

Polyploide Bäume für den Kurzumtrieb

Kristina Ulrich, Gisela Naujoks und Dietrich Ewald

Als Polyploidie bezeichnet man in der Biologie das bei manchen Arten zu beobachtende Phänomen, mehr als zwei Sätze von Chromosomen in den Zellen zu besitzen. Die verbesserten Eigenschaften selektierter, natürlich entstandener polyploider Bäume wie starke Wuchsleistung, verbesserte Holzeigenschaften und gesteigerte Resistenz sind lange bekannt. Polyploide Bäume können aber auch künstlich erzeugt werden.

Verschiedene Methoden zur gezielten Herstellung polyploider Aspen, Pappeln und Robinien wurden getestet und eingesetzt¹⁾. Durch In-vitro-Bestäubungen und konventionelle Kreuzungen mit diploidem (2 Chromosomensätze) Pollen, der durch Wärmebehandlung induziert oder aus natürlichen Pollengemischen angereichert wurde, konnten mehrere triploide (3 Chromosomensätze) Aspen- und Pappelklone erzeugt werden. Künstlich erzeugte tetraploide (4 Chromosomensätze) Aspen, Pappeln und Robinien sollen über die Produktion diploider Pollen oder Eizellen zur Züchtung leistungsfähiger triploider Klone verwendet werden. Das Wachstum der ersten triploiden Aspen im Freiland war Erfolg versprechend, aber auch unter den tetraploiden Pflanzen konnten Bäume mit besonderen Wachstums- und Resistenzeigenschaften gefunden werden.

Natürliche Polyploidie

Die größte Baumart der Welt, der „Küstenmammutbaum“, auch „Coast redwood“ (*Sequoia sempervirens*), wächst in Kalifornien und erreicht bei einem Brusthöhendurchmesser von 8 m eine Höhe von bis zu 115 m. Diese Bäume sind besonders schnellwüchsig, widerstandsfähig und sie sind hexaploid, das heißt, sie besitzen 6 Chromosomensätze. Ist das Zufall oder

gibt es einen Zusammenhang zwischen Ploidie und Wachstum?

Polyploide Pflanzen oder deren Früchte umgeben uns ständig. Beispiele sind die kernlosen triploiden Varianten von Melonen, Orangen, Zitronen und anderen Obstsorten, tetraploide großfrüchtige Bananen, Erdbeeren, Äpfel und Birnen, triploide Zuckerrüben, der hexaploide Weizen und viele andere mehr. Wie man sieht, hat sich die Landwirtschaft schon seit langer Zeit mit diesen Nutzungsvarianten polyploider Pflanzen auseinandergesetzt. Was ist aber mit Bäumen?

In der Natur kommen polyploide Bäume relativ häufig vor, wie viele alte spontan gefundene Apfel- und Birnensorten beweisen, wobei Polyploidie bei den Laubgehölzen wesentlich mehr Bedeutung hat als bei den Nadelgehölzen. Bei den Koniferen werden neben dem erwähnten hexaploiden Mammutbaum nach WRIGHT [1] die tetraploide Goldlärche und der tetraploide Wacholder genannt. Bei den Laubgehölzen wurden spontan entstandene Polyploidisierungen bei *Salix*-, *Alnus*-, *Betula*-, *Acer*-, *Aesculus*-, *Fraxinus*-, *Tilia*-, *Robinia*- und *Quercus*-Arten und in der Familie der Rosaceen gefunden [2, 3, 4, 5, 6]. Der Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*) ist von Natur aus bereits tetraploid.

Auch unter den Pappeln und Aspen, die sich neben Weiden und Robinien besonders für den Kurzumtrieb eignen, sind aus verschiedenen Sektionen wie zum Beispiel der Sektion Leuce (*Populus*) natürlich entstandene Polyploide bekannt [7]. Nach der Entdeckung einer stark wüchsigen Aspe mit ungewöhnlich großen Blättern (Gigamerkmale) 1935 in Schweden [8], die von MÜNTZING später als triploid charakterisiert

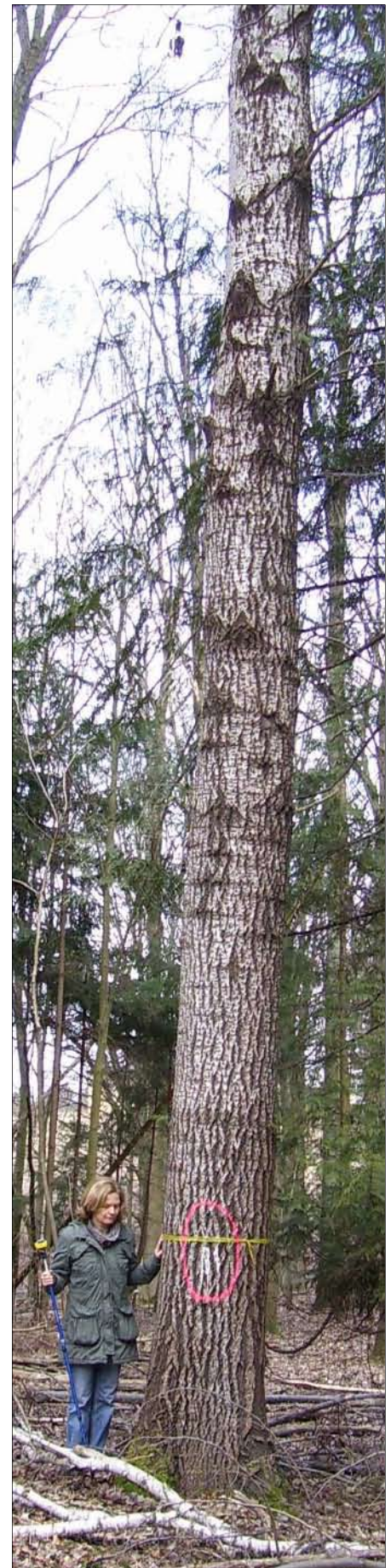


Abb. 1: Triploide, ungefähr 40 Jahre alte Graupappel Buchhorst 1 mit einer Höhe von 32 m und einem Brusthöhendurchmesser von 61 cm

Dr. K. Ulrich ist wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Forstgenetik in Waldsiedersdorf des Johann Heinrich von Thünen-Instituts.



Kristina Ulrich
kristina.ulrich@vti.bund.de

¹⁾ Die Arbeiten wurden im Rahmen der durch die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR) geförderten Projekte „FastWood“ und „Tetraploide“ durchgeführt.



Abb. 2: Bei der In-vitro-Bestäubung werden weibliche Aspenblüten im „fängischen“ Stadium im Gewächshaus entnommen und unter dem Stereomikroskop in der sterilen Werkbank präpariert. Die Fruchtknoten werden abgetrennt und mit der Narbe nach oben auf ein Nährmedium aufgesetzt. Die Pollenkörner werden unter dem Mikroskop nach Größe selektiert und mit einer speziell präparierten Borste auf die Narben übertragen (links). Alles geschieht unter semi-sterilen Bedingungen. Nach etwa 14 Tagen werden die reifen Samen mit einem Mikroskalpell entnommen (rechts) und auf ein Regenerationsmedium überführt.

werden konnte [9], wurden weitere triploide Aspen in verschiedenen Regionen Schwedens gefunden [8, 10, 11]. In Russland wurden besonders wüchsige triploide Riesenaspen mit einer starken Resistenz gegen über tierischen Schädlingen beschrieben [12]. Auch in Amerika begann, vorangetrieben durch die Papierindustrie, die Suche nach triploiden Aspen. Die ersten triploiden Klone der Amerikanischen Zitterpappel (*Populus tremuloides*) wurden in Minnesota gefunden. Dabei waren die meisten dieser Klone durch ungewöhnliche Größe, enormes Wachstum, große Blätter und sehr lange Fasern aufgefallen [13, 14, 15].

Polyploidiezüchtung bei Forstpflanzen

Das Auffinden der triploiden Aspenklone in Schweden und die Erkennung der Leistungsfähigkeit dieser Bäume gab den Anstoß für die Polyploidiezüchtung in der Forstpflanzenzüchtung allgemein. Mit der Entdeckung des Colchizins, das als „Mitosegift“ eine Verdopplung der Chromosomen in der Zelle möglich macht,

schafften BLAKESLEE und AVERY [16] die Voraussetzung zur künstlichen Herstellung polyploider Pflanzen.

Untersuchungen an verschiedenen Baumarten zeigten, dass Polyploidie jedoch nicht immer mit Wachstumssteigerung verbunden ist. Die tetraploiden Bäume brachten meist nicht den gewünschten Erfolg. Dagegen zeigten in vielen Fällen künstlich induzierte triploide Pflanzen gesteigerte Wuchsleistungen gegenüber den Kontrollen.

Durch Kreuzung künstlich erzeugter tetraploider Bäume mit diploiden Partnern konnten bei verschiedenen Baumarten gut wüchsige Triploide erzeugt werden. Besonders bei Aspen und Pappeln ist dieser Weg sehr aussichtsreich. Ein Beispiel dafür ist der von H. J. FRÖHLICH 1955 in Hannover Münden aus der Kreuzung einer tetraploiden *P. tremula* mit Pollen einer diploiden kanadischen *P. tremuloides* selektierte triploide Klon Astria, der sich in langjährigen Feldversuchen bewährt hat und heute noch angebaut wird [7].

EINSPAHR [17] konnte bei triploiden Hybridaspen, die durch Kreuzung von *Populus tremuloides* Michx. mit einer tet-

raploiden schwedischen *Populus tremula* erzeugt worden waren, neben der etwa doppelten Wachstumsrate eine höhere Holzdicke und längere Fasern nachweisen, was sie für die Papier- und Zellstoffindustrie besonders interessant machte. Während der Polyploidiezüchtung im forstlichen Sektor seit den 80er-Jahren in Europa relativ wenig Beachtung geschenkt wurde, führte man die Forschungen besonders in China konsequent weiter. Prof. ZHU, der Begründer dieser Forschungsrichtung in Peking, selektierte anfangs natürlich vorkommende triploide Klone von *Populus tomentosa* bezüglich ihrer Holzdicke, Faserlänge und Schädlingsresistenz [18]. Alle Merkmale waren besser als bei den diploiden Ausgangsbäumen, die durchschnittliche Zuwachsrate der Triploiden lag bei 56,4 % über der Kontrolle, der beste Klon bei 154 %. Außerdem wurden durch Verwendung von diploiden Pollen triploide *P. tomentosa*-Klone gezüchtet, von denen der beste Klon eine dreifache Wachstumsleistung im Vergleich zur Kontrolle hatte [19]. Eine triploide Mehrfachhybride [(*P. alba* x *P. glandulosa*) x *P. tomentosa*], die von KANG et al. [20] gezüchtet wurde, wies als zweijährige Pflanze ein um 55 % höheres Längenwachstum und einen um 119 % höheren basalen Durchmesser im Vergleich mit Sämlingsherkünften auf.

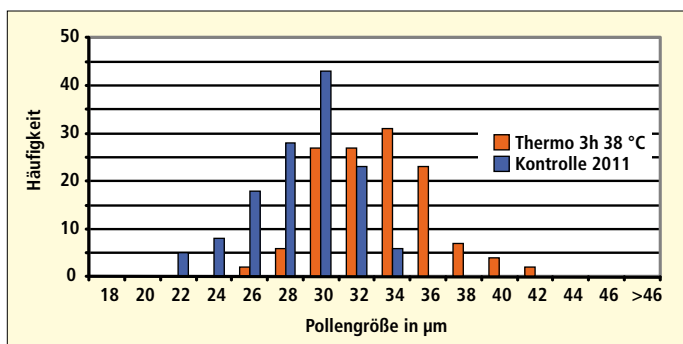


Abb. 3: Veränderung der Pollengröße (durchschnittlicher Pollendurchmesser) durch Thermobehandlung von Blühreisern des Pappelklons *P. „Androscoffin“*

Triploide Gehölze für die Biomassegewinnung

Mit der Zunahme des Interesses an Kurzumtriebspflanzen oder schnell wachsenden Pflanzen allgemein rückt aber auch in Deutschland die Züchtung von Bäumen wieder mehr in den Mittelpunkt des Inte-

resses. Dies trifft für die stoffliche Nutzung ihrer Biomasse ebenso zu wie für deren energetische Nutzung. Mit der Förderung von Arbeiten zur Züchtung wuchstarker, trocken-toleranter und möglichst krankheits-resistenter Bäume durch die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe ist auch die Züchtung polyploider Forstpflanzen wieder angelaufen. Das Hauptziel dieser Arbeiten, die Erzeugung triploider Pflanzen mit höherer Wuchsleistung und Resistenz, kann über mehrere Wege erreicht werden.

Triploidisierung durch Verwendung diploider Gameten (Pollen)

Pollen und Eizellen sind normalerweise haploid. Eine Möglichkeit zur Erzeugung triploider Pflanzen ist die Bestäubung mit diploidem Pollen ($1N + 2N = 3N$). MASHKINA et al. [21] konnten zum ersten Mal bei Pappeln zeigen, dass durch Temperatursprünge während der Prophase der Meiose die Erzeugung eines erhöhten Anteils an diploiden Pollen möglich ist. In unserer Arbeitsgruppe wurden in den letzten Jahren Untersuchungen zur künstlichen Induktion diploider Pollen durch Wärmebehandlung durchgeführt. Um den Zeitpunkt des für die Behandlung günstigsten Meiose-Stadiums genau abschätzen zu können, wurde zunächst das Blühverhalten der männlichen Pappel-Blüten durch mikroskopische Analyse und phänologische Betrachtungen der Pollenmutterzellen untersucht. Blühreiser, bei denen das entsprechende Stadium vorlag, wurden drei Stunden bei 38 °C im Wärmeschrank behandelt. Die mikroskopische Vermessung der entstandenen Pollen ergab eine deutliche Erhöhung der durchschnittlichen Pollengröße im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 3). Zur Anreicherung der diploiden Pollen wurden die entsprechenden Größenfraktionen mit einer speziellen Maschine ausgesiebt.

Eine Alternative zur Thermobehandlung ist die Verwendung natürlich entstandener und durch Siebung angereicherter größerer, diploider Pollen. Zur Veränderung der Chromosomenzahl kann es zum Beispiel durch Temperaturextreme während der Pollenreifung kommen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass extreme Temperaturen oder Temperatursprünge während der Prophase der Meiose (Reifeteilung) oft als Ursache dafür gesehen werden, dass an den Grenzen von Verbreitungsgebieten bestimmter Baumarten oder in Gebieten mit extremen Klimaverhältnissen gehäuft polyploide Bäume vorkommen.

Diploide Gameten können aber auch durch die Wirkung spezifischer Gene in Pflanzen auftreten (z.B. dyad-Mutante bei

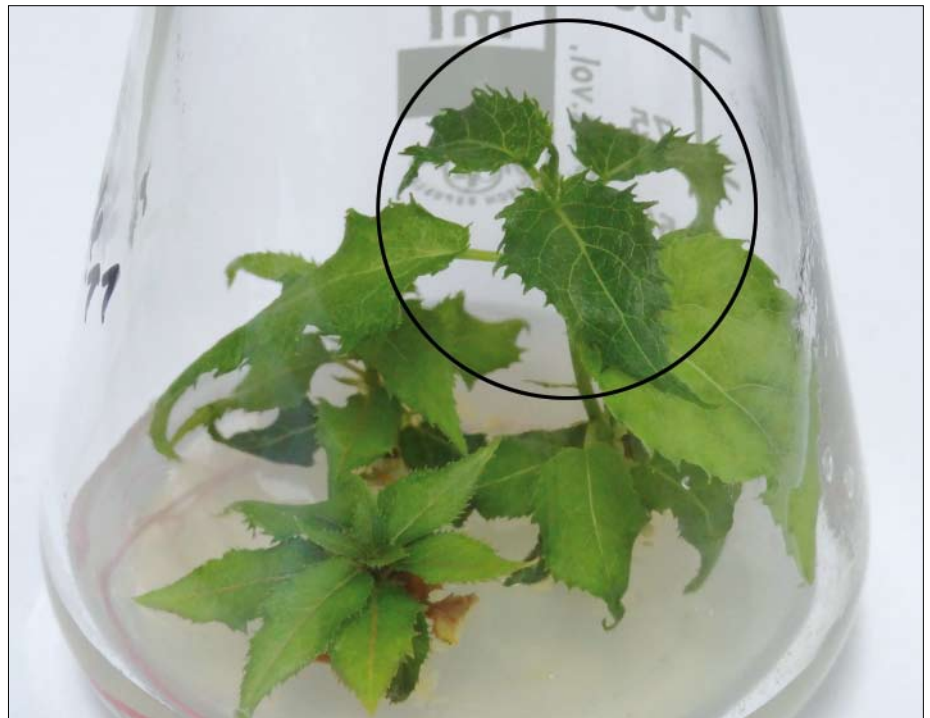


Abb. 4: Erzeugung tetraploider Pflanzen durch Colchizin-Behandlung. Oft zeigen die Pflanzen mit doppeltem Chromosomensatz veränderte morphologische Merkmale wie gezackte Blätter, eine starke Wurzelbildung und eine tief dunkelgrüne Färbung.

Arabidopsis). Würde es gelingen, diesen Bildungsmechanismus gezielt zu nutzen, wäre eine selektive Erzeugung triploider Organismen möglich [22].

Die angereicherten diploiden Pollen können für gezielte In-vitro-Bestäubungen (Abb. 2) oder auch für gelenkte Kreuzungen im Gewächshaus verwendet werden. Die Selektion der entstandenen triploiden Pflanzen erfolgt anhand phänotypischer Merkmale und mithilfe der Flowzytometrie (Messung des DNA-Gehaltes von Zellkernen).

Insgesamt wurden im Rahmen des FNR-Projekts „FastWood“ bisher vier triploide Aspenklone durch In-vitro-Bestäubung erzeugt. Zwei dieser Klone zeigten im Containerversuch ein mit dem triploiden Hybridaspensklon „Austria“ vergleichbares Wachstum. Durch gelenkte Kreuzungen mit fraktionierten größeren Pollen wurden drei triploide Nachkommen einer Aspenkreuzung und vier triploide Klone einer intersektionellen Pappel-Kreuzung (*P. deltoides* x *P. „Androscoegin“*) hergestellt. Es zeigt sich aber schon hier, dass triploide Pflanzen nicht immer wüchsig, aber unter den wüchsigsten Pflanzen häufig triploide zu finden sind.

Erzeugung tetraploider Bäume als Kreuzungspartner für die Züchtung triploider Klone

Auch durch Kreuzung von tetraploiden Bäumen mit diploiden Partnern ist eine Er-

zeugung triploider Nachkommen möglich ($2N + 1N = 3N$). Es gibt unter den Pappeln einige hervorragende Elternkombinationen, die ausgezeichnet wachsende Nachkommen mit sehr guten Eigenschaften hervorbringen. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Leistung noch gesteigert werden kann, wenn man jeweils einen Elter in die tetraploide Form überführt. Damit hätte man die Chance, jeweils die diploide Gametenform eines Elters für Kreuzungen zur Erzeugung triploider Nachkommen einsetzen zu können.

Im Projekt „Tetraploide“, das ebenfalls durch die FNR gefördert wird, sollen aus geprüften Aspen-, Pappel- und Robini-klonen stabile tetraploide Linien erzeugt werden, die dann die Voraussetzung für die Züchtung leistungsfähiger triploider Klone bilden. Für den ersten Schritt, die Erzeugung tetraploider Ausgangspflanzen, dienen Arbeiten an Bananen als Vorbild [23]. Mithilfe der Gewebekultivierung kann man einzelne Sprossfragmente bzw. Achselknospen gezielt einer Colchizinbehandlung unterziehen. Colchizin, ein toxisches Alkaloid der Herbstzeitlosen, hemmt die Ausbildung der Spindelfasern, sodass in der Anaphase der Mitose die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterkerne unterbleibt. Die Zelle verdoppelt dadurch ihre Chromosomenzahl und aus normalen diploiden Pflanzen entstehen tetraploide Pflanzen. Auf einem Regenerationsmedium entwickeln sich dann



Abb. 5: Starkwüchsige tetraploide Linie des Aspenklons Großdubrau 1 (*P. tremula*). Die Pflanze erreichte nach vier Monaten bei einem Wurzelhalsdurchmesser von 15 mm eine Größe von 180 cm.

aus den behandelten Sprossfragmenten neue Pflanzen, aus denen man mithilfe der Flowzytometrie und oft auch schon anhand morphologischer Merkmale (Abb. 4) tetraploide selektieren und gezielt vermehren kann.

So konnten von verschiedenen Aspenklonen, wie z.B. den Klonen Turesson 141 und Brauna 11, die der bekannten Hybridaspensorte „Holsatia“ zugrunde liegen, dem Pappelklon „Androscoggin“ und der Graupappel L 447 tetraploide Pflanzen erzeugt werden.

In einigen Fällen, wie z.B. bei dem Aspenklon Grossdubrau 1, ist eine Wuchsverbesserung auch im tetraploiden Material zu erkennen (Abb. 5). Der Klon zeichnet sich nicht nur durch herausragendes Wachstum aus, sondern auch durch lederartige, besonders dicke Blätter, was in der ersten Wachstumsperiode zu einer höheren Resistenz gegenüber Pappel-

blattkäfern führte. Ähnlich wurde bei verschiedenen durch Colchizinbehandlung erzeugten tetraploiden Nachkommen unterschiedlicher Pappelkreuzungen eine vollständige Resistenz gegen den Pappelrosterreger *Melampsora larici* beschrieben [24].

Neben Aspen und Pappeln wurden auch von einigen Robinienklonen, so zum Beispiel von dem österreichischen Leistungsklon Tulln-81/62, tetraploide Linien hergestellt [25].

Weil die stabilen tetraploiden Bäume nach Erreichen der Blühfähigkeit als Kreuzungseltern zur Züchtung triploider Nachkommen verwendet werden sollen, kommen verschiedene Techniken der Blühstimulierung wie die Reduktion des Wurzelsystems oder die Ringelung des Stammes zum Einsatz.

Auffinden und Etablierung triploider Pflanzen auf Versuchsflächen

Neben der „künstlichen“ Erzeugung triploider Bäume mithilfe unterschiedlicher Methoden ist es auch möglich, auf alten Versuchsflächen natürlich oder durch Kreuzung entstandene triploide Bäume zu selektieren und über Gewebekulturen zu vermehren. So wurden bei der Auswahl geeigneter Kreuzungseltern auf einer Versuchsfläche nahe Waldsiefersdorf zwei gut geformte und wüchsige männliche Graupappeln gefunden (Bezeichnung Buchhorst 1 und 2, Abb. 1), die auf ein Alter von 50 bis 60 Jahren geschätzt wurden (V. SCHNECK, persönliche Mitteilung).

Beide männlichen Graupappeln wiesen eine geringe Pollenbildung auf. Auch zeigten Mikrosatellitenanalysen von HEIKE LIESEBACH [26] bei beiden Genotypen an drei Genorten drei Allele als weiteren möglichen Hinweis auf Triploidie. Beide Bäume erwiesen sich als verwandt und für einen der beiden wurde Identität mit einem unter der Bezeichnung L84 geführten Graupappelklon aus dem Mutterquartier in der Baumschule des Instituts nachgewiesen. Aus den vorliegenden Informationen zum Klon L84 wurde ersichtlich, dass 1967 in einem Bestand in Mecklenburg-Vorpommern zwei Graupappeln ausgewählt worden waren (Prof. H.-F. JOACHIM, persönliche Mitteilung), die später die Bezeichnung L83 und L84 erhielten.

Die beiden auf der Versuchsfläche bei Waldsiefersdorf stehenden Graupappeln, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um diese Bäume handelt, können daher nicht älter als 44 Jahre sein. Die Untersuchung mit dem Flowzytometer bestätigte die Vermutung, dass beide triploid sind. Gegenwärtig werden sie als Klone über Gewebekulturen vermehrt, um sie

in künftige Versuche einbeziehen zu können.

Folgerungen

Im Zuge der gestiegenen Bedeutung von Holz als nachwachsender Rohstoff lohnt es sich, die Aufmerksamkeit wieder auf polyploide Pflanzen und ihre Herstellung zu richten.

Neben verbesserten Wuchseigenschaften tetraploider Pflanzen könnten auch verschiedene mit der Erhöhung der Chromosomenzahl verbundene Eigenschaften wie zum Beispiel die Steigerung der Resistenz gegenüber bestimmten Schädlingen, Trockentoleranz und die allgemein erhöhte Anpassungsfähigkeit der Pflanzen für den Anbau im Kurzumtrieb von Bedeutung sein.

Literaturhinweise:

- [1] WRIGHT, J. W. (1976): Introduction to forest genetics. Academic Press, New York 463 S. [2] EIFLER, I. (1967): Anwendungsmöglichkeiten der Polyloidiezüchtung in der Forstwirtschaft. Arch. Forstwesen, 16, S. 515-528. [3] KIM, C. S.; LEE, S. K. (1973): Morphological and cytological characteristics of a spontaneous tetraploid of *Robinia pseudoacacia*. Research Report of the Institute of Forest Genetics, Korea, Nr. 10, S. 57-65. [4] NAUJOKS, G.; HERTEL, H.; EWALD, D. (1995): Characterization and propagation of an adult triploid pendunculate oak (*Quercus robur* L.) *Silvae Genet.*, 44, S. 5-6. [5] DZIALUK, A.; CHYBICKI, I.; WELC, M.; SLIWINSKA, E.; BURCZYK, J. (2007): Presence of triploids among oak species. *Ann. Bot.*, 99, S. 959-964. [6] SERRESGIARDI, L.; DUFOUR, J.; RUSSELL, K.; BURET, C.; LAURENS, F.; SANTI, F. (2010): Natural triploids of wild cherry. *Canadian Journal of Forest Research*, 40, S. 1951-1961. [7] BAUMEISTER, G. (1980): Beispiele der Ploidie-Züchtung. *AFZ*, Nr. 26, S. 697-699. [8] NILSSON-EHLE, H. (1936): Über eine in der Natur gefundene Gigasform von *Populus tremula*. *Hereditas* 21. Jg., S. 397-382. [9] MÜNTZING, A. (1936): The chromosomes of a giant *Populus tremula*. *Hereditas*, 21. Jg., S. 383-393. [10] JOHNSON, H. (1940): Cytological studies of diploid and triploid *Populus tremula* and crosses between them. *Hereditas*, 26. Jg., 321-352. [11] JOHNSON, H. (1955): Report from the program of the Forest Tree Breeding Association. A review of results achieved and of studies underway. *Svensk Papperstid*, 59, S. 164-176. [12] MACKEVIC, N. V. (1959): *Dokl. Akad. Nauk SSSR (Proc. Acad. Sci. USSR)* 126, S. 183. [13] VAN BUIJTENEN, J. P.; JORANSON, P. N.; EINSPAHR, D. W. (1957): Naturally occurring triploid quaking aspen in the United States. *Proc. Soc. Am. Foresters*, S. 62-64. [14] EINSPAHR, D. W.; VAN BUIJTENEN, J. P.; PECKHAM, J. R. (1963): Natural variation and heritability in triploid aspen. *Silvae Genet.* 12, S. 51-58. [15] EINSPAHR, D. W.; WINTON, L. L. (1976): Genetics of Quaking Aspen. *U.S. Dep. Agric. For. Serv. Res. Paper WO-25*, 23 S. [16] BLAKESLEE, A. F.; AVERY, A. G. (1937): Methods inducing doubling of chromosomes in plants. *J. Hered.* 28, S. 393-411. [17] EINSPAHR, D. W. (1984): Production and utilisation of triploid hybrid aspen. *Iowa State Journal of Research*, 58, S. 401-409. [18] ZHU, Z.; KANG, X. Y.; ZHANG, Z. (1998): Studies on selection of natural triploids of *Populus tomentosa*. *Scientia Silvae Sinicae*, 34. Jg., S. 22-31. [19] ZHU, Z.; LIN, H.; KANG, X. Y. (1995): Studies on allotriploid breeding of *Populus tomentosa* B301 clones. *Scientia Silvae Sinicae*, 31. Jg., S. 499-505. [20] KANG, X. Y.; ZHANG, P. D.; GAO, P.; ZHAO, P. (2004): Discovery of a new way of poplar triploids induced with colchicine after pollination. *J. Beijing Forestry University*, 25, S. 1-4. [21] MASHKINA, O. S.; BURDAEVA, I. M.; BELOZEROVA, M. M.; VYUNOVA, L. N. (1989): A method of inducing pollen in woody species. *Lesovedenie*, 1, S. 19-25. [22] AGASHE, B.; PRASAD, C. K.; SIDDIQI, I. (2002): Identification and analysis of DYAD: a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in *Arabidopsis*. *Development* 129, S. 3935-3943. [23] HAMIL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. (1992): In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Aust. J. Bot.*, 40, S. 887-896. [24] SCHLÖSSER, L. D. (1967): Über den Rostbefall einer Population tetraploider Pappeln. *Theoret. Appl. Genet.* 37, S. 298-300. [25] EWALD, D.; ULRICH, K.; NAUJOKS, G.; SCHRÖDER, M.-B. (2009): Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 99, S. 353-357. [26] 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 Genet Genomes* 6, S. 259-269.