



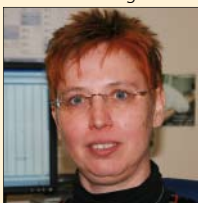
Abb. 1: Teilfläche der Aspen-Sammlung am Institut für Forstgenetik des vTI

Auch bei Pappeln ist nicht immer drin, was drauf steht

Hilke Schröder, Georg von Wühlisch, Matthias Fladung

Diverse Pappelarten, -hybride und -klone können inzwischen anhand von molekularen Markern identifiziert und voneinander unterschieden werden. Pappeln aus verschiedenen Klonsammlungen und Mutterquartieren wurden mithilfe dieser Marker auf ihre Identität mit dem Ergebnis überprüft¹⁾, dass einige Pappelhybride und Klone nicht das sind, was sie laut Etikettierung sein sollten. Jahrzehnte züchterischer Arbeit haben hier ihre Spuren hinterlassen. Die eingeschlichenen Fehler können jetzt mithilfe der molekularen Marker aufgedeckt und korrigiert werden.

Dr. H. Schröder ist wissenschaftliche Mitarbeiterin in dem Fachgebiet Genomforschung, Dr. G. v. Wühlisch ist wissenschaftlicher Mitarbeiter in dem Fachgebiet Herkunfts- und Züchtungsforschung und PD Dr. M. Fladung ist Leiter des Fachgebiets Genomforschung am Institut für Forstgenetik des vTI in Großhansdorf.



Hilke Schröder
hilke.schroeder@vti.bund.de

Die Gattung *Populus* hat aufgrund einer schnellen Wachstumsrate, insbesondere bei interspezifischen Hybriden, sowie einer breiten Anwendbarkeit sowohl in der Holz- und Papierindustrie als auch in der Biomasseproduktion eine hohe ökonomische Bedeutung erlangt [1, 2]. Für die

¹⁾ Die Arbeiten wurden vom Projekt FastWood (gefördert vom BMELV über die FNR) finanziell unterstützt. Die Laborarbeit führte die technische Assistentin Susanne Bein durch. Das Pflanzenmaterial stellte die NW-FVA und Sachsenforst zur Verfügung.

Identifizierung von Klonen und Hybriden, die aus den sieben Pappelarten

- Populus trichocarpa,*
- Populus maximowiczii,*
- Populus nigra,*
- Populus deltoides,*
- Populus tremula,*
- Populus tremuloides* und
- Populus alba*

bestehen, wurden sowohl Mikrosatelliten als auch SNP-Marker entwickelt und stehen seit kurzem für die praktische Anwendung zur Verfügung [3, 4, 5, 6].

Bei der Überprüfung von Pappelpflanzen, die seit Jahrzehnten in Klonsammlungen und Mutterquartieren kultiviert werden, wurden verschiedene Ungereimtheiten festgestellt. So war z.B. bei nahe verwandten Pappelarten die Art falsch angegeben, oder bei Hybriden war manches Mal die Kreuzungsrichtung falsch angegeben bzw. eine der angeblich in der Kreuzung verwendeten Arten nicht nachweisbar.

Forstpflanzenzüchtung braucht Zeit

Mit der Gründung des Institutes für Forstgenetik 1948 in Großhansdorf begann die züchterische Bearbeitung von Baumarten wie Lärche, Kiefer, Birke und Pappel. Insbesondere Pappeln der Sektion *Populus* (früher *Leuce*) wurden schon früh erfolgreich in einem kleinen, aber kontinuierlichen Kreuzungsprogramm bis heute in unterschiedlicher Intensität gezüchtet. So gelang es J. GREHN bereits 1951 die Kreuzung herzustellen, die europaweit unter dem Handelsnamen ‚Holsatia‘ als geprüftes Vermehrungsgut vertrieben wird [7] und viele gutwüchsige Klone hervorgebracht hat.

Die aus den Kreuzungen entstandenen Pflanzen wurden im Laufe der Jahrzehnte in Feldversuchen ausgebracht. Allein in der Sektion der Aspen wurden insgesamt 120 Feldversuche vom Institut angelegt. Das Ausgangsmaterial für die Züchtungen wurde jedoch für die leichtere Erreichbarkeit auf Flächen des Instituts angebaut. Dazu wurden Flächen, die vormals dem Kiesabbau dienten, planiert und konnten ab 1962 die immer umfangreicher werdenden Sammlungen in vier verschiedenen Teilflächen aufnehmen (Abb. 1).

Viele Personen waren mit dem inzwischen über 60 Jahre währenden Züchtungsprogramm befasst. Entsprechend haben sich die Ausrichtung und Schwerpunkte des Programms wie auch Namensgebungen des Materials geändert oder sind unterschiedlichen Regeln gefolgt.

Tab. 1: Artzugehörigkeit der 297 Pappel-Individuen aus dem Arboretum des Instituts für Forstgenetik (Großhansdorf) laut Bestandslisten und Darstellung der mit SNP-Markern festgestellten Abweichungen

Art	N: gesamt	N: Art falsch	Korrekte Art	Fehlende Art	Richtung falsch	Mutter
<i>P. tremuloides</i>	52	4	tre			
<i>P. tremula</i>	120	1	tro			
<i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	75	2	Mutter unbekannte Art		10	tro
<i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i>	6	2	tre x ?	<i>P. alba</i>		
<i>P. alba</i> x <i>P. tremula</i> (= <i>x canescens</i>)	20	2	tre x ?	<i>P. alba</i>	4	tre
<i>P. x canescens</i> x <i>tremuloides</i>	11				11	tre
<i>P. alba</i>	3					
unbekannt	9		8 x tre 1 x tro			
gesamt	297	11			24	

tre = *P. tremula*, tro = *P. tremuloides*

Überprüfung von Pflanzenmaterial der Sektion Populus

Auf dem Gelände des vTI, Institut für Forstgenetik (Großhansdorf), stehen in einem Pappel-Mutterquartier und auf Pappel-Pfropflingsflächen insgesamt 297 Individuen der Sektion Populus, verteilt auf den vier beschriebenen Flächen, für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung (Abb. 1). In den Jahren 2009 und 2010 wurden die Pflanzen der vier Flächen mit SNP-Markern des Chloroplasten- und Kerngenoms auf ihre Artzugehörigkeit sowie auf die Kreuzungsrichtung überprüft. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- a) Insgesamt elf Individuen gehörten nicht der Art an, die sie laut Bestandsliste sein sollten (Tab. 1). Davon finden sich bei den reinen Arten vier als *P. tremuloides* deklarierte Individuen, die aber tatsächlich *P. tremula* wa-

ren sowie ein als *P. tremula* ausgezeichnetes Individuum, das genetisch *P. tremuloides* entsprach (Tab. 1, Spalten „N: Art falsch“ und „korrekte Art“). Bei den Hybriden aus *P. tremula* und *P. tremuloides* verhält es sich so, dass bei zwei Individuen keine der beiden angegebenen Arten als Mutter identifiziert werden konnte, also eine weitere (andere), mit den SNP-Markern bisher nicht zu identifizierende Art, involviert sein muss (Tab. 1, Spalten „N: Art falsch“ und „korrekte Art“).

- b) Bei zehn *P. tremula* x *P. tremuloides*-Hybriden zeigte es sich, dass zwar tatsächlich beide Arten miteinander gekreuzt wurden, die Kreuzungspartner aber nicht in der korrekten Reihenfolge angegeben wurden (Tab. 1, Spalten: „Richtung anders“ und „Mutter“).
- c) In vier *P. alba* x *P. tremula*- und *P. tremula* x *P. alba*-Hybriden konnte kein Hinweis auf „genomische Anwesenheit“ von *P. alba* gefunden werden (Tab. 1, Spalten „Korrekte Art“ und „Fehlende Art“).
- d) Bei fünfzehn Kreuzungen, in denen *P. x canescens* (also *P. alba* als Mutter) enthalten sein

sollte, war die Kreuzungsrichtung nicht korrekt angegeben (Tab. 1, Spalten „Richtung falsch“ und „Mutter“).

Des Weiteren sind die 297 Individuen der vier Flächen mithilfe von 12 ausgewählten Mikrosatelliten-Markern genotypisiert worden. Die 297 Individuen verteilen sich insgesamt auf 93 Klone. 34 dieser Klone sind auf den Flächen mit mehr als einem Individuum (Ramet) vertreten. Die Identität ihrer Ramets wurde überprüft. Bei der Hälfte dieser Klone (17) zeigte es sich, dass mindestens ein Individuum (manchmal auch mehrere Individuen) unterschiedliche Allele aufwiesen, also nicht demselben Klon zuzuordnen sind [4, 5].

Überprüfung von Pflanzenmaterial der Sektionen Tacamahaca und Aigeios

Von der Nordwestdeutschen Versuchsanstalt (NW-FVA), Hann. Münden, wurden 38 Eltern-Individuen, bestehend aus den Arten *P. trichocarpa*, *P. maximowiczii*, *P. deltoides*, *P. nigra* sowie 52 ihrer Nachkommen, zur Verfügung gestellt, um sie auf Artreinheit bzw. auf korrekte Kreuzung hin zu untersuchen. Die Mütter der 52 Nachkommen waren alle unter Anwendung der Chloroplasten-SNP-Marker eindeutig korrekt den 38 Eltern-Individuen zuzuordnen.

Bei der Überprüfung beider Kreuzungspartner mit den Kern-SNP-Markern ergaben sich allerdings Ungereimtheiten. Es waren SNPs von Arten zu finden, die eigentlich in der Kreuzung nicht verwendet worden sein sollten. Letztendlich ergab sich nach der genealogischen Überprüfung, dass sechs der Eltern-Individuen, die als reine *P. trichocarpa* deklariert waren, bereits Hybride aus *P. trichocarpa* und *P. nigra* waren.

Klon-Überprüfung

In den Pappelmutterquartieren verschiedener Versuchsanstalten werden viele Pappel-Klone kultiviert, von denen nur ein Teil für den kommerziellen Anbau zugelassen und damit im Register „Zugelassene Klone und Klonmischungen der Pappeln“ aufgeführt ist. Unabhängig von der Zulassung der Klone wurden 143 Klone aus sechs Pappelmutterquartieren verschiedener Versuchsanstalten und drei Versuchsflächen des Instituts für Forstgenetik mit Mikrosatelliten genotypisiert. Waren verschiedene Individuen desselben Klons verfügbar, konnten diese auf Klonidentität geprüft werden. Hier ergaben sich nur wenige Abweichungen, z.B. unterschieden sich bei den zugelassenen Klonen Tapiau 3 (Synonym

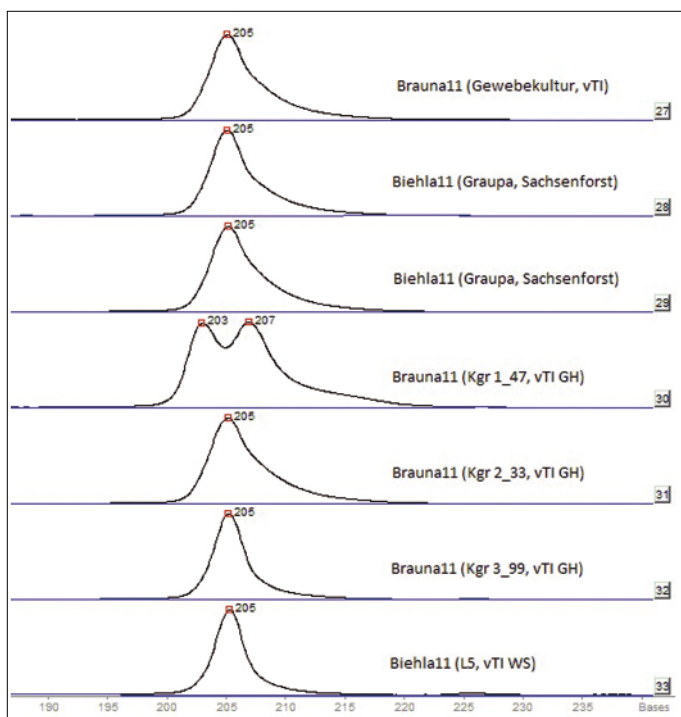


Abb. 2: Mikrosatelliten-Peaks eines der verwendeten 12 Marker für die sieben untersuchten Individuen, die als Brauna11 bzw. Biehla11 bezeichnet sind. Das Individuum Kgr 1_47 zeigt ein anderes Muster, ist folglich nicht derselbe Klon wie die anderen sechs Individuen. GH = Großhansdorf, WS = Waldsiefersdorf.

Wedesbüttel: W3) und Tapiau 7 (W7) verschiedene Individuen, die denselben Klon-Namen tragen, voneinander.

- Von dem **Klon Tapiau 3** wurden sechs Individuen von fünf Flächen mit bis zu 12 Mikrosatelliten-Markern untersucht. Vier der Individuen wiesen identische Fragmentmuster auf. Die übrigen zwei sind sowohl von den anderen vier als auch voneinander verschieden, gehören also nicht zu demselben Klon.
- Für den **Klon Tapiau 7** standen acht Individuen von zwei Flächen zur Verfügung. Auch hier waren zwei Individuen sowohl von den übrigen sechs als auch voneinander verschieden. Wobei sich eines der Individuen nur in einem Mikrosatelliten-Marker (aus 12) von den sechs identischen unterscheidet, also einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweist, während das andere Individuum nur in wenigen Allelen den übrigen ähnelt. Eine Überprüfung mit anderen Tapiau-Klonen muss hier zeigen, ob und wenn ja, welchem Klon die jeweiligen Individuen zuzuordnen sind.

Neben dieser Identitätsprüfung (derselbe Name = derselbe Klon?) wurden die Klone Biehla 11 und Brauna 11 dahingehend untersucht, ob es sich um einen Klon handelt (unterschiedliche Namen, aber möglicherweise derselbe Klon?). Diese beiden Klone sind vermutlich einheitlichen Ursprungs

und erhielten nur durch Verwendung sowohl in der ehemaligen DDR (Biehla 11) als auch in der BRD (Brauna 11) verschiedene Namen. Drei Individuen mit dem Namen Biehla 11 und vier mit dem Namen Brauna 11 wurden mit Mikrosatelliten untersucht.

- Sechs der insgesamt sieben Individuen wiesen identische Mikrosatelliten-Muster auf (Abb. 2) [4].
- Das eine ebenfalls als Brauna 11 geführte Individuum mit unterschiedlichem Mikrosatelliten-Muster darf also zukünftig nicht mehr als Brauna 11 bezeichnet werden.

Die Untersuchung ergab somit, dass die beiden Klone Biehla 11 und Brauna 11 identisch sind.

Folgerungen

Im Zuge von jahrzehntelanger Züchtungsarbeit können sich Verwechslungen und Fehl-Deklarationen einschleichen. Abgefallene und nach bestem Wissen ersetzte Etiketten, Ausfälle von Individuen auf Versuchsflächen, Durchwachsungen der Unterlage bei gepfropften Individuen und nicht zuletzt auch Wurzelbrut von ursprünglich gepflanzten Bäumen, die jetzt

für andere Individuen des Pflanzplanes gehalten werden, sind nur einige der möglichen Fehlerquellen. Wichtig ist hierbei allerdings, diese Fehl-Deklarationen erkennen und korrigieren zu können und zu wollen, damit bei zukünftigen Züchtungsaktivitäten wieder von korrekten Angaben zu den beinhalteten Pappel-Arten ausgegangen werden kann. Die Entwicklung und zur Anwendung gebrachten molekularen Marker bieten hier eine hervorragende Ergänzung zu phänotypischen Erkennungskriterien.

Literaturhinweise:

- [1] LICHT, L. A.; ISEBRANDS, J. G. (2005): Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass & Bioenergy* 28: 203-218. [2] STETTLER, R.; BRADSHAW, T.; HEILMAN, P.; HINCKLEY, T. (1996): *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press. Montreal, Canada. 542 Seiten. [3] LIESEBACH, H.; SCHNECK, V.; EWALD, E. (2010): Clonal fingerprinting in the genus *Populus* L. by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids. *Tree Genetics & Genomes* 6: 259-269. [4] SCHROEDER, H.; FLADUNG, M. (2010): SSR and SNP markers for the identification of clones, hybrids and species within the genus *Populus*. *Silvae Genetica* 59 (6): 257-263. [5] SCHRÖDER, H.; FLADUNG, M. (2010): Unterscheidung von Pappelarten und -klonen – molekulare Marker machen's möglich. *Forst und Holz* 65 (11): 18-21. [6] SCHROEDER, H.; HOELTKEN, A. M.; FLADUNG, M. (2011): Differentiation of *Populus* species using chloroplast SNP-markers – essential for comprehensible and reliable poplar breeding. *Plant Biology*, doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00502.x. [7] WÜHLISCH, G. von (2011): Hybridaspensorte ‚Holsatia‘ jetzt europaweit zugelassen. *AFZ-DerWald* 66 (14): 8-9.