Erzeugung, Nutzung und genetische Charakterisierung polyploider Pappeln

Kristina Ulrich[1], Heike Liesebach[2], Dietrich Ewald[1]

[1]Thünen-Institut für Forstgenetik, Waldsieversdorf
[2]Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf

Zusammenfassung

Triploide Aspen und Pappeln können neben hervorragenden Wachstumsleistungen auch besondere Holzeigenschaften wie längere Fasern, eine höhere Holzdichte und einen geringeren Ligninanteil besitzen. Außerdem werden polyploide Bäume oft mit verbesserten Resistenzeigenschaften und einer gesteigerten Anpassungsfähigkeit in Zusammenhang gebracht.

Ziel der Arbeiten war die Erzeugung und Selektion schnell wachsender triploider Aspen und Pappeln für die Biomasseerzeugung im Kurzumtrieb. Im Rahmen des Projekts wurden verschiedene Methoden zur Erzeugung triploider Aspen- und Pappelklone etabliert und bei unterschiedlichen Kreuzungen angewendet. Als Voraussetzung für die Kreuzungen wurden leistungsfähige Elternklone ausgewählt, und mit dem Ziel, bestimmte Eigenschaften wie Trockentoleranz oder die Fähigkeit zur Stecklingsbewurzelung zu verbessern, auch intersektionelle Kreuzungen einbezogen. Insgesamt konnten 45 triploide Klone erzeugt werden. Der größte Anteil der triploiden Klone, darunter 13 intersektionelle Hybride (Schwarzpappel × Balsampappel), resultiert aus gelenkten Kreuzungen bzw. *in vitro*-Bestäubungen mit diploidem Pollen. Dazu wurde spontan entstandener unreduzierter (diploider) Pollen, der unter natürlichen Bedingungen bis zu 5% der Gesamtpollenmenge betragen kann, durch Mikrosiebung angereichert. In einigen Fällen gelang außerdem eine Induktion diploider Pollen durch künstliche Wärmebehandlung der Pollenmutterzellen während der Meiose. Weitere triploide Klone konnten durch Induzierung von diploiden Embryosackzellen (postmeiotische Restitution) und durch Größenselektion von Einzelpflanzen aus konventionellen gelenkten Kreuzungen erzeugt werden.

Diploide Gameten können durch Störung der ersten (FDR, First Devision Restitution) oder zweiten (SDR, Second Division Restitution) Zellteilung der Meiose entstehen, wobei die FDR-Gameten und damit auch die resultierenden triploiden Pflanzen einen höheren Heterozygotiegrad aufweisen. Zur Unterscheidung beider Mechanismen wurden Mikrosatellitenmarker eingesetzt, die auch zeigten, dass ein weiblicher Hybridaspen-Klon spontan eine erhöhte Rate diploider Eizellen erzeugt.

In Freiland-Containerversuchen und bei einer Klonprüfung von ausgewählten triploide Klonen zeigten mehrere Aspenklone, die durch gelenkte Kreuzung mit angereicherten diploiden Pollen hervorgegangen bzw. durch Einzelpflanzenselektion aus konventionellen Kreuzungen entstanden waren, sehr gute Wachstumseigenschaften, die mit der Performance von triploiden Graupappel-Leistungsklonen vergleichbar sind.

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung triploider Pflanzen ist die Kreuzung diploider und tetraploider Eltern. Aus dem Projekt „Tetraploide“ (FNR, FKZ 22013409) wurden 12 tetraploide Aspen-, Pappel- bzw. Graupappellinien in das FastWood-Projekt einbezogen, die durch Polyploidisierung selektierter Elternklone erzeugt wurden. Diese Linien liegen als *in vitro*-Kulturen und Containerpflanzen vor und können nach Erreichen der Blühfähigkeit zur Gewinnung diploider Gameten für die Züchtung leitungsfähiger triploider Klone verwendet werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass man mit den angewendeten Methoden effektiv triploide Pflanzen erzeugen kann, von denen einige herausragende Wachstumseigenschaften besitzen.

Schlüsselworte: *Populus* sp., triploid, tetraploid, unreduzierte Gameten, Mikrosatellitenmarker, FDR, SDR

Abstract

Establishment, utilisation and genetic characterisation of polyploid poplars

Triploid trees often show higher growth potential, higher wood density, longer fibers and improved pulp properties in comparison with their diploid counterparts. Triploids were also found to have higher stress resistance and a greater ecological adaptability.

The aim of this project was to breed fast-growing triploid aspen and poplars for biomass production in short rotation coppice plantations. As prerequisite for the crossings, parent clones with high performance were selected. Intersectional crossbreeding had been conducted with the aim of improving tolerance characteristics and transferring the rooting capacity of shoot cuttings to the progeny.

Different methods were established and applied to breed triploid trees. In total, 45 triploid clones could be generated. The majority of the clones, including 13 intersectional hybrids (sections *Aigeiros* × *Tacamahaca*) resulted from crossings using enriched diploid pollen. Spontaneously occuring diploid pollen, which can reach up to 5% of total pollen under natural conditions, was enriched using microsieves. Additionaly, in some clones, unreduced diploid pollen could be induced by thermo-treatment of microspore mother cells during meiosis. Some triploid clones were generated by thermo-treatment of female flowers after pollination to induce postmeiotic restitution of embryo sac nuclei for the formation of 2n eggs or selected from conventional crossings.

Diploid, unreduced gametes (pollen or eggs) may arise from disturbances of the first (FDR, First division restitution) or the second (SDR, Second division restitution) phase of meiosis, with FDR gametes being more effective for transmitting heterozygosity. Microsatellite markers allowed a very effective determination of FDR resp. SDR processes and showed that a female hybrid aspen clone was assured to be able to cause a frequent spontaneous formation of diploid ovules.

Container tests and a field trial were performed to select the best-growing triploid clones. Some aspen clones derived from crossings using enriched pollen, and from selection of single plants from conventional crossings, showed excellent growth performance comparable to that of fast-growing triploid *P.* × *canescens* clones.

Another approach to produce triploids is to cross diploid with tetraploid trees. Twelve tetraploid clones of aspen, poplar and greypoplar, respectively, obtained by polyploidisation of selected parent clones were transferred from the project ”Tetraploide” (FKZ: 22013409). These plants can be used as valuable breeding material for the production of triploid plants after flower formation.

All in all, results show that the methods applied here are suitable to generate triploid plants, with some of them showing excellent growth.

Keywords: *Populus* sp., triploid, tetraploid, unreduced gametes, microsatellite markers, FDR, SDR

Einleitung

Nach der Entdeckung einer stark wüchsigen *P. tremula* mit ungewöhnlich großen Blättern („Gigas-Form“) in Schweden (Nilsson-Ehle 1936), die von Müntzing (1936) als Pflanze mit dreifachem Chromosomensatz beschrieben wurde, wuchs das Interesse an triploiden Bäumen. Weitere triploide Aspen wurden in verschiedenen Regionen Schwedens (Johnsson 1940) und in Russland (Mackevic 1959) gefunden, und auch in Nordamerika begann man, finanziert durch die Papierindustrie, nach triploiden Aspen zu suchen. Die ersten triploiden *P. tremuloides* wurden in Minnesota (van Buijtenen et al. 1957, Einspahr et al. 1963) und später in Utah (Every und Wiens 1971) entdeckt.

In der Natur aufgefundene, spontan entstandene triploide Pflanzen zeigen neben einem besseren Wachstum oft veränderte Holzeigenschaften wie längere Fasern, eine höhere Holzdichte und einen geringeren Ligninanteil, was vor allem für die Papier- und Zellstoffindustrie wichtig ist. Polyploide Pflanzen werden deshalb generell in Zusammenhang mit einer höheren Anpassungsfähigkeit an extreme klimatische Bedingungen gebracht (de Wet 1980), was besonders angesichts der zunehmenden Klimaerwärmung ein positiver Aspekt für die Züchtung von Forstpflanzen ist. Auch das Resistenzverhalten kann zum Beispiel durch morphologische Veränderungen wie stärkere Blattstrukturen verbessert sein. Die Fertilität triploider Pflanzen ist meist gestört, so dass keine oder nur infertile Blüten gebildet werden.

Unter natürlichen Bedingungen können triploide Pflanzen entstehen, wenn die Gametenbildung (Reifeteilung - Meiose) durch äußere Einflüsse wie zum Beispiel Temperaturextrema gestört wird, so dass anstelle der normalen haploiden Gameten diploide (unreduzierte) Eizellen oder Pollen entstehen. Je nach beeinflusster Teilungsphase entstehen diploide FDR-Gameten (First Division Restitution) oder SDR-Gameten (Second Division Restitution). Je nach Anzahl und Lokalisation der Chiasmata beim Crossing over kann bei FDR-Gameten eine deutlich höhere Heterozygotie als bei SDR-Gameten entstehen. Bei der Befruchtung mit diploiden Gameten kommt es neben dem Gen-Dosis-Effekt zur zusätzlichen Erhöhung der Heterozygotie in den triploiden Nachkommen (de Wet 1980).

Bald nach der Entdeckung der ersten triploiden Aspen und ihrer Leistungsfähigkeit begann die Suche nach Methoden zur künstlichen Erzeugung triploider Bäume.

Die gängigste Methode zur Züchtung triploider Pflanzen ist die Verwendung von spontan entstandenem oder induziertem diploiden Pollen. Natürlich entstandener 2n Pollen wurde in verschiedenen Aspen und Pappeln wie *P. tremula*, *P. × canescens*, *P. tomentosa* und *P. nigra* nachgewiesen (Müntzing 1936, Seitz 1954, Zhang und Kang 2010, Bradshaw und Stettler 1993). Weil die Entstehungsrate diploider Pollen nur sehr gering ist (unter 5%, Xi et al. 2011) wurde nach Methoden zur künstlichen Induzierung von 2n Pollen gesucht. Johnsson und Eklundh (1940) erzeugten triploide Bäume durch Bestäubung von weiblichen Blüten mit colchizin-induziertem 2n-Pollen von *P. tremula* und *P. tremuloides*. Mashkina et al. (1989) untersuchten die Bildung diploider Pollen verschiedener Pappeln und Aspen durch Thermobehandlung. Berichte über die Erzeugung triploider Bäume durch Induzierung diploider Eizellen sind selten, weil es sehr schwierig ist, die verschiedenen Stadien der Makrosporenbildung zu erkennen und zu differenzieren (Wang et al. 2010). Li et al. (2008) konnten durch Colchizinbehandlung der Eizellen triploide Nachkommen in *P. alba* × *P. glandulosa* erzeugen. Eine Methode zur Induzierung diploider weiblicher Gameten durch Temperatur- bzw. Colchizinbehandlung während der Embryosackentwicklung wurde für *P. pseudosimonii* × *P. nigra* beschrieben (Wang et al. 2012).

Eine andere Möglichkeit zur Herstellung triploider Bäume ist die Kreuzung zwischen tetraploiden und diploiden Elternbäumen, wobei das spontane Vorkommen tetraploider Bäume sehr selten ist. So wurde zum Beispiel aus der Kreuzung einer tetraploiden *P. tremula* mit Pollen einer diploiden kanadischen *P. tremuloides* der triploide Klon „Astria“ selektiert, der noch heute angebaut wird (Baumeister 1980). Durch Kreuzung selektierter diploider weiblicher *P. tremuloides* Klone mit einer einzigen tetraploiden *P. tremula* schwedischen Ursprungs wurden 1958 erstmals triploide Hybrid-aspen in größerem Umfang erzeugt, die neben einer etwa doppelten Wachstumsrate eine höhere Holzdichte und längere Fasern aufwiesen (Einspahr 1984). Eine gezielte Erzeugung tetraploider Elternpflanzen ist durch Anwendung des Alkaloids Colchizin möglich, das durch Hemmung der Mitose zur Verdopplung der Chromosomen in der Zelle führt. Auf diese Weise wurden in den letzten Jahren einzelne tetraploide Bäume der Sektionen *Populus* (Ewald et al. 2009) und *Tacamahaca* (Cai und Kang 2011, Wang et al. 2013) erzeugt, die jedoch noch nicht blühen.

Ziel dieses Teilprojektes war die Etablierung und Anwendung von effektiven Methoden zur Erzeugung und Selektion von leistungsstarken triploiden Aspen, Aspenhybriden und Pappelklonen. Durch Größenfraktionierung mit Mikrosieben wurde diploider Pollen angereichert und für gelenkte

Kreuzungen bzw. *in vitro*-Bestäubungen verwendet. Zusätzlich gelang in einigen Fällen die Induzierung diploider Pollen bzw. diploider weiblicher Gameten durch Thermobehandlung. Intersektionelle Kreuzungen wurden einbezogen, um besondere Eigenschaften wie Trockentoleranz oder die Fähigkeit zur Stecklingsbewurzelung zu verbessern. Die Selektion triploider Klone mit erhöhter Wuchsleistung wurde in Freiland-Containerversuchen und unter Baumschulbedingungen durchgeführt. Zur Einschätzung der Leistung der erzeugten triploiden Klone im Kurz- bzw. mittelfristigen Umtrieb sind weiterführende Untersuchungen auf unterschiedlichen Versuchsflächen erforderlich.

Die Genotypisierung aller Kreuzungseltern und aller triploiden Nachkommen mit nuklearen Mikrosatellitenmarkern wurde routinemäßig durchgeführt. Damit können Informationen gewonnen werden, ob der weibliche oder männliche Kreuzungselter einen doppelten Beitrag zum triploiden Nachkommen geleistet hat, und welcher zelluläre Mechanismus (FDR oder SDR) jeweils stattgefunden hat. Diese Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die verschiedenen Methoden zur Erzeugung von triploiden Pflanzen in ihrer Effektivität besser zu beurteilen.

Erzeugung triploider Aspen und Pappeln

Verwendung diploider Pollen

Anreicherung von natürlich entstandenem diploiden Pollen

Diploider Pollen, der zum Beispiel ausgelöst durch Temperaturschwankungen in der Winterperiode spontan entsteht, kann durch Fraktionierung mit Mikrosieben angereichert werden. Basierend auf der Annahme, dass diploide Pollenkörner durch eine gestörte Meiose entstehen (Bildung von nur 2 anstelle der normalen 4 Zellen), haben diploide runde Pollenzellen das doppelte Volumen und dementsprechend nach mathematischer Berechnung den 1,26-fachen Durchmesser im Vergleich zu haploiden Pollenkörnern. Für die für die Kreuzungen verwendeten männlichen Aspen- und Pappelklone wurden die mittleren Durchmesser der nativen Pollenkörner mikroskopisch ermittelt und liegen bei einer hohen Klonspezifität im Bereich von 28,8 bis 34,5 µm. Nach Messung und Berechnung der Größe der haploiden Pollenkörner kann durch Multiplikation mit dem Faktor 1,26 der Bereich ermittelt werden, in dem sich theoretisch der spontan gebildete diploide Pollen befindet. Zur Anreicherung der diploiden Pollen wurden für kleinere Pollen (unter 38 µm für den errechneten Durchmesser der 2n Pollen) Fraktionen von 32-45 µm bzw. 32-38 µm und für größere Pollen Fraktionen von 36-45 µm bzw. 40-45 µm herausgesiebt (Ulrich und Ewald 2014). Abbildung 1 zeigt die Größenverteilung der Pollen in einer nativen Pollenprobe des amerikanischen *P. tremuloides*-Klons T-46-60. Aus dem mittleren Durchmesser des haploiden Pollens (ca. 34 µm) kann der Bereich errechnet werden, in dem die 2n Pollen zu erwarten sind (42-43 µm) und durch Separierung der Fraktion 40-45 µm ist eine Anreicherung der diploiden Pollenkörner möglich.

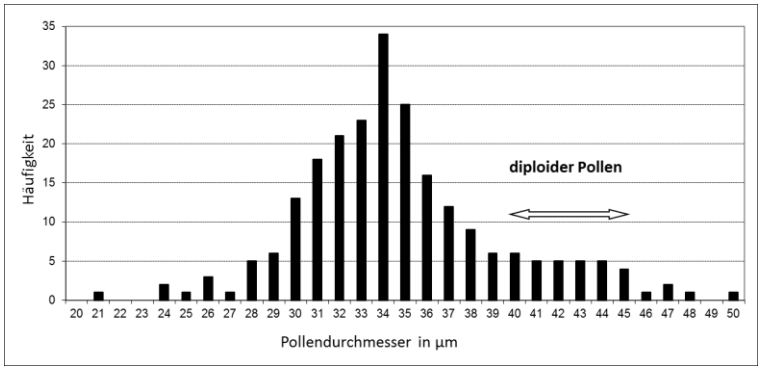

Abb. 1: Messung der Größenverteilung der Pollenkörner des *P. tremuloides* Klons T-46-60 zur Vorbereitung der Siebfraktionierung zur Gewinnung spontan entstandenen diploiden Pollens

Thermobehandlung zur Erhöhung des Anteils diploider Pollen

Bei einigen männlichen Aspenklonen wurde eine Thermobehandlung durchgeführt, um die Bildung von unreduziertem diploiden Pollen zu erhöhen. Dazu wurden nach einer Methode von Mashkina et al. (1989) Zweige mit männlichen Blüten im frühen Stadium der Meiose drei Stunden bei 38°C im Wärmeschrank inkubiert. Zur Erkennung der optimalen Behandlungszeit (Prophase I der Meiose) wurden Antheren nach Karminessigsäurefärbung mikroskopisch auf das Stadium der Pollenmutterzellen untersucht (Kang et al. 2000, Ulrich und Ewald 2014).

Ein Vergleich der Größenverteilung (Pollendurchmesser) der thermobehandelten Probe des *P. tremula*-Klons L9 mit dem entsprechenden nativen Pollen ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Menge der diploiden Pollen wurde durch die Behandlung deutlich erhöht und die Werte (Maxima) für die haploiden und diploiden Pollen stimmen mit dem berechneten Verhältnis von 1:1,26 (n:2n) überein. Durch Separation der Fraktion 36-45 µm mit Hilfe von Mikrosieben wurden die thermoinduzierten diploiden Pollen angereichert.

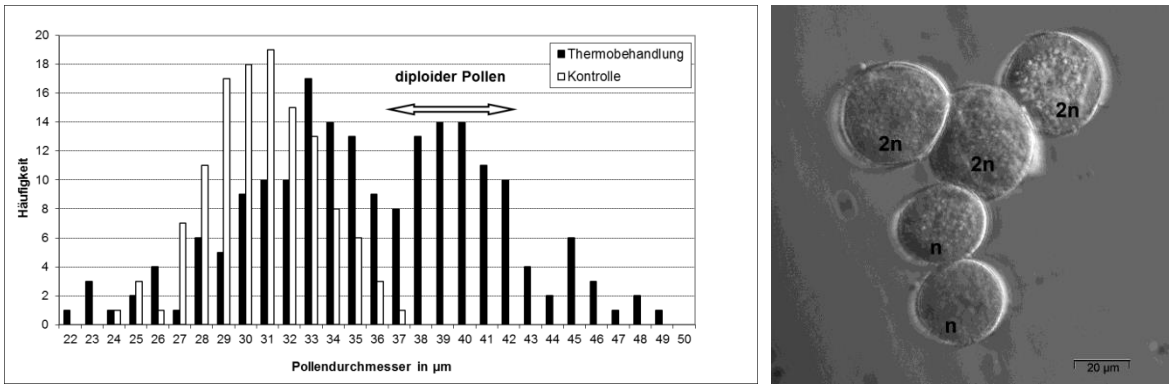

Abb. 2: Veränderung der Größenverteilung der Pollenkörner des *P. tremula* Klons L9 nach Thermobehandlung (3h, 38°C) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (links), Pollenkörner des *P. tremula* Klons L9 nach Thermobehandlung (3h, 38°C) zu Beginn der Meiose. „2n“ - diploider, unreduzierter Pollen, „n“ - normaler haploider Pollen (Karminessigsäure-Färbung) (rechts)

Die Thermobehandlung war nur bei zwei männlichen Klonen (*P. tremula* L9 und *P. tremula* × *P. tremuloides* L2) erfolgreich. Bei allen anderen getesten Klonen konnten nur sehr geringe bzw. keine 2n Pollen angereichert werden. Die Schwierigkeit der Methode liegt darin, dass viele verschiedene Faktoren die Induzierung der Bildung diploider Pollen und die anschließende Pollenfreisetzung beeinflussen wie zum Beispiel der Entwicklungsstatus der männlichen Blüten, der von den vorangegangenen Witterungsbedingungen abhängig ist, Zeit und Dauer der Behandlung und die Temperatur, die zur Induktion verwendet wird (Mashkina et al. 1989, Kang et al. 1999).

Lagerung des Pollens und Durchführung der Kreuzungen

Der gesiebte (angereicherte) diploide Pollen wurde entweder unmittelbar zur Bestäubung verwendet oder unter Vakuum in Ampullen eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

Die konventionellen Kreuzungen erfolgten in geschlossenen Kabinen im Gewächshaus. In einigen Fällen, zum Beispiel bei frühzeitigem Absterben der Samenkapseln bzw. bei unzureichender Ausreifung der Samen wurden durch Embryo-Rescue frühe Stadien zygotischer Embryonen *in vitro* zur Entwicklung, Reifung und Keimung gebracht.

Bei einigen Kreuzungen kam die Technik der *in vitro*-Bestäubungen zum Einsatz (Ewald und Ulrich 2012). Diese Methode ist zwar sehr aufwendig, kann aber z.B. bei Kombinationen mit inkompatiblen Partnern, die ein Embryo-Rescue erforderlich machen, oder auch bei limitierten Pollenmengen von

Nutzen sein. Weibliche Aspen- bzw. Pappelblüten wurden im „fängischen“ Stadium im Gewächshaus entnommen und unter dem Stereomikroskop in der sterilen Werkbank präpariert. Die Fruchtknoten wurden abgetrennt und mit der Narbe nach oben auf ein Nährmedium aufgesetzt. Unter dem Mikroskop und unter semi-sterilen Bedingungen wurden Pollenkörner nach Größe selektiert und mit einer speziell präparierten Borste auf die Narben übertragen. Nach etwa 14 Tagen konnten die reifen Samen mit einem Mikroskalpell entnommen und zur Anzucht auf ein Regenerationsmedium überführt werden. Nach Umsetzen der Pflänzchen auf Vermiculit erfolgte die Selektion der triploiden Nachkommen durch flowcytometrische Messung.

Induktion diploider Embryosackzellen (Thermobehandlung nach Bestäubung)

In Anlehnung an eine Methode von Wang et al. (2012) wurde im Frühjahr 2013 erstmals versucht, triploide Nachkommen durch die Induktion diploider Embryosackzellen durch Thermobehandlung nach der Bestäubung zu erzeugen (Postmeiotic restitution, PMR).

Als Mutter wurde der Graupappelklon *P.* × *canescens* L447 verwendet. Die Bestäubung wurde mit Pollen des *P. tremula* Klons L2 bzw. der chinesischen Silberpappel *P. tomentosa* C5088 (*P. alba* × *P. adenopoda*) vorgenommen. Die Thermobehandlung erfolgte 67 Stunden nach der Bestäubung für 6 Stunden bei 38°C. Zu beiden Kreuzungen wurde eine Kontrollvariante ohne Thermobehandlung durchgeführt. Die Samen wurden unter Vakuum eingefroren und im Frühjahr 2014 auf Vermiculit ausgesät. Danach wurden die Pflanzen in 104er Paletten pikiert und nach ca. 6 Wochen mit dem Flowcytometer auf ihre Ploidie getestet. Aus 150 gemessenen Pflanzen der ersten Kreuzung L447 × L2 konnten drei triploide und aus den 39 Pflanzen der Kreuzung L447 × *P. tomentosa* C5088 eine triploide Pflanze selektiert werden. In beiden Kontrollvarianten wurden keine Triploiden gefunden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Thermobehandlung nach Bestäubung eine geeignete Methode zur Erzeugung triploider Pflanzen ist. Auf 50 Pflanzen konnte durchschnittlich eine triploide selektiert werden.

Die selektierten Pflanzen werden verklont, *in vitro* vermehrt und im nächsten Jahr im Containerversuch auf ihre Wachstumseigenschaften getestet.

Abb. 3: Triploide Pflanzen der Kreuzung *P.* × *canescens* L447 × L2 (*P. tremula* × *P. tremuloides*), die durch Thermobehandlung während der Embryosackentwicklung erzeugt wurden. Eine Pflanze (links) zeigte ein besonders starkes Wachstum und extrem große Blätter (möglicherweise „Gigas“-Merkmale)

Im Frühjahr 2014 wurden sieben weitere Kreuzungen durchgeführt, bei denen eine Induzierung diploider Embryosackzellen während der Megagametophytenentwicklung vorgenommen wurde. Als Mütter kamen verschiedene *P. tremula* bzw. *P. tremula* × *P. tremuloides* Klone zum Einsatz, die Bestäubung erfolgte mit Pollen unterschiedlicher *P. tremula*-, *P. tremuloides*-, *P. alba*- bzw. *P.* × *canescens* Klone. Die gewonnenen Samen wurden unter Vakuum eingefroren und werden im Frühjahr 2015 zur Selektion triploider Nachkommen ausgesät.

Charakterisierung der erzeugten triploiden Klone

Insgesamt wurden bisher 45 triploide Klone erzeugt (Tabelle 1): 26 durch konventionelle Kreuzungen und fünf durch *in vitro*-Bestäubung mit angereicherten diploiden Pollen, 4 durch Thermobehandlung während der Embryosackentwicklung und 10 durch Größenselektion von Einzelpflanzen aus konventionellen Kreuzungen.

Tabelle 1: Übersicht über die bisher erzeugten triploiden Klone

Kreuzungskombination	Klone [n]	Art der Erzeugung
L40 × L311 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	2	*In vitro*-Bestäubung mit angereicherten diploiden Pollen
L40 × L2 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*) *	1	
L40 × L443 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P.* × *canescens*)	1	
ARB4M × ARB2M (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	1	
L40 × L311 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	3	Gelenkte Kreuzungen mit angereicherten diploiden Pollen
L40 × ARB2M (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	2	
L40 × L448 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	1	
L40 × L317 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	1	
S39 × Androscoggin *P. deltoides* × (*P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*)	4	
S39 × Sim1 *P. deltoides* × *P. simonii*	9	
P. alba × L311 (*P. alba* × *P. tremula*)	3	
P. alba × L2 (*P. alba*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	2	
L 40 × L 317 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	1	
L447 × C5088 (*P.* × *canescens*) × *P. tomentosa*	1	Thermobehandlung während der Embryosackentwicklung + angereicherter diploider Pollen
L447 × L2 (*P.* × *canescens*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	3	
L40 × ARB3M (P. *tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	2	Selektion aus konventionellen Kreuzungen
L40 × L448 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	2	
KP1 × L334 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	2	
Uhyst27 × L311 *P. tremula* × *P. tremula*	1	
L455 × ARB2M *P.* × *canescens* × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	1	
L40 × L311 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	1	
L 40 × S13 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. deltoides*	1	

***** Durchführung einer zusätzlichen Thermobehandlung zur Induzierung diploider Pollen

Untersuchung des Wachstumspotenzials ausgewählter triploider Klone

Von den bisher insgesamt 45 erzeugten triploiden Klonen wurden ausgewählte Klone - einige davon schon über mehrere Jahre - im Freiland-Containertest (12-er Quickpot-Paletten) getestet. Von jeweils 20-36 Einzelpflanzen pro Klon wurden nach einer Wachstumsperiode von 6 Monaten die Sprosslänge und der Wurzelhalsdurchmesser (WHD) gemessen (Abb. 3). Die besten Ergebnisse im Containertest 2012 zeigten der durch *in vitro*-Bestäubung erzeugte Klon L40 × L311/1 und die aus einer konventionellen Kreuzung mit angereicherten diploiden Pollen hervorgegangenen Klone L40 × L311/3 und 38. Alle drei Klone waren hinsichtlich der Sprosslängen vergleichbar mit dem triploiden Vergleichsklon Astria (*P. tremula*), zeigten aber signifikant höhere WHD. Die Werte für die WHD sind vergleichbar mit denen der stark wüchsigen triploiden *P.* × *canescens*-Klone Buchhorst 1 und 2, die auf alten Versuchsflächen gefunden und *in vitro* vermehrt worden waren. Die triploiden Klone 314 und 152, die durch konventionelle Bestäubung von *P. deltoides* mit angereichertem diploiden Pollen des Klons Androscoggin (*P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*) erzeugt wurden, wiesen nur ein sehr geringes Wachstum auf, zeichnen sich jedoch durch ein langes Wuchsintervall und ein hohe Rostresistenz aus.

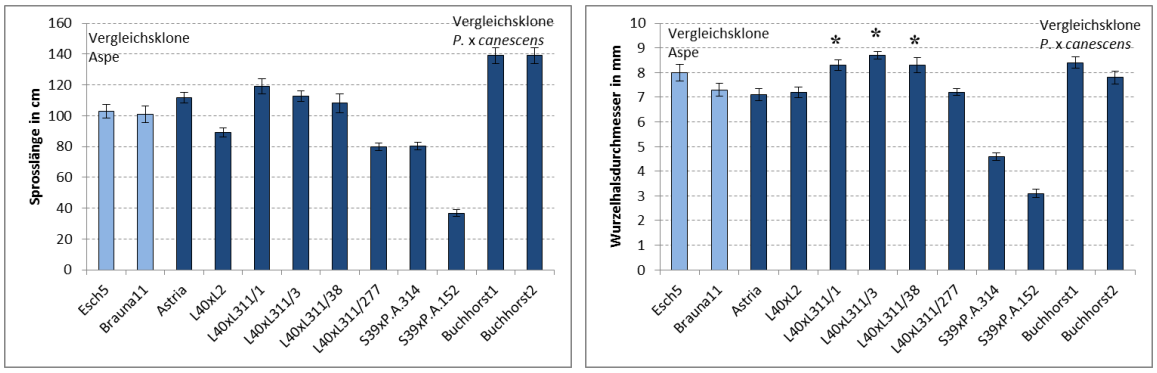

Abb. 3: Wuchsleistung (Sprosslänge und WHD) ausgewählter triploider Klone im Containerversuch 2012. Als Vergleichskone wurden die diploiden Aspenklone Esch 5 und Brauna 11 und der triploide Klon Astria verwendet. Die Sternchen (*) kennzeichnen statistisch signifikant höhere Werte im Vergleich zum triploiden Klon Astria (Dunn`s Test, p<0,05). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Dunkelblau: triploid, hellblau: diploid

Abbildung 4 zeigt die Wachstumsleistung von neun triploiden Klonen aus dem Containertest 2014. Acht Klone stammen aus gelenkten Kreuzungen mit angereicherten diploiden Pollen (L40 × ARB2M/27 bzw. L455 × ARB2M/1) oder wurden durch Selektion von Einzelpflanzen aus konventionellen Kreuzungen (Volker Schneck) erzeugt (KP1 × L334 Nr. 1 und 21, L40 × ARB3M Nr. 4 und 5, Graupa II/9 und L40 × L448/12). Hinsichtlich der Sprosslänge und des WHD liegen alle diese Klone deutlich, zum Teil signifikant über den Werten des triploiden Klons Astria. Der triploide Klon S39 × *P. simonii*, der durch intersektionelle Kreuzung von *P. deltoides* S39 (Sekt. *Aigeiros*) und eines chinesischen *P. simonii*-Klons entstanden ist, zeigte besonders bezüglich der Sprosslänge sehr geringe Werte.

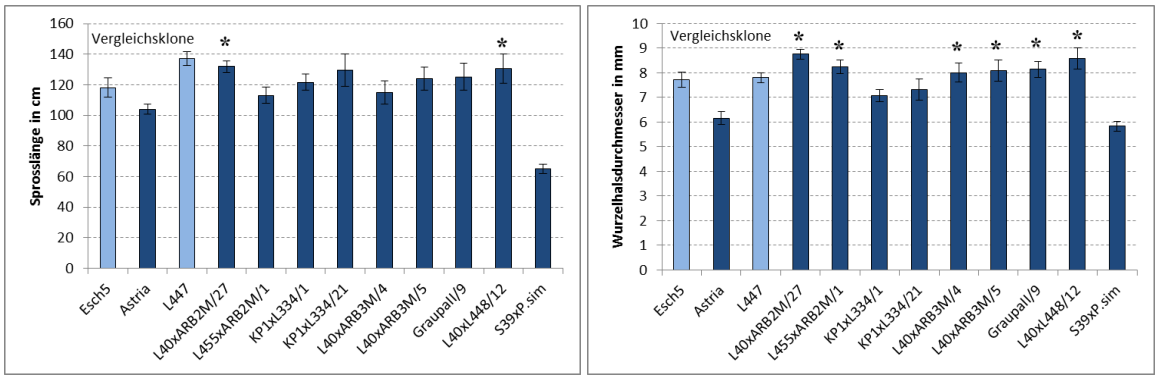

Abb. 4: Wuchsleistung ausgewählter triploider Klone im Containerversuch 2014. Als Vergleichskone wurden die Aspenklone Esch 5 und Astria und der *P.* × *canescens*-Klon L447 verwendet. Die Sternchen (*) kennzeichnen statistisch signifikant höhere Werte im Vergleich zum triploiden Klon Astria (Dunn`s Test, p<0,05). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Dunkelblau: triploid, hellblau: diploid

Ein erster Freilandtest, der im Frühjahr 2013 in der Baumschule angelegt wurde, konnte die Ergebnisse der Containerversuche bestätigen. Die aus der konventionellen Kreuzung L40 × L311 mit diploiden Pollen hervorgegangenen triploiden Klone L40 × L311/3, 38 und 277 zeigten in der Klonprüfung von insgesamt 35 Klonen hinsichtlich der Sprosshöhe (Abb. 5) und des WHD (nicht gezeigt) das beste Wachstum und waren vergleichbar mit den gut wüchsigen triploiden *P.* × *canescens*-Klonen Buchhorst 1 und 2. Auch der durch *in vitro*-Bestäubung erzeugte triploide Klon L40 × L311 Nr.1 brachte gute Ergebnisse.

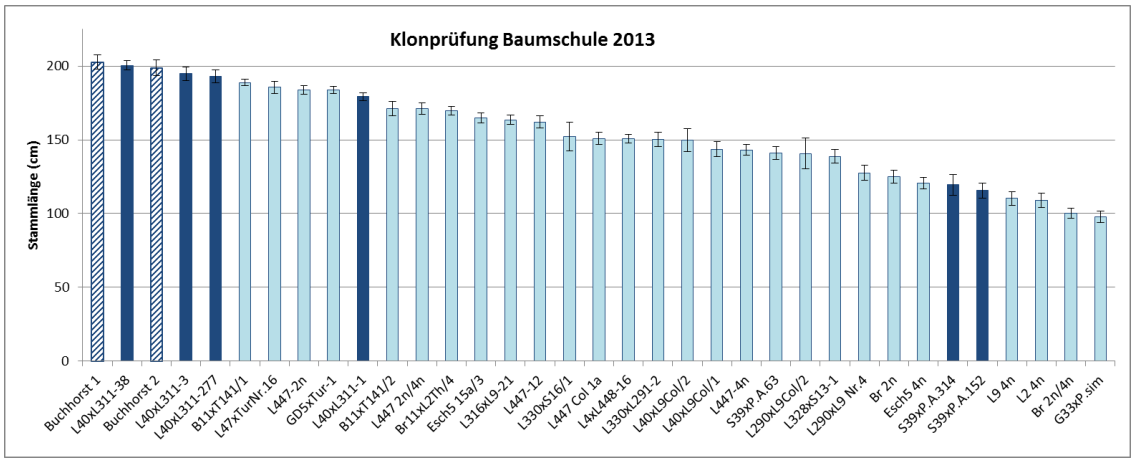

Abb. 5: Wuchsleistung ausgewählter triploider Klone (Alter: 3 Jahre) im Baumschultest 2013 (Klonprüfung). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

Untersuchung der Bewurzelungsfähigkeit triploider Pappelklone

Aus einer im Frühjahr 2011 durchgeführten intersektionellen Kreuzung zwischen *P. deltoides* S39 × *P. simonii* (Sekt. *Aigeiros* × *Tacamahaca*) mit angereichertem diploiden Pollen wurden 9 triploide Nachkommen selektiert. Die Überführung in die *in vitro* Vermehrung war sehr schwierig und nur bei zwei Klonen gelang die Anzucht von Pflanzen. Als Alternative zur *in vitro* Kultivierung soll in diesem Jahr die Stecklingsbewurzelbarkeit getestet werden. Dazu wurden von den 5 größten Pflanzen jeweils 12 Stecklinge geschnitten und ein Bewurzelungstest in 12-er Quickpot-Paletten angesetzt (Abb. 6). Wie bei einer Kombination mit der stark wurzelnden *P. simonii* zu erwarten, bewurzelten sich alle Stecklinge zu einhundert Prozent und trieben auch aus.

Abb. 6: Triploide Pflanzen aus der intersektionellen Kreuzung *P. deltoides* S39 × *P. simonii* (*Aigeiros* × *Tacamahaca*), links: Ausgangspflanzen, rechts: Untersuchung des Bewurzelungspotenzials im Stecklingsversuch

Genetische Charakterisierung der triploiden Klone

Bisher wurden 41 triploide Nachkommen genetisch charakterisiert. Aus den jeweils bekannten Genotypen der beiden Kreuzungseltern und der allelischen Konfiguration der Nachkommen (Abb. 7) kann zweifelsfrei festgestellt werden, ob der weibliche oder männliche Elter einen diploiden Beitrag geleistet hat. Zusätzlich kann anhand der Genotypen an bestimmten Markern, die in der Nähe des Zentromers der jeweiligen Chromosomen lokalisiert sind, bestimmt werden, ob ein FDR- oder SDR-Prozess stattgefunden hat (Tabelle 2). Ausführliche Erklärungen zum genetischen und methodischen

Hintergrund sowie zur Berechnung des Heterozygotiegrades wurden kürzlich veröffentlicht (Liesebach et al. 2014). Bei einer Thermobehandlung nach der Bestäubung und einem weiblichen doppelten Beitrag wird eine PMR angenommen.

Bei gemeinsamer Betrachtung der genetisch bestimmten männlichen bzw. weiblichen diploiden Beiträge und der jeweils eingesetzten Behandlung zur Erzeugung der triploiden Pflanzen musste festgestellt werden, dass trotz Bestäubung mit angereichertem diploidem Pollen in 6 Fällen ein weiblicher diploider Beitrag vorhanden war. Alle 6 stammen aus Kreuzungskombinationen mit dem Hybridaspen-Klon L40 als Mutter. Unter den bisher untersuchten aufgrund der Wuchshöhe selektierten triploiden Pflanzen (7 x weiblich diploid, 1 x männlich diploid) befinden sich ebenfalls 5, die von Klon L40 stammen. Dieser Klon besitzt offensichtlich die Fähigkeit, spontan einen erhöhten Anteil diploider Eizellen über den SDR-Mechanismus zu produzieren, was sich bisher in mehreren Blühperoiden gezeigt hat.

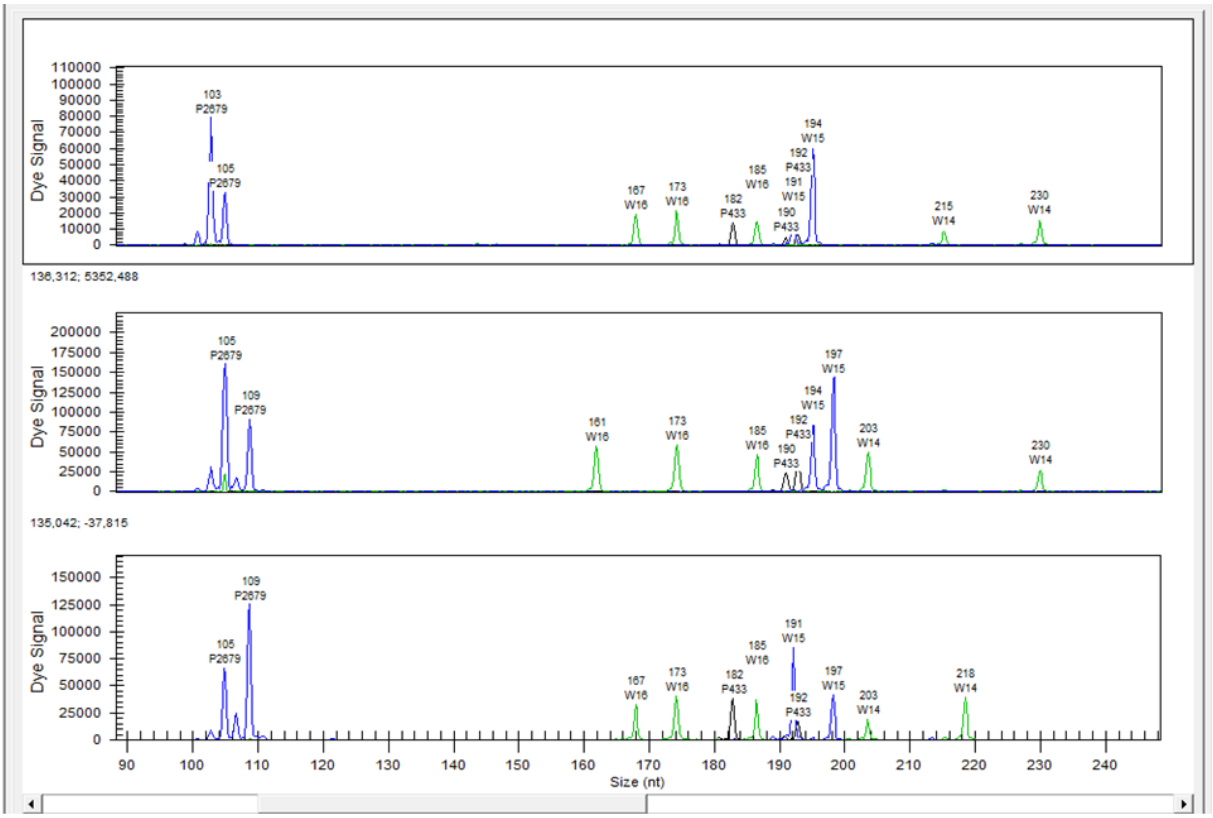

Abb. 7: Typische Genotypenmuster triploider Pflanzen (Beispiel: 3 Nachkommen der Kreuzung L447 × L2) mit teilweise 3 Allelen je Marker (WPMS16) oder einem ausgeprägten Dosis-Effekt (PMGC2679, WPMS15 und WPMS14)

Tabelle 2: Ergebnis der Genotypisierungen: Männlicher bzw. weiblicher diploider Beitrag und FDR-, SDR- bzw. PMR-Prozesse von 41 untersuchten triploiden Nachkommen

Sektion	Diploider Beitrag	Mechanismus	Anzahl
Tacamahaca	Männlich	FDR	8
	Männlich	SDR	5
Populus	Weiblich	FDR	1
	Weiblich	SDR	12
	Weiblich	PMR	6
	Männlich	FDR	2
	Männlich	SDR	7

Erzeugung tetraploider Bäume als Kreuzungspartner für die Züchtung triploider Klone

Auf lange Sicht ist die Kreuzung tetraploider und diploider Eltern die einfachste und direkteste Methode zur Erzeugung triploider Nachkommen. Voraussetzung dafür ist jedoch das Vorhandensein blühfähiger tetraploider Kreuzungspartner. Ziel eines im Februar 2014 beendeten Projektes (FNR „Tetraploide“ FKZ: 22013409) war die Erzeugung stabiler tetraploider Linien aus geprüften Aspen- und Pappelklonen. Als Ausgangsmaterial wurden Klone gewählt, die in vorangegangenen Kreuzungen hervorragende Leistungen erbracht haben, wie zum Beispiel Brauna 11 (*P. tremula*) und Turesson 141 (*P. tremuloides*), die als Elternklone zur Züchtung der Hybridaspe „Holsatia“ verwendet wurden, oder die weiblichen *P. tremula* Klone Großdubrau 1 und 5, die sich in verschiedenen anderen Kreuzungen bewährt haben. Durch Kombination der Polyploidisierung mit der Technik der *in vitro* Kultivierung war es möglich, unabhängig von der Vegetationsperiode gezielt tetraploide Pflanzen herzustellen und zu selektieren. Präparierte Sprossmeristeme wurden mit Mitosehemmern (Colchizin, Oryzalin) behandelt, was zu einer Verdopplung des Chromosomensatzes führt. Aus den behandelten Explantaten wurden Sprosse regeneriert und durch flowcytometrische Messung auf den Grad ihrer Ploidie getestet. Nach mehrfacher Subkultivierung wurden genetische stabile tetraploide Linien selektiert und *in vitro* vermehrt.

Insgesamt konnten tetraploide Linien von 10 Aspenklonen, einem Graupappelklon und einem Pappelklon erzeugt werden (Tabelle 3). Die tetraploiden Linien und die entsprechenden diploiden Ausgangsklone werden als *in vitro* Kulturen und Containerpflanzen erhalten und in das Projekt FastWood III übernommen. Nach Erreichen der Blühfähigkeit sollen diese Linien über die Erzeugung diploider männlicher und weiblicher Gameten zur Züchtung leistungsfähiger triploider Aspen und Pappeln verwendet werden. Um die Zeit bis zur Blüte zu verkürzen, werden verschiedene Methoden zur Blühstimulierung wie z.B. Reduktion des Wurzelsystems, Ringelung, Herabbiegen der Krone oder Pfropfung auf frühblühende Unterlagen getestet.

Tabelle 3: Tetraploide Linien von Aspen- bzw. Pappelklonen, die durch Behandlung mit Colchizin bzw. Oryzalin erzeugt wurden

Name	Art	Anzahl 4n-Linien
Aspen / Graupappel:		
Esch 5 (♀)	*Populus tremula × P. tremuloides* /Brauna11 × Tur141	2
Brauna 11 (♀)	*P. tremula*	1
1 Großdubrau (♀)	*P. tremula*	1
L314 (Großdubrau Nr. 5) (♀)	*P. tremula*	2
L40 (♀)	*P. tremula × P. tremuloides*	3
Turesson 141 (♂)	*P. tremuloides*	1
L291 (♂)	*P. tremula*	6
L9 (♂)	*P. tremula*	1
L2 (♂)	*P. tremula × P. tremuloides*	3
L317 (♂)	*P. tremula*	2
L447 (♀)	*Populus × canescens* (Hybride aus *P. alba × P. tremula*)	4
Pappeln:		
Androscoggin (♂)	*P. maximowiczii × P. trichocarpa*	3

Einige tetraploide Linien, so zum Beispiel zwei Linien der Graupappel L447 und eine Linie des *P. tremula* Klons L291 weisen ein deutlich besseres Wachstum gegenüber den diploiden Ausgangspflanzen auf, das sich besonders in einem signifikant höheren Stammdurchmesser zeigt. Auffallend war auch eine signifikant höhere Blattstärke, die bei zwei Aspen, einem Pappel- und einem Graupappelklon gemessen wurden. Einige tetraploide Klone zeigten einen deutlich geringeren Befall mit blattfressenden Insekten, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die durch die Polyploidisierung bedingte Veränderung der Blattmorphologie zurückzuführen ist. Tetraploide Linien

mit besonders gutem Wachstum könnten nach weiteren Tests (Resistenzverhalten, Holzeigenschaften usw.) perspektivisch direkt in eine Klonzulassungsprüfung aufgenommen werden.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen, dass die angewendeten Methoden zur kurzfristigen Erzeugung triploider Aspen- und Pappelklone geeignet sind. Die Verwendung von angereichertem diploiden Pollen bei Kreuzungen im Gewächshaus und bei *in vitro*-Bestäubungen erwies sich als sehr effektiv.

Eine gezielte oder zumindest bevorzugte Erzeugung von FDR-Gameten, die einen höheren Heterozygotiegrad in den triploiden Nachkommen zur Folge haben und damit über den reinen Dosiseffekt hinausgehende positive Eigenschaften erwarten lassen, scheint bisher nicht möglich. Die Einzelblüten in den weiblichen und männlichen Kätzchen entwickeln sich nicht synchron, sondern beginnend von der Basis und fortschreitend bis zur Spitze. Bei einer stundenweisen Thermobehandlung der Blütenzweige während der Meiose befindet sich immer ein Teil der Blüten in der Meiose I, während in einem anderen Teil offensichtlich schon die Phase der Meiose II stattfindet.

Auch die Selektion von triploiden Einzelpflanzen aus konventionellen Kreuzungen hat sich als geeignet erwiesen, weil hier gleich eine Selektion nach der Größe erfolgt.

Für die langfristige und hocheffiziente Erzeugung triploider Pappelpflanzen bietet sich die Erzeugung tetraploider Elternpflanzen von ausgewählt guten Kreuzungskombinationen an, da dort, nach Erreichen der Blühfähigkeit, beide Kombinationen (4n × 2n) mit jeweils einem tetraploiden Elternteil durchgeführt werden können. Somit kann die effektivste Kombination gewählt und zugleich können aus den triploiden Nachkommen die besten noch einmal gesondert selektiert und verklont werden.

Bei der Züchtung intersektioneller triploider Hybride soll neben der Wuchsleistung weiterhin das Ziel verfolgt werden, Eigenschaften wie Trockentoleranz, Resistenzen gegenüber bestimmten Schaderregern oder die Fähigkeit zur Stecklingsvermehrung auf die Nachkommen zu übertragen.

Literatur

Baumeister G, 1980: Beispiele der Ploidie-Züchtung. AFZ 26: 340-343.

Blakeslee AF, Avery AG, 1937: Methods inducing doubling of chromosomes in plants, J Hered 28: 393-411.

Bradshaw HD, Stettler RF, 1993: Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars. Theor Appl Genet 86: 301-307 doi:10.1007/bf00222092

Cai X, Kang XY, 2011: *In vitro* tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudosimonii* Kitag. Plant Cell Rep 30: 1771-1778.

De Wet JMJ, 1980: Origin of polyploids. In: Polyploidy - Biological relevance. Lewis, H.W. (ed.): Plenum Press, New York – London: 3-15.

Einspahr DW, Van Buijtenen JP, Peckham JR, 1963: Natural variation and heritability in triploid aspen. Silvae Genet 12: 51-58.

Einspahr DW, 1984: Production and utilisation of triploid hybrid aspen. Iowa State J Res 58: 401-409.

Every DA, Wiens D, 1971: Triploidy in Utah aspen. Madrono: 138-47.

Ewald D, Ulrich K, Naujoks G, Schröder MB, 2009: Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult 99: 353-357.

Ewald D, Ulrich K, 2012: *In vitro* pollination in poplar of section *Populus*. Plant Cell Tiss Organ Cult 111: 255-258.

Johnsson H, Eklundh C, 1940: Colchicine treatment as a method in breeding hardwood species Svensk Papperstidning 43: 373-377.

Johnsson H, 1940: Cytological studies of diploid and triploid *Populus tremula* and crosses between them. Hereditas 26: 321-352.

Kang XY, Zhu ZT, Lin HB, 1999: Study on the effective treating period for pollen chromosome doubling of *P. tomentosa* × *P. bolleana*. Sci Silvae Sin 35: 21-24.

Kang XY, Zhu ZT, Zhang ZY, 2000: Breeding of triploids by the reciprocal crossing of *Populus alba* × *P. glandulosa* and *P. tomentosa* × *P. bolleana*. J Beijing For Univ 22: 8-11.

Kang XY, Zhu ZT, Zhang ZY, 2000a: Suitable period of high temperature treatment for 2n pollen of *Populus tomentosa* × *P. bolleana*. J Beijing For Univ 22: 1-4.

Li YH, Kang XY, Wang SD, Zhang ZH, Chen HW, 2008: Triploid induction in *Populus alba* × *P. glandulosa* by chromosome doubling of female gametes. Silv Genet 57: 37-40.

Liesebach H, Ulrich K, Ewald D, 2014: FDR and SDR processes in meiosis and diploid gamete formation in poplars (*Populus* L.) detected by centromere-associated microsatellite markers. Tree Genet. Genomes 11, DOI: 10.1007/s11295-014-0801-6.

Mackevic NV, 1959: Dokl. Akad. Nauk SSSR (Proc. Acad. Sci. USSR) 126: 183.

Mashkina OS, Burdaeva IM, Belozerova MM, Vyunova LN, 1989: A method of inducing pollen in woody species. Lesovedenie 1: 19-25.

Müntzing A, 1936: The chromosomes of a giant *Populus tremula*. Hereditas 21: 383-393

Nilsson-Ehle H, 1936: Note regarding the gigas form of *Populus tremula* found in nature. Hereditas 21, 372-82

Seitz FW, 1954: The occurrence of triploids after self-pollination of anomalous androgynous flowers of a grey poplar. Z Forstgenet 3, 1-6

Ulrich K, Ewald D, 2014: Breeding triploid aspen and poplar clones for biomass production. Silv Genet 63: 47-58.

Ulrich K, Naujoks G, Ewald D, 2012: Polyploide Bäume für den Kurzumtrieb. AFZ (15): 17-20.

Van Buijtenen JP, Joranson PN, Einspahr DW, 1957: Naturally occurring triploid quaking aspen in the United States. Proc Soc Am Foresters: 62-64.

Wang J, Kang XY, Li DL, 2012: High temperature-induced triploid production during embryo sac development in *Populus*. Silv Genet 61: 85-93.

Wang J, Kang XY, Li DL, Chen H, Zhang P, 2010: Induction of diploid eggs with colchicine during embryo sac development in *Populus* Silv Genet 59: 40-48.

Wang J, Shi L, Song S, Tian J, Kang X, 2013: Tetraploid production through zygotic chromosome doubling in *Populus*. Silva Fennica Vol. 47 no. 2, article id 932. 12 p (SSN-L 0037-5330 | ISSN 2242-4075 (Online)).

Xi XJ, Jiang XB, Li D, Guo LQ, Zhang JF, Wei ZZ, Li BL, 2011: Induction of 2n pollen by colchicine in *Populus × popularis* and its triploids breeding. Silv Genet 60: 155-160.

Zhang Z, Kang X, 2010: Cytological characteristics of numerically unreduced pollen production in *Populus tomentosa* Carr. Euphytica 173: 151-159.

Zhang ZY, Li FL, Zhu ZT, 1992: Chromosome doubling and triploid breeding of *Populus tomentosa* Carr. and its hybrid. J Beijing For Univ 14 (suppl.): 52-58.

Korrespondierende Autorin:
Dr. Kristina Ulrich
Thünen-Institut für Forstgenetik
Eberswalder Chaussee 3 a
15377 Waldsieversdorf
kristina.ulrich@ti.bund.de

THÜNEN

FastWOOD II: Züchtung schnellwachsender Baumarten für die Produktion nachwachsender Rohstoffe im Kurzumtrieb – Erkenntnisse aus 6 Jahren FastWOOD

Mirko Liesebach (Hrsg.)

Thünen Report 26

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

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

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

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

Zitationsvorschlag – *Suggested source citation:*
Mirko Liesebach (ed) (2015) FastWOOD II: Züchtung schnellwachsender Baumarten für die Produktion nachwachsender Rohstoffe im Kurzumtrieb – Erkenntnisse aus 6 Jahren FastWOOD. Braunschweig: Johann Heinrich von Thünen-Institut, 210 p, Thünen Rep 26

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

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

THÜNEN

Thünen Report 26

Herausgeber/Redaktionsanschrift – *Editor/address*

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

thuenen-report@ti.bund.de
www.ti.bund.de

ISSN 2196-2324
ISBN 978-3-86576-131-6
DOI:10.3220/REP_26_2015
urn:nbn:de:gbv:253-201503-dn054837-5