (BMU 2012).....	9
<b>Figure 1 (Publikation I):</b> Geographical distribution (dark grey) of <i>Quercus robur</i> (A) and <i>Tilia cordata</i> (B) and locations of the tested populations. Modified map of EUFORGEN ( <a href="http://www.euforgen.org/distribution-maps/">http://www.euforgen.org/distribution-maps/</a> ).....	17
<b>Figure 2 (Publikation I):</b> Mean index of injury [%] ( $\pm$ standard error) for different populations of <i>Quercus robur</i> (A) and <i>Tilia cordata</i> (B) at two different frost treatments in early November 2011. Different lower case letters indicate significant differences between populations ( $\alpha=0.05$ , $n=8$ ).....	22
<b>Figure 1 (Publikation II):</b> Geographical distribution (dark grey) of <i>Quercus robur</i> (A) and <i>Tilia cordata</i> (B) and locations of the tested populations. Modified map of EUFORGEN ( <a href="http://www.euforgen.org/distribution-maps/">http://www.euforgen.org/distribution-maps/</a> ).....	39
<b>Figure 2 (Publikation II):</b> Phenological score for different populations of <i>Tilia cordata</i> and <i>Quercus robur</i> at end of April. Different lower case letters indicate significant differences between populations. ( $\alpha=0.05$ , $n=54$ ).....	43
<b>Figure 3 (Publikation II):</b> Mean index of injury [%] ( $\pm$ standard error) for different populations of <i>Quercus robur</i> (A) and <i>Tilia cordata</i> (B) for two different frost treatments (average of 24 <sup>th</sup> of April, 2 <sup>nd</sup> and 8 <sup>th</sup> of May). Different lower case letters indicate significant differences between populations ( $\alpha=0.05$ , $n=8$ ).....	46
<b>Figure 1 (Publikation III):</b> Mean stomatal conductance ( $g_s$ ) ( $\pm$ standard error) for different populations of container-grown <i>Quercus robur</i> and <i>Tilia cordata</i> in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments. ( $\alpha=0.05$ , $n=9$ ).....	62



---

**Figure 2 (Publikation III):** Mean pre dawn leaf waterpotential ( $\Psi_{pd}$ ) ( $\pm$  standard error) for different populations of container-grown *Quercus robur* and *Tilia cordata* in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ). ..... 63

**Figure 3 (Publikation III):** Mean relative leaf water content ( $RWC_{leaf}$ ) ( $\pm$  standard error) for different populations of container-grown *Quercus robur* and *Tilia cordata* in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ). ..... 64

**Figure 4 (Publikation III):** Mean chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ) ( $\pm$  standard error) for different populations of container-grown *Quercus robur* and *Tilia cordata* in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ). ..... 65

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über das experimentelle Design der vorliegenden Arbeit.....	11
<b>Tabelle 2:</b> Art, Bundesland, Populations Code, Breitengrad (BG), Längengrad (LG), Höhe über normal Null (ALT), durchschnittliche Jahrestemperatur ( $T_a$ ), durchschnittliche Herbsttemperatur (September - November) ( $T_{aut}$ ), durchschnittliche Frühjahrstemperatur (März - Mai) ( $T_{spr}$ ), durchschnittlicher Jahresniederschlag ( $P_a$ ) und durchschnittlicher Sommerniederschlag (Juni-August) ( $P_s$ ) der Populationen.....	12
<b>Table 1 (Publikation I):</b> County, population code, latitude (LAT), longitude (LONG), altitude (ALT), mean annual temperature ( $T_a$ ) and mean autumn (September, October, November) temperature ( $T_{aut}$ ) of populations sites of origin. Climatic data are means from 1965-1990.....	18
<b>Table 2 (Publikation I):</b> Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$ standard error) in shoot tips of four populations of <i>Quercus robur</i> after treatment at different temperatures. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ , $n=8$ ).....	24
<b>Table 3 (Publikation I):</b> Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$ standard error) in shoot tips of three populations of <i>Tilia cordata</i> after treatment at different temperatures. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ , $n=8$ ).....	25
<b>Table 1 (Publikation II):</b> County, population code, latitude (LAT), longitude (LONG), altitude (ALT), mean annual temperature ( $T_a$ ) and mean autumn (September, October, November) temperature ( $T_{aut}$ ) of populations sites of origin. Climatic data are means from 1965-1990.....	40
<b>Table 2 (Publikation II):</b> Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$ standard error) in shoot tips of four populations of <i>Quercus robur</i> after treatment at different temperatures in April 2012. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ , $n=8$ ).....	44

---

**Table 3 (Publikation II):** Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$  standard error) in shoot tips of three populations of *Tilia cordata* after treatment at different temperatures in April 2012. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ )..... 45

**Table 1 (Publikation III):** Species, county, population code, latitude (LAT), longitude (LONG), altitude (ALT), mean annual temperature ( $T_{\text{annual}}$ ), mean annual precipitation ( $P_{\text{annual}}$ ) and mean summer (June, July, August) precipitation ( $P_{\text{summer}}$ ) for the sites of origin. For tested populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata*. Climatic data are means from 1965 to 1990..... 59

**Table 2 (Publikation III):** Mean concentrations of GFS (glucose, fructose and sucrose), starch and proline ( $\pm$  standard error) in the newest leaves of four populations of *Quercus robur* and three populations of *Tilia cordata*, all container-grown, after different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]) in July/August 2012. Different lower case letters indicate significant differences between populations within a drought treatment. Populations code: NW = Nordrhein-Westfalen (Germany), BB = Brandenburg (Germany), BY = Bayern (Germany), SN = Sachsen Anhalt (Germany), BW = Baden-Württemberg (Germany), HU = Tiszadob (Hungary). Significant differences between drought treatments for the same population are indicated by capital letters. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ).... 66

---

## Abkürzungsverzeichnis

§	Paragraph
$\Psi_{pd}$	pre-dawn leaf water potential
Abs	Absatz
ALT	Altitude
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
ASRD	Alberta sustainable resource development
BB	Brandenburg
BG	Breitengrad
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit
BNatSchG	Bundesnaturschutzgesetz
BW	Baden-Württemberg
BY	Bayern
CDL	Critical day length
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DW	Dry weight
DWD	Deutscher Wetterdienst
EUFORGEN	European forest genetic resources programme
FoVG	Forstvermehrungsgutgesetz
FoVHgV	Forstvermehrungsgut-Herkunftsgebietsverordnung

---

FDD	Fast developing drought
$F_v/F_m$	variable fluorescence / maximum fluorescence
FW	Fresh weight
GFS	Combination of glucose, fructose, sucrose
$g_s$	Stomatal conductivity
h	Stunde / hour
HU	Hungary
$I_t$	Index of injury
K	Potassium
$K_2O$	Potassium oxide
$L_{1t}$	Initial electric conductivity
$L_{2t}$	final electric conductivity
LAT	Latitude
LG	Längengrad
LONG	Longitude
M	Monat
m.a.s.l.	Meter above sea level
MgO	Magnesium oxide
N	Nitrogen
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
$NaHCO_3$	Sodium bicarbonate
NaOH	Sodium hydroxide
Nr	Nummer

---

NW	Nordrhein-Westfalen
P	Phosphorus
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Phosphorus pentoxide
P <sub>a</sub> and P <sub>annual</sub>	Mean annual precipitation
P <sub>s</sub> and P <sub>summer</sub>	Mean summer precipitation
PSII	Photosystem II
R <sub>0</sub>	Relative electrolyte leakage of unfrozen sample
REL	Relative electrolyte leakage
rpm	Revolutions per minute
R <sub>t</sub>	Relative electrolyte leakage for a given temperature (t)
RWC <sub>leaf</sub>	Leaf relative water content
SDD	Slow developing drought
SN	Sachsen Anhalt
T <sub>a</sub> and T <sub>annual</sub>	Mean annual temperature
T <sub>aut</sub>	Mean autumn temperature
T <sub>spr</sub>	Mean spring temperature
TW	Turgid weight

## Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Heike Bohne für das mir entgegengebrachte Vertrauen, ihre Geduld die ich oft strapaziert habe und ihre Unterstützung während der gesamten Promotion. Ohne die fruchtbaren Diskussionen, ihre fachliche Expertise und ihre Fähigkeit, Dinge aus einem ganz neuen Blickwinkel zu betrachten, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch für die Hinweise und Anmerkungen beim Verfassen der Publikationen und dieser Arbeit danke ich ihr sehr.

Ich danke Prof. Dr. Traud Winkelmann und Prof. Dr. Hartmut Stützel für die Übernahme des Korreferates beziehungsweise des Vorsitzes meiner Promotion.

Desweiteren danke ich allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts. Allen voran Johanna Buse und Dorit Röhm für ihre tatkräftige Mitarbeit und ihre Unterstützung beim Erlernen der unterschiedlichsten Methoden, Sabine Reinecke für die Unterstützung bei allen administrativen Vorgängen, Herrn Herbert Geyer und Herrn Simon Richartz sowie dem gärtnerischen Personal für die Unterstützung bei der Kultivierung der Versuchspflanzen und der Durchführung der Experimente.

Herrn Dr. Daniel Gerhard danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein Dank gilt auch der „Baumschule Lorenz von Ehren GmbH & Co. KG“ für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und Bernhard von Ehren als Person für seine fachliche Expertise und die anregenden Diskussionen.

Schließlich danke ich allen Menschen, die an dieser Stelle keine namentliche Erwähnung fanden, durch große und auch kleinere Hilfestellungen aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Verbreitungsgebiete von Baumarten und Anpassung an Umweltbedingungen

Die Verbreitungsgebiete von Baumarten in Europa überspannen große geographische Areale. So erstreckt sich das Verbreitungsgebiet der Stieleiche (*Quercus robur* L.) von Nordspanien bis Südkandinavien und von Irland bis hin zum Uralgebirge (Ducousso und Bordacs 2004). Dies bedingt eine Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen, insbesondere an abiotische Stressfaktoren wie Frost oder Trockenheit. Hierbei wird häufig von Populationen gesprochen. Eine Population ist eine Gruppe von Individuen einer Art, die räumlich getrennt von anderen Individuen derselben Art existieren und sich untereinander kreuzen (Campbell und Reece 2003). Anpassungen von Baumarten an regionale Umweltbedingungen wurden schon vor längerer Zeit nachgewiesen. Ducousso et al. (1996) untersuchten bei dreijährigen Sämlingen verschiedener Populationen von *Quercus petraea* (Matt) Liebl. (angezogen am selben Standort), ob es einen Zusammenhang zwischen dem Breitengrad (44° - 56° N) bzw. der Höhe über NN (35 - 425 m) des Herkunftsstandorts und dem Zeitpunkt des Austriebs im Frühjahr gibt. Populationen von südlicheren Breitengraden bzw. höheren Standorten trieben früher aus und waren anfälliger gegenüber Spätfrost. Durch die Anzucht der verschiedenen Populationen am selben Standort folgt, dass die phänologischen Unterschiede genetisch festgelegt sind.

Die treibende Kraft für die Ausprägung dieser an lokale Umweltbedingungen angepassten Populationen ist die natürliche Selektion (Kawecki und Ebert 2004). Nach dem darwinistischen Prinzip haben Individuen mit einer höheren „Fitness“ (bessere Anpassung an lokale Umweltbedingungen) einen evolutionären Vorteil. Für eine Anpassung an lokale Umweltbedingungen muss aber der Selektionsdruck (z.B. Stressfaktor) die Merkmalsausprägung (z.B. Stresstoleranz) von Individuen so stark begünstigen, dass diese sich gegenüber anderen durchsetzen. Bezüglich der Spätfrosthärte bei *Fagus sylvatica* Sämlingen wiesen Kreyling et al. (2014) eine stärkere lokale Anpassung bei Populationen nach, die vom Rand des Verbreitungsgebiets stammten, verglichen mit zentraleren Populationen. Sie führten dies auf den stärkeren Selektionsdruck am Rand eines Verbreitungsgebiets zurück. Neben dem Selektionsdruck wird das Ergebnis einer möglichen Selektion auch von anderen Faktoren beeinflusst. Ein starker Genfluss („gene flow“) zwischen Populationen, also der Transfer von genetischem Material von einer Population auf eine andere, führt zwar zur Vergrößerung der genetischen Variation innerhalb der Population, aber gleichzeitig zu einer Verringerung der genetischen Variation zwischen den Populationen



---

und somit möglicherweise zum Abschwächen von Anpassungen an lokale Umweltbedingungen. Der Genfluss ist stark abhängig von den Lebenseigenschaften einer Pflanzenart. Starker Genfluss wird Pflanzen mit Allogamie (Fremdbefruchtung), Anemogamie (Windbestäubung) und durch Wind oder Tiere verbreiteten Samen zugeschrieben (Hamrick et al. 1992), was auf den Großteil der europäischen Baumarten zutrifft. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass Hamrick et al. (1992) durch eine Literaturrecherche bei Bäumen im Vergleich zu Pflanzen mit anderen Lebenseigenschaften zwar eine hohe genetische Variation innerhalb ihrer Populationen aber nur eine geringe zwischen den Populationen abgeleitet hat. Ein weiterer Faktor, der die Anpassung von Populationen an lokale Umweltbedingungen beeinflusst, ist die phänotypische Plastizität. Dieser Begriff beschreibt die Eigenschaft eines Genotyps unter unterschiedlichen Umweltbedingungen verschiedene Phänotypen auszubilden (Valladares et al. 2006). Die phänotypische Plastizität wird bei Bäumen als stark ausgeprägt angesehen (Petit und Hampe 2006). Vitasse et al. (2010) wiesen bezüglich der Blattphänologie (Zeitpunkt von Austrieb und Triebabschluss) eine hohe Plastizität bei Sämlingen unterschiedlicher Populationen von *Fagus sylvatica* und *Quercus petraea* nach, die entlang eines Höhengradienten gepflanzt wurden.

Sowohl lokale Anpassung als auch phänotypische Plastizität werden in der Literatur als Mechanismen der Anpassung an Umweltbedingungen beschrieben (Grenier et al. 2016). Lokale Anpassung beschreibt eine langfristige, sich über viele Generationen erstreckende, Anpassung an Umweltbedingungen durch die Veränderung der genetischen Struktur einer Population. Phänotypische Plastizität dagegen ermöglicht eine kurzfristige Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen ohne die Veränderung der genetischen Struktur einer Population. Beide Anpassungsmechanismen schließen sich aber nicht gegenseitig aus, sondern entwickeln sich vielmehr gemeinsam und beeinflussen sich gegenseitig. Dies macht es häufig schwer bei der Betrachtung von Anpassungen an lokale Umweltbedingungen zwischen beiden zu unterscheiden (Yampolsky et al. 2014).

Bei der Betrachtung möglicher Anpassungen von Populationen an lokale Umweltbedingungen treten bei Bäumen einige Besonderheiten aufgrund ihrer Lebenseigenschaften auf. Bäume sind aufgrund ihrer Immobilität und langen Lebenszeit immer wieder ungünstigen Umweltbedingungen ausgesetzt. Diese ungünstigen Umweltbedingungen beinhalten sowohl biotische (z.B. Pathogene, herbivore Insekten) als auch abiotische (z.B. Frost, Trockenheit, Hitze, Salz- und Schwermetallbelastungen) Stressfaktoren (Grativol et al. 2012). Diese Stressfaktoren üben langfristig einen spezifischen Selektionsdruck aus. Die Individuen einer Baumpopulation, welche in der Lage sind, trotz dieser Stressfaktoren zu überleben (Vermeidung/Toleranz), haben durch eine höhere Fitness einen reproduktiven Vorteil gegenüber anderen Individuen und geben die genetischen

---

Informationen der Stressantwort an ihre Nachkommen weiter. Somit kann sich unter bestimmten Bedingungen (starker Selektionsdruck, geringer Genfluss) über viele Generationen eine an diese Stressfaktoren angepasste Population bilden. Die Stressantworten können sowohl morphologischer als auch physiologischer Natur sein. Zudem treten Stressfaktoren häufig nicht dauerhaft, sondern im Jahresverlauf wiederkehrend auf. Im Fall von Frost und Trockenheit bedingen die Jahreszeiten und die damit einhergehenden Temperatur- und Niederschlagswechsel ein temporäres Stressmuster mit höherer Wahrscheinlichkeit für Froststress im Winter und Trockenstress im Sommer.

Die Ausbildung lokal angepasster Baumpopulationen ist also vom Zusammenspiel verschiedener Faktoren abhängig; einerseits von den Mechanismen der Anpassung, andererseits aber auch von der Art des Selektionsdrucks.

## 1.2 Frost

In der gemäßigten Klimazone Europas sind Kälte- und Froststress zwei der wichtigsten Faktoren, die die geografische Verbreitung von Baumarten bestimmen (Sakai und Larcher 1987). Da das Auftreten dieser Stressfaktoren aber einem temporären Muster folgt, müssen auch die energieaufwendigen Mechanismen zur Abwehr dieser Stressfaktoren nicht dauerhaft aufrechterhalten werden. Zum Beispiel ist die Frosthärte eines Baumes unter anderem abhängig von der zeitlichen Regulierung des Triebabschlusses im Herbst und des Austriebs im Frühjahr (Vitasse et al. 2009a, Caffarra und Donnelly 2011, Kreyling et al. 2014). Baumarten der gemäßigten Klimazone gehen im Winter in eine Dormanzphase über wobei die Frosthärte im Herbst ansteigt, ihr Maximum im Winter erreicht und sich zum Frühjahr hin wieder verringert. Sie synchronisieren somit ihren Wachstumszyklus mit günstigen Wachstumsbedingungen im Sommer und ungünstigen im Winter.

### 1.2.1 Prozess der Abhärtung

Beginn und Ende der Dormanzphase werden von äußeren Umweltfaktoren, primär der Photoperiode und Temperatur, bestimmt (Repo et al. 2008). Die Einleitung der Dormanzphase im Herbst wird durch Verkürzen der Tageslänge und/oder sinkende Temperaturen ausgelöst. Hierbei treten sowohl phänologische Veränderungen (Abwerfen der Blätter und Ausbildung der Winterknospen) als auch metabolische Veränderungen (u.a. Verringerung des Wassergehaltes, Einlagerung von Nährstoffen und Aufbau cryoprotektiver Substanzen) auf. Die spezifische Tageslänge, welche den Dormanzeintritt auslöst, wird kritische Tageslänge genannt und ist unter starker genetischer Kontrolle (Rohde et al. 2011). Sie ist von der Baumart abhängig, kann sich aber auch zwischen Populationen derselben

Baumart unterscheiden. Häufig wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen dem Breitengrad des Herkunftsstandorts einer Population und der kritischen Tageslänge für den Dormanzeintritt hergestellt. Populationen von südlicheren Standorten initiieren den Eintritt in die Dormanzphase bei kürzeren kritischen Tageslängen als Populationen nördlicherer Standorte. Howe et al. (1995) zeigten dies in Gewächshausversuchen mit *Populus trichocarpa*. Als Pflanzenmaterial dienten bewurzelte Stecklinge von Mutterpflanzen von nördlichen ( $53^{\circ}50'$  und  $53^{\circ}35'$ ) sowie südlichen ( $40^{\circ}32'$  und  $34^{\circ}10'$ ) Breitengraden, die unter verschiedenen Tageslängen kultiviert wurden. Die kritischen Tageslängen für den Triebabschluss lagen bei 15 h für die nördlichen und 11 h für die südlichen Populationen.

Die Terminierung des Dormanzeintritts von Bäumen kann als Kompromiss zwischen dem maximalen Ausnutzen der Wachstumsperiode und der Minimierung des Risikos von Frostschäden gesehen werden. Auf der Nordhalbkugel sind an kalendarisch gleichen Tagen die Tageslängen im Herbst an südlicheren Standorten kürzer als an nördlicheren. Somit würden südlichere Populationen bei gleicher kritischer Tageslänge früher in die Dormanzphase eintreten und folglich die Wachstumsperiode nicht maximal ausnutzen.

Das Ende der Dormanz im Frühjahr wird, reziprok zum Eintritt, durch steigende Temperaturen und eine längere Photoperiode ausgelöst, wobei hier auch Faktoren wie das Erreichen eines vorangegangenen spezifischen Kältebedürfnisses modifizierend wirken. Diese Faktoren sind, wie auch beim Dormanzeintritt, art- bzw. populationsabhängig.

Die Gefahr von Frostschäden ist während der Abhärtungsphase im Herbst und Enthärtungsphase im Frühjahr besonders groß, da hier die maximale Frosthärte noch nicht aufgebaut bzw. wieder abgebaut ist. Dieser Verlauf der Frosthärte wurde auch bei Klimakammerversuchen von Morin et al. (2007) mit *Quercus robur* bestätigt, bei denen zu verschiedenen Zeitpunkten die Temperatur bestimmt wurde, die zu 50 % Zellschädigung führte. Die Frosthärte stieg vom Oktober zum Januar an und fiel im April wieder ab. Die Frosthärte korrelierte hier sehr stark mit dem Gehalt an cryoprotektiven Substanzen in den Pflanzen.

## 1.2.2 Frosttoleranz

Die Frosttoleranz einer Pflanze setzt sich aus der Fähigkeit der Vermeidung von intrazellulärer Eisbildung und der Toleranz von Zelldehydrierung (Wasserverlust durch interzelluläre Eisbildung) zusammen (Levitt 1980).

Ein Gefrieren des cytoplasmatischen Wassers führt durch die Bildung von Eiskristallen und die damit verbundene mechanische Verletzung der Zellmembranen zum Tod der Zellen und muss daher unbedingt verhindert werden. Dies kann von Pflanzen durch sogenanntes „supercooling“ erreicht werden. Dieser Begriff beschreibt die Fähigkeit einer Lösung auch bei

Temperaturen unter ihrem Gefrierpunkt die flüssige Phase beizubehalten. Hierbei spielen in der Pflanzenzelle u.a. ein geringer Wassergehalt, die Abwesenheit interner Nukleatoren und die Konzentration an gelösten Stoffen im Cytoplasma eine wichtige Rolle (Sakai und Larcher 1987). Die Eisbildung in Pflanzen beginnt also im interzellulären Raum aufgrund der hier geringeren Konzentration an gelösten Stoffen. Da der Wasserdampfdruck über dem interzellulären Eis aber geringer ist als jener des cytoplasmatischen Wassers in den umliegenden Zellen, führt dies zur Diffusion des Zellwassers der umliegenden Zellen in den interzellulären Raum. Dies führt zum einen zu einer weiteren, passiven Erhöhung der Konzentration an gelösten Stoffen im cytoplasmatischen Wasser, zum anderen resultiert daraus aber auch eine fortschreitende Dehydrierung der Zellen, was ebenfalls zum Tod der Zellen führen kann (Sakai und Larcher 1987). Um Zellschäden durch eine Dehydrierung zu vermeiden, verändert sich im Laufe der Abhärtung die Zusammensetzung und Gesamtmenge an Membranlipiden. Der Gehalt an Phospholipiden steigt an und es werden vermehrt ungesättigte Fettsäuren eingebaut, um eine notwendige Flexibilität der Zellmembranen aufrecht zu erhalten (Mahajan und Tuteja 2005). Untersuchungen von Hietala et al. (1998) an *Salix viminalis* zeigten einen Anstieg im Gesamtgehalt an Fettsäuren, sowie einen Anstieg des Verhältnisses von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren während der Abhärtungsphase. Dies war begleitet von einer Erhöhung der Frosthärte.

Zudem erhöht sich während der Abhärtungsphase der Gehalt an cryoprotektiven Substanzen wie Zuckern (u.a. Glucose, Fructose und Saccharose), Zuckeralkoholen und Aminosäuren (Prolin). Lösliche Zucker wirken, durch die Verringerung des osmotischen Potentials in der Zelle (Osmoregulierung) einer Dehydrierung der Zellen entgegen. Durch die direkte Anlagerung an die Phosphatgruppen der Membranlipide und die damit verbundene Verringerung der Permeabilität schützt Saccharose die Zelle weiter vor zu starker Dehydrierung (Tarkowski und van den Ende 2015). Desweiteren bindet Saccharose über Wasserstoffbrücken an die Oberfläche von Proteinen und substituiert somit Wassermoleküle. Bei starker Dehydrierung verhindert dies eine Denaturierung dieser Proteine (Crowe et al. 1987). Untersuchungen von Morin et al. (2007) mit *Quercus robur*, *Quercus ilex* und *Quercus pubescens* zeigten einen positiven Effekt erhöhter Konzentrationen von löslichen Kohlenhydraten (Glukose, Fruktose, Saccharose) auf die Frosthärte.

Eine besondere Bedeutung bei der Stressantwort kommt der Aminosäure Prolin zu. Zahlreiche Studien zeigen, dass Prolin in höheren Pflanzen bei einer großen Anzahl an Stressfaktoren akkumuliert. Die protektiven Eigenschaften dieser Aminosäure sind so vielfältig, dass Szabados und Savouré (2010) sie als „a multifunctional amino acid“ bezeichneten. Prolin agiert bei Stress als Signalmolekül, schützt Enzyme, die in der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies involviert sind, wirkt als Osmolyt der Dehydration

---

der Zelle entgegen und stellt nach einem Stressereignis durch Degradierung Energie, Stickstoff und Kohlenstoffskelette bereit.

## 1.3 Trockenheit

In Deutschland liegt die vorausgesehene Erhöhung der durchschnittlichen Tagestemperatur durch den Klimawandel bis zum Jahr 2080 zwischen 1.6 und 3.8 °C. Dies geht auch mit Veränderungen der Niederschlagsmenge und -verteilung einher. Während die Niederschlagsmenge in den Wintermonaten steigt, sinkt sie in den Sommermonaten (Umweltbundesamt 2015). Diese Veränderung des Niederschlagsmusters, zusammen mit steigenden Temperaturen kann zu häufigeren und stärkeren Trockenstressereignissen führen. Trockenstress bedeutet ein Ungleichgewicht zwischen Wasseraufnahme und Wasserabgabe, welches über einen längeren Zeitraum anhält und zu einer Stressreaktion führt. Dieses Ungleichgewicht tritt auf, wenn die Wasseraufnahme durch die Wurzeln aufgrund hoher Wasserspannungen im Boden (geringer Wassergehalt) eingeschränkt ist. Durch die Veränderung des Niederschlagsmusters können auch Regionen betroffen werden, in denen üblicherweise keine Trockenstressereignisse auftreten. Dieser Trend ist besonders kritisch für Bäume zu sehen, da eine evolutionäre Anpassung an diese Veränderungen aufgrund ihrer langen Lebensspanne und den langsamen Generationszyklen eingeschränkt ist (Günthardt-Goerg und Arend 2013).

### 1.3.1 Vermeidung und Toleranz von Trockenstress

Die Strategien von Gehölzen, um mit Trockenheit umzugehen, lassen sich in die Vermeidung von Trockenstress und die Toleranz von Trockenstress einteilen. Um Trockenstress zu vermeiden, muss die Wasserabgabe so gering wie möglich gehalten werden beziehungsweise die Wasseraufnahme erhöht werden. Dies kann langfristig durch ein geringes Spross/Wurzel-Verhältnis oder kurzfristig durch die Regulierung der stomatären Leitfähigkeit erreicht werden. Das Schließen der Stomata ist häufig eine der ersten physiologischen Reaktionen von vielen Gehölzen auf eine eingeschränkte Wasseraufnahme (McDowell 2008). Sparks und Black (1999) untersuchten dies bei *Populus trichocarpa* und stellten Unterschiede zwischen verschiedenen Populationen heraus. Zwar zeigten alle Populationen eine stomatäre Reaktion auf Trockenstress, Populationen aus Gebieten mit niedrigerem durchschnittlichen Jahresniederschlag reagierten aber schneller mit dem Schließen der Stomata als Populationen aus Gebieten mit höherem durchschnittlichen Jahresniederschlag.

Ein großer Nachteil dieser Stressantwort ist allerdings die damit ebenso verbundene Verminderung der CO<sub>2</sub>-Aufnahme, welche die photosynthetische Aktivität, und damit das

Wachstum einschränkt. Zudem führt eine Verminderung der photosynthetischen Aktivität bei gleichzeitig starker Einstrahlung zu stärkerer Photooxidation und somit zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, welche biologische Moleküle in ihrer Umgebung schädigen (Osakabe et al. 2014).

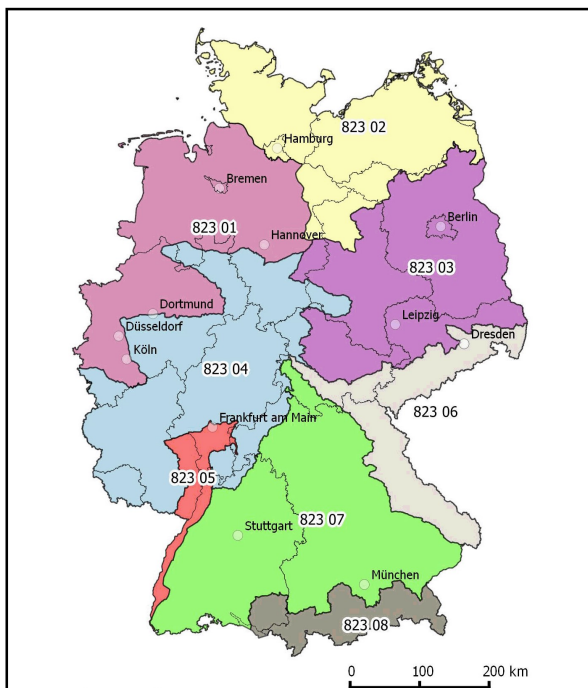
Eine gänzliche Vermeidung der Wasserabgabe ist nicht möglich, was je nach Intensität und Dauer der Trockenheit früher oder später zu einer Dehydration der Zellen und somit zur Verringerung des Wasserpotentials der Zellen führt. Da auch Froststress eine Dehydration der Zellen hervorruft ähneln sich die biochemischen Reaktionen von Gehölzen zur Toleranz beider Stressarten. Auch bei Trockenstress akkumulieren verschiedene organische Moleküle (Osmolyte), wie Kohlenhydrate (z.B. Glukose, Fruktose und Saccharose) und Aminosäuren (z.B. Prolin). Diese so genannte „Osmoregulation“ wirkt über die Verringerung des osmotischen Potentials der Zelle einer weiteren Dehydration entgegen. Hierdurch kann der Turgordruck der Zelle aufrechterhalten werden (Callister et al. 2008), was ein weiteres Wachstum ermöglicht und die photosynthetische Aktivität aufrechterhält (Thomas und Gausling 2000). Zudem schützen diese akkumulierten Stoffe Proteine und Zellmembranen vor Schäden bei starker Dehydrierung und sind durch die Bereitstellung von Energie, Stickstoff und Kohlenstoffskeletten wichtig für die Regeneration nach einem Stressereignis.

## 1.4 Verwendung von gebietseigenen Gehölzen in Deutschland

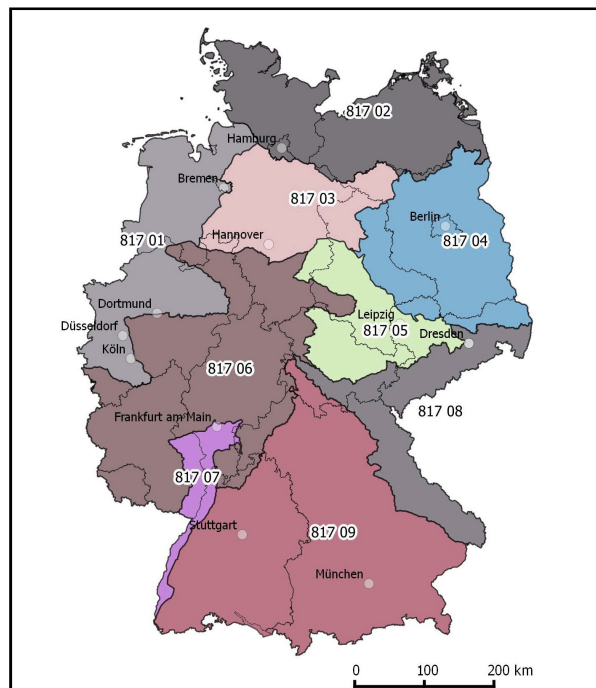
„Als gebietseigen werden Pflanzen beziehungsweise Sippen bezeichnet, die aus Populationen einheimischer Sippen stammen, welche sich in einem bestimmten Naturraum über einen langen Zeitraum in vielen Generationsfolgen vermehrt haben und bei denen eine genetische Differenzierung gegenüber Populationen der gleichen Art in anderen Naturräumen anzunehmen ist“ (BMU 2012). Es wird angenommen, dass gebietseigene Baumpopulationen einer Baumart in Bezug auf ihre adaptiven Eigenschaften besser an den eigenen Standort angepasst sind als gebietsfremde Populationen derselben Baumart und diesen somit überlegen sind (Liesebach et al. 2007, Biere und Verhoeven 2008, Kreyling et al. 2014). Durch die Ausbringung gebietsfremder Populationen und die Hybridisierung mit den gebietseigenen Populationen derselben Baumart besteht die Gefahr des Verlustes der adaptiven Eigenschaften der gebietseigenen Populationen. Um die biologische Vielfalt einschließlich der innerartlichen Vielfalt zu schützen und Florenverfälschungen vorzubeugen, wurden gesetzliche Regelungen getroffen, die die Verwendung von Pflanzenmaterial in Deutschland bestimmen.

Die Verwendung von pflanzlichem Vermehrungsgut für forstliche Zwecke in Deutschland unterliegt den Regelungen des Forstvermehrungsgutgesetzes (FoVG). Ziel dieses Gesetzes ist es: „[...] den Wald mit seinen vielfältigen positiven Wirkungen durch die Bereitstellung von

hochwertigem und identitätsgesichertem forstlichen Vermehrungsgut in seiner genetischen Vielfalt zu erhalten und zu verbessern [...]“ (§1 Abs.1, FoVG, 2002). Mit der Annahme, dass für einen bestimmten Standort gebietseigene Gehölze aufgrund der besseren Angepasstheit gebietsfremden Gehölzen überlegen sind, wurden von den einzelnen Bundesländern „Herkunftsempfehlungen“ ausgegeben. Die Herkunftsempfehlungen beziehen sich auf Herkunftsgebiete, die unter Berücksichtigung von ökologischen Grundeinheiten (Schmidt und Krause 1997) und gegebenenfalls der Höhenlage für die 26 verschiedenen im FoVG enthaltenen Gehölzarten abgegrenzt wurden (§1 Abs. 2, FoVHgV 1994). Die Anzahl dieser Herkunftsgebiete variiert je nach Baumart. So werden zum Beispiel die Herkünfte von *Tilia cordata* Mill. in acht (Abbildung 1), und die von *Quercus robur* L. in neun Herkunftsgebiete (Abbildung 2) eingeteilt.



**Abbildung 1:** Forstliche Herkunftsgebiete von *Tilia cordata* MILL. nach FoVHgV 1994



**Abbildung 2:** Forstliche Herkunftsgebiete von *Quercus robur* L. nach FoVHgV 1994

Um die Verwendung gebietseigener Gehölze auch auf nicht forstliche Zwecke auszuweiten und gesetzlich zu regeln, wurde 2010 das Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG) novelliert sowie ein „Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze“ (BMU 2012) herausgegeben. Der Anwendungsbereich des novellierten § 40 BNatSchG bezieht sich auf die „freie Natur“. Dieser juristische Begriff gilt nicht für den „[...] innerstädtischen und innerörtlichen Bereich sowie in Splittersiedlungen, Gebäuden zugeordneten Gärten und Wochenendhausgebieten im Außenbereich (sogenannter besiedelter Bereich) sowie Sportanlagen [...]“. Ebenfalls von den Regelungen des BNatSchG ausgenommen ist der Anbau in der Land- und Forstwirtschaft sowie Sonderstandorte (z.B. unmittelbarer Straßenseitenraum, Lärmschutzwände und Mittel- und Trennstreifen), wenn durch die Verwendung gebietsheimischen Pflanzenmaterials andere

Aspekte wie Lichtraumprofil und Verkehrssicherheit nicht gewährleistet werden können (BMU 2012). Die Novelle des BNatSchG stellt die Ausbringung von Gehölzen



**Abbildung 3:** Vorkommensgebiete für Gehölze zur Ausbringung in der freien Natur (BMU 2012).

gebietsfremden Ursprungs in der freien Natur unter Genehmigungspflicht. Von dieser Genehmigungspflicht ausgenommen sind Pflanzen, die ihren genetischen Ursprung in dem betreffenden Gebiet haben. Da nicht immer Daten zum genetischen Ursprung vorliegen, wurde, wie für forstliche Zwecke, eine indirekte Differenzierung von Populationen unter Bezug auf die naturräumlichen Grundeinheiten (Schmidt und Krause 1997) vorgenommen (Seitz und Kowarik 2003). Allerdings wurde bei der Verwendung von Gehölzen für die „freie Natur“ Deutschland nur in sechs Gebiete eingeteilt. Um sich nomenklatorisch vom FoVG abzugrenzen wird im BNatSchG beziehungsweise im

„Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze“ von Vorkommen und ihren Vorkommensgebieten anstelle von Herkünften und Herkunftsgebieten gesprochen. Hier liegt auch einer der gravierendsten Unterschiede zwischen beiden Gesetzen. Grenzt die Verordnung über Herkunftsgebiete für forstliches Vermehrungsgut (FoVHG) die Anzahl der Herkunftsgebiete spezifisch je Baumart ab, so existiert im BNatSchG nur eine Einteilung in sechs Vorkommensgebiete (Abbildung 3) für alle 55 im Leitfaden genannten Gehölzarten. Diese Abgrenzung im BNatSchG wurde anhand einer Karte von Schmid und Krause (1997) erstellt, die ebenfalls auf der Einteilung nach ökologischen Grundeinheiten basiert. Gänzlich trennen kann man die Regelungen der beiden Gesetze nicht, da sich die in den Gesetzen aufgenommenen Gehölzarten zum Teil überschneiden. Grundsätzlich sollen die Regelungen des FoVG auch außerhalb der Wälder gelten, wenn für eine Baumart sechs oder weniger Herkunftsgebiete existieren. Für Baumarten mit mehr als sechs Herkunftsgebieten oder die nicht im Geltungsbereich des FoVG liegen, sollen die Regelungen des BNatSchG und des „Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze“ gelten. Die neuen Regelungen des BNatSchG haben eine Übergangsfrist bis zum 1. März 2020. Aber auch bis zu diesem Zeitpunkt sollen Gehölze vorzugsweise innerhalb ihrer Vorkommensgebiete ausgebracht werden (§ 40 Abs.1 Nr.4 BNatSchG).



---

Für Gartenbaubetriebe, insbesondere der Baumschulwirtschaft, aber auch für ausschreibende Stellen, gehen mit den neuen Regelungen des BNatSchG weitreichende Veränderungen einher. Es müssen geeignete Erntebestände in den einzelnen Vorkommensgebieten ausgewiesen werden. Dies gilt insbesondere für die Gehölzarten, die nicht vom FoVG abgedeckt sind. Zudem müssen in den Baumschulen Bestände von gebietseigenen Gehölzen, getrennt nach den einzelnen Vorkommensgebieten, aufgebaut werden, um die bundesweit noch nicht zufriedenstellende Angebotssituation (BMU 2012) zu verbessern. Auch müssen der Nachweis und die lückenlose Rückverfolgung des Ursprungs eines Gehölzes, von der Saatgutgewinnung bis zur Pflanzung am Endstandort, durch die Etablierung geeigneter Zertifizierungssysteme gewährleistet werden, um ausschreibenden Stellen Rechtssicherheit bei der Verwendung dieser Gehölze zu ermöglichen. Der mit den neuen Regelungen des § 40 BNatSchG einhergehende höhere Aufwand für die Produktion und Zertifizierung gebietseigener Gehölze wird zu höheren Preisen dieser Gehölze führen. Außerdem kann es zu Angebotsengpässen kommen, wenn nicht ausreichend geeignetes Pflanzenmaterial einzelner Vorkommensgebiete vorhanden ist.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die Regelungen des §40 BNatSchG und des Leitfadens zur Verwendung gebietseigener Gehölze (BMU 2012) nehmen genetisch determinierte Unterschiede in den adaptiven Eigenschaften von Gehölzpopulationen in Deutschland an, die durch die Vorkommensgebiete abgebildet werden können. Hierfür steht ein wissenschaftlicher Nachweis allerdings noch aus. In dieser Arbeit wurden 2-jährige Sämlinge verschiedener Populationen von *Quercus robur* L. und *Tilia cordata* MILL. aus Regionen in Deutschland, welche geographisch verschiedenen Vorkommensgebieten zugeordnet werden, können auf mögliche Unterschiede in ihrer Frostbeziehungsweise Trockenstresstoleranz untersucht. Vorhandene Unterschiede in der Stressantwort zwischen den Populationen können Hinweise auf mögliche Unterschiede in den genetisch determinierten, adaptiven Eigenschaften der Populationen liefern. Um einen größeren geographischen Rahmen abzudecken wurde ebenfalls eine ungarische Population von *Quercus robur* L. einbezogen. Die Stressfaktoren wurden durch Klimakammerversuche (Früh- und Spätfroststress) sowie Gewächshausversuche (Trockenstress) simuliert. Um eventuelle Unterschiede in der Stressantwort zwischen den Populationen aufzuzeigen, wurden für den jeweiligen Stressfaktor typische morphologische, physiologische und biochemische Parameter erfasst, sowie ein Teil der Pflanzen durch weitere Kultivierung nach dem Stressereignis auf ihre Regenerationsfähigkeit beziehungsweise das Überleben untersucht. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- (1) Gibt es Unterschiede in der Stressantwort zwischen den jeweiligen Populationen?
- (2) Können mögliche Unterschiede auf die Bedingungen am Herkunftsstandort zurückgeführt werden?

## 2 Material und Methoden

Detaillierte Angaben zu Material und Methoden werden in den einzelnen Publikationen erläutert. Hier soll nur eine kurze zusammenfassende Übersicht über die verschiedenen Experimente und verwendeten Populationen gegeben werden. Eine Übersicht der durchgeführten Experimente ist schematisch in Tabelle 1 zu finden. Die geographischen und klimatischen Bedingungen der verschiedenen Herkunftsstandorte der Populationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

### 2.1 Experimentelles Design

**Tabelle 1:** Übersicht über das experimentelle Design der vorliegenden Arbeit

Zeitpunkt	Experiment	Stressfaktoren	Erhobene Parameter
2011 (Herbst)	Charakterisierung (Triebabschluss)		Phänologischer Status der Terminalknospe (Note 1-5)
2011 (November)	Frühfroststress	+ 5°C - 15 °C - 25 °C	Analysen (Glukose, Fruktose, Saccharose, Stärke, Prolin), relativer Elektrolytverlust, Überleben der Regenerationspflanzen
2012 (Frühjahr)	Charakterisierung (Austrieb)		Phänologischer Status der Terminalknospe (Note 1-5)
2012 (April/Mai)	Spätfroststress	+ 5°C - 6 °C - 12 °C	Analysen (Glukose, Fruktose, Saccharose, Stärke, Prolin), relativer Elektrolytverlust, Überleben der Regenerationspflanzen
2012 (Juli/August)	Trockenstress	Kontrolle * FDD * SDD *	Stomatäre Leitfähigkeit, "pre-dawn" Wasserpotential, Chlorophyllfluoreszenz, relativer Elektrolytverlust, Analysen (Glukose, Fruktose, Saccharose, Stärke, Prolin), Überleben der Regenerationspflanzen

\* Kontrolle: Bewässerung nach guter gärtnerischer Praxis; FDD (fast developing drought): 25 % des nach der letzten Bewässerung evapotranspirierten Wassers; SDD (slow developing drought): 50 % des nach der letzten Bewässerung evapotranspirierten Wassers

## 2.2 Übersicht über die verwendeten Populationen

**Tabelle 2:** Art, Bundesland, Populationscode, Breitengrad (BG), Längengrad (LG), Höhe über Normalnull (ALT), durchschnittliche Jahrestemperatur ( $T_a$ ), durchschnittliche Herbsttemperatur (September - November) ( $T_{aut}$ ), durchschnittliche Frühjahrstemperatur (März - Mai) ( $T_{spr}$ ), durchschnittlicher Jahresniederschlag ( $P_a$ ) und durchschnittlicher Sommerniederschlag (Juni-August) ( $P_s$ ) der Populationen. Die klimatischen Daten sind Mittelwerte von 1965-1990 (DWD).

Art	Bundesland	Code	BG	LG	ALT [m.a.s.l]	$T_a$ [°C]	$T_{aut}$ [°C]	$T_{spr}$ [°C]	$P_a$ [mm]	$P_s$ [mm]
<i>Quercus robur</i>	Nordrhein- Westfalen	NW	N 51°55'	E 07°58'	60	9.4	9.6	8.7	772	221
	Brandenburg	BB	N 52°21'	E 14°06'	50	8.6	8.8	7.9	538	175
	Bayern	BY	N 48°45'	E 12°59'	350	7.8	7.9	7.9	992	303
	Hungary	HU	N 47°59'	E 21°10'	100	9.2	10.2	10.5	565	207
<i>Tilia cordata</i>	Nordrhein- Westfalen	NW	N 50°40'	E 07°03'	160	9.8	10.3	8.9	631	203
	Sachsen	SN	N 51°21'	E 12°20'	110	9.1	9.7	8.4	478	165
	Baden- Württemberg	BW	N 47°51'	E 09°38'	450	7.7	8.0	7.3	914	334

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Publikation I: “Early frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany”

Publiziert als:

Selig, M., & Bohne, H. (2016): Early frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany. *European Journal of Horticultural Science*, 81(1), 13–21. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2016/81.1.2>

---

## “Early frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany”

M. Selig, H. Bohne

Institute for Horticultural Production Systems, Section Woody Plant and Propagation Physiology, Leibniz Universität Hannover, Germany

### Summary

Local adapted tree populations underlie the risk of losing their adaptive traits by hybridization with trees of non-local populations. To prevent this hybridization the German government amended the Federal Nature Conservation Act (BNatSchG) in 2010 and six defined areas of origin were arranged (BMU, 2012) for the use of plants in free nature. The transfer of propagation material between them is forbidden from 1<sup>st</sup> March 2020. However, the grade of local adaptation in populations of woody species in Germany is not clearly demonstrated. The aim of this study was to investigate differences in early frost reactions among German populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* by artificial freezing of shoots at – 15 °C and – 25 °C in November 2011. The process of bud set was rated prior and frost damage, sugar, starch and proline concentration were measured after the freezing experiments. To estimate long term survival whole plants were frozen simultaneously and then cultivated to investigate their regeneration. We did not find differences in bud set and early frost hardiness of shoots between German populations of the target species. Differences in these traits only occurred for the included Hungarian population of *Quercus robur* with lower grade of bud set and higher frost damage while having the highest proline concentration. Physiological differences occurred among German populations of *Tilia cordata* with higher soluble sugar concentration of the most southern population (47.51°N). However, these physiological differences did not improve frost hardiness indicating phenology as the main factor for early frost hardiness in the current experiment. The ecological differences at the sites of origin of the used populations seem not to be big enough to generate different early frost reactions in our experiment, counteracting ecological factors affecting the same biological parameter substitute each other or high phenotypic plasticity covers local adaptation.

Keywords: adaptation, bud set, carbohydrates, index of injury, proline, provenances

---

## Significance of this study

### *What is already known on this subject?*

The adaptation of woody plant populations to local ecological conditions can lead to different abiotic stress reactions, e.g. early frost. These adaptive traits can be lost by hybridization with non-local populations. However, the magnitude of local adaptation in German populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* is not fully clear. Nevertheless from 1<sup>st</sup> March 2020 the Federal Nature Conversation Act forbids the planting of populations outside their newly arranged defined areas of origin in free nature.

### *What are the new findings?*

After transfer to the experimental site in Hannover and growth for seven months, we did not find differences in bud set between German populations of the target species. Also after artificial freezing at  $-15\text{ °C}$  and  $-25\text{ °C}$  in November 2011 no interpopulation differences in frost damage occurred. Differences in sugar, starch and proline concentration were marginal.

### *What is the expected impact on horticulture?*

Based on the results for possible risks due to early frost, the partitioning of six defined areas of origin for the use of woody plants in free nature of Germany has to be reconsidered. An exchange of plant material between adjacent defined areas of origin should be possible in case of a lack of suitable plant material. This would alleviate the expenditure for the acquisition of seed for tree nurseries and improve the supply of planting stock.

## Introduction

*Quercus robur* and *Tilia cordata* are important silvicultural plant species but are often used for renaturation projects outside the forests in Germany as well. In silviculture, provenances are used for a long time in Germany due to the assumption of higher adaptation to local environmental conditions. It is supposed that local adaptation results in higher fitness of the plants of a population at their site of origin compared with non-local plants of the same species (Biere and Verhoeven, 2008). Outplanting of non-local populations of a plant species bears the risk of higher susceptibility to stress events because of maladaptation to the new environmental conditions and the loss of adaptive traits of the local population by hybridization (Hufford and Mazer, 2003). The use of provenances shall prevent local populations from hybridization with non-local populations. For silvicultural purposes Germany is divided into different numbers of provenance zones, depending on the species. This is regulated by law (FoVG, 2002). In 2010, the amendment to the Federal Nature

Conversation Act (BNatSchG) also regulated the use of woody plants in the free nature. Free nature in the BNatSchG (BMU, 2012) is a juristic term and is defined as all non-built-up areas with exception of forestry and street vegetation (e.g. alley trees). Here six “defined areas of origin” independent on species were established according to a map of Schmidt and Krause (1997) based on ecological fundamental units (BMU, 2012). After a transition period until 1<sup>st</sup> March 2020 it is forbidden for a number of species (BMU, 2012) to use populations outside their defined area of origin in the free nature without permission. This makes the production of woody plants due to the acquisition of propagation material and documentation more difficult and expensive. Furthermore it could result in a lack of suitable plant material.

Adaptive traits of plants to local climatic and geographic conditions are manifold. Early frost tolerance is an important one. It is related, among others, to the timing of phenological events and initiation of frost hardiness of a plant (Campbell and Sorensen, 1973; Jensen and Deans, 2004; Vitasse et al., 2009a; Kreyling et al., 2014).

In the case of phenological events perennial plants synchronize their timing of growth cessation and bud set in autumn and flushing in spring to favorable local climatic conditions with the aim to maximize the benefit from growth during the vegetation period without running into the risk of being damaged by frost events (Howe et al., 2003). The driving force for growth cessation and bud set of many broad-leaved tree species in autumn is short day photoperiod and/or decreasing temperatures. The specific photoperiod triggering these phenological events is called critical day length (CDL) and is under strong genetic control (Christersson, 1978; Junttila, 1980; Rohde, 2011). It is well documented that CDL of many tree species is related to the latitudinal and altitudinal origin of a population. Populations from lower latitudes and altitudes set buds at shorter CDL than populations from higher latitudes and altitudes (Heide, 1974; Junttila, 1980; Viherä-Aarnio et al., 2006; Vitasse et al., 2009b). These photoperiodic adapted populations are called photoperiodic ecotypes (Vartaja, 1954; Heide, 1974). In general, after a transfer from lower to higher latitudes non-local populations cease growth and set buds later than the locally adapted ones (Hurme et al., 1997; Li et al., 2005) which comes along with a higher risk of early frost damage.

Also physiological traits are affecting the susceptibility of a plant to frost. For cryoprotection many woody plants accumulate compatible solutes like soluble carbohydrates and proline during cold acclimation (Kozłowski and Pallardy, 2002; Kosová et al., 2007). This accumulation is supposed to correlate with the place of origin (Oleksyn et al., 2000; Morin et al., 2007).

Examples from literature show that the occurrence of differences among populations and their relation to local conditions seems to be strongly dependent on factors like plant species, magnitude of ecological differences between population sites of origin, examined parameters

and interactions between these factors (Oleksyn et al., 2000; Whiteley et al., 2003; Li et al., 2005; Ingvarsson et al., 2006; Viherä-Aarnio et al., 2006).

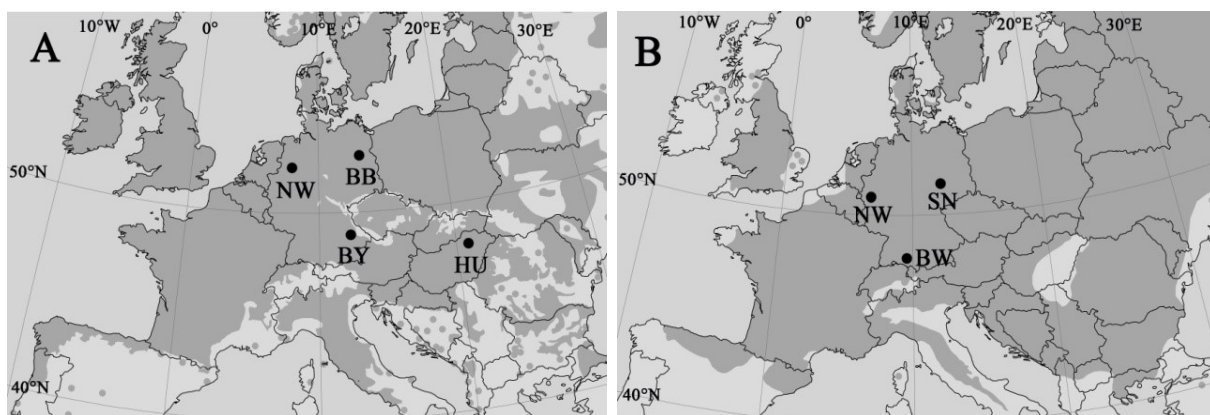
The use of local plant populations in free nature with the goal of conserving biological diversity and avoiding loss of local adaptation by hybridization with non-local populations is discussed in many countries. However, by our knowledge, Germany is the only one which regulated this by law. Regarding the defined areas of origin in Germany the question arises whether the ecological differences are strong and consistent enough to generate locally adapted populations with respect to early frost reactions. By enlarging the data base, the results support careful consideration of this topic not only for the German situation.

In this study it was investigated if populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* from three of the German defined areas of origin differ in their reaction to early frost events after transfer and cultivation at the same non local site. To cover a bigger geographic range one Hungarian population of *Quercus robur* was included.

## Materials and methods

### Plant material

In April 2011 three German populations of *Tilia cordata* and *Quercus robur* and one Hungarian population of *Quercus robur* were bought from nurseries (Figure 1, Table 1). Referring to § 40 BNatSchG (BMU, 2012) three defined areas of origin were included in the investigations. The populations of *Quercus robur* originated from the west (Nordrhein-Westfalen (NW)), east (Brandenburg (BB)) and south (Bayern (BY)) of Germany and from northwest of Hungary (near Tiszadob (HU)). *Tilia cordata* populations originated from west (Nordrhein-Westfalen (NW)), east (Sachsen (SN)) and south (Baden-Württemberg (BW)) of Germany. The 2 years old seedlings were potted into 3 L containers with peat as growing



**Figure 1 (Publikation I):** Geographical distribution (dark grey) of *Quercus robur* (A) and *Tilia cordata* (B) and locations of the tested populations. Modified map of EUFORGEN (<http://www.euforgen.org/distribution-maps/>)



medium (Klasmann Deilmann) containing 0.8 g nitrogen L<sup>-1</sup> substrate (Osmocote 8-9 M exact standard; 15% N, 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 11% K<sub>2</sub>O, 2% MgO (Everris GmbH)) and arranged in a randomized complete block design with two blocks per population outside on the container area at the experimental site in Ruthe (52°14'N, 9°49'E). In sum 54 seedlings with a plant density of 45 x 45 cm were cultivated per population. The irrigation took place automatically with a drip irrigation system.

**Table 1 (Publikation D):** County, population code, latitude (LAT), longitude (LONG), altitude (ALT), mean annual temperature ( $T_a$ ) and mean autumn (September, October, November) temperature ( $T_{aut}$ ) of populations sites of origin. Climatic data are means from 1965-1990.

Species	County/Country	Code	LAT	LONG	ALT [m.a.s.l.]	$T_a$ [°C]	$T_{aut}$ [°C]
<i>Quercus robur</i>	Nordrhein-Westfalen	NW	N 51°55'	E 07°58'	60	9.4	9.6
	Brandenburg	BB	N 52°21'	E 14°06'	50	8.6	8.8
	Bayern	BY	N 48°45'	E 12°59'	350	7.8	7.9
	Hungary	HU	N 47°59'	E 21°10'	100	9.2	10.2
<i>Tilia cordata</i>	Nordrhein-Westfalen	NW	N 50°40'	E 07°03'	160	9,8	10.3
	Sachsen	SN	N 51°21'	E 12°20'	110	9.1	9.7
	Baden-Württemberg	BW	N 47°51'	E 09°38'	450	7.7	8.0

### Climate chamber conditions

Three shoots approximately 30 cm in length were cut from each of 24 randomly selected plants per population and placed into plastic bags. 24 shoots of each population were arranged randomly in one of three climate chambers (Vötsch Industrietechnik, Modell VTZ 3008/S). The minimum temperatures of the climate chambers were 5 °C, -15 °C and -25 °C. The temperature was decreased by 5 °C per hour, the minimum temperature was held for 8 hours and then increased by 5 °C per hour. The shoots were frosted at 9<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> of November. On each day the three target temperatures were assigned randomly to the three climate chambers.

In addition to the excised shoots 8 whole plants per population and temperature were treated analog to the shoots at the same time to determine the long term behavior after the experiment. To protect the roots of these so called “regeneration plants” their root ball was embedded with peat substrate in big tubs. Air and root ball temperature were measured with temperature loggers (iButton DS1922L-F5, Maxim Integrated). After frost treatment the plants were planted out in the field and survival was observed.

### Sampling

After exposure to the different temperatures, a 3 cm-long segment of each shoot tip was taken to measure relative electrolyte leakage (REL). The rest of each shoot was used for analysis of biomarkers (proline, glucose, fructose, sucrose and starch) and N-, P- and K- content. To stop enzymatic activity each shoot was cut into small pieces and treated in a microwave for 2.5 minutes at 700 watt. Then the plant material was dried for nutrient and carbohydrate/proline analyses at 70 °C and 60 °C, respectively and milled by a planetary ball mill (PM 100, Retsch).

### Frost damage

Frost damage was measured by relative electrolyte leakage (REL) according to the method of McKay (1992). Tips of shoots were rinsed with distilled water to remove surface ions and inserted into glass vessels (one shoot tip per glass) containing 30 ml distilled water of a known conductivity. The vessels were capped and stored at room temperature. After 24 h they were shaken by hand and the initial electrical conductivity ( $L_{1t}$ ) of the solution was measured by a conducting meter (WTW, LF 197-S). To degrade the membranes totally capped vessels were stored in an oven at 70 °C for 24 h. After cooling the solution to room temperature the final electric conductivity ( $L_{2t}$ ) was measured. REL for a given temperature ( $R_t$ ) was calculated by:

$$R_t = L_{1t} / L_{2t}$$

To adjust REL of the frozen samples to REL of the unfrozen samples of each population index of injury ( $I_t$ ) at temperature  $t$  was calculated according to Flint et al. (1967):

$$I_t = 100 (R_t - R_0) / (1 - R_0)$$

where:

$R_0$  : Mean relative electrolyte leakage of unfrozen control samples of respective population.

$R_t$  : relative electrolyte leakage of sample frozen at temperature  $t$ .

### Proline analyses

Free proline was analysed spectro-photometrically using a modified ninhydrin method of Bates et al. (1973). 50 mg of plant material of shoots were extracted with 1.8 ml sulfosalicylic acid (3%). After centrifugation (14800 rpm) for 15 minutes, 150  $\mu$ l of supernatant, 90  $\mu$ l

glacial acid and 90  $\mu\text{l}$  of acid ninhydrin were cooked for 45 minutes and extracted with 1.5 ml toluol by mixing and shaking. 200  $\mu\text{l}$  of toluol phase was pipette in a quartz-microplate and absorbance was read at 520 nm with microplate spectrophotometer (Molecular Devices, VersMax ELISA). Proline concentration was determined from a standard curve and calculated on dry weight (DW) basis ( $\text{mg g}^{-1}$  DW).

### Carbohydrate analysis

Analyses of carbohydrates were carried out after a modified method of Zhao et al. (2010). 30 mg of plant material was extracted three times with hot (80 °C) ethanol:water (80:20 (v/v)). After centrifugation the supernatants were combined and analyzed enzymatically for glucose, fructose and sucrose in a microplate with glucose as standard. 20  $\mu\text{l}$  of sample-extract was combined with 200  $\mu\text{l}$  of tri-acetate-buffer including 1  $\text{mg ml}^{-1}$  NADP, 5  $\text{mg ml}^{-1}$  ATP and 5  $\text{mg ml}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ . After adding 10  $\mu\text{l}$  of hexokinase/glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 15 minutes of incubation at 30 °C absorbance was read at 340 nm (E1) by a microplate spectrophotometer (Molecular Devices, VersMax ELISA). Afterwards 10  $\mu\text{l}$  of phosphoglucose isomerase was added and after incubation for 15 minutes at 30 °C absorbance was read at 340 nm (E2). The last read (E3) was done after adding 20  $\mu\text{l}$  of  $\beta$ -fructosidase and incubating for 60 minutes at 30 °C. Calculation of the glucose equivalents was done with the glucose standard curve and respective sugar was calculated as follows:

Glucose [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]: E1

Fructose [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]: E2-E1

Sucrose [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]: (E3-E2)\*0.96

Results were calculated on dry weight basis ( $\text{mg g}^{-1}$  DW).

After extraction the remaining pellet was used for starch analysis (Boehringer, 1984). For this the pellet was solved in NaOH (0.5 M) and incubated at 60 °C for 30 minutes. To adjust pH-value to 4.6-4.8 glacial acid was added. After centrifugation at 5000 rpm for 5 minutes supernatant (10  $\mu\text{l}$ ) was pipetted to a microplate and combined with amyloglucosidase. Extinction (E1) was read at 340 nm after adding tri-acetate-buffer and incubation for 60 minutes at 30 °C. Extinction (E2) was read at 340 nm after adding hexokinase/glucose-6-phosphate-dehydrogenase and incubation at 30 °C for 15 minutes. Starch concentration was determined by glucose based standard curve calculated on dry weight basis ( $\text{mg g}^{-1}$  DW).

### Bud set assessment

To assess bud set 54 plants of each population were evaluated from 10<sup>th</sup> October to 9<sup>th</sup> of December. Bud set was divided into 5 classes by shape, length and color of terminal and axillary buds (NW-FVA) For *Quercus robur*: (1) terminal bud 2 mm in length and obtuse coned, axillary buds initiated; (2) terminal bud unchanged, axillary buds 1 mm in length and round; (3) terminal bud 3 mm in length and triangular, axillary buds 2 mm in length and acuminate; (4) terminal bud 5 mm in length and acute coned; axillary buds 3-4 mm in length; (5) terminal bud 9 mm in length and acute coned, axillary buds 5-7 mm in length.

For *Tilia cordata*: (1) Active growth, no terminal bud; (2) little acuminate terminal bud, bright green; (3) little acuminate-shaped terminal bud, bright green, one bud-scale visible; (4) terminal bud starts to round up and coloring brownish, two bud-scales visible; (5) terminal bud round, colored red, three bud-scales visible. Bud setting stage is calculated as mean of bud set classes of each population and evaluation.

### Statistics

Statistical analyses were performed with statistic software R 3.0.3 (R Core Team, 2014) with additional package 'multcomp' (Hothorn et al., 2008). Bud set assessment data were analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey all-pair comparison with provenance as factor. Index of injury and biochemical parameters were analysed by two-way ANOVA and Tukey all-pair comparison with provenance and treatment as factors. Data were checked for heterogeneity of variance and normal distribution and if necessary logarithmic transformed to satisfy requirements of ANOVA.

## Results

### Phenology

For none of the populations of *Quercus robur* bud set was complete (all plants with bud set class 5) until the end of assessment at December 9<sup>th</sup> 2011 (data not shown). However, HU showed a delayed formation of buds compared with the German populations, which did not differ among each other. Averaged, bud setting stage at the time of early frost experiment (9<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup> November) was higher for the German populations of *Quercus robur* (3.9) compared to the Hungarian (2.8) one (data not shown).

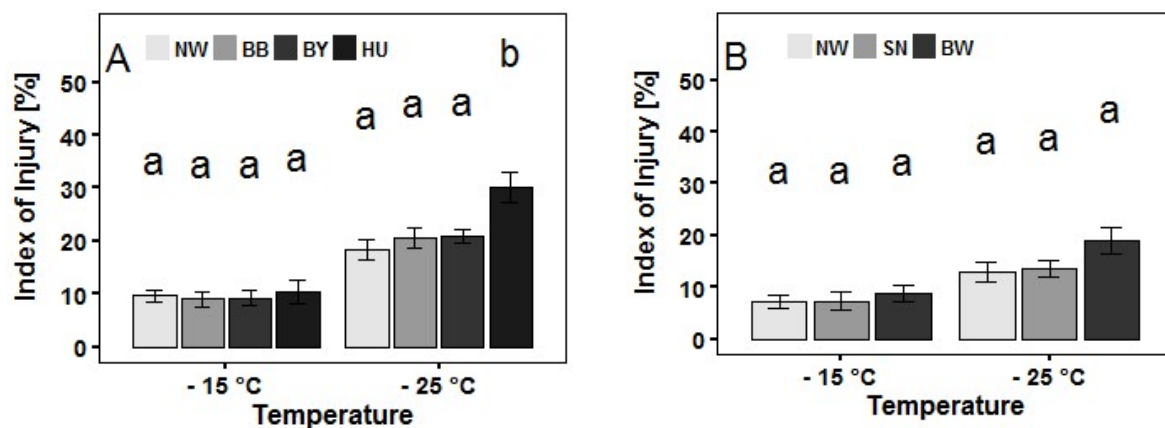
All populations of *Tilia cordata* showed complete bud setting (all plants with bud set class 5) at the end of assessment at December 9<sup>th</sup> 2011 (data not shown). Already at the time of early frost experiment the populations NW, SN and BW almost set buds completely with 4.9 of bud

setting stage (data not shown). For *Tilia cordata* there were no interpopulation differences in the course of bud setting and bud setting stage at the date of early frost experiment.

### Frost damage

In our frost experiment,  $I_t$  of shoot tips in November 2011 was relatively low (Figure 2). For *Quercus robur* values of only 8.9 – 10.4 % were reached at -15 °C and 18.4 - 30 % at -25 °C. The German populations did not differ among each, neither at -15 °C nor at -25 °C. Only at -25 °C the Hungarian population significantly differed from the German ones showing higher  $I_t$ . For *Tilia cordata*  $I_t$  was even lower with 7.1 – 8.9 % at -15 °C and 12.9 – 19.1 % at -25 °C (Figure 2). Comparison of *Tilia cordata* populations showed higher  $I_t$  for BW (8.9 %) than SN (7.3 %) and NW (7.1 %) at -15 °C and also at -25 °C with 19.1 %, 13.7 % and 12.9 %, respectively. Nevertheless these differences are marginal and not significant.

Long term assessment of regeneration plants showed die back of the upper shoot tips but no differences among populations neither for *Tilia cordata* nor for *Quercus robur* occurred (data not shown). All plants survived frost treatment down to -25 °C and flushed in spring 2012.



**Figure 2 (Publikation I):** Mean index of injury [%] ( $\pm$  standard error) for different populations of *Quercus robur* (A) and *Tilia cordata* (B) at two different frost treatments in early November 2011. Different lower case letters indicate significant differences between populations ( $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ ).

### Biochemical parameters

Temperature partially affected biochemical parameters of *Quercus robur* populations (Table 2). Following frost of -25 °C, all populations showed a tendency to have higher glucose and fructose concentrations compared to 5 °C-treatment. However, this was only significant for population BY. In contrast, at -15 °C treatment compared to 5 °C, glucose and fructose concentrations decreased except for population BY. By trend all populations showed a decrease in sucrose concentration with decreasing temperature. But this was only significant

---

for population BB. Starch and proline concentration was not affected by temperature. In none of the treatments a significant difference in glucose, fructose and sucrose between the populations occurred. However, such differences partially could be detected for starch and proline concentrations. BB had higher starch concentration than NW at - 25 °C. At - 25 °C HU had significantly higher proline concentration compared to all other populations, while at -15 °C this was significant only compared to NW and BB.

For *Tilia cordata* the biochemical parameters (glucose, fructose, sucrose, starch and proline concentration) were not significantly affected by the frost treatments (Table 3). However, differences between populations within one treatment existed. There was a trend of higher soluble sugar concentration of BW compared with the other populations, but without being significant consistently. While BW differed significantly from NW in fructose at -15 °C and - 25 °C, significant differences for glucose and sucrose were found only at -25 °C with SN. In contrast to soluble sugars, the starch and proline concentrations did not differ between populations.

**Table 2 (Publikation I):** Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$  standard error) in shoot tips of four populations of *Quercus robur* after treatment at different temperatures. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ ).

	Temperature					
	5 °C		- 15 °C		- 25 °C	
	Glucose [mg g <sup>-1</sup> DW]					
<b>NW</b>	6.0 $\pm$ 1.1	a,A	4.3 $\pm$ 0.7	a,A	6.7 $\pm$ 0.8	a,A
<b>BB</b>	5.0 $\pm$ 0.9	a,A	4.6 $\pm$ 0.6	a,A	6.9 $\pm$ 0.9	a,A
<b>BY</b>	3.0 $\pm$ 0.6	a,A	4.4 $\pm$ 0.7	a,AB	5.2 $\pm$ 0.7	a,B
<b>HU</b>	5.3 $\pm$ 1.1	a,A	4.8 $\pm$ 0.7	a,A	7.8 $\pm$ 1.1	a,A
	Fructose [mg g <sup>-1</sup> DW]					
<b>NW</b>	6.7 $\pm$ 1.1	a,A	5.4 $\pm$ 0.8	a,A	8.4 $\pm$ 0.8	a,A
<b>BB</b>	6.8 $\pm$ 1.0	a,A	6.6 $\pm$ 0.6	a,A	8.8 $\pm$ 1.1	a,A
<b>BY</b>	4.5 $\pm$ 0.6	a,A	6.2 $\pm$ 0.8	a,AB	7.5 $\pm$ 0.8	a,B
<b>HU</b>	7.0 $\pm$ 1.3	a,A	5.8 $\pm$ 0.7	a,A	9.1 $\pm$ 1.3	a,A
	Sucrose [mg g <sup>-1</sup> DW]					
<b>NW</b>	23.4 $\pm$ 2.7	a,A	22.0 $\pm$ 1.9	a,A	21.6 $\pm$ 1.2	a,A
<b>BB</b>	27.1 $\pm$ 3.0	a,A	23.7 $\pm$ 2.2	a,AB	18.0 $\pm$ 1.4	a,B
<b>BY</b>	25.9 $\pm$ 1.8	a,A	23.9 $\pm$ 2.2	a,A	21.5 $\pm$ 1.4	a,A
<b>HU</b>	25.2 $\pm$ 1.1	a,A	20.4 $\pm$ 2.6	a,A	22.0 $\pm$ 2.6	a,A
	Starch [mg g <sup>-1</sup> DW]					
<b>NW</b>	47.6 $\pm$ 2.5	a,A	47.5 $\pm$ 2.0	a,A	42.5 $\pm$ 1.8	a,A
<b>BB</b>	47.9 $\pm$ 3.2	a,A	47.9 $\pm$ 4.1	a,A	54.1 $\pm$ 2.8	b,A
<b>BY</b>	50.8 $\pm$ 2.4	a,A	46.6 $\pm$ 3.0	a,A	50.8 $\pm$ 2.4	ab,A
<b>HU</b>	46.2 $\pm$ 3.1	a,A	47.3 $\pm$ 2.6	a,A	44.1 $\pm$ 3.3	ab,A
	Proline [mg g <sup>-1</sup> DW]					
<b>NW</b>	2.3 $\pm$ 0.6	a,A	2.1 $\pm$ 0.6	a,A	2.2 $\pm$ 0.2	a,A
<b>BB</b>	2.7 $\pm$ 0.6	a,A	1.9 $\pm$ 0.6	a,A	2.4 $\pm$ 0.5	a,A
<b>BY</b>	2.5 $\pm$ 0.5	a,A	3.1 $\pm$ 0.6	ab,A	2.6 $\pm$ 0.5	a,A
<b>HU</b>	4.3 $\pm$ 0.9	a,A	6.1 $\pm$ 1.2	b,A	5.7 $\pm$ 0.9	b,A

**Table 3 (Publikation I):** Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$  standard error) in shoot tips of three populations of *Tilia cordata* after treatment at different temperatures. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ ).

		Temperature				
		5 °C	- 15 °C		- 25 °C	
		Glucose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	2.4 $\pm$ 0.4	a,A	2.2 $\pm$ 0.3	a,A	2.3 $\pm$ 0.3	ab,A
SN	2.1 $\pm$ 0.3	a,A	1.8 $\pm$ 0.3	a,A	1.7 $\pm$ 0.2	a,A
BW	2.8 $\pm$ 0.6	a,A	2.4 $\pm$ 0.4	a,A	3.2 $\pm$ 0.5	b,A
		Fructose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	1.8 $\pm$ 0.3	a,A	1.6 $\pm$ 0.2	a,A	2.0 $\pm$ 0.2	a,A
SN	2.9 $\pm$ 0.4	a,A	2.7 $\pm$ 0.3	b,A	2.7 $\pm$ 0.2	ab,A
BW	3.1 $\pm$ 0.6	a,A	3.1 $\pm$ 0.6	b,A	3.8 $\pm$ 0.5	b,A
		Sucrose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	47.6 $\pm$ 1.2	a,A	47.6 $\pm$ 2.8	a,A	44.1 $\pm$ 1.5	ab,A
SN	47.7 $\pm$ 2.4	a,A	44.8 $\pm$ 2.8	a,A	43.9 $\pm$ 2.7	a,A
BW	54.4 $\pm$ 3.8	a,A	52.4 $\pm$ 1.4	a,A	52.8 $\pm$ 2.8	b,A
		Starch [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	12.6 $\pm$ 4.1	a,A	15.1 $\pm$ 1.4	a,A	9.7 $\pm$ 1.6	a,A
SN	7.6 $\pm$ 1.0	a,A	10.6 $\pm$ 1.9	a,A	8.9 $\pm$ 1.7	a,A
BW	11.5 $\pm$ 1.9	a,A	19.0 $\pm$ 6.1	a,A	18.9 $\pm$ 4.6	a,A
		Proline [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	0.40 $\pm$ 0.14	a,A	0.47 $\pm$ 0.16	a,A	0.20 $\pm$ 0.03	a,A
SN	0.22 $\pm$ 0.06	a,A	0.22 $\pm$ 0.05	a,A	0.39 $\pm$ 0.12	a,A
BW	0.57 $\pm$ 0.19	a,A	0.44 $\pm$ 0.12	a,A	0.19 $\pm$ 0.06	a,A

## Discussion

### Phenology

German populations of *Quercus robur* did not differ significantly in their bud set behavior. However, the most southern population of *Quercus robur*, HU, showed a delayed bud set compared with the German populations after transfer to the northern experimental site of Hannover. In this case our results are consistent with findings of many other plant species, i.e. *Betula pendula* (Li et al., 2005; Viherä-Aarnio et al., 2006), *Populus tremula* (Ingvarsson et al., 2006) and *Ulmus laevis* (Whiteley et al., 2003) showing a shorter CDL for bud set for



southern populations. Also population BY was expected to show later bud set than the other German populations. Maybe this was not the case because the effect of southern latitude was substituted by the effect of higher altitude (350 m) at population origin. A shorter growing season at higher altitude resulting in earlier bud set in autumn is also described by Vitasse et al. (2009b) for *Fagus sylvatica* and *Quercus petraea*. Populations of *Tilia cordata* did not differ significantly in the timing of bud set. Basler and Körner (2012) only found a marginal significant ( $p=0.064$ ) effect of photoperiod for bud burst of *Tilia cordata*. Maybe this is true in general for photoperiodic responses of *Tilia cordata* including bud set in autumn. In addition, also for population BW the interaction between altitude and latitude might be the reason for no differences in timing of bud set among the populations in our study.

The literature cited above, finding a latitudinal cline for bud set, were carried out in Scandinavia and covered a huge geographic range of 7 – 13 latitudinal degrees. German populations in our study covered a smaller geographic range of approximately 3 latitudinal degrees for *Quercus robur* as well as *Tilia cordata*. The relative small geographic magnitude between the populations in the current study might also be a reason for no phenological differentiation.

### **Frost damage**

For *Quercus robur* as well as for *Tilia cordata* no significant differences among German populations in  $I_t$  occurred. Significant differences in  $I_t$  were only found for the Hungarian population of *Quercus robur* at  $-25\text{ °C}$  compared with the German ones. Regarding the bud set assessment this could have been expected because phenology and frost hardiness are intimately linked (Morin et al., 2007). A relation between bud set and early frost hardiness existing in our study was also indicated by Jensen and Deans (2004) for *Quercus robur*, Deans and Harvey (1995) for *Quercus petraea* and Whiteley et al. (2003) for *Ulmus laevis*.

$I_t$  of both target species was relatively low in the current study. This was surprising because of the young plant material and because  $-25\text{ °C}$  is a very uncommon temperature in Germany especially in November. Nevertheless, the low values of  $I_t$  lead to die back symptoms of the upper shoot tips at the regeneration plants. However, all regeneration plants of *Tilia cordata* as well as of *Quercus robur* survived frost treatment down to  $-25\text{ °C}$  in November and flushed in spring 2012. These results indicate a high early frost hardiness of German populations of the target species already at seedling stage.

### Biochemical parameters

For *Quercus robur* average glucose, fructose, sucrose and starch concentrations of the unfrozen control are similar with findings of other authors (e.g. Morin et al., 2007) in November. Abod and Webster (1991) measured seasonal variations in stem soluble sugar (glucose, fructose, sucrose) and starch concentration of young *Tilia cordata* seedlings. Their results of soluble sugars in November are very similar to our findings in unfrozen control. However, starch concentration in our study is a little bit lower than findings of Abod and Webster (1991). In general, this indicates a normal hardening process of *Quercus robur* and *Tilia cordata* seedlings in our study.

We expected higher concentration of soluble carbohydrates and lower starch concentrations in northern populations because of earlier initiation of cold acclimation (Li et al., 2002; Savolainen et al., 2007; Aitken et al., 2008; Dauwe et al., 2012). However, this was not the case in our study. Morin et al. (2007) found interpopulation differences for *Quercus robur* populations in cold hardiness, soluble carbohydrates and starch concentrations during early hardiness due to differences in phenology of the populations. In our study no differences in phenology occurred between German populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* and no differences in soluble sugar and starch concentrations for the unfrozen control was found. Also HU, while showing a delayed bud set, did not differ significantly in any measured biochemical compound compared to the other populations in the unfrozen control. Regarding the measured biochemical parameters these results indicate that prior to the stress treatments the German populations of *Quercus robur* as well as *Tilia cordata* showed the same level of physiological cold acclimation even though originating from different geographic and climatic conditions.

During the stress treatments, with exception of population BB and BY of *Quercus robur* no changes in soluble carbohydrate, starch and proline concentration occurred. In the literature an increase of soluble carbohydrate and proline concentrations and a decrease of starch concentration due to freezing stress is described for many plant species (e.g. Palonen, 1999; Strimbeck et al., 2008). Only BB, having the lowest initial concentration for fructose and glucose, reacted with an increase in these sugar concentrations to the frost treatments. It might be that the higher initial concentrations of the other populations were sufficient to survive our stress conditions without an energy consuming production of cryoprotective solutes.

Interestingly, after stress treatment the Hungarian population of *Quercus robur* showed significant higher proline concentration than the German ones. But HU also showed by trend higher proline concentrations in the unfrozen control even though it showed a delayed bud set. In contrast to findings of other studies (e.g. Aslamarz et al., 2011) higher proline concentration of HU in November did not lead to higher frost tolerance. However, in studies

with *Arabidopsis thaliana* (Murelli et al., 1995) and barley (Wanner and Juntilla, 1999) also no direct correlation between proline concentration and cold acclimation could be pointed out. Concerning *Tilia cordata*, the populations partly showed significant differences for soluble carbohydrate concentrations after stress exposure. By trend BW showed the highest concentration of all soluble carbohydrates measured in the current study compared with the other populations, even though they did not differ in bud set. However, this did not lead to higher frost tolerance of BW. Morin et al. (2007) pointed out that total carbohydrate concentration of *Quercus robur* populations is related to maximum cold hardiness (January) but not necessarily to autumn and spring hardiness when the risk of freezing injury is lower. In their point of view cryoprotective active soluble carbohydrates at this time are rather allocated to processes such as cell growth or converted to starch. Our results indicate that for *Quercus robur* as well as for *Tilia cordata* populations, phenology rather than physiology was related to early frost hardiness.

### General Discussion

We did not find differences in bud set and early frost damage between German populations of the target species. Also no relation between climatic and geographic conditions at populations site of origin and measured parameters occurred. This could be due to different reasons:

1. Relatively small differences of climatic and geographic conditions at populations site of origin.
2. Interaction between counteracting factors (e.g. lower latitude vs. higher altitude) at population site of origin level off the resulting effect on the respective biological parameter (e.g. critical day length).
3. High adaptability of populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* to changing ecological conditions.

Other investigations, finding differences in phenology and early frost reactions between populations of a woody plant species, used populations originating from sites with bigger geographic and climatic differences (e.g. Li et al., 2005) or from sites varying in only one ecological factor (Vitasse, 2009a). Furthermore, trees have a high potential of phenotypic plasticity to withstand rapid environmental changes (Hamrick, 2004). Vitasse et al. (2010) describes this with respect to temperature changes for *Fagus sylvatica* and *Quercus petraea*.

However, the question if the small magnitude of ecological differences between population sites of origin, a substitution of counteracting ecological factors or a high phenotypic plasticity of our target species is the reason for the lack of essential differences in early frost

reactions cannot clearly be answered in this investigation. There was a very high standard deviation for almost all measured parameters within each population, sometimes higher than among populations. This indicates a high intrapopulation diversity and less interpopulation diversity of the target species which is also reviewed for woody plants in general by Hamrick (1992).

## Conclusion

The current study is one part of a research project about abiotic stress reactions (early frost, late frost and drought) of populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* in Germany. It indicates that local adaptation of the investigated populations of these species in Germany is not as strong and clear as the defined areas of origin assume.

Therefore, the partitioning of the six defined areas of origin for the use of woody plants in free nature of Germany has to be reconsidered. Also an exchange of plant material between adjacent defined areas of origin should be possible in case of a lack of suitable plant material. This would alleviate the expenditure for the acquisition of seed and improve the supply of planting stock.

To fully answer the question of local adaptation in German tree populations, further investigations are needed including more tree species, populations, adaptive traits and also genetic analyses.

## Acknowledgement

This project was financially supported by the tree nursery “Baumschule Lorenz von Ehren GmbH & Co. KG”. We thank Bernhard von Ehren for his expertise in many discussions, Dr. Andreas Wrede for the provision of plant material, and Dr. Daniel Gerhard for statistical support.

## References

Abod, S., & Webster, A. (1991). Carbohydrates and their effects on growth and establishment of *Tilia* and *Betula*: I. Seasonal changes in soluble and insoluble carbohydrates. *Journal of Horticultural Science*, 66(2), 235–246.

- 
- Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. a., Wang, T., & Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, 1(1), 95–111.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216.
- Aslamarz, A. A., Vahdati, K., Hassani, D., Rahemi, M., Mohammadi, N., & Leslie, C. (2011). Cold Hardiness and its Relationship with Proline Content in Persian Walnut. *European Journal of Horticultural Science*, 76(3), 84–90.
- Bano, A., Rehman, A., & Winiger, M. (2009). Altitudinal variation in the content of protein, proline, sugar and abscisic acid (ABA) in the alpine herbs from Hunza valley, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 41(4), 1593–1602.
- Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207.
- Biere, A., & Verhoeven, K. (2008). Local adaptation and the consequences of being dislocated from coevolved enemies. *New Phytologist*, 180(2), 265–268.
- BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit). (2012). Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze. BMU Refer. 13, 1–32.
- BNatSchG 2009. (Bundesnaturschutzgesetz vom 29. Juli 2009 (BGBl. I S. 2542), das durch Artikel 421 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist).
- Korrektur zu BNatSchG 2009 vom 07.03.2020: BNatSchG (Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege) (2010). Bundesnaturschutzgesetz vom 29.07.2009, in Kraft getreten am 01.03.2010, zuletzt geändert durch Art. 421 V v. 31.3.2015 (BGBl. I 1474). BGBl I:2542.
- Boehringer, S. A. (1984). *Methods of enzymatic food analysis using single reagents*. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.
- Campbell, R. K., & Sorensen, F. C. (1973). Cold-Acclimation in Seedling Douglas-Fir Related to Phenology and Provenance. *Ecology*, 54(5), 1148–1151.
- Christersson, L. (1978). The Influence of Photoperiod and Temperature on the Development of Frost Hardiness in Seedlings of *Pinus silvestris* and *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*, 44(3), 288–294.

- 
- Dauwe, R., Holliday, J., Aitken, S. N., & Mansfield, S. D. (2012). Metabolic dynamics during autumn cold acclimation within and among populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *The New Phytologist*, 194(1), 192–205.
- Deans, J., & Harvey, F. (1995). Phenologies of sixteen European provenances of sessile oak growing in Scotland. *Forestry*, 68(3), 265–274.
- Flint, H. L., Boyce, B. R., & Beattie, D. J. (1967). Index of injury-A useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. *Canadian Journal of Plant Science*, 47(2), 229–230.
- FoVG 2002. (Forstvermehrungsgutgesetz vom 22. Mai 2002 (BGBl. I S. 1658), das durch Artikel 414 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist).
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6(1-4), 95–124.
- Hamrick, J. (2004). Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197(1-3), 323–335.
- Heide, O. M. (1974). Growth and Dormancy in Norway Spruce Ecotypes (*Picea abies*) I. Interaction of Photoperiod and Temperature. *Physiologia Plantarum*, 30(1), 1–12.
- Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P.H., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50(3), pp.346–363.
- Howe, G. T., Aitken, S. N., Neale, D. B., Jermstad, K. D., Wheeler, N. C., & Chen, T. H. H. (2003). From genotype to phenotype : unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Canadian Journal of Botany*, 81(12), 1247–1266.
- Hufford, K. M. & Mazer, S. J. (2003). Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(3), 147–155.
- Hurme, P., Repo, T., Savolainen, O., & Pääkkönen, T. (1997). Climatic adaptation of bud set and frost hardiness in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Canadian Journal of Forest Research*, 27(5), 716-723.
- Ingvarsson, P. K., García, M. V., Hall, D., Luquez, V., & Jansson, S. (2006). Clinal variation in phyB2, a candidate gene for day-length-induced growth cessation and bud set, across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula*). *Genetics*, 172(3), 1845–1853.
- Jensen, J. S. & Deans, J. D. (2004). Late Autumn Frost Resistance of Twelve North European Provenances of *Quercus* Species. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 19(5), 390–399.

- 
- Junttila, O. (1980). Effect of photoperiod and temperature on apical growth cessation in two ecotypes of *Salix* and *Betula*. *Physiologia Plantarum*, 48(3), 347–352.
- Kawecki, T. J. (2008). Adaptation to Marginal Habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 321–342.
- Kempa, S., Krasensky, J., Dal Santo, S., Kopka, J., & Jonak, C. (2008). A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PloS One*, 3(12), e3935.
- Kim, Y. T., & Glerum, C. (1995). Seasonal free amino acid fluctuations in red pine and white spruce needles. *Canadian Journal of Forest Research*, 25(5), 697–703.
- Kleinschmit, J. (1993). Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Annals of Forest Science*, 50, 166–185.
- Kosová, K., Vítámvás, P., & Prášil, I. T. (2007). The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum*, 51(4), 601–617.
- Kozłowski, T. T., & Pallardy, S. G. (2002). Acclimation and Adaptive Responses of Woody Plants to Environmental Stresses. *The Botanical Review*, 68(2), 270–334.
- Kreyling, J., Thiel, D., Nagy, L., Jentsch, A., Huber, G., Konnert, M., & Beierkuhnlein, C. (2012). Late frost sensitivity of juvenile *Fagus sylvatica* L. differs between southern Germany and Bulgaria and depends on preceding air temperature. *European Journal of Forest Research*, 131(3), 717–725.
- Kreyling, J., Buhk, C., Backhaus, S., Hallinger, M., Huber, G., Huber, L., Jentsch, A., Konnert, M., Thiel, D., Wilmking, M., & Beierkuhnlein, C. (2014). Local adaptations to frost in marginal and central populations of the dominant forest tree *Fagus sylvatica* L. as affected by temperature and extreme drought in common garden experiments. *Ecology and Evolution*, 4(5), 594–605.
- Li, C., Puhakainen, T., Welling, A., Viherä-Aarnio, A., Ernstsén, A., Junttila, O., Heino, P., & Palva, E. T. (2002). Cold acclimation in silver birch (*Betula pendula*). Development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes. *Physiologia Plantarum*, 116(4), 478–488.
- Li, C., Welling, A., Puhakainen, T., Viherä-Aarnio, A., Ernstsén, A., Junttila, O., Heino, P., & Palva, E. T. (2005). Differential responses of silver birch (*Betula pendula*) ecotypes to short-day photoperiod and low temperature. *Tree Physiology*, 25(12), 1563–1569.

- McKay, H. M. (1992). Electrolyte leakage from fine roots of conifer seedlings: a rapid index of plant vitality following cold storage. *Canadian Journal of Forest Research*, 22(9), 1371–1377.
- Morin, X., Améglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Miglietta, F., & Chuine, I. (2007). Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, 27(6), 817–825.
- Murelli, C., Rizza, F., Albini, F. M., Dulio, A., Terzi, V., & Cattivelli, L. (1995). Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley. *Physiologia Plantarum*, 94(1), 87–93.
- Northwest German Forest Research Station (NW-FVA): without year.
- Oleksyn, J., Zytkowski, R., Karolewski, P., Reich, P. B., & Tjoelker, M. G. (2000). Genetic and environmental control of seasonal carbohydrate dynamics in trees of diverse *Pinus sylvestris* populations. *Tree Physiology*, 20(12), 837–847.
- Palonen, P. (1999). Relationship of seasonal changes in carbohydrates and cold hardiness in canes and buds of three red raspberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(5), 507–513.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rohde, A., Bastien, C., & Boerjan, W. (2011). Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiology*, 31(5), 472–482.
- Savolainen, O., Pyhäjärvi, T., & Knürr, T. (2007). Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 595–619.
- Schmidt, P. A. & Krause, A. (1997). Zur Abgrenzung von Herkunftsgebieten bei Baumschulgehölzen für die freie Landschaft. *Natur & Landschaft* 72,92-95.
- Strimbeck, G. R., Kjellsen, T. D., Schaberg, P. G., & Murakami, P. F. (2008). Dynamics of low-temperature acclimation in temperate and boreal conifer foliage in a mild winter climate. *Tree Physiology*, 28(9), 1365–1374.
- Vaartaja, O. (1954). Photoperiodic ecotypes of trees. *Canadian Journal of Botany*. 32(3), 392–399.



- 
- Viherä-Aarnio, A., Häkkinen, R., & Junttila, O. (2006). Critical night length for bud set and its variation in two photoperiodic ecotypes of *Betula pendula*, *Tree Physiology*, 26(8), 1013–1018.
- Vitasse, Y., Porté, A. J., Kremer, A., Michalet, R., & Delzon, S. (2009a). Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia*, 161(1), 187–198.
- Vitasse, Y., Delzon, S., Bresson, C. C., Michalet, R., & Kremer, A. (2009b). Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(7), 1259–1269.
- Vitasse, Y., Bresson, C. C., Kremer, A., Michalet, R., & Delzon, S. (2010). Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, 24(6), 1211–1218.
- Wanner, L., & Junttila, O. (1999). Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 120(2), 391–399.
- Whiteley, R., Black-Samuelsson, S., & Jansson, G. (2003). Within and between population variation in adaptive traits in *Ulmus laevis*, the European white elm. *Forest Genetics*, 10(4), 306–319.
- Zhao, D., MacKown, C. T., Starks, P. J., & Kindiger, B. K. (2010). Rapid Analysis of Nonstructural Carbohydrate Components in Grass Forage Using Microplate Enzymatic Assays. *Crop Science*, 50(4), 1537-1545.

### **3.2 Publikation II: “Late frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany”**

Publiziert als:

Selig, M., & Bohne, H. (2016). Late frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany. *European Journal of Horticultural Science*, 81(3), 157–164. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2016/81.3.4>

---

## “Late frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany”

M. Selig, H. Bohne

Institute for Horticultural Production Systems, Section Woody Plant and Propagation Physiology, Leibniz Universität Hannover, Germany

### Summary

The German government amended the Federal Nature Conservation Act (BNatSchG) in 2010 and six defined areas of origin were assigned (BMU, 2012) for the use of plants in free nature. The transfer of propagation material between them is forbidden from 1<sup>st</sup> March 2020. This should protect locally adapted tree populations from losing their adapted traits by hybridization with non-local populations. However, the question of local adaptation in woody species in Germany is not clearly demonstrated. To get nearer to the answer of this question the current study was carried out to investigate differences in late frost reactions among German populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* by artificial freezing shoots at – 6 °C and – 12 °C in April/May 2012. Bud burst was rated prior to the freezing experiments after transferring populations from different origins to Hannover, and frost damage, sugar, starch and proline concentration were measured afterwards. To estimate long term survival, whole plants were frozen simultaneously and then cultivated to investigate their regeneration ability. We did not find differences in bud burst and late frost hardiness of shoots between German populations of the target species. Differences in these traits only occurred in the Hungarian population of *Quercus robur* which exhibited higher grade of bud burst but lower frost damage. With few exceptions no biochemical differences occurred among populations of the target species and late frost hardiness was not affected. Regarding late frost reactions, local adaptation of German tree populations seem not to be as distinctive as the defined areas of origin assume.

Keywords: adaptation, bud burst, carbohydrates, index of injury, proline, provenances

### Significance of this study

*What is already known on this subject?*

The adaptation of woody plant populations to local ecological conditions can lead to different responses to abiotic stress, such as late frost. These adaptive traits can be lost by hybridization with non-local populations. However, the magnitude of local adaptation in German

populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* is not fully clear. Nevertheless from 1<sup>st</sup> March 2020 the Federal Nature Conversation Act forbids the planting of populations outside their newly defined areas of origin in free nature.

#### *What are the new findings?*

After transfer to the experimental site in Hannover and growth for one vegetation period, we did not find significant differences in bud burst between German populations of the target species. Also after artificial freezing at  $-6\text{ °C}$  and  $-12\text{ °C}$  in April/May 2012 no interpopulation differences in frost damage occurred. Differences in sugar, starch and proline concentrations were marginal and did not affect late frost hardiness.

#### *What is the expected impact on horticulture?*

Based on the results for possible risks due to late frost, local adaptation does not seem to be as distinctive as the defined areas of origin assume. An exchange of plant material between adjacent defined areas of origin should be possible in case of a lack of suitable plant material. This would alleviate the expenditure for the acquisition of seed for tree nurseries and improve the supply of planting stock.

## **Introduction**

Locally adapted populations of plant species are suggested to show higher fitness at their site of origin than non-locally adapted populations (Kreyling et al., 2014; Biere and Verhoeven, 2008). Adaptation to local ecological conditions took place over many generations by selective pressure (Bennie et al., 2010; Körner and Basler, 2010). But locally adapted tree populations underlie the risk of losing their adaptive traits by hybridization with non-local populations of the same species.

For silvicultural purposes in Germany locally adapted tree populations are used for a long time. This is prescribed by law (FoVG, 2002). Therefore Germany is divided into different numbers of provenance zones depending on the species. *Quercus robur* and *Tilia cordata* are two important species for silviculture and also for landscaping. To extend the use of locally adapted populations to the free nature, the German government amended the Federal Nature Conversation Act (BNatSchG) in 2010. “Free nature” in the BNatSchG is a juristic term and is defined as all non-built-up areas with exception of forestry and street vegetation (e.g. alley trees) (BMU, 2012). In the BNatSchG six “defined areas of origin” independent of the species were arranged according to a map of Schmidt and Krause (1997) based on ecological fundamental units (BMU, 2012). After a transition period until 1<sup>st</sup> March 2020 for a number of species (BMU, 2012), it is forbidden to use populations outside their defined area of origin

in the free nature without permission. This makes the production of woody plants due to the acquisition of propagation material and documentation more difficult and expensive. Furthermore, it could result in a lack of suitable plant material for tree nurseries and plantings in the landscape.

Local adaptation is a result of multiple traits (Aitken et al., 2008). Late frost tolerance is an important one. Kreyling et al. (2012) found differences in late frost sensitivity of *Fagus sylvatica* populations with a positive correlation between minimum May temperature of origin and late frost damage.

Late frost tolerance is, among other factors, related to the release of dormancy and timing of bud burst in spring (Vitasse et al., 2009a; Caffarra and Donnelly, 2011; Kreyling et al., 2014). Tree species in temperate climates synchronize their growth cycle to favorable climatic conditions. The timing of dormancy release and bud burst in spring is depending on factors like chilling requirement, heat requirement (forcing temperatures in ecodormancy phase) and, depending on successional status of tree species, photoperiod (Basler and Körner, 2012; Laube et al., 2014; Schueler and Liesebach, 2014; Way and Montgomery 2014). However, it is species-specific to which extent these factors have an effect, furthermore they can also differ on population level (Dantec et al., 2014).

Phenological and physiological traits are linked especially in autumnal cold acclimation and spring deacclimation. A clear metabolic dynamic with increasing concentrations of cryoprotective compounds (e.g. soluble sugars, proline) during hardening in autumn and decreasing concentrations during dormancy release in spring, is known for many deciduous tree species (Kasuga et al., 2007; Morin et al., 2007; Sivaci 2006; Ashworth et al., 1993). Because of the linkage between phenology and physiology it seems likely that interpopulation differences also exist for degradation of cryoprotective compounds during dormancy release in spring, but literature dealing with this question is rare. Morin et al. (2007) pointed out differences in soluble carbohydrate concentration during dehardening in spring among populations of *Quercus robur* and *Quercus pubescens*. These differences were related to the mean monthly temperature at the location of the sampled population. But Morin et al. (2007) took shoot samples at the population sites of origin. So the results did not answer the question of interpopulation differences after transfer to and growth at non local sites.

The use of local plant populations in free nature to conserve biological diversity and to avoid loss of local adaptation by hybridization with non local populations is discussed in many countries. However, to our knowledge, Germany is the only one which regulated this by law for free nature. Regarding the defined areas of origin in Germany the question arises whether the ecological differences are strong and consistent enough to generate locally adapted populations with respect to late frost reactions. By enlarging the data base, the results support careful consideration of this topic not only for the German situation.

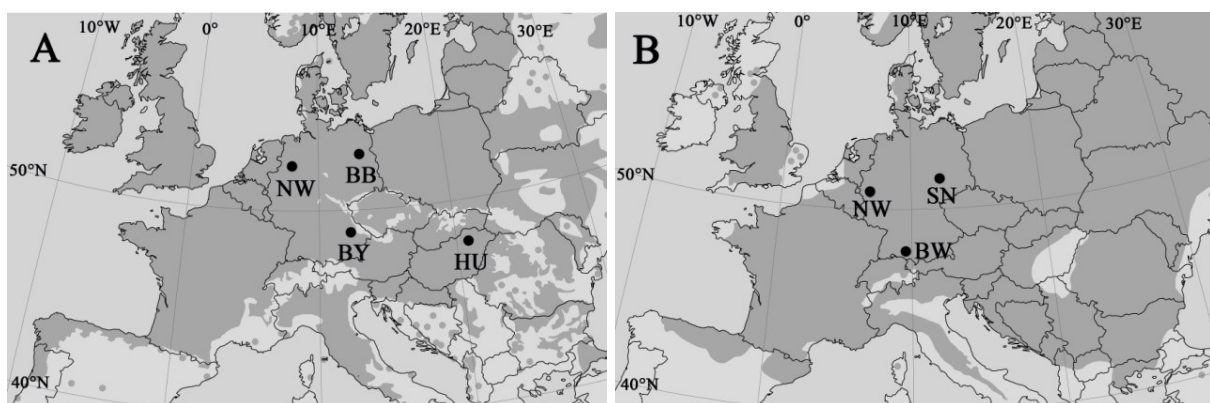
In this study it was investigated if populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* from three of the German defined areas of origin differ in their reaction to late frost events after transfer to and cultivation at the non local site in Hannover. To cover a larger geographic range one Hungarian population of *Quercus robur* was included.

## Material and Methods

### Plant material

In April 2011, three German populations of *Tilia cordata* and *Quercus robur* and one Hungarian population of *Quercus robur* were purchased from nurseries (Figure 1, Table 1). A certificate (prescription of FoVG) was provided to verify the local area of origin of the populations. Referring to § 40 BNatSchG (BMU, 2012) three defined areas of origin were included in the investigations. The populations of *Quercus robur* originated from the west (Nordrhein-Westfalen (NW)), east (Brandenburg (BB)) and south (Bayern (BY)) of Germany and from northwest of Hungary (near Tiszadob (HU)). *Tilia cordata* populations originated from west (Nordrhein-Westfalen (NW)), east (Sachsen (SN)) and south (Baden-Württemberg (BW)) of Germany.

The 2 years old seedlings were potted into 3 L containers (one plant per container) with peat as growing medium (Klasmann Deilmann) containing 0.8 g N L<sup>-1</sup> Substrate (Osmocote 8-9 M exact standard; 15% N, 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 11% K<sub>2</sub>O, 2% MgO (Everris GmbH)) and arranged in a randomized complete block design with two blocks per population outside on the container area at the experimental site in Ruthe (52°14'N, 9°49'E). In sum 54 containers with one plant per container, placed in a distance of 45 x 45 cm, were cultivated per population. The irrigation took place automatically with a drip irrigation system.



**Figure 1 (Publikation II):** Geographical distribution (dark grey) of *Quercus robur* (A) and *Tilia cordata* (B) and locations of the tested populations. Modified map of EUFORGEN (<http://www.euforgen.org/distribution-maps/>)

**Table 1 (Publikation II):** County, population code, latitude (LAT), longitude (LONG), altitude (ALT), mean spring (March – May) temperature ( $T_{\text{spr}}$ ) and mean April temperature ( $T_{\text{April}}$ ) of populations sites of origin. Climatic data are means from 1965-1990.

Species	County/Country	Code	LAT	LONG	ALT [m.a.s.l.]	$T_{\text{spr}}$ [°C]	$T_{\text{April}}$ [°C]
<i>Quercus robur</i>	Nordrhein-Westfalen	NW	N 51°55'	E 07°58'	60	8.7	8.1
	Brandenburg	BB	N 52°21'	E 14°06'	50	7.9	7.3
	Bayern	BY	N 48°45'	E 12°59'	350	7.9	7.7
	Hungary	HU	N 47°59'	E 21°10'	100	10.5	10.3
<i>Tilia cordata</i>	Nordrhein-Westfalen	NW	N 50°40'	E 07°03'	160	8.9	8.2
	Sachsen	SN	N 51°21'	E 12°20'	110	8.4	7.9
	Baden-Württemberg	BW	N 47°51'	E 09°38'	450	7.3	6.9

### Climate chamber conditions

At each date (24 April, 2 and 8 May 2012), three shoots (length approximately 30 cm) per plant were cut from nine randomly selected plants of each population. The resulting 27 shoots per population were randomly divided into three groups (nine shoots per group) and placed into plastic bags. Afterwards, each group was arranged randomly in one of the three climate chambers (Vötsch Industrietechnik, Modell VTZ 3008/S). Freezing temperatures in the climate chambers were -6 °C and -12 °C; the control was kept at 5 °C. The temperature was decreased by 5 °C per hour starting at 5 °C, the minimum temperature was held for 8 hours and then was increased by 5 °C per hour to 5 °C. On each day, the three target temperatures were assigned randomly to the three climate chambers.

In addition to the excised shoots at each date, three whole plants per population and temperature were treated analog to the shoots at the same time to determine their regeneration ability after the frost treatments. To protect the roots of these so called “regeneration plants” their root ball was embedded with peat substrate in big tubs prior to their exposure to the assigned temperature. Air and root ball temperature were measured with temperature loggers (iButton DS1922L-F5, Maxim Integrated). After frost treatment the plants were planted out in the field and survival was recorded.

### Sampling

After exposure to the different temperatures, a 3 cm-long segment of each shoot tip was taken to measure relative electrolyte leakage (REL). The rest of each shoot was used for analysis of biomarkers (proline, glucose, fructose, sucrose and starch) and N-, P- and K- content. To stop enzymatic activity each shoot was cut into small pieces and treated in a microwave for 2.5

minutes at 700 watt. Then the plant material was dried for nutrient and biomarker analyses at 70 °C and 60 °C, respectively, and milled by a planetary ball mill (PM 100, Retsch).

### **Frost damage**

Frost damage was measured by relative electrolyte leakage (REL) according to the method of McKay (1992). Tips of shoots were rinsed with distilled water to remove surface ions and inserted into glass vessels (one shoot tip per glass) containing 30 ml distilled water of a known conductivity. The vessels were capped and stored at room temperature. After 24 h they were shaken by hand and the initial electrical conductivity ( $L_{1t}$ ) of the solution was measured by a conducting meter (WTW, LF 197-S). To degrade the membranes totally capped vessels were stored in an oven at 70 °C for 24 h. After cooling the solution to room temperature the final electric conductivity ( $L_{2t}$ ) was measured. REL ( $R_t$ ) for a given temperature was calculated by:

$$R_t = L_{1t} / L_{2t}$$

Index of injury ( $I_t$ ) at temperature  $t$  was calculated according to FLINT et al. (1967):

$$I_t = 100 (R_t - R_0) / (1 - R_0)$$

where:

$R_0$  : relative electrolyte leakage of unfrozen control sample.

$R_t$  : relative electrolyte leakage of sample frozen at temperature  $t$ .

### **Proline analyses**

Free proline was analyzed spectrophotometrically using a modified ninhydrin method of Bates et al. (1973). 50 mg of plant material of shoots were extracted with 1.8 ml sulfosalicylic acid (3%). After centrifugation (14800 rpm) for 15 minutes, 150  $\mu$ l of supernatant, 90  $\mu$ l glacial acid and 90  $\mu$ l of acid ninhydrin were cooked for 45 minutes and extracted with 1.5 ml toluol by mixing and shaking. 200  $\mu$ l of toluol phase was pipetted in a quartz-microplate and absorbance was read at 520 nm with VersaMax Microplate reader (Molecular Devices, VersMax ELISA). Proline concentration was determined from a standard curve and calculated on dry weight (DW) basis ( $\text{mg g}^{-1}$  DW).

### **Carbohydrate analysis**

Analyses of carbohydrates were carried out following a modified method of Zhao et al. (2010). Initially, 30 mg of plant material was extracted three times with hot (80 °C) ethanol and water mixture (80:20 (v/v)). After centrifugation the supernatants were combined and analyzed enzymatically for glucose, fructose and sucrose in a microplate with glucose as



standard. 20  $\mu\text{l}$  of sample-extract was combined with 200  $\mu\text{l}$  of Tri-acetate-buffer including 1  $\text{mg ml}^{-1}$  NADP, 5  $\text{mg ml}^{-1}$  ATP and 5  $\text{mg ml}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ . After adding 10  $\mu\text{l}$  of hexokinase/glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 15 minutes of incubation at 30 °C absorbance was read at 340 nm (E1). Afterwards 10  $\mu\text{l}$  of phosphoglucose isomerase was added and after incubation for 15 minutes at 30 °C absorbance was read at 340 nm (E2). The last read (E3, at 340 nm) was done after adding 20  $\mu\text{l}$  of  $\beta$ -fructosidase and incubating for 60 minutes at 30 °C. Calculation of the glucose equivalents was done with the glucose standard curve and respective sugar was calculated as follows:

Glucose [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]: E1

Fructose [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]: E2-E1

Sucrose [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]: (E3-E2)\*0.96

The remaining pellet after extraction was used for starch analysis.

Results were calculated on dry weight basis ( $\text{mg g}^{-1}$  DW).

After extraction the remaining pellet was used for starch analysis (Boehringer, 1984). For this the pellet was solved in NaOH (0.5 M) and incubated at 60 °C for 30 minutes. To adjust pH-value to 4.6-4.8 glacial acid was added. After centrifugation at 5460 x g for 5 minutes supernatant (10  $\mu\text{l}$ ) was pipetted to a microplate and combined with amyloglucosidase. Extinction (E1) was read at 340 nm after adding tri-acetate-buffer and incubation for 60 minutes at 30 °C. Extinction (E2) was read at 340 nm after adding hexokinase/glucose-6-phosphate-dehydrogenase and incubation at 30 °C for 15 minutes. Starch concentration was determined by glucose based standard curve calculated on dry weight basis ( $\text{mg g}^{-1}$  DW).

### **Bud burst assessment**

To assess bud burst 54 plants of each population were evaluated from 23 March to 4 May. Bud burst was divided into 5 classes (NW-FVA, without year). For *Quercus robur* and *Tilia cordata*: (1) terminal bud swollen; (2) terminal bud just opening; (3) leaf apexes visible; (4) leaf unfolding; (5) leaf fully expanded.

Phenological score is calculated as mean of bud burst classes of each population and evaluation.

### **Statistics**

Statistical analyses were performed with statistic software R 3.0.3 (R Core Team, 2014) with additional package 'multcomp' (Hothorn et al., 2008). Bud set assessment data were analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey all-pair comparison with provenance as factor. Index of injury and biochemical parameters were analyzed by two-way ANOVA and Tukey all-pair comparison with provenance and treatment as factors. Data were

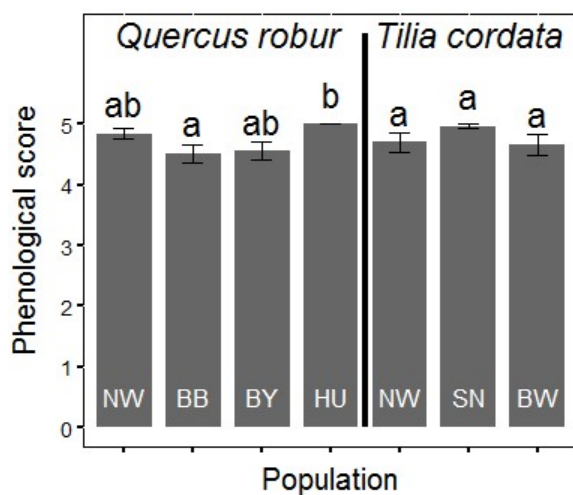
checked for heterogeneity of variance and normal distribution and if necessary logarithmic transformed to satisfy requirements of ANOVA.

## Results

### Phenology

At the time of late frost experiment (end of April) budburst was almost completed for all populations of *Quercus robur* with a phenological score from 4.5 to 5 for the four populations (Figure 2) and German populations did not significantly differ among each other in phenology. The Hungarian population showed an advanced bud burst compared with the German ones but this was only significant between HU and BB.

Populations of *Tilia cordata* showed almost completed flushing but did not differ significantly among each other in phenological score (Figure 2).



**Figure 2 (Publikation II):** Phenological score for different populations of *Tilia cordata* and *Quercus robur* at end of April. Different lower case letters indicate significant differences between populations. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=54$ )

### Physiology

For *Quercus robur* higher glucose and fructose concentrations occurred at frost treatments (Table 2), except for glucose concentration of population BY and HU at  $-6$  °C treatment. NW and HU showed lower sucrose concentrations at  $-12$  °C compared with the  $5$  °C treatment. Starch concentrations did not differ between the treatments for German populations. Only HU had higher starch concentrations at  $-6$  °C treatment compared to the

control treatment. Interpopulation differences only occurred for proline at  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  with lower concentration of NW compared with population HU.

For *Tilia cordata* BW showed higher glucose and fructose concentration at  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  treatment compared to NW (Table 3). Apart from that no significant interpopulation differences occurred. Temperature effects only occurred for glucose and fructose concentrations. NW had higher glucose concentrations at  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  compared to the other treatments. For fructose concentration this was true for both frost treatments compared with the  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  treatment. Also BW showed higher fructose concentration at  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Table 2 (Publikation II):** Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$  standard error) in shoot tips of four populations of *Quercus robur* after treatment at different temperatures in April 2012. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ ).

		Temperature				
		5 °C	- 6 °C	- 12 °C		
		Glucose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	7.95 ± 3.1	a,A	16.65 ± 3.7	a,B	15.73 ± 3.2	a,B
BB	4.41 ± 1.4	a,A	10.62 ± 1.1	a,B	14.08 ± 3.7	a,B
BY	7.79 ± 1.8	a,A	13.65 ± 2.4	a,A	11.85 ± 1.9	a,A
HU	6.68 ± 1.5	a,A	9.42 ± 1.7	a,AB	11.31 ± 1.3	a,B
		Fructose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	5.87 ± 1.7	a,A	17.92 ± 3.8	a,B	16.31 ± 3.1	a,B
BB	3.00 ± 0.7	a,A	11.16 ± 1.7	a,B	13.11 ± 3.1	a,B
BY	4.51 ± 0.8	a,A	13.36 ± 2.8	a,B	11.46 ± 2.5	a,B
HU	6.01 ± 1.4	a,A	15.60 ± 2.9	a,B	16.03 ± 1.9	a,B
		Sucrose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	36.36 ± 8.5	a,A	14.54 ± 6.0	a,AB	18.83 ± 7.9	a,B
BB	23.28 ± 6.8	a,A	10.48 ± 4.8	a,A	11.44 ± 4.9	a,A
BY	29.94 ± 8.1	a,A	11.40 ± 3.6	a,A	12.32 ± 4.5	a,A
HU	37.62 ± 6.2	a,A	27.21 ± 8.8	a,AB	14.08 ± 3.8	a,B
		Starch [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	2.79 ± 0.5	a,A	4.25 ± 1.8	a,A	5.53 ± 1.3	a,A
BB	3.04 ± 0.6	a,A	4.25 ± 1.5	a,A	4.30 ± 1.0	a,A
BY	6.60 ± 3.3	a,A	5.99 ± 2.0	a,A	3.92 ± 1.0	a,A
HU	3.06 ± 0.8	a,A	7.86 ± 2.1	a,B	3.35 ± 0.4	a,AB
		Proline [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	0.44 ± 0.1	a,A	0.48 ± 0.2	a,A	0.35 ± 0.1	a,A
BB	0.74 ± 0.1	a,A	1.25 ± 0.2	ab,A	0.94 ± 0.2	a,A
BY	0.82 ± 0.3	a,A	1.00 ± 0.3	ab,A	0.91 ± 0.2	a,A
HU	0.86 ± 0.3	a,A	1.32 ± 0.8	b,A	0.99 ± 0.5	a,A

**Table 3 (Publikation II):** Mean concentration of glucose, fructose, sucrose, starch and proline ( $\pm$  standard error) in shoot tips of three populations of *Tilia cordata* after treatment at different temperatures in April 2012. Different lower case letters indicate significant differences between populations. Significant differences between temperatures for the same population are indicated by capitals. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ ).

		Temperature				
		5 °C	- 6 °C		- 12 °C	
		Glucose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	5.71 $\pm$ 1.1	a,A	11.41 $\pm$ 2.0	a,B	8.43 $\pm$ 1.2	a,AB
SN	9.72 $\pm$ 1.6	ab,A	11.92 $\pm$ 2.1	a,A	12.35 $\pm$ 1.8	a,A
BW	12.01 $\pm$ 1.9	b,A	15.90 $\pm$ 2.7	a,A	16.37 $\pm$ 3.2	a,A
		Fructose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	4.22 $\pm$ 0.8	a,A	10.35 $\pm$ 1.1	a,B	9.18 $\pm$ 0.9	a,B
SN	6.31 $\pm$ 0.7	ab,A	11.02 $\pm$ 1.6	a,A	10.34 $\pm$ 1.1	a,A
BW	8.28 $\pm$ 1.1	b,A	13.97 $\pm$ 2.0	a,AB	15.02 $\pm$ 2.2	a,B
		Sucrose [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	27.03 $\pm$ 7.6	a,A	21.99 $\pm$ 4.7	a,A	21.10 $\pm$ 4.9	a,A
SN	42.44 $\pm$ 7.9	a,A	29.54 $\pm$ 5.6	a,A	21.22 $\pm$ 5.2	a,A
BW	43.83 $\pm$ 8.2	a,A	25.39 $\pm$ 6.6	a,A	21.09 $\pm$ 3.1	a,A
		Starch [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	4.80 $\pm$ 2.5	a,A	5.99 $\pm$ 2.1	a,A	5.30 $\pm$ 1.2	a,A
SN	3.43 $\pm$ 0.7	a,A	6.05 $\pm$ 1.2	a,A	4.68 $\pm$ 1.5	a,A
BW	2.90 $\pm$ 0.8	a,A	8.08 $\pm$ 2.4	a,A	5.02 $\pm$ 0.8	a,A
		Proline [mg g <sup>-1</sup> DW]				
NW	0.77 $\pm$ 0.2	a,A	1.16 $\pm$ 0.3	a,A	0.83 $\pm$ 0.2	a,A
SN	0.99 $\pm$ 0.2	a,A	1.38 $\pm$ 0.5	a,A	0.88 $\pm$ 0.2	a,A
BW	0.98 $\pm$ 0.4	a,A	1.24 $\pm$ 0.5	a,A	1.21 $\pm$ 0.5	a,A

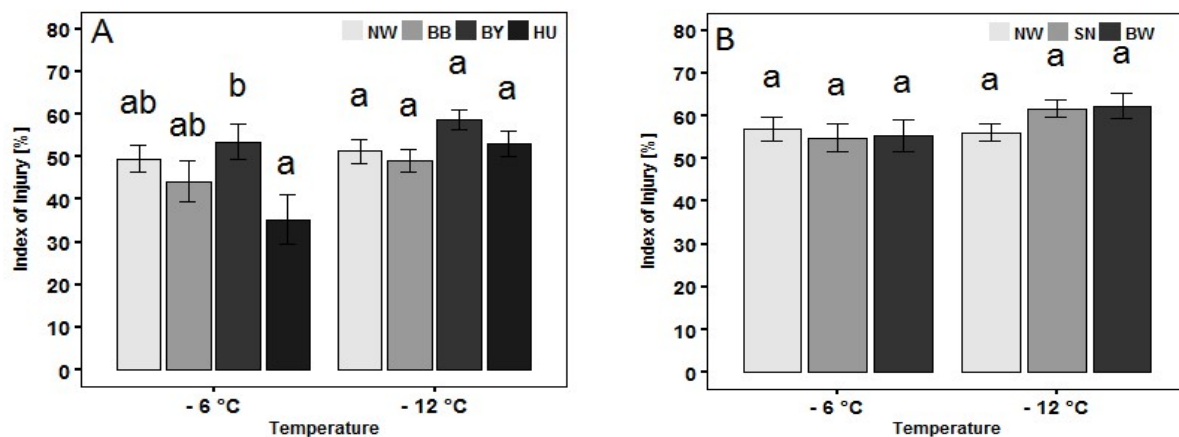
### Index of injury

Values of  $I_t$  for *Quercus robur* populations ranged from 36.4 % – 54.1 % at – 6 °C and 46.8 % - 58.5 % at – 12 °C. German populations did not differ significantly at any of the frost treatments even though BY showed by trend the highest  $I_t$ . However, BY had significant higher  $I_t$  compared with the Hungarian population at – 6 °C (Figure 3).

For *Tilia cordata*  $I_t$  ranged from 54.9 – 56.9 % at - 6 °C and 56.1 – 62.2 % at - 12 °C; but no significant interpopulation differences occurred at any of the frost treatments (Figure 3)

Visual long term assessment of regeneration plants showed die back of open buds and young leaves after – 12 °C treatment and partially after – 6 °C treatment. But no differences among populations neither for *Tilia cordata* nor for *Quercus robur* occurred (data not shown). Buds that still were closed during the late frost experiment, burst during cultivation after the frost

treatment, and all plants survived temperatures as low as  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ . There occurred no interpopulation differences in length and diameter increment, after regrowth (data not shown).



**Figure 3 (Publikation II):** Mean index of injury [%] ( $\pm$  standard error) for different populations of *Quercus robur* (A) and *Tilia cordata* (B) for two different frost treatments (average of 24<sup>th</sup> of April, 2<sup>nd</sup> and 8<sup>th</sup> of May). Different lower case letters indicate significant differences between populations ( $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ ).

## Discussion

### Phenology of *Quercus robur* and *Tilia cordata* populations in spring

Flushing for all populations of the target species was almost completed when the late frost experiment started. German populations of *Quercus robur* did not differ significantly in their spring phenology. However, population HU originating from the site with the warmest climate in April ( $T_{\text{April}} = 10.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) showed significantly higher phenological score (advanced bud burst) than BB originating from the coldest climate in April ( $T_{\text{April}} = 7.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). This behavior is also pointed out by Vitasse et al. (2009b) for *Quercus petraea* and *Fraxinus excelsior*. A reason for this might be the adaptation to later flushing in colder regions to avoid late frost damage to young leaves in spring. This later flushing is a result of higher heat requirement (warm temperatures during ecodormancy phase) rather than chilling requirement of populations from colder climate as pointed out by Dantec et al. (2014) for high (colder climate) and low (warmer climate) elevation populations of *Quercus petraea*. However, variation of  $T_{\text{Spr}}$  for German populations of *Quercus robur* in our study ( $7.3 - 8.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) is lower than that described by Dantec et al. (2014) ( $2.5 - 12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), resulting in only marginal differences in phenology among our populations.

For *Tilia cordata* no interpopulation differences occurred and no phenological cline regarding the population climate of origin could be pointed out. The absence of a phenological cline is

also reported for *Acer pseudoplatanus* by Vitasse et al. (2009b) due to high intrapopulation variance in phenological traits. This high intrapopulation variance in bud burst also existed in our experiment, albeit for both target species.

In general, late-successional tree species like *Quercus robur* and *Tilia cordata* are known as photoperiodic sensitive (Basler and Körner, 2012). Spring phenology of these species is, in addition to temperature, depending on day length because photoperiod is a more consistent factor for seasonality than temperature alone. But an adaptation to different day length (latitudinal cline) for bud burst among populations in the current study could not be found. Way and Montgomery (2014) reviewed photoperiodic sensitivity of different temperate tree species and concluded that different results in literature for a given species could be due to different fulfillment of chilling requirements. Laube et al. (2014) found out that photoperiodic sensitivity decreases with increasing fulfillment of chilling requirement. Also Schueler and Liesebach (2014) concluded for *Fagus sylvatica* that adaptations to local temperature regimes are much higher than adaptations to local light conditions, what is in consistence with our results.

### **Late frost hardiness of *Quercus robur* and *Tilia cordata* populations**

The investigated German populations of *Quercus robur* did not differ significantly among each other in  $I_t$  at neither  $-6\text{ °C}$  nor  $-12\text{ °C}$ . This could have been expected because phenology and cold hardiness are tightly linked (Morin et al., 2007; Kreyling et al., 2014) and differences among German populations of *Quercus robur* in bud burst in the current study were marginal.

Surprisingly, population HU showed the lowest  $I_t$  at  $-6\text{ °C}$ , while having the highest phenological score (advanced bud burst). Further advanced leaf development after expansion and associated increase in frost tolerance of leaves could be a reason (Taschler et al., 2004; Kreyling et al., 2012). This indicates an important role of the timing of frost events during bud burst.

*Tilia cordata* populations neither differed in the timing of bud burst nor showed interpopulation differences in  $I_t$ . Our results are in contrast to findings of Kreyling et al. (2012) for *Fagus sylvatica* showing differences in late frost tolerance in populations from Germany and Bulgaria, although they did not differ in phenology. These differences were related with minimum temperatures in May at geographic origin of populations.

Surprisingly in spite of complete die back of opened buds and young leaves all regeneration plants of *Quercus robur* and *Tilia cordata* survived frost treatment in April/May down to  $-12\text{ °C}$ . This temperature normally is unusual in all of the population sites of origin as well as in most parts of Germany in this time of the year (mean minimum temperature in April (1965-1990) for *Quercus* populations:  $-3\text{ °C}$  (NW),  $-3.3\text{ °C}$  (BB),  $-2.6\text{ °C}$  (BY) and  $-0.9\text{ °C}$  (HU);

for *Tilia* populations: - 2 °C (NW), - 2.7 °C (SN), - 3.5 °C (BW)). Furthermore, two year old seedlings are known to be more frost sensitive than adult trees (Ningre and Collin, 2007). In general this indicates a survival of our *Quercus robur* and *Tilia cordata* populations even at late frost temperatures (April/May) lower than those usually occurring in most parts of Germany.

### **Physiology of *Quercus robur* and *Tilia cordata* populations in spring**

For *Quercus robur* average glucose, fructose, sucrose and starch concentrations of the unfrozen control differed from those reported by other authors (Morin et al., 2007) for April/May, with higher sugar and lower starch concentrations in our study. These differences might be a result of already flushed plant material in our study. For *Tilia cordata* similar results to ours are shown for soluble sugar and starch concentrations in April/May (Abod and Webster, 1991).

Because of the cryoprotective traits of soluble sugars (Santarius, 1992; Pearce, 1999), higher concentrations of these substances for populations from colder spring climate as an adaptation to higher risk of late frost events at origin were expected. For *Tilia cordata* this was the case in the unfrozen control. Population BW ( $T_{spr} = 8$  °C) showed higher soluble sugar concentrations than NW ( $T_{spr} = 10.3$  °C), being significant for glucose and fructose. This might be interpreted as a physiological adaptation to late frost events of our populations from colder spring climate. However, for *Quercus robur* populations this relation to climatic regime in spring did not exist. Morin et al. (2007) found interpopulation differences for *Quercus robur* with higher soluble sugar concentrations for populations from colder climate. But they investigated trees grown at their geographic origin and did not transfer them to a non local site with equal climatic conditions for the populations. Also Lei et al. (2013) found differences in physiology among populations of *Quercus variabilis* grown in their geographic origin. Interestingly these physiological differences disappeared when the populations from different locations were grown in the same environment. This indicates a high adaptability of *Quercus variabilis* when transferred to non local conditions which could be speculated to be true in general for *Quercus* species.

During the stress treatments an increase in glucose and fructose concentration and a decrease of sucrose concentration was found. Such changes in carbohydrate metabolism are also known for other abiotic stresses like salt (Kempa et al., 2008) and drought stress (Sánchez et al., 1998). This indicates a short-term biochemical adaptability of the investigated populations during late frost events, however without interpopulation differences.

Biochemical parameters were not related to late frost damage. This is in agreement with other studies. Morin et al. (2007) pointed out that total carbohydrate concentration of *Quercus robur* populations is related to maximum cold hardiness (January), but not necessarily to

autumn and spring hardiness. In their point of view, soluble carbohydrates in spring are rather allocated to processes such as cell growth or converted to starch. They also conclude, and this is in accordance with our results, that phenology rather than physiology is related to late frost hardiness.

Proline concentration was not related to late frost hardiness of the investigated *Quercus robur* populations. Although, NW have lower proline concentration than HU at  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  treatment these populations did not differ in frost damage. A cryoprotective effect of higher proline concentration as mentioned by Aslamarz et al. (2011) for *Juglans regia* L. cultivars in April could not be pointed out. For *Juglans regia* L. the average concentration of proline in April was 8 fold higher than in our experiment and also differences between cultivars were more distinct. In our study the low concentration could be a reason for an absence of a cryoprotective effect of proline.

### *General discussion*

Significant differences in biochemical parameters partly occurred between populations from different defined areas of origin, but were not related to late frost damage indicating phenology as the main factor for late frost hardiness, as mentioned in other studies (Morin et al., 2007; Kreyling et al., 2014) as well.

We did not find significant differences in late frost damage and spring phenology among German populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata*. However, some trends mainly for oak populations could be pointed out as well as a relation of these trends to climate of population origins. However, these relations were marginal and not significant indicating only low level of local adaptation, regarding late frost reactions

Therefore we only can speculate on different reasons coming into consideration. (1) Relative small climatic differences among population sites of origin exerted only low selective pressure. (2) High intrapopulation diversity for tree species in general (see review of Hamrick, 1992) overrules local adaptation. (3) High phenotypic plasticity for tree species in general (Hamrick, 2004; Vitasse et al., 2010) enables populations to cope with a wide range of climatic conditions.

Comparing literature dealing with late frost hardiness of different populations of the same tree species and our study, it seems that the magnitude of differences among populations is strongly related to the magnitude of climatic differences (primarily spring temperature) between geographic origins of populations.

## **Conclusion**

As one part of a research project about abiotic stress reactions (early frost, late frost and drought) of populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* in Germany the current study



indicates that local adaptation of the investigated populations of these species in Germany is not as strong and clear as the defined areas of origin assume. Taking this into account, and considering also the survival of very severe late frost temperatures (regeneration plants) unusual for most parts of Germany we conclude that *Quercus robur* and *Tilia cordata* can cope with a wide range of ecological conditions related to late frost. The strong restrictions by BNatSchG (2010) and the arrangement of the defined areas of origin should be reconsidered. Especially when suitable plant material is lacking, this would alleviate the expenditure for the acquisition of seed for tree nurseries and improve the supply of planting stock.

However, to fully answer the question of local adaptation in German tree populations, further investigations are needed including more tree species, populations, adaptive traits (e.g. pathology sensibility, soil adaptation) and also genetic analyses.

## Acknowledgement

This project was financially supported by the tree nursery “Baumschule Lorenz von Ehren GmbH & Co. KG”. We thank Bernhard von Ehren for his expertise in many discussions, Dr. Andreas Wrede for the provision of plant material, and Dr. Daniel Gerhard for statistical support.

## References

- Abod, S., & Webster, A. (1991). Carbohydrates and their effects on growth and establishment of *Tilia* and *Betula*: I. Seasonal changes in soluble and insoluble carbohydrates. *Journal of Horticultural Science*, 66(2), 235–246.
- Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. a., Wang, T., & Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, 1(1), 95–111.
- Ashworth, E. N., Stirm, V. E., & Volenec, J. J. (1993). Seasonal variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L. *Tree Physiology*, 13(4), 379–388.
- Aslamarz, A. A., Vahdati, K., Hassani, D., Rahemi, M., Mohammadi, N., & Leslie, C. (2011). Cold Hardiness and its Relationship with Proline Content in Persian Walnut. *European Journal of Horticultural Science*, 76(3), 84–90.
- Basler, D., & Körner, C. (2012). Photoperiod sensitivity of bud burst in 14 temperate forest tree species. *Agricultural and Forest Meteorology*, 165, 73–81.

---

Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207.

Bennie, J., Kubin, E., Wiltshire, A., Huntley, B., Baxter, R. (2010) Predicting spatial and temporal patterns of bud-burst and spring frost risk in North-West Europe: the implications of local adaptation to climate. *Global Change Biology*, 16 (5), 1503–1514

Biere, A., & Verhoeven, K. (2008). Local adaptation and the consequences of being dislocated from coevolved enemies. *New Phytologist*, 180(2), 265–268.

BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) (2012). Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze. BMU Refer. 13, 1–32.

BNatSchG (Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege) (2010). Bundesnaturschutzgesetz vom 29.07.2009, in Kraft getreten am 01.03.2010, zuletzt geändert durch Art. 421 V v. 31.3.2015 (BGBl. I 1474). BGBl I:2542.

Boehringer, S. A. (1984). *Methods of enzymatic food analysis using single reagents*. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

Caffarra, A., & Donnelly, A. (2011). The ecological significance of phenology in four different tree species: effects of light and temperature on bud burst. *International Journal of Biometeorology*, 55(5), 711–721.

Dantec, C. F., Vitasse, Y., Bonhomme, M., Louvet, J. M., Kremer, A., & Delzon, S. (2014). Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range. *International Journal of Biometeorology*, 1–12.

FoVG (2002). Forstvermehrungsgutgesetz vom 22.05.2002, in Kraft getreten am 01.01.2003, zuletzt geändert durch Artikel 414 V v. 31.08.2015 (BGBl. I S. 1474). BGBl. I S. 1658.

Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6(1-4), 95–124.

Hamrick, J. (2004). Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197(1-3), 323–335.

Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P.H., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346–363.

- 
- Kasuga, J., Arakawa, K., & Fujikawa, S. (2007). High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. *The New Phytologist*, 174(3), 569–579.
- Kempa, S., Krasensky, J., Dal Santo, S., Kopka, J., & Jonak, C. (2008). A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PloS One*, 3(12), e3935.
- Körner, C., & Basler, D. (2010). Plant science. Phenology under global warming. *Science* (New York, N.Y.), 327(5972), 1461–1462. doi:10.1126/science.1186473
- Kreyling, J., Thiel, D., Nagy, L., Jentsch, a., Huber, G., Konnert, M., & Beierkuhnlein, C. (2012). Late frost sensitivity of juvenile *Fagus sylvatica* L. differs between southern Germany and Bulgaria and depends on preceding air temperature. *European Journal of Forest Research*, 131(3), 717–725.
- Kreyling, J., Buhk, C., Backhaus, S., Hallinger, M., Huber, G., Huber, L., Jentsch, A., Konnert, M., Thiel, D., Wilmking, M., & Beierkuhnlein, C. (2014). Local adaptations to frost in marginal and central populations of the dominant forest tree *Fagus sylvatica* L. as affected by temperature and extreme drought in common garden experiments. *Ecology and Evolution*, 4(5), 594–605.
- Laube, J., Sparks, T. H., Estrella, N., Höfler, J., Ankerst, D. P., & Menzel, A. (2014). Chilling outweighs photoperiod in preventing precocious spring development. *Global Change Biology*, 20(1), 170–182.
- Lei, J. P., Xiao, W., Liu, J. F., Xiong, D., Wang, P., Pan, L., Jiang, Y., Li, M. H. (2013). Responses of Nutrients and Mobile Carbohydrates in *Quercus variabilis* Seedlings to Environmental Variations Using In Situ and Ex Situ Experiments. *PLoS ONE*, 8(4), 40–43. doi:10.1371/journal.pone.0061192
- McKay, H. M. (1992). Electrolyte leakage from fine roots of conifer seedlings: a rapid index of plant vitality following cold storage. *Canadian Journal of Forest Research*, 22(9), 1371–1377.
- Morin, X., Améglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Chuine, I. (2007). Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, 27(6), 817–825.

---

Ningre, F., & Colin, F. (2007). Frost damage on the terminal shoot as a risk factor of fork incidence on common beech (*Fagus sylvatica* L.). *Annals of Forest Science*, 64, 79–86.

NW-FVA (Northwest German Forest Research Station). without year.

Pearce, R. S. (1999). Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation*, 29(1-2), 47–76.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Sánchez, F. J., Manzanares, M., de Andres, E. F., Tenorio, J. L., & Ayerbe, L. (1998). Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research*, 59(3), 225–235.

Santarius, K. A. (1992). Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 87–93.

Schmidt, P. A. & Krause, A. (1997). Zur Abgrenzung von Herkunftsgebieten bei Baumschulgehölzen für die freie Landschaft. *Natur & Landschaft* 72, 92-95.

Schueler, S., & Liesebach, M. (2014). Latitudinal population transfer reduces temperature sum requirements for bud burst of European beech. *Plant Ecology*, 216(1), 111–122.

Sivaci, A. (2006). Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings. *Scientia Horticulturae*, 109(3), 234–237.

Taschler, D., Beikircher, B., & Neuner, G. (2004). Frost resistance and ice nucleation in leaves of five woody timberline species measured in situ during shoot expansion. *Tree Physiology*, 24(3), 331–337.

Vitasse, Y., Porté, A. J., Kremer, A., Michalet, R., & Delzon, S. (2009a). Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia*, 161(1), 187–198.

Vitasse, Y., Delzon, S., Bresson, C. C., Michalet, R., & Kremer, A. (2009b). Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(7), 1259–1269.

Vitasse, Y., Bresson, C. C., Kremer, A., Michalet, R., & Delzon, S. (2010). Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, 24(6), 1211–1218.

Way, D. A., & Montgomery, R. A. (2014). Photoperiod constraints on tree phenology, performance and migration in a warming world. *Plant, Cell & Environment*, 38(9), 1725-1736

Zhao, D., MacKown, C. T., Starks, P. J., & Kindiger, B. K. (2010). Rapid Analysis of Nonstructural Carbohydrate Components in Grass Forage Using Microplate Enzymatic Assays. *Crop Science*, 50(4), 1537-1545.

### **3.3 Publikation III: “Drought stress reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill.”**

Publiziert als:

Selig, M. & Bohne, H. (2017): Drought stress reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill.. *Journal of Environmental Horticulture*, 35(1), 6-12.  
<http://hrijournal.org/doi/full/10.24266/0738-2898-35.1.6>

---

“Drought stress reactions of different populations of *Quercus robur* L.  
and *Tilia cordata* Mill.”

Malte Selig, Heike Bohne

Institute for Horticultural Production Systems, Section Woody Plant and Propagation Physiology, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuserstrasse 2, D-30419 Hannover, Germany

## Abstract

Locally adapted trees and shrubs are suggested to show higher fitness at their site of origin than non-locally adapted ones. The production in tree nurseries could take this into account to improve outplanting performance. However, separate production of specific ecotypes in nurseries increases the costs of production and may reduce the availability of a specific species. In this study, we investigated drought stress reactions of 2 year-old container-grown seedlings of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. of four respectively three different populations, each from a different site of origin. Slow- and fast-developing drought stress treatments were applied in a greenhouse study to determine any difference in drought tolerance. Control plants were well irrigated. Depending on the species and stress development, only marginal interpopulation differences in particular physiological (pre-dawn water potential, stomatal conductance, relative water content) and/or biochemical (glucose, fructose, sucrose, starch, proline) reactions to drought existed. These differences did not consistently reflect precipitation conditions at the population sites of origin, indicating only low level of local adaptation for populations of the target species.

**Index words:** adaptation, carbohydrates, pedunculate oak, provenances, proline, small-leaved lime.

**Species used in this study:** pedunculate oak (*Quercus robur* L.); small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.).

---

## Significance to the Horticulture Industry

Prescribed use of local tree populations not only for silviculture but also for plantings in the landscape will complicate the submission process and increase the cost of production due to a separated cultivation of different populations within each nursery. This can lead to problems concerning the supply of an adequate quantity of trees and shrubs. Our results show that all investigated populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* can cope with different drought conditions. Previous results showed that this is also the case for early and late frost stress (Selig and Böhne 2016a, 2016b). Hence prescribed use of local populations by the German Federal Nature Conservation Act (BNatSchG §40) can be eased.

## Introduction

Outplanting performance of trees, especially in the first years after nursery cultivation, is strongly dependent on the tolerance to abiotic stress factors like drought or frost events at the planting site. Production of suitable plants for landscaping purposes is a challenge for nurseries. Among cultivation procedures, genetic factors can be taken into consideration. It is suggested that local tree populations are adapted to ecological conditions at their site of origin and can better cope with these conditions (Biere and Verhoeven 2008). Adaptive traits are manifold and drought tolerance is an important one that involves several physiological and biochemical mechanisms.

Specific drought responses, matching ecological conditions at the site of origin, may enhance survival and performance of a local population. However, for regions with small differences of geographical and/or climatic conditions, local adaptation is not consistently demonstrated (Peuke et al. 2002). Using locally adapted populations for plantations requires the certification of suitable seed source areas and a separated cultivation within nurseries. This will increase the costs for production and, for some purposes, this can lead to problems concerning the supply of an adequate quantity of trees and shrubs.

For silvicultural purposes, Germany is divided into different provenances, depending on the species. The use of stock plants from these provenances has been recommended for many years and is regulated by law (FoVG 2002). For landscaping purposes in Germany, the Federal Nature Conservation Act (BNatSchG 2010) was amended in 2010 and aims to preserve populations with suggested local adaptations. Six “defined areas of origin” independent of species were assigned according to a map by Schmidt and Krause (1997) based on ecological fundamental units (BMU 2012). After a transition period until March 1, 2020, it is forbidden to plant tree populations outside their defined area of origin in free nature without permission. Free nature in the BNatSchG is a juristic term and is defined as all non-



built-up areas with exception of forestry and vegetation in the immediate vicinity of streets (e.g. alley trees) (BMU 2012). *Quercus robur* and *Tilia cordata* are two important species for landscaping purposes in free nature and are affected by BNatSchG.

This greenhouse study investigated if populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* from three of the German defined areas of origin differ in their reaction to drought. To cover a bigger geographic range, one Hungarian population of *Quercus robur* was included. In this experiment a slow and a fast developing drought stress were imposed to cover different adaptation challenges which can occur in the landscape. We addressed the following questions: (1) do populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* differ in their drought response; (2) can possible interpopulation differences be related to local ecological conditions at the site of origin?

## Material and Methods

### Plants and cultivation

In April 2011, 2 year-old seedlings from three German populations of *Tilia cordata* and *Quercus robur* and one Hungarian population of *Quercus robur* were bought from nurseries (Table 1). Referring to § 40 BNatSchG (BMU 2012), three defined areas of origin were included in the investigations. A certificate (prescription of FoVG) was provided to verify the provenance. The populations of *Quercus robur* originated from the west (Nordrhein-Westfalen (NW)), east (Brandenburg (BB)) and south (Bayern (BY)) of Germany and from northwest of Hungary (near Tiszadob (HU)). *Tilia cordata* populations originated from west (Nordrhein-Westfalen (NW)), east (Sachsen (SN)) and south (Baden-Württemberg (BW)) of Germany. Regarding the precipitation range, three populations originated from relative dry habitats (*Quercus robur*: BB and HU; *Tilia cordata*: SN) and four populations from relative wet habitats (*Quercus robur*: NW, BY; *Tilia cordata*: NW, BW).

The seedlings were potted into 3 L (3.17 qt) containers with peat as the growing medium (Klasmann Deilmann GmbH, Georg-Klasmann-Strasse 2-10, 49744 Geeste, Germany) and were fertilized with Osmocote® Exact Standard 8-9M (15% N, 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 11% K<sub>2</sub>O, 2% MgO + trace elements; Everris NA Inc., 4190 CA Geldermalsen, Netherlands) to result in 0.8 g N L<sup>-1</sup> (0.1 oz/gal) substrate. Until the drought experiment started the plants were arranged, separated by populations (each divided into two blocks), on the container area at the experimental site in Ruthe (52°14'N, 9°49'E). In sum, 54 seedlings per population (27 per block) with a distance of 45 cm (17.7 in) between containers were cultivated. The irrigation took place automatically by a drip irrigation system.

**Table 1 (Publikation III):** Species, county, population code, latitude (LAT), longitude (LONG), altitude (ALT), mean annual temperature ( $T_{\text{annual}}$ ), mean annual precipitation ( $P_{\text{annual}}$ ) and mean summer (June, July, August) precipitation ( $P_{\text{summer}}$ ) for the sites of origin. For tested populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata*. Climatic data are means from 1965 to 1990.

Species	County/ Country	Code	LAT	LONG	ALT [m.a.s.l]	$T_{\text{annual}}$ [°C]	$P_{\text{annual}}$ [mm]	$P_{\text{summer}}$ [mm]
<i>Quercus robur</i>	Nordrhein- Westfalen	NW	N 51°55'	E 07°58'	60	9.4	772	221
	Brandenburg	BB	N 52°21'	E 14°06'	50	8.6	538	175
	Bayern	BY	N 48°45'	E 12°59'	350	7.8	992	303
	Hungary	HU	N 47°59'	E 21°10'	100	9.9	565	207
<i>Tilia cordata</i>	Nordrhein- Westfalen	NW	N 50°40'	E 07°03'	160	9.8	631	203
	Sachsen	SN	N 51°21'	E 12°20'	110	9.1	478	165
	Baden- Württemberg	BW	N 47°51'	E 09°38'	450	7.7	914	334

### Experimental drought conditions

Drought experiments were carried out from July 1 to 11, 2012 (*Tilia cordata*) and July 27 to August 14, 2012 (*Quercus robur*) in a greenhouse. At the beginning of the experiment, all root balls were saturated with water by submerging them for five minutes. After saturation and drainage for 5 minutes, the mass of each individual plant, including the container and the root ball, was weighed as the starting point for evapotranspiration. A total of 54 plants from each species and population were arranged completely randomized on four tables. Containers of the control plants were sited directly on the table and were irrigated twice a day for 20 minutes by an ebb and flow system. Containers of plants to be drought stressed were put on 7 cm (2.7 in) high spacers to prevent contact with the irrigation water of the control plants.

Two different drought treatments were applied: a slow developing and a fast developing drought stress. To achieve this, the plants to be stressed were irrigated manually and individually every other day with only 50% (slow developing drought, SDD) or 25% (fast developing drought, FDD) of the lost mass (evapotranspiration) since the last irrigation. To calculate the amount of water needed per stress treatment and plant, the pots were reweighed every other day.

For every treatment, 18 plants from each population were used. These 18 plants were again divided into 9 plants for measurements/analyses and 9 plants were used as "regeneration plants". The regeneration plants were re-watered at the end of experiment, placed back on the container area, and further irrigated according to the gardener's code of best practice to

determine their regeneration ability. One month after re-watering, survival of the regeneration plants was determined.

### Sampling

For *Tilia cordata*, the experiment ended when severe wilting symptoms (droopy leaves with initiating chlorosis) of more than half of all plants of one treatment were visible. For the FDD treatment, this was reached after 6 days (July 6, 2012) and for SDD after 11 days (July 11, 2012). The control treatment ended after 11 days as well.

Because of the inflexible leaves of *Quercus robur*, wilting symptoms were not as clear as for *Tilia cordata*. To achieve similar stress status like *Tilia cordata* plants, the *Quercus robur* experiment ended when half of all plants of one treatment showed pre dawn leaf water potential of  $-2.5$  MPa. FDD treatment reached this status after 13 days (August 8, 2012). SDD treatment was harvested after 19 days (August 14, 2012), however, pre-dawn water potential already was more negative than the target value. The control treatment was sampled after 19 days as well.

For analyses of biochemical parameters at the end of the experiment (proline, sugars, starch, N, P, K) about 10 g of the youngest fully expanded leaves were taken (biochemical samples). To stop enzymatic activity, the leaves were cut into small pieces and treated in a microwave for 2.5 minutes at 700 Watt immediately after sampling. Afterwards the leaves were dried for nutrient and biochemical analyses at 70 C (158 F) and 60 C (140 F), respectively and milled by a planetary ball mill (PM 100, Retsch GmbH, Retsch-Allee 1-5, 42781 Haan, Germany).

### Measurements during experiment

During the experiments, physiological parameters of the plants were measured to determine any different responses among the populations to drought stress. The measurements were carried out every other day before irrigation with 3 plants per population and treatment, which were randomly chosen. For all measurements, the second fully expanded leaf of the longest shoot was taken. Pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ) was measured between 4 and 5 a.m. with a Scholander type pressure chamber (Model 600, PMS Instrument Company, 1725 Geary Street SE, Albany, USA). Leaf relative water content ( $RWC_{leaf}$ ) was calculated based on fresh weight (FW), turgid weight (TW), and dry weight (DW). Leaf FW was determined on a mass balance immediately after being excised from the plants. TWs were determined after soaking the leaves in de-ionized water for 24 h in a covered glass vessel; they were weighed immediately after being blotted. Leaves were then dried at 80 C (176 F) for at least 72 h prior to being weighed for DW.  $RWC_{leaf}$  [%] was calculated using the formula:  $(FW - DW) / (TW - DW) \times 100$  (Barrs and Weatherley 1962). Stomatal conductance ( $g_s$ ) was measured with a porometer (AP4, Delta-T Devices Ltd, 130 Low Road, Cambridge, UK) and expressed as

[ $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ]. To determine any damage to the photosynthetic apparatus, chlorophyll fluorescence (Chl fluorescence) was measured with a chlorophyll fluorimeter (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., Narborough Road, King's Lynn, UK) at the sampling dates. Parameter  $F_v/F_m$  was used to describe the maximum quantum efficiency of photosystem II photochemistry (Baker 2008).

At the end of the experiment, samples for biochemical analyses were taken as described above (Sampling section) and all plants of the respective treatment were chosen for physiological measurements.

### **Proline analyses**

Free proline was analyzed spectrophotometrically using a modified ninhydrin method of Bates et al. (1973). Material of biochemical samples (50 mg) was extracted with 1.8 ml sulfosalicylic acid (3%). After centrifugation (14,800 rpm) for 15 minutes, 150  $\mu\text{l}$  of the supernatant, 90  $\mu\text{l}$  glacial acetic acid and 90  $\mu\text{l}$  of acid ninhydrin were heated for 45 minutes at 100 C (212 F) and extracted with 1.5 ml toluene by mixing and shaking and 200  $\mu\text{l}$  of toluene phase was pipetted in a quartz-microplate and absorbance was read at 520 nm with a VersaMax Microplate reader (VersaMax ELISA, Molecular Devices, 1311 Orleans Drive, Sunnyvale CA 94089, USA). Proline concentration was determined from a standard curve and calculated on a dry weight (DW) basis ( $\text{mg g}^{-1} \text{ DW}$ ).

### **Carbohydrate analysis**

Material of biochemical samples (30 mg) was extracted three times with 1.5 ml of hot (80 C) (176 F) ethanol (80%). After centrifugation, the supernatants were combined and analyzed enzymatically for glucose, fructose and sucrose in a microplate as detailed by Zhao et al. (2010). Results were calculated on dry weight basis [ $\text{mg g}^{-1} \text{ DW}$ ] and combined as soluble sugars (GFS).

After extraction of sugars, the remaining pellet was used for starch analysis (Boehringer 1984). The pellet was solved in NaOH (0.5 M) and incubated at 60 C for 30 minutes. To adjust the pH approximately to 4.7, glacial acetic acid was added. After centrifugation at 5000 rpm for 5 minutes, the supernatant (10  $\mu\text{l}$ ) was placed to a microplate. Starch was hydrolyzed to glucose by adding 20  $\mu\text{l}$  of amyloglucosidase and incubated for 60 minutes at 30 C (86 F). Starch concentration was determined by glucose based standard curve (see glucose assay above) and calculated on a dry weight basis [ $\text{mg g}^{-1} \text{ DW}$ ].

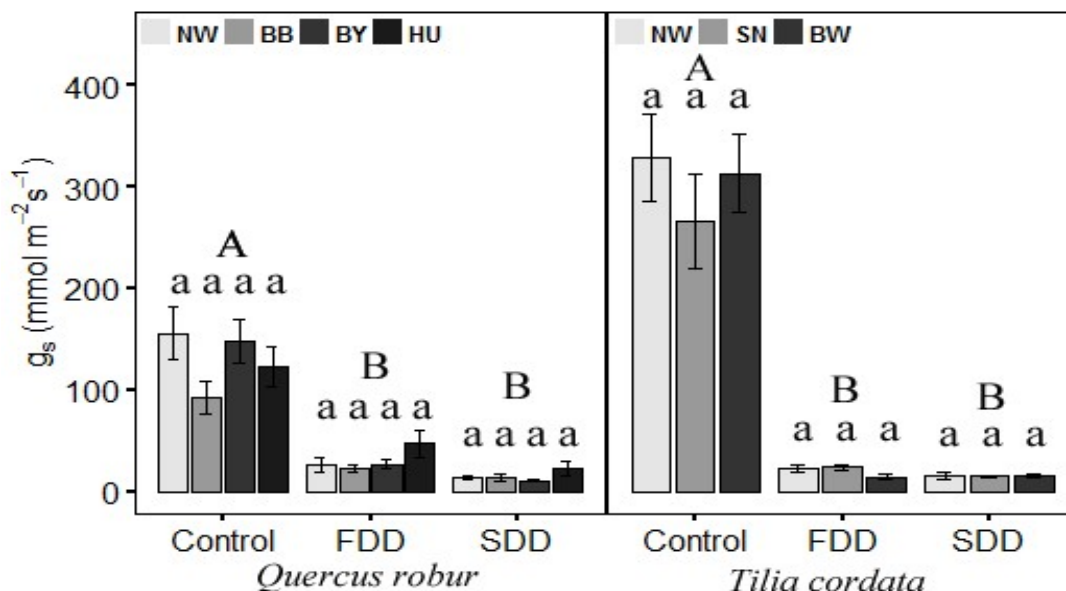
### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with statistic software R 3.1.3 (R Core Team 2014) with an additional statistical package ‘multcomp’ (Hothorn et al. 2008). All physiological parameters ( $RWC_{leaf}$ ,  $\Psi_{pd}$ ,  $g_s$ , chlorophyll fluorescence) and biochemical parameters (GFS, starch and proline) were analyzed by a two-way ANOVA and Tukey all-pair comparison with population and treatment as factors. Data were checked for heterogeneity of variance and normal distribution and if necessary logarithmic transformed to satisfy requirements of ANOVA.

## Results and Discussion

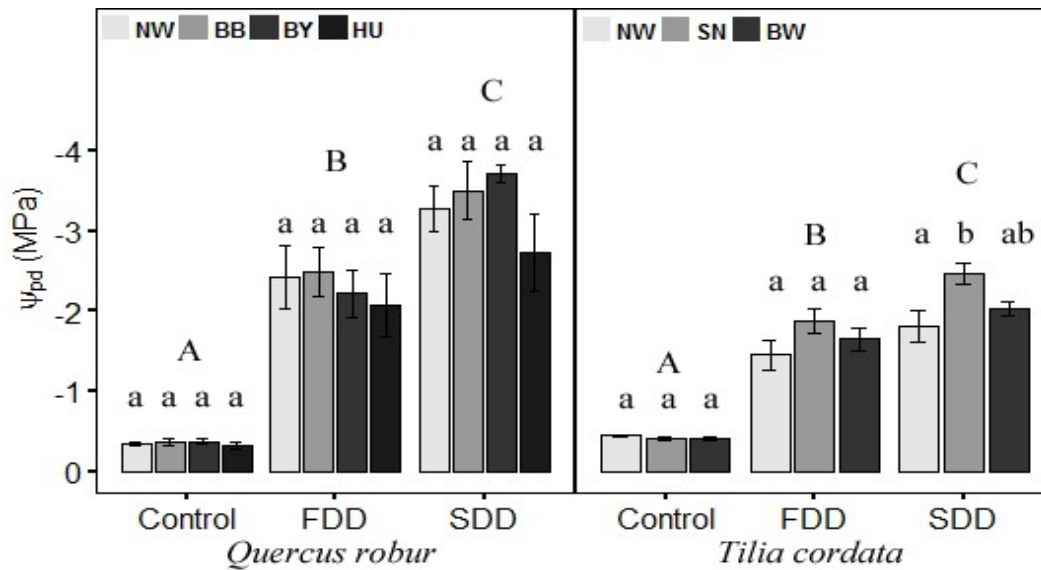
Populations of *Quercus robur* and *Tilia cordata* did not differ significantly in the measured physiological parameters during the drought progress. Hence, only the results from the sampling day at the end of the experiment are shown.

Closing stomata to reduce water loss under water deficit conditions is a typical physiological response of trees to drought stress (Peuke et al. 2002, Steiner et al 2014). Both target species showed decreasing stomatal conductance ( $g_s$ ) at both drought treatments compared to the control (Fig. 1).

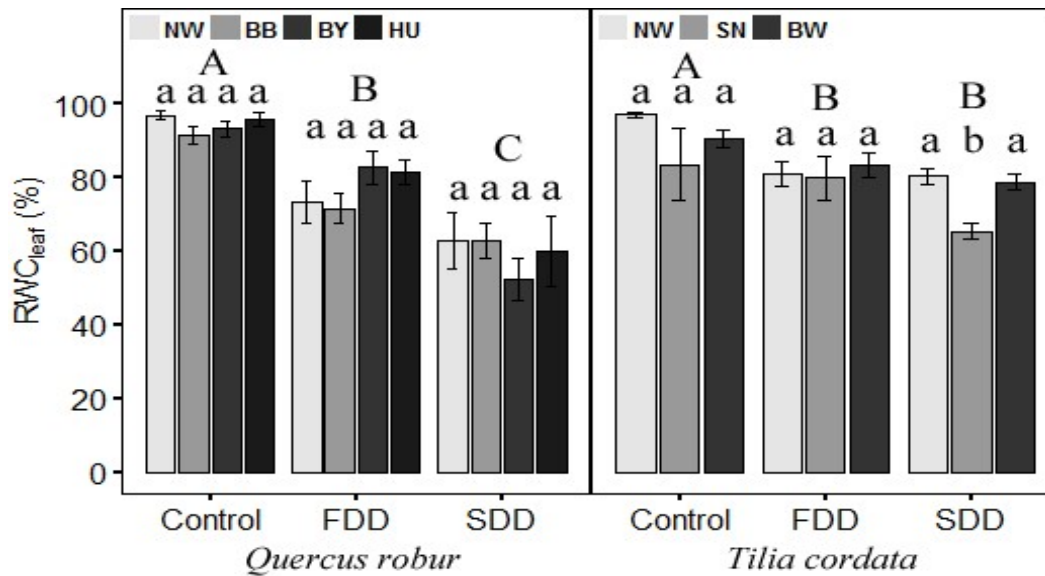


**Figure 1 (Publikation III):** Mean stomatal conductance ( $g_s$ ) ( $\pm$  standard error) for different populations of container-grown *Quercus robur* and *Tilia cordata* in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ).

However, drought development rate (FDD vs. SDD) did not affect this response. Water loss was not entirely limited as shown by decreasing  $\Psi_{pd}$  and  $RWC_{leaf}$  at drought treatments for both species compared to the control treatment (Figs. 2 and 3).

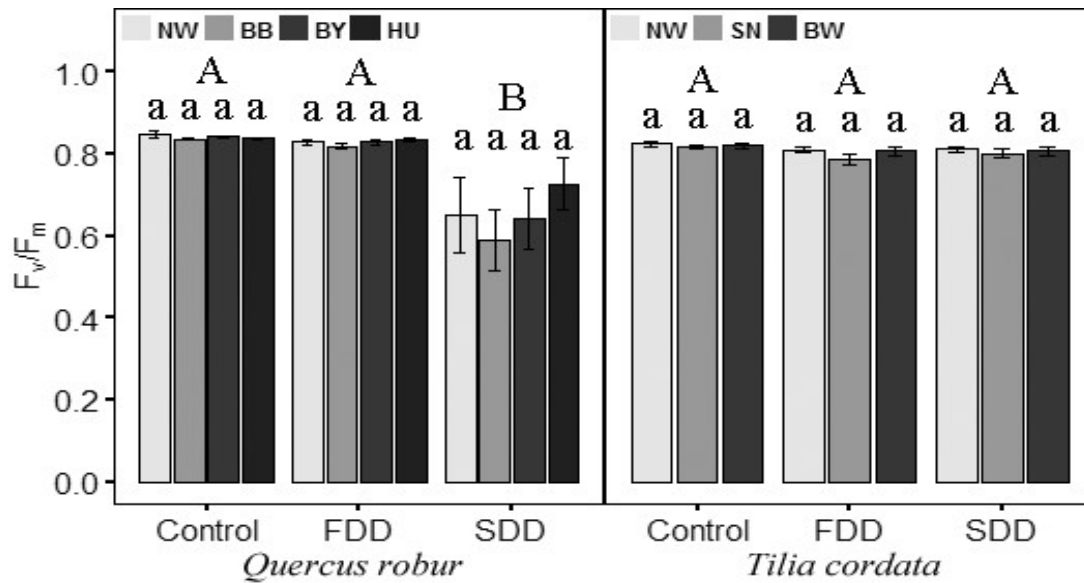


**Figure 2 (Publikation III):** Mean pre dawn leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ) ( $\pm$  standard error) for different populations of container-grown *Quercus robur* and *Tilia cordata* in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ).



**Figure 3 (Publikation III):** Mean relative leaf water content ( $RWC_{leaf}$ ) ( $\pm$  standard error) for different populations of container-grown *Quercus robur* and *Tilia cordata* in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ).

However, while  $\Psi_{pd}$  decreased more at SDD compared to FDD for both target species, a greater reduction of  $RWC_{leaf}$  at SDD was only true for *Quercus robur*. While for *Quercus robur*  $F_v/F_m$  was not affected by FDD, it decreased at SDD. For *Tilia cordata*, neither FDD nor SDD affected  $F_v/F_m$  (Fig. 4). Greater reduction of  $\Psi_{pd}$  at SDD for both species and  $RWC_{leaf}$  for *Quercus robur* indicates more severe drought stress at this treatment. This is in accordance with results of Épron et al. (1993) for different *Quercus* species, who found rapid reduction of PSII photochemistry ( $F_v/F_m$ ) only at very severe drought stress ( $\Psi_{pd} < -4$  MPa). As shown by Épron and Dreyer (1992) for *Quercus petraea* (a species similar to pedunculate oak),  $F_v/F_m$  also declined rapidly after a critical  $RWC_{leaf}$  ( $\sim 25\%$ ) value is reached. It seems likely that critical  $RWC_{leaf}$  values, affecting PS II photochemistry, were not reached at FDD for *Quercus robur* and *Tilia cordata*. In the Climate-Species-Matrix by Roloff et al. (2009), *Quercus robur* and *Tilia cordata* are categorized as “suitable” concerning dry climates. A high drought tolerance is also found in our results. Differences in stomatal closure among *Quercus robur* and *Tilia cordata* populations did not exist (Fig. 1). This is contrary to findings of Aspelmeier and Leuschner (2004) for *Betula pendula* as they recorded higher  $g_s$  for genotypes of low-rainfall origin than genotypes of high-rainfall origin under drought conditions.



**Figure 4 (Publikation III):** Mean chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ) ( $\pm$  standard error) for different populations of container-grown *Quercus robur* and *Tilia cordata* in the control and two different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]). Populations code: Germany (NW = Nordrhein-Westfalen, BB = Brandenburg, BY = Bayern, SN = Sachsen Anhalt, BW = Baden-Württemberg), Hungary (HU = Tiszadob). Different lower case letters indicate significant differences between populations within a treatment. Capitals indicate differences between treatments. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ).

Peuke et al. (2002) observed the highest  $g_s$  from populations of wet and lowest from dry regions under drought conditions for *Fagus sylvatica* seedlings. These contrary results indicate a species-specific response of stomatal closure to drought on a population level. While no interpopulation differences occurred for *Quercus robur* populations, *Tilia cordata* populations did differ in  $RWC_{leaf}$  and  $\Psi_{pd}$  at SDD (Figs. 2 and 3). Population SN from a relative dry habitat showed lower  $\Psi_{pd}$  compared to population NW and the lowest  $RWC_{leaf}$  of all populations, indicating a more severe drought response for this population. This is in contrast to results of Ying et al. (2015) of *Camptotheca acuminata* Decne. seedlings with higher  $RWC_{leaf}$  of a population from a drier habitat compared to a wet one. However, SN did not differ in survival of regeneration plants (data not shown) compared with the other populations, indicating that SN can survive such low  $RWC_{leaf}$  and  $\Psi_{pd}$  values. There were no differences in the reaction of PSII photochemistry ( $F_v/F_m$ ) to drought stress among the populations.

With the exception of the population HU, an increase of GFS concentration in response to drought stress was observed for *Quercus robur* as also reported by Spieß et al. (2012) (Table 2). Accumulation of soluble sugars due to alterations in expression of genes encoding for enzymes involved in the sugar conversion pathway is a response to a water deficit (e.g. Kempa et al. 2008). None of the populations of *Tilia cordata* showed an increase in GFS concentration as a response to drought stress. Callister et al. (2008) reported an absence or only little osmotic adjustment for *Eucalyptus* hybrids with a high ability to increase cell wall



elasticity under drought. Thomas and Gausling (2000) reported that *Quercus robur* has a low ability to increase cell wall elasticity under drought. Literature regarding drought stress reactions of *Tilia cordata* is rare, so we only can speculate an increase of cell wall elasticity under drought conditions of this species and absence of GFS accumulation. Degradation of starch to supply energy and carbohydrate skeletons is a typical response under osmotic stress (Kempa et al. 2008). This behavior was also observed for the populations of both species in the current study with the exception of BB (*Quercus robur*) (Table 2).

**Table 2 (Publikation III):** Mean concentrations of GFS (glucose, fructose and sucrose), starch and proline ( $\pm$  standard error) in the newest leaves of four populations of *Quercus robur* and three populations of *Tilia cordata*, all container-grown, after different drought treatments (FDD [fast-developing drought], SDD [slow-developing drought]) in July/August 2012. Different lower case letters indicate significant differences between populations within a drought treatment. Populations code: NW = Nordrhein-Westfalen (Germany), BB = Brandenburg (Germany), BY = Bayern (Germany), SN = Sachsen Anhalt (Germany), BW = Baden-Württemberg (Germany), HU = Tiszadob (Hungary). Significant differences between drought treatments for the same population are indicated by capital letters. ( $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ ).

		Drought treatment					
		Control		FDD		SDD	
<i>Quercus robur</i>		GFS [ $\text{mg g}^{-1}$ DW]					
	NW	4.5 $\pm$ 0.4	b,A	6.0 $\pm$ 0.6	a,B	5.4 $\pm$ 0.3	a,AB
	BB	3.3 $\pm$ 0.2	a,A	6.2 $\pm$ 0.6	a,B	5.8 $\pm$ 0.5	a,B
	BY	3.1 $\pm$ 0.2	a,A	5.6 $\pm$ 0.5	a,B	6.6 $\pm$ 0.6	a,B
	HU	4.7 $\pm$ 0.4	b,A	6.4 $\pm$ 0.7	a,A	5.9 $\pm$ 0.4	a,A
		Starch [ $\text{mg g}^{-1}$ DW]					
	NW	0.18 $\pm$ 0.03	ab,A	0.16 $\pm$ 0.01	a,AB	0.11 $\pm$ 0.01	a,B
	BB	0.09 $\pm$ 0.01	a,A	0.07 $\pm$ 0.01	a,A	0.07 $\pm$ 0.01	a,A
	BY	0.14 $\pm$ 0.01	a,A	0.10 $\pm$ 0.01	a,B	0.07 $\pm$ 0.01	a,B
	HU	0.27 $\pm$ 0.03	b,A	0.12 $\pm$ 0.03	a,B	0.12 $\pm$ 0.04	a,B
		Proline [ $\text{mg g}^{-1}$ DW]					
	NW	177 $\pm$ 10	a,A	616 $\pm$ 169	a,AB	1296 $\pm$ 380	a,B
BB	208 $\pm$ 21	ab,A	616 $\pm$ 159	a,A	2963 $\pm$ 548	b,B	
BY	249 $\pm$ 22	b,A	402 $\pm$ 193	a,A	2366 $\pm$ 358	ab,B	
HU	271 $\pm$ 10	b,A	551 $\pm$ 89	a,A	1729 $\pm$ 413	ab,B	
<i>Tilia cordata</i>		GFS [ $\text{mg g}^{-1}$ DW]					
	NW	5.9 $\pm$ 0.5	a,A	5.9 $\pm$ 0.3	a,A	6.4 $\pm$ 0.3	ab,A
	SN	5.6 $\pm$ 0.5	a,A	6.0 $\pm$ 0.4	a,A	6.8 $\pm$ 0.3	b,A
	BW	6.6 $\pm$ 0.2	a,A	5.3 $\pm$ 0.2	a,B	5.5 $\pm$ 0.3	a,B
		Starch [ $\text{mg g}^{-1}$ DW]					
	NW	0.40 $\pm$ 0.10	a,A	0.04 $\pm$ 0.01	a,B	0.02 $\pm$ 0.01	a,B
	SN	0.42 $\pm$ 0.10	a,A	0.06 $\pm$ 0.02	a,B	0.04 $\pm$ 0.01	a,B
	BW	1.13 $\pm$ 0.13	b,A	0.07 $\pm$ 0.02	a,B	0.05 $\pm$ 0.01	a,B
		Proline [ $\text{mg g}^{-1}$ DW]					
NW	217 $\pm$ 23	a,A	310 $\pm$ 116	a,AB	561 $\pm$ 148	ab,B	
SN	162 $\pm$ 6	a,A	607 $\pm$ 140	a,AB	1038 $\pm$ 192	b,B	
BW	204 $\pm$ 14	a,A	435 $\pm$ 101	a,AB	499 $\pm$ 79	a,B	

Depletion of starch associated with an increase in the GFS concentration of *Quercus robur* was also reported by Épron and Dreyer (1996). This did not occur in any of the *Tilia cordata* populations. Maybe energy and carbon skeletons supplied by depletion of starch were utilized for other compatible solutes, such as other sugars (e.g. raffinose) or sugar alcohols (e.g. mannitol) involved in osmotic adjustment under drought conditions. Accumulation of proline under water and osmotic stress is reported for many species (Kempa et al. 2008, Watanabe et al. 2000). This indicates the important role of proline for osmotic adjustment and stabilizing cell membranes and proteins (Hare et al. 1998, Szabados and Savouré 2010). However, compared to the control treatment, proline concentration was only increased in the SDD treatment for both target species (Table 2). This is in accordance with results from other authors measuring higher osmoregulation if drought develops slowly (Arndt et al. 2001, Aspelmeier and Leuschner 2004).

Differences in sugar concentrations among *Quercus robur* populations only occurred in the control treatment and disappeared in both FDD and SDD treatments. However, the differences among populations for the controls were not related to total rainfall ( $P_{\text{annual}}$ ) or summer rainfall ( $P_{\text{summer}}$ ) (Table 1), because both the population with the lowest precipitation (BB) and the highest precipitation (BY) did not differ significantly. In contrast to *Quercus robur*, the sugar concentration of *Tilia cordata* population BW decreased under drought conditions and resulted in significantly lower GFS concentrations in BW at SDD compared to population SN. Sanchez-Rodriguez et al. (1999) also observed a decrease of soluble sugars under drought for *Casuarina equisetifolia* L. Differences among populations in starch concentration only existed at control treatment for both target species. For *Quercus robur*, only population HU showed a higher starch concentration, while German populations did not differ from each other. The *Tilia cordata* population BW showed the highest starch concentration under well irrigated conditions (control treatment). However, these differences disappeared under drought conditions, indicating stronger degradation of starch for population BW. Differences among populations in proline concentration occurred in the control treatment for *Quercus robur* and at SDD treatment for both target species. Well watered plants of population BY and HU showed higher proline concentrations compared to NW. At SDD, NW also had the numerically lowest concentration of proline. *Tilia cordata* population SN had a higher proline concentration compared to population BW at SDD. These interpopulation differences at SDD could be carefully related to precipitation conditions at the site of origin. Populations with lowest  $P_{\text{summer}}$  (*Quercus robur*: BB, *Tilia cordata*: SN) seem to accumulate highest amounts of proline under water deficit as also reported for *Populus cathayana* Rehder populations (Xiao et al. 2008). Nevertheless, also the *Quercus robur* population BY with the highest  $P_{\text{summer}}$  showed high accumulation of proline under drought conditions comparable to population BB and HU. Among protective functions for cell

membranes and proteins, proline is also known to be important as an energy and substrate supply for resumed growth after stress events (Szabados and Saviouré 2010, Taylor 1996). Therefore, the high accumulation of proline of *Tilia cordata* population SN could be the reason for survival of regeneration plants (data not shown), in spite of stronger reduction in  $\Psi_{pd}$  and  $RWC_{leaf}$  of SN compared to the other populations.

How can our differing results concerning local adaptation be explained? Physiological drought stress reactions did not indicate local adaptations for *Quercus robur* populations, even though they differ in precipitation conditions at the site of origin. Similar results are reported by Wanjiku and Bohne (2016) for hazelnut populations. Concerning the influence of drought on growth, this contrasts results of Arend et al. (2011) who found provenance-specific responses for *Quercus robur*. However, even for the bigger range of environmental conditions covered by Arend et al. (2011) compared to our studies, provenance differences could not be related to climatic conditions at their site of origin. They conclude that selective pressures at the sites of origin were either low or interfered with genetic effects of postglacial immigration history. Especially for the populations used in our experiment, differences concerning the selective pressure to abiotic stress (i.e. drought) had been very small. In contrast to *Quercus robur*, interpopulation differences concerning physiological reactions were found in *Tilia cordata*, albeit they did not affect survival. These differences could be partly related to precipitation conditions at the site of origin. We can only speculate on the reasons. However, compared to *Quercus robur* with glacial refugia in south-west and south-east Europe, those of *Tilia cordata* were concentrated in south-east Europe (Willis 1996), suggesting less interaction of different genotypes during post-glacial immigration.

On the biochemical level, species differed in their drought reactions. GFS only increased for *Quercus robur* (German populations) at drought stress treatments compared to the control treatment and not for *Tilia cordata* (Tab. 3). Osmoregulation seems to be a high plastic trait with large interspecific variations (Aspelmeier and Leuschner 2004). In contrast to GFS, proline accumulation could be observed for both species at SDD and interpopulation differences occurred (Table 2). The manifold features of proline under several environmental stresses (e.g. Szabados and Saviouré 2010; Taylor 1996) could be a reason for the species-unspecific accumulation of proline. In both species, proline was significantly synthesized only with slowly developing drought (SDD) (Table 2), suggesting a higher vulnerability of short and intense drought events.

Regarding drought stress reactions, the current study shows only minor hints of local adaptation of *Quercus robur* and *Tilia cordata* populations. This is in accordance with previous investigations regarding early (Selig and Bohne 2016a) and late frost reactions (Selig and Bohne 2016b). Regulations within § 40 of BNatSchG do not differ between species, because of assumed local adaptation of populations of woody species *per se*. However, these

assumptions could not be confirmed by the current study. This should be considered by the generalized restrictions of BNatSchG § 40 and the assignment of the defined areas of origin. Otherwise, the costs for nursery production will be unnecessarily increased and the availability of a specific species for landscaping purposes may be reduced.

## References

- Arend, M., T. Kuster, M. S. Gunthardt-Goerg, and M. Dobbertin. 2011. Provenance-specific growth responses to drought and air warming in three European oak species (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*). *Tree Physiol.* 31:287–297.
- Arndt, S.K., S.C. Clifford, W. Wanek, H.G. Jones, and M. Popp. 2001. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. *Tree Physiol.* 21:705–715.
- Aspelmeier, S. and C. Leuschner. 2004. Genotypic variation in drought response of silver birch (*Betula pendula*): leaf water status and carbon gain. *Tree Physiol.* 24:517–528.
- Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:89–113.
- Barrs, H.D. and P.E. Weatherley. 1962. A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15:413–428.
- Bates, L., R. Waldren, and I. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205–207.
- Biere, A. and K. Verhoeven. 2008. Local adaptation and the consequences of being dislocated from coevolved enemies. *New Phytol.* 180:265–268.
- BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit). 2012. Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze. BMU Refer. N13. p. 1–32.
- BNatSchG (Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege). 2010. Bundesnaturschutzgesetz vom 29.07.2009, in Kraft getreten am 01.03.2010, zuletzt geändert durch Art. 421 V v. 31.3.2015 (BGBl. I 1474). BGBl I:2542.
- Boehringer, S.A. 1984. Methods of enzymatic food analysis using single reagents. *Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.* p. 79.

- 
- Callister, A.N., S.K. Arndt, P.K. Ades, A. Merchant, D. Rowell, and M.A. Adams. 2008. Leaf osmotic potential of *Eucalyptus* hybrids responds differently to freezing and drought, with little clonal variation. *Tree Physiol.* 28:1297–1304.
- Épron, D., E. Dreyer, and G. Aussenac. 1993. A comparison of photosynthetic responses to water stress in seedlings from 3 oak species: *Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q. rubra* L and *Q. cerris* L. *Annales Des Sciences Forestières* 50:48–60.
- Épron, D., and E. Dreyer. 1996. Starch and soluble carbohydrates in leaves of water-stressed oak saplings. *Annales Des Sciences Forestières* 53:263–268.
- FoVG. 2002. Forstvermehrungsgutgesetz vom 22.05.2002, in Kraft getreten am 01.01.2003, zuletzt geändert durch Artikel 414 V v. 31.08.2015 (BGBl. I S. 1474). BGBl. I S. 1658.
- Hare, P.D., W.A. Cress, and J. Van Staden. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21:535–553.
- Hothorn, T., F. Bretz, and P.H. Westfall. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical J.* 50:346–363.
- Kempa, S., J. Krasensky, S. Dal Santo, J. Kopka, and C. Jonak. 2008. A Central Role of Abscisic Acid in Stress-Regulated Carbohydrate Metabolism. *PLoS ONE* 3:e3935.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. (Accessed October 31, 2014)
- Roloff, A., S. Korn, and S. Gillner. 2009. The Climate-Species-Matrix to select tree species for urban habitats considering climate change. *Urban For. Urban Green.* 8:295–308.
- Sanchez-Rodriguez, J., P. Perez, and R. Martinez-Carrasco. 1999. Photosynthesis, carbohydrate levels and chlorophyll fluorescence-estimated intercellular CO<sub>2</sub> in water-stressed *Casuarina equisetifolia*. *Plant Cell Environ.* 22:867–873
- Schmidt, P.A. and A. Krause. 1997. Zur Abgrenzung von Herkunftsgebieten bei Baumschulgehölzen für die freie Landschaft. *Natur und Landschaft* 72:92-95.
- Selig, M. and H. Bohne. 2016a. Early frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany. *Eur. J. Hort. Sci.* 81:13–21.

---

Selig, M. and H. Bohne. 2016b. Late frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany. Eur. J. Hortic. Sci. 81:157–164.

Spieß, N., M. Oufir, I. Matusšíková, M. Stierschneider, D. Kopecky, A. Homolka, K. Burg, S. Fluch, J.F. Hausman, and E. Wilhelm. 2012. Ecophysiological and transcriptomic responses of oak (*Quercus robur*) to long-term drought exposure and rewatering. Environ. Exp. Bot. 77:117–126.

Steiner, M., E.G. Tóth, Á. Juhász, M.S. Diószegi, and K. Hrotkó. 2014. Stomatal responses of drought and heat stressed linden (*Tilia* sp.) leaves. Plants in Urban Areas and Landscape. Nitra: Slovak University of Agriculture 7-10.

Szabados, L. and A. Savouré. 2010 Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Sci. 15:89–97.

Taylor, C. 1996. Proline and water deficit: Ups, downs, ins, and outs. Plant Cell 8:1221–1224.

Thomas, F.M. and T. Gausling. 2000. Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. Ann. For. Sci. 57:325–333.

Wanjiku, J.G. and H. Bohne. 2016. Local Adaptation ? - Physiological and Biochemical Responses of four Hazelnut Populations to Drought and Possible Impacts on Tree Nurseries. J. Environ. Hort. 34:47–51.

Watanabe, S., K. Kojima, Y. Ide, and S. Sasaki. 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. Plant Cell Tiss. Org. 63:199–206.

Willis, K.J. 1996. Where did all the flowers go? The fate of temperate European flora during glacial periods. Endeavour 20:110–114.

Xiao, X., X. Xu, and F. Yang. 2008. Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. Silva Fenn. 42:705–719.

Ying, Y.Q., L.L. Song, D.F. Jacobs, L. Mei, P. Liu, S.H. Jin, and J.S. Wu. 2015. Physiological response to drought stress in *Camptotheca acuminata* seedlings from two provenances. Front. Plant Sci. 6:361.

---

Zhao, D., C.T. MacKown, P.J. Starks, and B.K. Kindiger. 2010. Rapid Analysis of Nonstructural Carbohydrate Components in Grass Forage Using Microplate Enzymatic Assays. *Crop Sci.* 50:1537-1545.

## 4 Allgemeine Diskussion

Nachdem die verschiedenen Reaktionen der Stressantwort auf Frost und Trockenheit der untersuchten Populationen von *Quercus robur* L. und *Tilia cordata* MILL. in den vorangegangenen Kapiteln detailliert diskutiert wurden, werden die Ergebnisse im Folgenden in einen größeren Zusammenhang gestellt.

### 4.1 Beurteilung der geringen Unterschiede in der Stressantwort zwischen den verwendeten Populationen

In der vorliegenden Arbeit wurden Populationen von *Tilia cordata* MILL. und *Quercus robur* L., welche aus Gebieten mit verschiedenen klimatischen Bedingungen stammten und geographisch verschiedenen Vorkommensgebieten zuzuordnen sind, auf mögliche Unterschiede bei der Reaktion auf Frühfrost, Spätfrost und Trockenstress untersucht. Bei *Quercus robur* wurde auch eine ungarische Population einbezogen. Es konnten nur in Ausnahmefällen signifikante Unterschiede zwischen den Populationen nachgewiesen werden. Zudem waren diese Unterschiede meist nur schwach signifikant und wirkten sich kaum auf das Überleben der Pflanzen aus. Dies ist besonders auffällig, wenn man bei *Quercus robur* nur die deutschen Populationen betrachtet. Zudem konnten Unterschiede zwischen Populationen nur in einem Fall (Trockenstress bei *Tilia cordata*) auf die klimatischen Bedingungen am Herkunftsstandort zurückgeführt werden. Dies deutet bezüglich der klimatisch bedingten Stressreaktionen auf nur geringe Unterschiede in der lokalen Anpassung der hier untersuchten Populationen hin.

In der Literatur sind allerdings Untersuchungen zu finden, die für verschiedene Baumarten Unterschiede zwischen Populationen nachweisen konnten. Dies ist sowohl bei physiologischen/biochemischen Parametern (Li et al. 2013) als auch bei morphologischen Parametern (Vitasse et al. 2009b, Alberto et al. 2011) der Fall. Unterschiede in der Ausbildung lokaler Adaptionen von Populationen sind unter anderem abhängig von Unterschieden in den klimatischen (z. B. Temperatur, Niederschlag) und geographischen (z. B. Breitengrad, Höhenlage) Bedingungen an den Herkunftsstandorten der Populationen (Kawecki und Ebert 2004, Savolainen et al. 2007). Die Unterschiede zwischen diesen Bedingungen sind bei den von uns untersuchten Populationen allerdings vergleichsweise gering. Untersuchungen, welche Unterschiede zwischen Gehölzpopulationen nachweisen konnten, verwendeten meist Populationen von Standorten mit größeren Unterschieden in den geographischen und klimatischen Bedingungen als es bei den von uns verwendeten Populationen der Fall war. Alberto et al. (2011) untersuchten unter anderem den Zeitpunkt des Austriebs bei Sämlingen von *Quercus petraea*. Um einen Einfluss des Breitengrades



(Anpassung an kritische Tageslänge) zu minimieren stammten die Populationen aus zwei Tälern (Ossau und Luz) der Pyrenäen mit Höhenlagen von 131 m bis 1630 m und wurden am selben Standort angezogen. Es wurden jeweils die Populationen verschiedener Höhenlagen eines Tals miteinander verglichen. Hier konnten signifikante Unterschiede im Zeitpunkt des Austriebs zwischen den Populationen des jeweiligen Tals nachgewiesen werden. Populationen aus höheren Lagen trieben später aus als Populationen aus tieferen Lagen, was als Anpassung an die kälteren Bedingungen in höheren Lagen angesehen wird (Ducouso et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede im Austrieb zwischen den deutschen Populationen beider Baumarten nachgewiesen werden. Die Variation in der Höhenlage der von uns verwendeten Populationen war sowohl für *Quercus robur* (50 m – 350 m) als auch für *Tilia cordata* (160 m – 450 m) wesentlich geringer. Nur die ungarische Population (HU) von *Quercus robur* zeigte einen gering signifikanten, früheren Austrieb als die Population aus Brandenburg (BB), obwohl sie mit einer Höhenlage von 100 m ü. NN ebenfalls in dem Bereich der deutschen Populationen lag. Dieser frühere Austrieb ist vermutlich auf eine Anpassung an Unterschiede in der durchschnittlichen Temperatur zum Zeitpunkt des Austriebs an den Herkunftsstandorten (HU 10,3 °C; BB 7,3 °C) zurückzuführen.

Die Annahme von Unterschieden zwischen Populationen in der Anpassung an lokale Umweltbedingungen setzt Unterschiede im Selektionsdruck zwischen den Herkunftsstandorten der jeweiligen Populationen voraus (Petit und Thompson 1998). Frost- und Trockenheitsereignisse sind starke Selektionsdrücke (Kreyling et al. 2012) und werden unter anderem durch die klimatischen und geographischen Umweltbedingungen beeinflusst. Die insgesamt aber geringen Unterschiede in diesen Umweltbedingungen zwischen den Herkunftsstandorten der von uns verwendeten Populationen können dafür sprechen, dass sich nur geringe Unterschiede in der Adaption an lokale Umweltbedingungen zwischen den Populationen ausgebildet haben und daher nur geringe Unterschiede in den Stressreaktionen zwischen den Populationen nachgewiesen werden konnten.

Eine Anpassung von Population an lokale Umweltbedingungen kann aber nicht nur durch die Mechanismen der Selektion, sondern auch durch Veränderung des Phänotyps, der so genannten phänotypischen Plastizität geschehen (Gimeno et al. 2009, Grenier et al. 2016). Selektion findet auf der genetischen Ebene einer Population statt, indem Individuen mit unvorteilhaften Eigenschaften (geringere Fitness) über mehrere Generationen hinweg ausselektiert werden und sich Individuen mit vorteilhaften Eigenschaften (höhere Fitness) durchsetzen. Dies verringert in der Regel die genetische Diversität einer Population und führt zu einer genetisch determinierten lokalen Anpassung an die Umweltbedingungen am Herkunftsstandort (Grenier et al. 2016). Die phänotypische Plastizität hingegen befähigt ein Individuum sich an ändernde Umweltbedingungen rein phänotypisch anzupassen. Diese

---

Anpassung geschieht schnell (innerhalb einer Generation) und nicht auf genetischer Ebene, also ohne genetische Anpassung an die Umweltbedingungen am Herkunftsstandort. Unter bestimmten Bedingungen kann die phänotypische Plastizität die genetische Adaption (Selektion) einer Population beeinflussen (Grenier et al. 2016) oder auch selbst als Eigenschaft, welche der Selektion unterliegt, angesehen werden (Kreyling et al. 2019). Die phänotypische Plastizität wirkt sich auf die Fitness eines Individuums aus. Sie kann fehlangepasst (negative Beeinflussung der Fitness), neutral (keine Beeinflussung der Fitness) oder adaptiv (positive Beeinflussung der Fitness) sein (Scheiner 1993). Wie sich die phänotypische Plastizität auf die Fitness auswirkt ist abhängig von dem dafür erforderlichen Aufwand. Plastische Veränderungen gehen mit einem Aufwand einher wie z. B. Energie- oder Materialverbrauch (DeWitt et al. 1998). Wirkt sich die phänotypische Anpassung eines Individuums an lokale Umweltbedingungen, trotz des zu erbringenden Aufwands, positiv auf die Fitness (adaptive Plastizität) aus, wird dieses Individuum nicht ausselektiert. Es können sich also auch Genotypen innerhalb einer Population durchsetzen, die nicht genetisch an die lokalen Umweltbedingungen angepasst sind, da sie sich phänotypisch anpassen können. Dies führt nicht zu einer Reduzierung der genetischen Diversität der Population und schwächt somit den Effekt der Selektion ab (Grenier et al. 2016). Diese Abschwächung des Effektes der Selektion führt ebenso zu einer Verminderung der Ausbildung einer genetisch determinierten lokalen Anpassung dieser Populationen und kann somit einer genetischen Differenzierung zwischen Populationen entgegen wirken. Die phänotypische Plastizität wird bei Gehölzen als stark ausgeprägt angesehen (Petit und Hampe 2006). Dies könnte als Grund angeführt werden, warum in der vorliegenden Arbeit nur marginale Unterschiede zwischen den Stressreaktionen der Populationen gefunden wurden. Allein durch die Messung von phänotypischen Merkmalen (physiologische und biochemische Parameter) kann allerdings nicht direkt auf die genetische Struktur der Populationen geschlossen werden. Es wurden in der vorliegenden Arbeit keine genetischen Analysen zur Differenzierung der Populationen durchgeführt. Und somit kann hier nicht unterschieden werden, ob die geringen Unterschiede in den Stressreaktionen zwischen den Populationen auf nur geringe genetische Differenzierung der Populationen oder auf die Überlagerung einer möglichen genetischen Differenzierung durch die Ausbildung ähnlicher Phänotypen unter ähnlichen Umweltbedingungen (phänotypische Plastizität) zurückzuführen ist. Ähnliches berichten auch Vitasse et al. (2010) bei *Fagus sylvatica* und *Quercus petraea*. In dieser Arbeit wurden Populationen untersucht, die von verschiedenen Höhenlagen in den Pyrenäen stammten. Beide Baumarten wiesen schwache aber signifikante, genetische Unterschiede zwischen den Populationen auf (Vitasse et al. 2009b). In einem späteren Experiment mit den gleichen Populationen wurde eine starke phänotypische Plastizität anhand phänologischer Merkmale (Zeitpunkt von Triebabschluss und Austrieb) beobachtet. Die Autoren kamen zu dem Schluss,

dass der überwiegende Teil der Variation in den phänologischen Merkmalen an den verschiedenen Versuchsstandorten eher auf die hohe phänotypische Plastizität als auf die genetischen Unterschiede zwischen den Populationen zurückzuführen ist (Vitasse et al. 2010). Auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine genetischen Untersuchungen durchgeführt wurden, gibt es in der Literatur allerdings Quellen, die eine Schlussfolgerung bezüglich einer geringen genetischen Differenzierung zwischen Gehölzpopulationen stützen. Bäumen wird im Allgemeinen aufgrund ihrer Lebenseigenschaften eine hohe genetische Diversität innerhalb ihrer Populationen, aber nur eine geringe genetische Diversität zwischen den Populationen zugeschrieben (Hamrick et al. 1992). Dies kann durch genetische Untersuchungen auch auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Baumarten angewendet werden. Molekulargenetische Untersuchungen bei europäischen Populationen von *Quercus robur* z. B. durch Zanetto et al. (1994) (Frankreich, Österreich, Slowenien, Rumänien, Serbien, Skandinavien), Yakovlev und Kleinschmidt (2002) (europäischer Teil Russlands) und Crăciunesc et al. (2016) (Rumänien) wiesen eine hohe genetische Diversität innerhalb der Populationen nach, aber nur eine geringe zwischen den Populationen. Gleiches gilt für Untersuchungen bei europäischen Populationen von *Tilia cordata* z. B. durch Fineschi et al. (2003) (England, Schweden, Deutschland, Frankreich, Italien, Slowakei, Russland) und Mylett (2015) (England). Dieses Phänomen lässt sich mit den Lebenseigenschaften beider Baumarten erklären. Sowohl *Tilia cordata* als auch *Quercus robur* sind langlebige Gehölzarten mit großen geographischen Verbreitungsgebieten, fremdbefruchtendem Vermehrungssystemen und über Wind und bei *Tilia cordata* auch Insekten verbreitete Pollen, was einen hohen Genfluss, also den Austausch genetischen Materials, zwischen den Populationen erlaubt (Hamrick et al. 1992). Dies wirkt einer Anpassung an lokale Umweltbedingungen und somit einer genetischen Differenzierung der Populationen entgegen. Interessanterweise wiesen Pohjanmies et al. (2016) bei Populationen von *Quercus robur* aus Finnland signifikante genetische Unterschiede zwischen den Populationen nach, wobei aber auch hier der Großteil der genetischen Variation innerhalb der Populationen lag. Verantwortlich für die relativ großen genetischen Unterschiede zwischen den Populationen ist nach Meinung der Autoren die Lage dieser Populationen im Verbreitungsgebiet der Baumart. Am Rand eines Verbreitungsgebietes herrschen ein geringerer, asymmetrischer Genfluss sowie ein höherer Selektionsdruck, insbesondere durch häufiger und stärker auftretende Stressereignisse, auf die Individuen einer Population verglichen mit zentraleren Bereichen des Verbreitungsgebietes (Eckert et al. 2008, Kawecki 2008). Dies führt zu einer stärkeren Adaption an die lokalen Umweltbedingungen am Rand des Verbreitungsgebietes. Die von uns verwendeten Populationen von *Quercus robur* und *Tilia cordata* stammten aus dem zentralen Bereich ihres jeweiligen Verbreitungsgebiets, was ebenfalls als Grund für die nur geringen Unterschiede zwischen den Populationen sprechen kann.

Die heutige genetische Struktur einer Gehölzart ist allerdings nicht nur abhängig von ihren Lebenseigenschaften, sondern auch von erdgeschichtlichen Ereignissen, die ebenfalls Einfluss auf evolutionäre Prozesse hatten. Die phylogenetische Geschichte, also die Entwicklung von Taxa oder bestimmter Arten innerhalb eines Taxons, der europäischen Flora und Fauna ist geprägt durch sich abwechselnde Kaltphasen (Glazial) und Warmphasen (Interglazial) während der jüngeren Erdgeschichte, insbesondere des Quartärs. Diese hatten großen Einfluss auf die phylogeographische Struktur (Entwicklung und Verbreitung der Taxa beziehungsweise Arten innerhalb eines Taxons). Während des letzten Glazial (Weichsel-Kaltzeit) bildeten sich in Nordeuropa ein Eisschild und Permafrost-Bedingungen in Zentraleuropa (z.B. Velichko et al. 1997). Diese Bedingungen führten zu einem Rückzug der Arten nach Südeuropa. Die Refugien, die ein Überleben ermöglichten, lagen überwiegend auf der iberischen Halbinsel, in Italien und dem Balkan (Willis 1996, Hewitt 2004). Aufgrund natürlicher Barrieren wie z.B. dem Mittelmeer waren diese Refugien voneinander isoliert (Austerlitz et al. 2000). Diese Isolation dauerte ca. 100.000 Jahre an. Mit steigenden Temperaturen in Europa begannen die Arten vor etwa 15.000 Jahren zu Beginn des heutigen Interglazial (Holozän) aus ihren Refugien in Süd-, Südwest- und Südosteuropa in Richtung Nordeuropa zurückzuwandern (Brewer et al. 2002). Durch Pollenanalysen können Rückschlüsse auf die Rekolonisierungsrouten verschiedener Arten/Gattungen gezogen werden. Es wird vermutet, dass durch die lange Zeit der Isolation die genetischen Unterschiede zwischen den Populationen in den jeweiligen Refugien groß waren und dies teilweise auch für genetische Unterschiede von heutigen Populationen, die aus unterschiedlichen Refugien stammen, verantwortlich ist (Kremer 2016). Bestimmte Zonen (z. B. Zentraleuropa) bilden bei der Betrachtung der post-glazialen Rekolonisierung Europas allerdings eine Ausnahme. Hier treffen und vermischen sich Abstammungslinien aus verschiedenen glazialen Refugien. Dies kann als einer der Gründe dafür angesehen werden, dass in diesen Zonen eine geringere genetische Diversität zwischen den Populationen herrscht als im Vergleich zu anderen Regionen Europas (Petit et al. 2002). Da dies nach Petit et al. (2002) auch auf die deutschen Populationen von *Quercus robur* in der vorliegenden Arbeit übertragen werden kann, könnte dies ein weiterer Ansatz zur Erklärung der geringen Unterschiede zwischen den Populationen sein.

## **4.2 Beurteilung der Ergebnisse vor dem Hintergrund des Klimawandels**

Bei der Betrachtung möglicher Anpassung von Baumpopulationen an ihre Standorte in der Vergangenheit ist auch ein Blick in die Zukunft interessant. Es stellt sich die Frage ob und wie Baumpopulationen mit den sich rapide verändernden Umweltbedingungen umgehen

können. Für Deutschland wird eine Erhöhung der durchschnittlichen Tagestemperatur im Zeitraum von 2021 bis 2050 zwischen 1 und 2,5 °C und eine Reduktion der Sommerniederschläge, insbesondere in den östlichen Landesteilen, von 30 % vorausgesagt (Umweltbundesamt 2011). Diese rapiden Veränderungen gehen mit weitreichenden Folgen für die Tier- und Pflanzenwelt einher. Eine Reduktion der Sommerniederschläge zusammen mit erhöhten Temperaturen führt zu häufigeren und stärkeren Trockenstressereignissen. Ebenso kann es zu einer Verschiebung der phänologischen Phasen kommen, insbesondere des Triebabschlusses und des Zeitpunkts des Austriebs, was zu einem größeren Risiko von Früh- und Spätfrostschäden führen kann (Günthardt-Goerg und Arend 2013). Hierbei muss allerdings zwischen Baumarten mit unterschiedlichem Sukzessionsstatus differenziert werden. Untersuchungen von Basler und Körner (2012) zeigten, dass Baumarten mit frühem Sukzessionsstatus (z. B. *Betula pendula* und *Fraxinus excelsior*) bezüglich des Austriebs weniger photoperiodisch sensitiv reagieren als Baumarten mit spätem Sukzessionsstatus (z. B. *Quercus robur*, *Tilia cordata*, *Fagus sylvatica*). Die photoperiodische Sensitivität kann als Strategie angesehen werden, um den Austrieb trotz warmer Temperaturen zu ungünstigen Zeitpunkten (z. B. starke Gefahr von Frostereignissen) zu verzögern (Basler und Körner 2012). Baumarten mit stärkerer photoperiodischer Sensitivität (später Sukzessionsstatus) werden also vermutlich weniger stark von dem erhöhten Risiko durch Spätfrostschäden bei steigenden Temperaturen durch den Klimawandel betroffen sein. Dennoch kann hierdurch auch ein Nachteil entstehen, da Baumarten mit frühem Sukzessionsstatus aufgrund ihrer überwiegend temperaturabhängigen Steuerung des Austriebs die im Zuge des Klimawandels verlängerte Vegetationsperiode besser ausnutzen können und dadurch einen Konkurrenzvorteil gegenüber photoperiodisch sensitiven Baumarten besitzen (Körner und Basler 2010, Way und Montgomery 2014).

Die untersuchten Populationen von *Quercus robur* und *Tilia cordata* zeigten nach einem Stressereignis, auch unter Stressbedingungen, die für weite Teile Deutschlands insbesondere der Standorte der Populationen (noch) untypisch sind eine hohe Regenerationsfähigkeit und ein hohes Überlebenspotenzial. Dies lässt darauf schließen, dass die Individuen dieser Populationen auch Stressbedingungen überleben können, denen sie am natürlichen Standort nur selten oder gar nicht ausgesetzt sind. Die Stressbedingungen (zum Beispiel Frosttemperatur) losgelöst von anderen Faktoren zu betrachten wäre allerdings inkonsequent. Stressreaktionen sind ein System sehr komplexer Faktoren. Zum Beispiel korreliert im Fall von Früh- beziehungsweise Spätfroststress der phänologische Status (Zeitpunkt von Triebabschluss beziehungsweise Austrieb) sehr stark mit dem Schaden (Kreyling et al. 2014, Deans und Harvey 1996). Der phänologische Status ist wiederum von Faktoren abhängig (unter anderem Interaktion von Temperatur und Photoperiode, Kältebedürfnis, Wärmebedürfnis) die sich gegenseitig beeinflussen. Eine Vorhersage, wie der Klimawandel

diese Faktoren und ihre komplexen, ökologischen Interaktionen beeinflusst, ist kaum möglich (Aitken et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Regenerationsfähigkeit beziehungsweise des Überlebens sind also vielmehr eine Momentaufnahme unter den aktuell herrschenden Umweltbedingungen. Fest steht, dass die Veränderungen in den Umweltbedingungen durch den Klimawandel eine Verschiebung des Selektionsdruckes bedingen, dem eine Population an einem bestimmten Standort ausgesetzt ist (Jump et al. 2009). Es steht also die Frage im Raum, ob und wie sich Baumpopulationen an diese verändernden Umweltbedingungen anpassen können.

Das Ausmaß der genetischen Diversität innerhalb von Baumpopulationen ist ein entscheidender Faktor für eine genetische Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen (z.B. Jump und Peñuelas 2005). Eine starke intrapopuläre genetische Diversität ist unter anderem durch einen starken Genfluss zwischen Populationen bedingt (Hamrick et al. 1992). Dies trifft durch verschiedene Eigenschaften auch auf die von uns verwendeten Baumarten (Langlebigkeit, fremdbefruchtendes Vermehrungssystem und weite Samen- und Pollenverbreitung) und deren Populationen (zentrale Lage im Verbreitungsgebiet der Baumart; kein asymmetrischer Genfluss) zu. Im Allgemeinen führt der Genfluss zwischen Populationen zu einer Abschwächung des Effektes der Selektion beziehungsweise Adaption an lokale Umweltbedingungen (Aitken und Whitlock 2013), da genetisches Material von anderen nicht lokalen Populationen, mit unter Umständen geringerer Fitness als am Zielstandort, in die lokale Population eingebracht wird. Eine hohe genetische Diversität ermöglicht es Populationen allerdings auch Allele vorzuhalten, die von zukünftigem Nutzen bei der genetischen Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen sind, auch wenn diese in der aktuellen Situation nicht vorteilhaft sein sollten (Jump et al. 2009). Die genetische Diversität innerhalb von Baumpopulationen ist verglichen mit anderen Pflanzengruppen groß, was die genetische Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen begünstigt (z.B. Hamrick 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit kann indirekt über die hohe Standardabweichung bei den untersuchten Parametern (Stressreaktionen, Phänologie) auf eine hohe Variabilität innerhalb der Populationen geschlossen werden (Kreyling et al. 2014). Eine Grundvoraussetzung für die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen ist also auch bei den von uns untersuchten Populationen gegeben.

Aufgrund ihrer Langlebigkeit und der langen Generationszyklen benötigen Baumpopulationen, verglichen mit anderen Pflanzengruppen, mehr Zeit für eine genetische Anpassung. Eichen benötigen zum Beispiel je nach Stand etwa 40-50 Jahre (freistehend) und 60-70 Jahre (im Bestand) um fortpflanzungsfähig zu sein (MacCárthaigh und Spethmann 2000). Dies könnte bei dem prognostizierten, sehr schnell eintretenden Klimaveränderungen dazu führen, dass Baumpopulationen sich nicht schnell genug genetisch an die sich ändernden Umweltbedingungen anpassen können (Matyas 1996).

Eine schnelle aber eingeschränkte, nicht genetische Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen wird über die Mechanismen der phänotypischen Plastizität ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit kann auf Grund des experimentellen Designs nicht direkt auf das Ausmaß der phänotypischen Plastizität der untersuchten Populationen geschlossen werden. Dennoch wird diese bei Gehölzarten im Allgemeinen (Petit und Hampe 2006) und bei den von uns verwendeten Baumarten im Speziellen (Kramer 1995) als sehr ausgeprägt angesehen. Die phänotypische Plastizität kann ein entscheidender Faktor bei der Anpassung von Baumpopulationen an die sich schnell verändernden Umweltbedingungen durch den Klimawandel sein (Vitasse et al. 2010). Sie ermöglicht es den Individuen innerhalb einer Population die ersten Jahre widriger Umweltbedingungen zu überstehen und die Fortpflanzung aufrecht zu erhalten, um durch Rekombination neue, besser angepasste Genotypen hervorzubringen (Hamrick 2004).

Durch die Mechanismen der Anpassung, ob phänotypisch oder genetisch, ist es Bäumen und ihren Populationen möglich, unter sich verändernden Umweltbedingungen zu überleben. Dies zeigt auch die phylogenetische Geschichte der europäischen Baumarten mit ihren immer wiederkehrenden Klimaveränderungen (Kremer 2016). Eine neue Herausforderung, der sich Baumarten in der aktuellen Situation allerdings stellen müssen, ist die Geschwindigkeit mit der sich die Umweltbedingungen verändern. Auch wenn die Grundvoraussetzungen für eine Anpassung gegeben sind, bleibt die Frage offen, ob die europäischen Baumarten sich schnell genug an den Klimawandel anpassen können.

### **4.3 Beurteilung der Ergebnisse aus naturschutzfachlicher Sicht**

Aus naturschutzfachlicher Sicht stellen der Erhalt der genetischen Diversität, insbesondere der innerartlichen, und die Sicherung der genetischen Struktur von Gehölzpopulationen ein wichtiges Ziel dar (BMU 2012, Seitz und Kowarik 2007). Durch die Novellierung des Bundesnaturschutzgesetzes im Jahr 2010 soll dies durch die Verwendung gebietseigenen Pflanzenmaterials (genetischer Ursprung innerhalb eines der 6 Vorkommensgebiete) in Deutschland sichergestellt werden. Der Ausweisung der 6 Vorkommensgebiete lag die Annahme zugrunde, dass die vergleichsweise homogenen ökologischen Bedingungen innerhalb bestimmter Gebiete (ökologische Grundeinheiten nach FoVHgV (1994)) beziehungsweise die Unterschiede zwischen den Gebieten zur Ausbildung unterschiedlicher, entsprechend angepasster, genetisch einheitlicher Genotypen geführt haben (Frenz et al. 2009). Diese Annahme kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich Unterschieden in den Stressreaktionen und in der Phänologie von Populationen von *Quercus robur* und *Tilia cordata*, welche von Standorten in verschiedenen Vorkommensgebieten stammten, nicht untermauert werden. Gleiches berichten auch Eimert et al. (2012) durch

Untersuchungen zur genetischen Differenzierung von *Prunus spinosa* L. Populationen in Deutschland. Sie konnten mit ihren Methoden keinen eindeutigen Nachweis zur Unterstützung der angenommenen Anpassung der Populationen an bestimmte Vorkommensgebiete finden. Obwohl es sich bei den Ergebnissen von Eimert et al. (2012) zu *Prunus spinosa* um eine Strauchart mit anderen Lebensgemeinschaften als bei den in dieser Arbeit untersuchten Arten handelt, unterstreichen sie, dass die Annahme über die genetische Differenzierung von Gehölzpopulationen aus verschiedenen Vorkommensgebieten nicht schematisch möglich ist. Ebenso ist aber auch eine grundsätzliche Annahme geringer genetischer Diversität zwischen Gehölzpopulationen innerhalb eines Vorkommensgebietes, aufgrund der angenommenen Anpassung an homogene, ökologische Bedingungen, schwierig. Eimert et al. (2012) beschreiben zum Teil höhere genetische Differenzierung zwischen Populationen von *Prunus spinosa* innerhalb eines Vorkommensgebietes als zwischen den Vorkommensgebieten.

Wird bei der Ausweisung der forstlichen Herkunftsgebiete feiner unterteilt, zum Beispiel individuell nach Baumart und unter Einbeziehung von Höhenlagen, so ist dies bei der Einteilung der Vorkommensgebiete nicht grundsätzlich der Fall (BMU 2012). Zwar können, sofern aus naturschutzfachlicher Sicht notwendig, auch weitere Differenzierungen (zum Beispiel Hochgebirgslagen) berücksichtigt werden, die formellen Bedingungen für diese Entscheidung werden im „Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze“ allerdings nicht weiter aufgeführt. Dabei wurde gerade für klimatisch extreme Standorte, wie Höhenlagen, die Ausbildung genetisch differenzierter Populationen bei relativ kleinen geographischen Unterschieden nachgewiesen (z. B. Vitasse et al. 2009b, Alberto et al. 2011). Schon Schmidt und Krause (1997) wiesen in ihrer Publikation, auf die sich die Einteilung der Vorkommensgebiete in Deutschland bezieht, auf ungelöste Fragen hinsichtlich der Verwendung gebietseigener Gehölze hin. Es herrsche nur lückenhaftes Wissen über die genetische Differenzierung vieler Baumarten und darüber, ob lokale Populationen wirklich gebietseigen sind oder schon anthropogenen Eingriffen unterlagen. Laut Schmidt und Krause (1997) steht vielfach die bloße Vermutung anstelle des endgültigen Beweises. Trotz vermehrter wissenschaftlicher Untersuchungen der letzten Jahre sind diese Fragen weiterhin nicht klar zu beantworten. Auch Eimert et al. (2012) stellen die Regelungen zur Verwendung gebietseigener Gehölze im Sinne des BNatSchG § 40 in Frage. Ihrer Meinung nach sollte über alternative Konzepte nachgedacht werden, um dieselben ausgewiesenen, naturschutzfachlichen Ziele zu erreichen. Eines dieser Konzepte könnte es sein, wann immer möglich, bei Renaturierungsmaßnahmen auf den Prozess der natürlichen Sukzession zu setzen; entweder ausschließlich unbeeinflusst durch den Menschen, oder durch angepasste, aber so gering wie möglich gehaltene Steuerung. Dies würde natürliche Prozesse bei



Renaturierungsmaßnahmen bewahren und finanzielle Ressourcen schonen, die für weitere Forschung im Bereich des Umweltschutzes nötig sind.

Bei der Verwendung gebietseigener Gehölze nach dem BNatSchG § 40 können Probleme bei der Bereitstellung geeigneten, gebietseigenen Saatgutes auftreten. Im FoVG gibt es Ausnahmeregelungen, die eine ersatzweise Nutzung von Pflanzenmaterial aus ausgewiesenen, direkt angrenzenden Herkunftsgebieten (Ersatzherkunftsgebiete) ermöglichen, wenn geforderte Gehölze nachweislich nicht verfügbar sind. Dies ist für die Verwendung von gebietseigenem Pflanzenmaterial im Sinne des BNatSchG § 40 für die freie Natur nicht grundsätzlich gegeben, sondern steht unter Genehmigungspflicht. Hier sollten ebenfalls Ausnahmeregelungen getroffen werden können, gerade vor dem Hintergrund, dass durch Genfluss zwischen Gehölzpopulationen angrenzender Vorkommensgebiete ein Austausch genetischen Materials auch auf natürliche Weise möglich ist. Studien über die Windverbreitung von Pollen beschreiben bei *Quercus robur* Entfernungen von 80 km (Buschbom et al. 2011) beziehungsweise sogar 199 km (Dyakowska und Zurzycki 1959 in Ducouso et al. 1993).

Das Konzept, Gebiete für die Verwendung von Pflanzenmaterial auszuweisen, ist auch in anderen Ländern verbreitet. So werden zum Beispiel im kanadischen Bundesstaat Alberta, aber auch in US amerikanischen und anderen kanadischen Bundesstaaten, sogenannte „Seed Zones“ für Gehölze ausgewiesen (ASRD 2016). Vergleichbar mit den deutschen Herkunftsbeziehungsweise Vorkommensgebieten sind diese Gebiete auch aufgrund der Annahme von homogenen ökologischen Bedingungen entstanden und stehen stellvertretend für die genetische Struktur einer Baumart (Gray und Hamann 2011). Die Verwendung von Pflanzenmaterial in den Seed Zones ist gesetzlich verankert und wird in den „Alberta Forest Genetic Resource Management and Conservation Standards“ geregelt (ASRD 2016). Das Verbot der Verwendung von Pflanzenmaterial außerhalb der Seed Zone, aus welcher es stammt, soll auch hier sicherstellen, dass nur Pflanzenmaterial verwendet wird, welches an die lokalen Umweltbedingungen angepasst ist. Die Seed Zones sind, wie die deutschen Vorkommensgebiete, nicht artspezifisch unterteilt, was aber in der letzten Version der „Alberta Forest Genetic Resource Management and Conservation Standards“, aufgrund wissenschaftlicher Erkenntnisse über artspezifische Unterschiede in der Anpassung an lokale Umweltbedingungen (Chai et al 2013), in Aussicht gestellt wird (ASRD 2016).

Das Konzept der Verwendung gebietseigenen Pflanzenmaterials wird seit Jahrzehnten in verschiedenen Ländern erfolgreich angewendet. Dennoch stellen Wissenschaftler die Grundannahme, dass lokale Populationen optimal an ihren Standort angepasst sind, in Anbetracht der schon herrschenden und vorhergesagten Klimaveränderungen, in Frage (z. B. McKenney et al. 2009, Gray and Hamann 2011, Aitken und Whitlock 2013). Auch diese Überlegungen sind in die „Alberta Forest Genetic Resource Management and Conservation

Standards“ einbezogen worden. Durch weiterführende Forschung soll es zur Entwicklung sogenannter „seed transfer and deployment standards“ kommen. Eine weitere, kontinuierliche Einbeziehung wissenschaftlicher Forschung ist auch für das BNatSchG und den „Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze“ sinnvoll und wünschenswert.

## 5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurden hinsichtlich ihrer phänologischen, physiologischen und biochemischen Reaktionen auf Frost- und Trockenstress nur in Einzelfällen geringe Unterschiede zwischen den Populationen von *Quercus robur* und *Tilia cordata* gefunden. Dies ist insbesondere bei den untersuchten deutschen Populationen der Fall. Ebenso konnte auch nur in einem Fall ein Zusammenhang zwischen Unterschieden in der Stressreaktion und den Umweltbedingungen am Herkunftsstandort hergestellt werden. Die Annahme des BNatSchG §40 von Unterschieden in der Anpassung an lokale Umweltbedingungen von Baumpopulationen in Deutschland, die durch die Einteilung der Vorkommensgebiete geographisch abgebildet werden können, ist für die hier untersuchten Baumarten insgesamt also nicht zu bestätigen. Mögliche Gründe hierfür sind vergleichsweise geringe Unterschiede in den Umweltbedingungen (Selektionsfaktoren), sowie Eigenschaften der untersuchten Baumarten (hohe phänotypische Plastizität, starker Genfluss zwischen Populationen, phylogeographische Geschichte), welche die Ausbildung von Unterschieden in der Anpassung an lokale Umweltbedingungen beeinflussen. Einschränkend muss allerdings angemerkt werden, dass hier nur einzelne Populationen untersucht wurden, die nicht die gesamte Populationsstruktur eines Vorkommensgebietes abdecken. Zudem sind die Reaktionen auf Stressereignisse bei Gehölzen sehr komplex und beinhalten sehr viele, zum Teil miteinander korrelierende, biochemische und physiologische Parameter. Hier konnten nur einzelne, wenn auch repräsentative, Stressparameter untersucht werden. Da allerdings auch Schadensparameter sowie das Überleben der Pflanzen nach einem Stressereignis untersucht wurden und diese ebenfalls nicht auf Unterschiede zwischen den Populationen hindeuten, kann vermutet werden, dass auch bei den nicht untersuchten Parametern keine essentiellen Unterschiede zwischen den Populationen bestehen. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit bezogen sich auf phänotypische Merkmale, es wurden keine genetischen Analysen der verschiedenen Populationen durchgeführt. Dementsprechend kann nicht eindeutig auf das Fehlen genetischer Unterschiede zwischen den Populationen geschlossen werden.

Trotz dieser Einschränkungen gibt die vorliegende Arbeit wichtige Hinweise darauf, dass Unterschiede in der Anpassung von Populationen an lokale Umweltbedingungen der von uns untersuchten Baumarten in Deutschland nicht so klar und ausgeprägt sind, wie die Einteilung in die Vorkommensgebiete vermuten lässt. Dies sollte im BNatSchG §40 berücksichtigt werden, um unnötige Kosten für die Produktion und die Bereitstellung gebietseigenen Pflanzenmaterials in Deutschland zu minimieren. Zum Beispiel sollten die Regelungen für die Einteilung der Vorkommensgebiete weniger generell sein. Eine Einbeziehung der Gehölzart beziehungsweise Baumart und somit die Berücksichtigung möglicher Auswirkungen

---

artspezifischer Lebenseigenschaften auf die Mechanismen der Selektion wären wünschenswert. Bei Ausschreibungen für Rekultivierungsmaßnahmen in der freien Natur sollte ähnlich wie bei den forstlichen Herkunftsgebieten auf ausgewiesene Ersatzvorkommensgebiete zurückgegriffen werden können, um Engpässe bei der Bereitstellung geeigneten Pflanzenmaterials einer bestimmten Baumart zu verhindern. Zudem sollte das Konzept der Verwendung gebietseigener Gehölze in Deutschland vor dem Hintergrund des Klimawandels grundsätzlich überdacht werden um die Anpassung der Baumarten in Deutschland an die anthropogen bedingten, sich rapide verändernden Umweltbedingungen zu unterstützen und ein Überleben zu sichern.

---

## 6 Literaturverzeichnis

Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. A., Wang, T. & Curtis-McLane, S. (2008): Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, 1(1), 95–111.

Aitken, S. N. & Whitlock, M. C. (2013): Assisted Gene Flow to Facilitate Local Adaptation to Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 44(1), 367–388.

Alberto, F., Bouffier, L., Louvet, J. M., Lamy, J.B., Delzon, S. & Kremer, A. (2011): Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(7), 1442–1454.

ASRD (2003): Standards for Tree Improvement in Alberta (STIA). Alberta Sustainable Resource Development, Land and Forest Division, Edmonton, Alberta.

ASRD (2016): Alberta Forest Genetic Resource Management and Conservation Standards (first revision of FGRMS; third revision of STIA). Alberta Agriculture and Forestry, Forestry Division, Edmonton, Alberta.

Austerlitz, F., Mariette, S., Machon, N., Gouyon, P. H. & Godelle, B. (2000): Effects of colonization processes on genetic diversity: Differences between annual plants and tree species. *Genetics*, 154(3), 1309–1321.

Basler, D. & Körner, C. (2012): Photoperiod sensitivity of bud burst in 14 temperate forest tree species. *Agricultural and Forest Meteorology*, 165, 73–81.

Biere, A. & Verhoeven, K. (2008): Local adaptation and the consequences of being dislocated from coevolved enemies. *New Phytologist*, 180(2), 265–268.

BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) (2012): Leitfaden zur Verwendung gebietseigener Gehölze. BMU Referat, N13, 1–32.

BNatSchG (Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege) (2010): Bundesnaturschutzgesetz vom 29.07.2009, in Kraft getreten am 01.03.2010, zuletzt geändert durch Art. 8 G v. 13.Mai 2019 (BGBl. I S. 706).

Brewer, S., Cheddadi, R., de Beaulieu, J. L. & Reille, M. (2002): The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management*, 156(1–3), 27–48.

---

Buschbom, J., Yanbaev, Y. & Degen, B. (2011): Efficient Long-Distance Gene Flow into an Isolated Relict Oak Stand. *Journal of Heredity*, 102(4), 464–472.

Caffarra, A. & Donnelly, A. (2011): The ecological significance of phenology in four different tree species: effects of light and temperature on bud burst. *International Journal of Biometeorology*, 55(5), 711–721.

Callister, A. N., Arndt, S. K., Ades, P. K., Merchant, A., Rowell, D. & Adams, M. A. (2008): Leaf osmotic potential of *Eucalyptus* hybrids responds differently to freezing and drought, with little clonal variation. *Tree Physiology*, 28, 1297–1304.

Chai, S. L., Eaton, B., Woosaree, J., Rweyongeza, D. & Fraser, E. (2013): Seed Transfer of Woody Shrubs in Alberta – Are Current Seed Zones Applicable? Prepared by Alberta Innovates - Technology Futures, Vegreville, Alberta and Alberta Environment and Sustainable Resource Development, Edmonton, Alberta.

Campbell, N. A. & Reece, J. B. (2003): *Biologie*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin 2003.

Crăciunesc, I., Curtu, A. L. & Șofletea, N. (2016): Genetic diversity and differentiation among four *Quercus Robur* and *Q. Petraea* natural populations in Romania. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Series II: Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering*, 9(2), 7–16.

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., & Aurell Wistrom, C. (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, 242(1), 1–10.

Davis, M. B. & Shaw, R. G. (2001): Range Shifts and Adaptive Responses to Quaternary Climate Change. *Science*, 292(5517), 673–679.

Deans, J. & Harvey, F. J. (1996): Frost hardiness of 16 European provenances of sessile oak growing in Scotland. *Forestry*, 69(1), 5–12.

DeWitt, T. J., Sih, A. & Wilson, D. S. (1998): Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(2), 77–81.

Ducousso, A., Michaud, H. & Lumaret, R. (1993): Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L.. *Annals of Forrest Science*, 50(1), 91-106.

Ducousso, A., Guyon, J. & Krémer, A. (1996): Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl). *Annales Des Sciences Forestières*, 53(2–3), 775–782.

---

Ducouso, A. & Bordacs, S. (2004): EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Dyakowska, J. & Zurzycki, J. (1959): Botany: gravimetric studies on pollen. Bulletin de L'Académie Polonaise des Sciences. Série des sciences biologiques 2(7) 11-16

Eckert, C. G., Samis, K. E. & Lougheed, S. C. (2008): Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17(5), 1170–1188.

Eimert, K., Rückert, F.-E. & Schröder, M.-B. (2012): Genetic diversity within and between seedstock populations of several German autochthonous provenances and conventionally propagated nursery material of blackthorn (*Prunus spinosa* L.). *Plant Systematics and Evolution*, 298(3), 609–618.

Fineschi, S., Salvini, D., Turchini, D., Carnevale, S. & Vendramin, G. G. (2003): Chloroplast DNA variation of *Tilia cordata* (Tiliaceae). *Canadian Journal of Forest Research*, 33(12), 2503–2508.

FoVG (2002): (Forstvermehrungsgutgesetz vom 22. Mai 2002 (BGBl. I S. 1658), das zuletzt durch Artikel 414 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist)

FoVHgV (1994): (Forstvermehrungsgut-Herkunftsgebietsverordnung vom 7. Oktober 1994 (BGBl. I S. 3578), die durch Artikel 1 der Verordnung vom 15. Januar 2003 (BGBl. I S. 238) geändert worden ist)

Frenz, W., Hellenbroich, T. & Seitz, B. (2009): Anpflanzung von Gehölzen gebietseigener Herkünfte in der freien Landschaft– rechtliche und fachliche Aspekte der Vergabepraxis. BfN- Skripten, Bundesamt für Naturschutz, Bonn-Bad Godesberg.

Gimeno, T. E., Pias, B., Lemos-Filho, J. P. & Valladares, F. (2009): Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the responses of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. *Tree Physiology*, 29(1), 87–98.

Grativol, C., Hemerly, A. S. & Ferreira, P. C. G. (2012): Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 176–185.

Gray, L. K. & Hamann, A. (2011): Strategies for Reforestation under Uncertain Future Climates: Guidelines for Alberta, Canada. *PLoS ONE*, 6(8), e22977.

- 
- Grenier, S., Barre, P. & Litrico, I. (2016): Phenotypic Plasticity and Selection: Nonexclusive Mechanisms of Adaptation. *Scientifica*, Vol. 2016, Article ID 7021701, 9 pages
- Günthardt-Goerg, M. S. & Arend, M. (2013): Woody plant performance in a changing climate. *Plant Biology*, 15(1), 1–4.
- Hamann, A., Gylander, T. & Chen, P. (2011): Developing seed zones and transfer guidelines with multivariate regression trees. *Tree Genetics & Genomes*, 7(2), 399–408.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. & Sherman-Broyles, S. L. (1992): Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6(1–4), 95–124
- Hamrick, J. (2004): Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197(1–3), 323–335.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359, 183-195.
- Hietala, T., Hiekkala, P., Rosenqvist, H., Laakso, S., Tahvanainen, L. & Repo, T. (1998): Fatty acid and alkane changes in willow during frost-hardening. *Phytochemistry*, 47(8), 1501–1507.
- Howe, G. T., Hackett, W. P., Furnier, G. R. & Klevorn, R. E. (1995): Photoperiodic responses of a northern and southern ecotype of black cottonwood. *Physiologia Plantarum*, 93(4), 695–708.
- Jump, A. S. & Peñuelas, J. (2005): Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, 8(9), 1010–1020.
- Jump, A. S., Marchant, R. & Peñuelas, J. (2009): Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends in Plant Science*, 14(1), 51–58.
- Kawecki, T. J. & Ebert, D. (2004): Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12), 1225–1241
- Kawecki, T. J. (2008): Adaptation to Marginal Habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 321–342.
- Körner, C. & Basler, D. (2010): Phenology Under Global Warming. *Science*, 327, 1461–1462.



Kramer, K. (1995): Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant, Cell and Environment*, 18(2), 93–104.

Kremer, A. (2016): Microevolution of European temperate oaks in response to environmental changes. *Comptes Rendus Biologies*, 339(7–8), 263–267.

Kreyling, J., Thiel, D., Nagy, L., Jentsch, A., Huber, G., Konnert, M., & Beierkuhnlein, C. (2012): Late frost sensitivity of juvenile *Fagus sylvatica* L. differs between southern Germany and Bulgaria and depends on preceding air temperature. *European Journal of Forest Research*, 131(3), 717–725.

Kreyling, J., Buhk, C., Backhaus, S., Hallinger, M., Huber, G., Huber, L., Jentsch, A., Konnert, M., Thiel, D., Wilmking, M. & Beierkuhnlein, C. (2014): Local adaptations to frost in marginal and central populations of the dominant forest tree *Fagus sylvatica* L. as affected by temperature and extreme drought in common garden experiments. *Ecology and Evolution*, 4(5), 594–605

Kreyling, J., Puechmaille, S. J., Malyshev, A. V. & Valladares, F. (2019): Phenotypic plasticity closely linked to climate at origin and resulting in increased mortality under warming and frost stress in a common grass. *Ecology and Evolution*, 1–9.

Levitt, J. (1980): *Responses of Plants to Environmental Stress*. 2. Auflage. Academic Press, New York 1980.

Li, M.-H., Cherubini, P., Dobbertin, M., Arend, M., Xiao, W.-F. & Rigling, A. (2013): Responses of leaf nitrogen and mobile carbohydrates in different *Quercus* species/provenances to moderate climate changes. *Plant Biology*, 15(1), 177–184.

Liesebach H., Schneck V. & Kätzel R. (2007): Phänotypische und genetische Variation bei Landschaftsgehölzen: ein Review und Beitrag zur aktuellen Diskussion über Herkunftsgebiete. *Naturschutz und Landschaftsplanung*, 32(10), 297-303

MacCárthaigh, D. & Spethmann, W. (2000): *Küssmanns Gehölzvermehrung*. Parey, Berlin

Mahajan, S. & Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139–158.

Matyas, C. (1996): Climatic adaptation of trees: rediscovering provenance tests. *Euphytica*, 92(1–2), 45–54.

McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G. & Yezpez, E. A. (2008): Mechanisms of Plant Survival

and Mortality during Drought: Why Do Some Plants Survive while Others Succumb to Drought?. *New Phytologist* 178(4), 719–739.

McKenney, D., Pedlar, J. & O'Neill, G. (2009): Climate change and forest seed zones: Past trends, future prospects and challenges to ponder. *The Forestry Chronicle*, 85(2), 258–266.

Morin, X., Améglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Miglietta, F. & Chuine, I. (2007): Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, 27(6), 817–825.

Mylett, A. J. (2015): Genetic diversity and regenerative potential of *Tilia cordata* Miller in the Lincolnshire limewoods. Dissertation, University of Lincoln.

Neophytou C., Aravanopoulos F., Fink S. & Dounavi A. (2010): Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forest Ecology and Management* 259, 2026–2035.

Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. & Tran, L.-S. P. (2014): Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–8.

Petit, C. & Thompson, J. D. (1998): Phenotypic Selection and Population Differentiation in Relation to Habitat Heterogeneity in *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). *Journal of Ecology* 86(5), 829–840.

Petit, R. J., Csaikl, U. M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., van Dam, B. C., Deans, J. D., Dumolin-Lapégue, S., Fineschi, S., Finkelday, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P. G., Jensen, J. S., König, A., Lowe, A. J., Madsen, S. F., Mátyás, G., Munro, R. C., Pemonge, M.-H., Popescu, F., Slade, D., Olalde, M., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S. M. G., Ziegenhagen, B. & Kremer, A. (2002): Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, 156(1–3), 5–26.

Petit, R. J. & Hampe, A. (2006): Some Evolutionary Consequences of Being a Tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1), 187–214.

Pohjanmies, T., Elshibli, S., Pulkkinen, P., Rusanen, M., Vakkari, P., Korpelainen, H. & Roslin, T. (2016): Fragmentation-related patterns of genetic differentiation in pedunculate oak (*Quercus robur*) at two hierarchical scales. *Silva Fennica*, 50(2).

- 
- Repo, T., Mononen, K., Alvila, L., Pakkanen, T. T. & Hänninen, H. (2008): Cold acclimation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) at its northernmost distribution range. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1–3), 59–70.
- Rohde, A., Bastien, C. & Boerjan, W. (2011): Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiology*, 31(5), 472–482.
- Savolainen, O., Pyhäjärvi, T. & Knürr, T. (2007): Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 595–619.
- Sakai, A. & Larcher, W. (1987): *Frost Survival of Plants*. 1. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1987.
- Scheiner, S. M. (1993): Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 35–68.
- Schmidt, P. A. & Krause, A. (1997): Zur Abgrenzung von Herkunftsgebieten bei Baumschulgehölzen für die freie Landschaft, *Natur und Landschaft* 72, 92–95.
- Selig, M. & Bohne, H. (2016a): Early frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany. *Eur. J. Hortic. Sci.* 81:13–21.
- Selig, M. & Bohne, H. (2016b): Late frost reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill. in Germany. *Eur. J. Hortic. Sci.* 81:157–164.
- Selig, M. & Bohne, H. (2017): Drought stress reactions of different populations of *Quercus robur* L. and *Tilia cordata* Mill.. *Journal of Environmental Horticulture*, 35(1), 6-12.
- Sparks, J. P. & Black, R. A. (1999): Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiology*, 19(7), 453–459.
- Seitz, B. & Kowarik, I. (2003): Perspektiven für die Verwendung gebietseigener Gehölze. *NEOBIOTA* 2, 3–26.
- Seitz, B., Jürgens, A. & Kowarik, I. (2007): Erhaltung genetischer Vielfalt : Kriterien für die Zertifizierung regionalen Saat- und Pflanzguts. *Bfn-Skripten* 208, 1–48.
- Strømme, C. B., Schmidt, E., Olsen, J. E. & Nybakken, L. (2019): Climatic effects on bud break and frost tolerance in the northernmost populations of Beech (*Fagus sylvatica*) in Europe. *Trees - Structure and Function*, 33(1), 79–89.

- 
- Szabados, L. & A. Savouré (2010): Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15(2), 89–97.
- Tarkowski, L. P. & Van den Ende, W. (2015): Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Frontiers in Plant Science*, 6(203), 1-7.
- Thomas, F. M. & Gausling, T. (2000): Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. *Annals of Forest Science*, 57, 325–333.
- Umweltbundesamt (2011): Themenblatt: Anpassung an den Klimawandel Landwirtschaft. Bundesumweltamt, Dessau Roßlau 2011.
- Umweltbundesamt (2015): Monitoringbericht 2015. Umweltbundesamt, Dessau Roßlau 2015.
- Valladares, F., Sanchez-Gomez, D. & Zavala, M. A. (2006): Quantitative estimation of phenotypic plasticity: Bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, 94(6), 1103–1116.
- Velichko, A. A., Kononov, Y. M. & Faustova, M. A. (1997): The last glaciation of earth: Size and volume of ice-sheets. *Quaternary International*, 41–42(96), 43–51.
- Vitasse, Y., Porté, A. J., Kremer, A., Michalet, R. & Delzon, S. (2009a): Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia*, 161(1), 187–198.
- Vitasse, Y., Delzon, S., Bresson, C. C., Michalet, R. & Kremer, A. (2009b): Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(7), 1259–1269.
- Vitasse, Y., Bresson, C. C., Kremer, A., Michalet, R. & Delzon, S. (2010): Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, 24(6), 1211–1218.
- Way, D. A., & Montgomery, R. A. (2014): Photoperiod constraints on tree phenology, performance and migration in a warming world. *Plant, Cell & Environment*, 38(9), 1725-1736.
- Willis, K. J. (1996): Where did all the flowers go? The fate of temperate European flora during glacial periods. *Endeavour*, 20(3), 110–114.

Yakovlev, I. A. & Kleinschmidt, J. (2002): Genetic Differentiation of Pedunculate Oak *Quercus robur* L. in the European Part of Russia Based on RAPD Markers. *Russian Journal of Genetics*, 38(2), 148–155.

Yampolsky, L. Y., Schaer, T. M. M. & Ebert, D. (2014): Adaptive phenotypic plasticity and local adaptation for temperature tolerance in freshwater zooplankton. *Proceedings of the Royal Society B*, 281: 20132744.

Zanetto, A., Roussel, G. & Kremer, A. (1994): Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Forest Genetics*, 1(2), 111–123.

---

## 7 Lebenslauf

---

Name:	Malte Selig
Geburtsdatum:	27.05.1983
Geburtsort:	Hildesheim
Staatsangehörigkeit:	deutsch

---

### **Beruflicher Werdegang**

Seit Aug. 2014	Versuchsleiter bei Field Research Support in Wunstorf
----------------	--

---

### **Akademischer Werdegang**

Apr. 2011 bis Jun. 2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Promotionsstudent an der Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme
Okt. 2008 bis Nov. 2010	Masterstudium Gartenbauwissenschaften an der Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme
Okt. 2005 bis Sep. 2008	Bachelorstudium Gartenbauwissenschaften an der Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme

---

### **Ausbildung/Zivildienst**

Aug. 2003 bis Jul. 2005	Ausbildung zum Gärtner Fachrichtung Baumschule bei Turnau Pflanzenhandel GmbH
Jul. 2002 bis Apr. 2003	Zivildienst beim Naturschutzring Bad Segeberg e.V.

---

### **Schulischer Werdegang**

1993 bis 2002	Abitur, Gymnasium Christophorusschule Elze
1989 bis 1993	Grundschule in Nordstemmen