

## Entwicklung polyploider Pappellinien von verschiedenen Arten mit Hilfe der Protoplastenfusion

Renate Lührs<sup>1</sup>, Nadia Efremova<sup>1</sup>, Peter Welters<sup>1</sup>, Thomas Teichmann<sup>2</sup>, Matthias Fladung<sup>3</sup>, Anne Hennig<sup>4</sup>, Andreas Meier-Dinkel<sup>4</sup>, Alwin Janßen<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Phytowelt GreenTechnologies GmbH, Köln

<sup>2</sup>Georg-August Universität Göttingen, Göttingen

<sup>3</sup>Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf

<sup>4</sup>Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (NW-FVA), Hann. Münden

### Zusammenfassung

Polyploidisierung spielt in der Züchtung von Obst- und Forstpflanzen eine zunehmend wichtige Rolle. In der Gattung *Populus* werden triploide Aspenklone, die sich insgesamt durch sehr gutes Wachstum und erhöhte Resistenzen auszeichnen, weltweit angebaut.

Aus diesem Grund sollten im Rahmen des Projektes u.a. neue polyploide Pappel-Linien entwickelt und analysiert werden. Dazu wurden die jeweiligen Expertisen der Kooperationspartner optimal kombiniert. Aufbauend auf effiziente Systeme zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten wurde die Technik der Zellfusion zur gezielten Entwicklung auto-polyploider Linien eingesetzt. Insgesamt konnten triploide und tetraploide Linien von 11 unterschiedlichen Pappelklonen, die 7 verschiedenen Arten bzw. Hybriden angehören, erzeugt werden. Die Linien wurden in Gewächshaus- und Feldversuchen phänotypisch analysiert. Für zwei triploide Aspen-Linien konnte im ersten Feldversuch eine sehr gute Wüchsigkeit im Vergleich zu den diploiden Ausgangsklonen festgestellt werden. Die Mehrzahl der auto-tetraploiden Linien fiel durch größere und dickere Blätter mit längeren Stomata sowie einen stärkeren Stammdurchmesser auf.

Die Kollektion aus unterschiedlichen auto-tetraploiden Pappellinien, die 7 verschiedenen Pappelarten, bzw.-hybriden angehören und sich von 11 unterschiedlichen Klonen ableiten, bietet eine optimale Basis für die Züchtung neuer triploider Pappelsorten.

**Schlüsselworte:** *Populus*, Züchtung, Polyploidierung, autopolyploid, tetraploid, triploid, Protoplastenfusion, *in vitro*-Vermehrung, Stomata, Chloroplast, molekularer Marker, cytofluorimetry, Feldversuch

### Abstract:

#### Development of polyploid poplar lines of different species using protoplast fusion technology

In fruit and forest trees, polyploidization plays an increasing role in breeding programs. In the genus *Populus*, triploid aspen clones which generally show improved growth and resistance characters are already world-wide used in plantations.

Therefore, one aim of the project was the development of new auto-polyploid poplar lines. The specific expertise of the 4 cooperation partners were optimal combined for developing and analyzing the polyploid lines. Basing on efficient plant regeneration systems, the protoplast fusion technology was applied to establish auto-polyploid poplar lines. In summary, 11 different autopolyploid (3n, 4n) clones belonging to 7 different species were generated. The auto-polyploid clones were tested in greenhouse and field trials. Two triploid aspen clones showed extreme high juvenility and growth. Most of the tetraploid lines can be distinguished from the diploid clones by larger leaves and stem diameters.

The collection of the auto-tetraploid lines deriving from 11 clones and belonging to 7 different poplar species and hybrids presents an optimal basis for breeding new triploid poplar cultivars.

**Keywords:** *Populus*, breeding, polyploidization, auto-polyploid, tetraploid, triploid, protoplast fusion, *in vitro* plant regeneration, stomata, chloroplast, molecular marker, cytofluorimetry, field trial

## Einleitung

Die gezielte Entwicklung polyploider Klone hat in der Pappelzüchtung an Bedeutung gewonnen, seit für mehrere Klone mit sehr guten Wuchsleistungen ein polyploider Status entdeckt wurde (Stanton et al. 2010).

Der klassische Weg zur Erzeugung polyploider Pflanzen ist der Einsatz von Mitose-Hemmstoffen oder Temperaturschocks (Ewald et al. 2009, 2012, Wang et al. 2013). Bei verschiedenen Pflanzenarten wurden polyploide Pflanzen auch mit Hilfe der Protoplastenfusion erzielt. Autopolyploide Linien wurden z.B. bei *Citrus* als Nebenprodukt von interspezifischen Fusionen und durch gezielte Autofusionen entwickelt (Grosser und Gmitter 2011, Aleza et al. 2012).

Auch für verschiedene Arten der Gattung *Populus* stellt die Protoplastenfusion eine effiziente Alternative zur Entwicklung polyploider Klone dar. Eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung dieser Technik sind jedoch reproduzierbare Protokolle zur Pflanzenregeneration aus Protoplasten.

## Zellfusion und Identifizierung auto-polyploider Linien

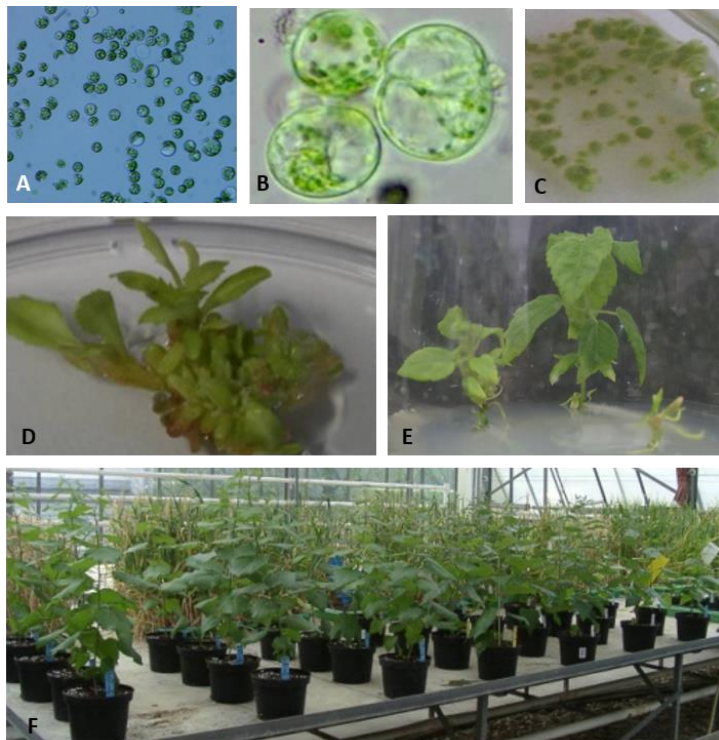
Phytowelt hat im Rahmen zweier von der FNR-geförderter Projekte effiziente Protokolle zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten für 11 Pappelklone, die zu 7 verschiedenen Pappelarten bzw. -hybriden gehören, etabliert (Lührs et al. 2010, Efremova et al. 2013; Tabelle 1). Als Beispiel ist in Abbildung 1 die Pflanzenregeneration aus Protoplasten von *P. tremula* x *P. tremuloides* gezeigt. Die Protoplastenfusion wird in einer Art Massenfusion ( $10^6$  bis  $10^8$  Protoplasten/ml) mit Hilfe von Elektropulsen stimuliert (Nissing et al. 2006).

**Tabelle 1:** Auflistung der Klone, für die (1) Regenerationsprotokolle etabliert wurden, und die (2) für Fusionsexperimente eingesetzt wurden. Die polyploiden Linien (3n, 4n) wurden mit Hilfe der Zytofluorimetrie unter den regenerierten Pflanzen aus den Massenfusions-Experimenten selektiert. Autotetraploide Pflanzen aus interspezifischen Fusionen (Allofusion) waren mit Hilfe molekularer Marker identifiziert worden.

Pappelarten bzw. -hybriden	Kürzel	Klonbezeichnung	Fusion	Anzahl selektierter Linien	
				4n	3n
<i>P. tremula</i>	P2	Ahle 2-21.4	Autofusion	10	2
<i>P. tremula</i>	P18	Brauna 11	Autofusion	5	2
<i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	P3	Münden 2-11.7	Allofusion	15	-
<i>P. x canescens</i>	P1	INRA 717 1B4	Allofusion	3	1
<i>P. alba</i>	P31	Raket	Autofusion	7	2
<i>P. nigra</i>	P7	102E	Allofusion	15	-
<i>P. nigra</i>	P39	NW 9-488 E Rüd 118	Allofusion	3	-
<i>P. simonii</i>	P12	NW 9-475P	Allofusion	10	-
<i>P. deltoides</i> x <i>P. nigra</i>	P27	Aue 2	Allofusion	1	-
<i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	P9	B19	Allofusion	1	-
<i>P. nigra</i> x <i>P. maximowiczii</i>	P10	Max 4	Allofusion	3	-

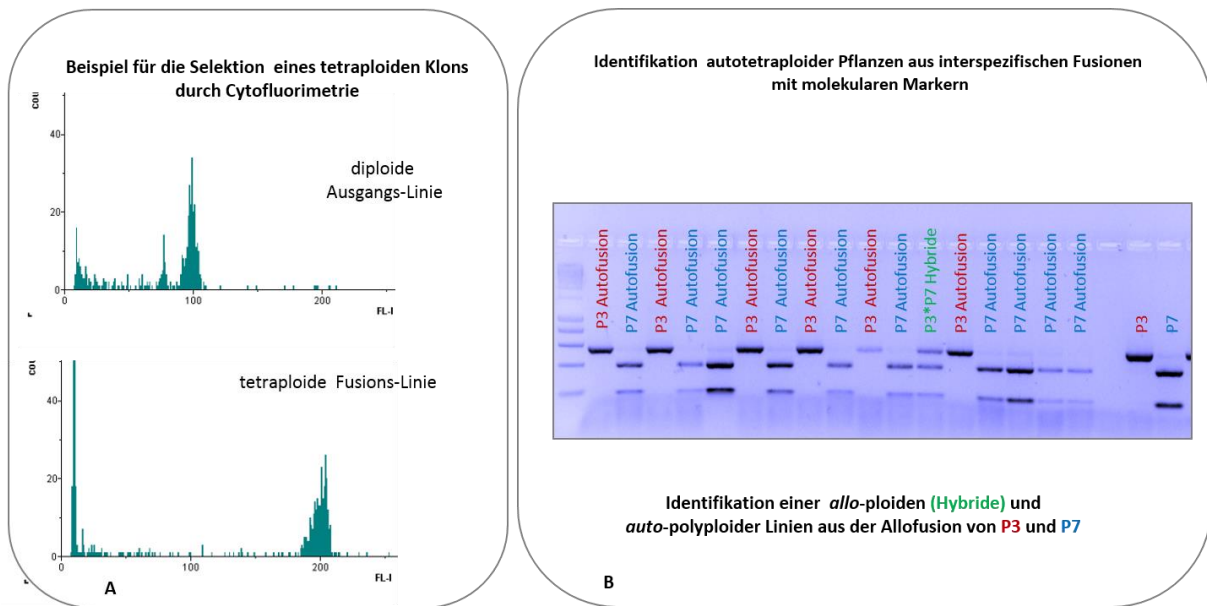
Zur gezielten Entwicklung autopolyploider Klone wurde die Selbstfusion von Protoplasten der jeweiligen Klone induziert und die polyploiden Regenerate mittels zytofluorimetrischer Messungen

identifiziert (Abb. 2A). Als Nebenprodukt wurden zusätzlich autotetraploide Pflanzen aus interspezifischen Fusionen (Allofusionen) mit Hilfe molekularer Marker selektiert (Abb. 2B). Verschiedene Typen von molekularen Markern stehen für alle drei DNA-enhaltende Kompartimente einer Pflanzenzelle (Kern, Chloroplast, Mitochondrium) bereits zur Verfügung bzw. werden derzeit entwickelt (Schröder et al. 2012, Bruegmann und Fladung 2013, Schröder und Fladung 2014). Neben Mikrosatellitenmarkern eignen sich insbesondere kleine Sequenzunterschiede in der DNA, die entweder als „*single nucleotide polymorphisms*“ (SNPs) oder „*insertions/deletions*“ (InDels) bezeichnet werden (Fladung und Buschbom 2009, Schröder und Fladung 2011).



**Abb. 1:** Beispiel für die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten von *P. tremula* x *P. tremuloides* (P3). **A:** Frisch isolierte Protoplasten. **B:** Erste Teilung von Protoplasten 1 Woche nach Isolierung. **C:** Entwicklung von Mikrocalli 4 bis 8 Wochen nach Protoplastenisolierung. **D:** Entwicklung von Sprossen auf Spross-Induktionsmedium. **E:** Bewurzelung der Sprosse. **F:** Transfer bewurzelter Sprosse in Erde und Kultivierung im Gewächshaus ca. 8 Monate nach der Protoplastenisolierung.

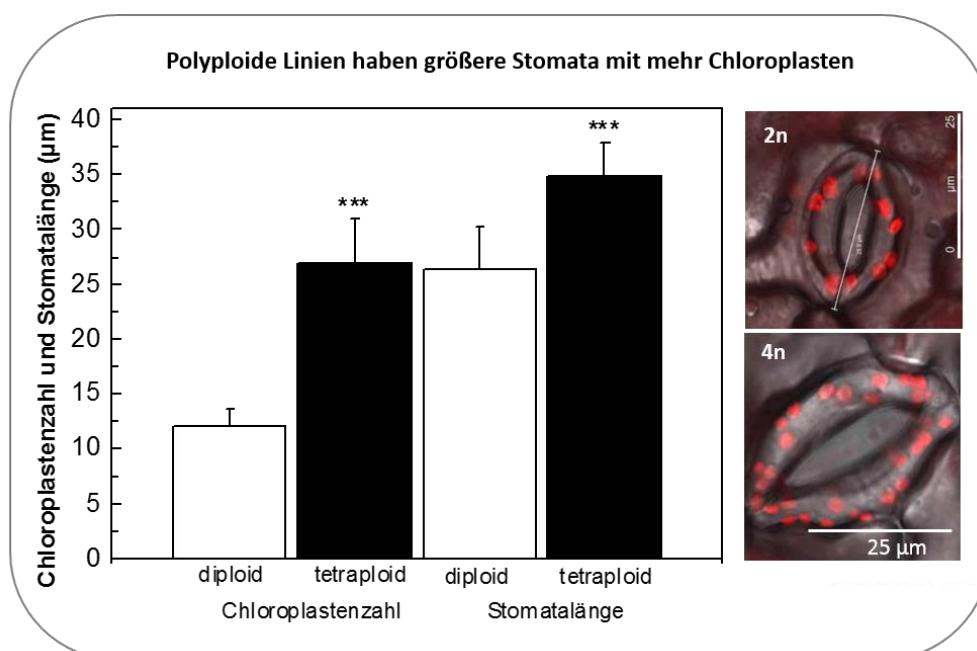
In Tabelle 1 sind die polyploiden Pappelinien aufgeführt, die aus verschiedenen Fusionsexperimenten regeneriert wurden. Tetraploide Linien stehen für alle 11 Klone zur Verfügung. Auch triploide Linien konnten von Klonen der Sektion *Populus* (*P. tremula*, *P. alba*, *P. x canescens*) regeneriert werden.



**Abb. 2:** Identifizierung polyploider Pflanzen aus den Fusionsexperimenten. **A:** Mit Hilfe der Zytofluorimetrie wurden tetraploide Regenerate identifiziert. **B:** Aus interspezifischen Fusionen (Allofusionen) wurden die autopolyploiden Linien durch Analysen mit molekularen Markern selektiert.

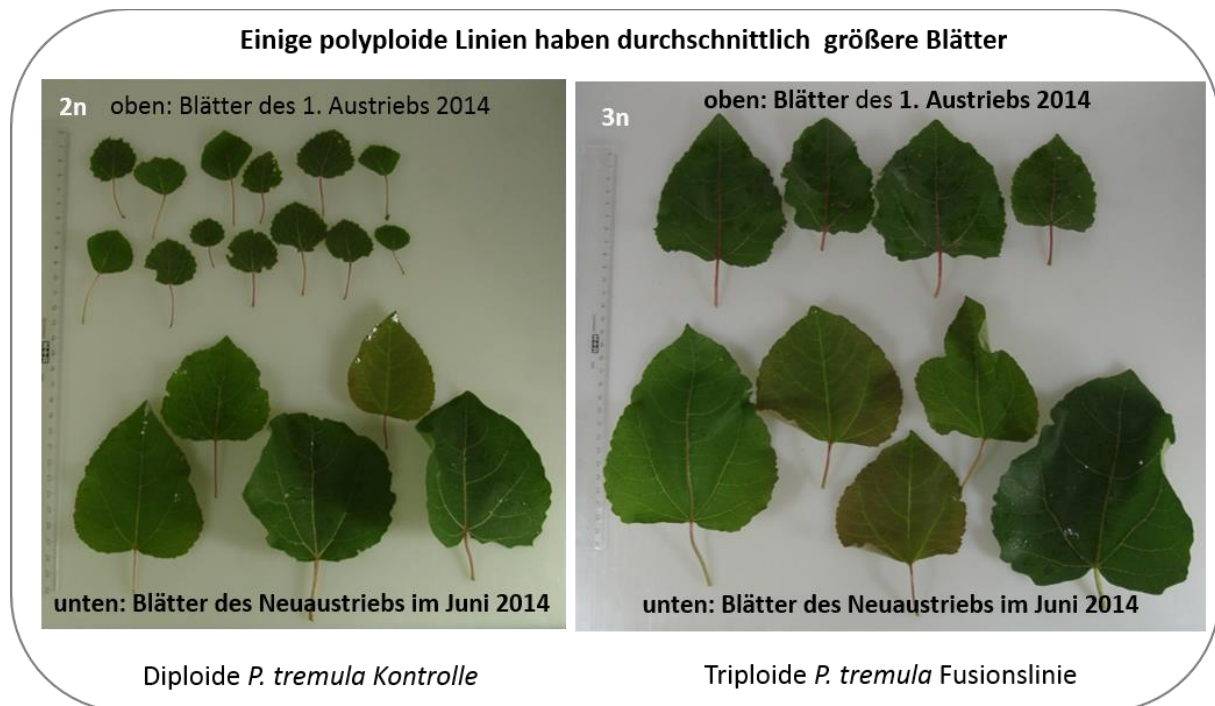
### Phänotypische Bewertungen:

Ein Teil der polyploiden Linien wurde bereits in Gewächshaus- und Feldversuchen der NW-FVA und Phytowelt phänotypisch bewertet. Mikroskopische Untersuchungen der Blattepidermis tetraploider *P. x canescens* Pflanzen durch die Abteilung Zellbiologie der Universität Göttingen zeigten, dass die Stomata der tetraploiden Pflanzen durchschnittlich 40% länger sind als die der diploiden Pflanzen (Abb. 3). Die polyploiden Linien fallen häufig durch größere und dickere Blätter auf (Abb. 4). Der Einfluss der Ploidie auf die Blattgröße und -dicke sowie die Länge der Spaltöffnungen wurde auch für andere tetraploide Bäumen beschrieben, z.B. *Morus alba*, *Acacia mearnsii*, *Citrus limonia*, *Betula platyphylla* (Chaicharoen et al. 1995, Beck et al. 2003, Allario et al. 2011, Mu et al. 2013).



**Abb. 3:** Vergleich der Anzahl der Chloroplasten und Länge der Stomata in diploiden und tetraploiden Pflanzen

Ausgewählte Linien aus der Protoplastenfusion der Sektion *Populus* wurden von der NW-FVA bereits im zweiten Jahr im Feld getestet. Die tetraploiden Pflanzen zeigen im Vergleich zu den diploiden Kontrollen Unterschiede im Wachstum, sie wirken eher gestauchter. Nur die tetraploide P3-Linie 1-9 (Ausgangsklon *P. tremula* x *P. tremuloides* P3) wächst höher als der diploide P3-Kontrollklon (Abb. 5A). Auffällig ist jedoch, dass sowohl bei den tetraploiden P3-Linien (1-92, 21) als auch bei der tetraploiden P1-Linie 21 (*P. x canescens*) der Wurzelhalsdurchmesser im Vergleich zu den diploiden Kontrollen dicker ist (Abb. 5B). Diese Tendenz zeichnete sich bereits in den Gewächshausversuchen der Universität Göttingen mit einer tetraploiden Linie des P1-Ausgangsklons ab (Abb. 5B). Trotz geringerem Höhenwachstum erzielen einige tetraploide Linien aufgrund ihres größeren Stammdurchmessers eine höhere Biomasse als die diploiden Ausgangsklone (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4:** Vergleich der Blattgrößen einer triploiden *P. tremula*-Linie, die aus einer gezielten Autofusion regeneriert wurde. Die Blätter der triploiden Linien, insbesondere des ersten Austrieb, unterscheiden sich deutlich in der Größe.

Die Beobachtung - niedrigere Höhe, größerer Stammdurchmesser - wurde auch für die tetraploiden Pflanzen anderer Baumarten *Morus alba*, *Betula platyphylla*, *Citrus limonia* berichtet (Chaicharoen et al. 1995, Allario et al. 2011, Mu et al. 2013).

Erste Auswertungen der Pflanzen im Feld von Phytowelt deuten darauf hin, dass die triploiden *P. tremula* Linien nicht nur wesentlich größere Blätter als ihre diploiden Ausgangsklone entwickeln, sondern - anders als die tetraploiden Linien - auch ein wesentlich stärkeres Jugend- und Höhenwachstum zeigen. Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten zu triploiden Pappelklonen überein, die oft ein wesentliches besseres Wachstum und Gigas-Merkmale aufweisen (Ewald et al. 2012, Wang et al. 2013).

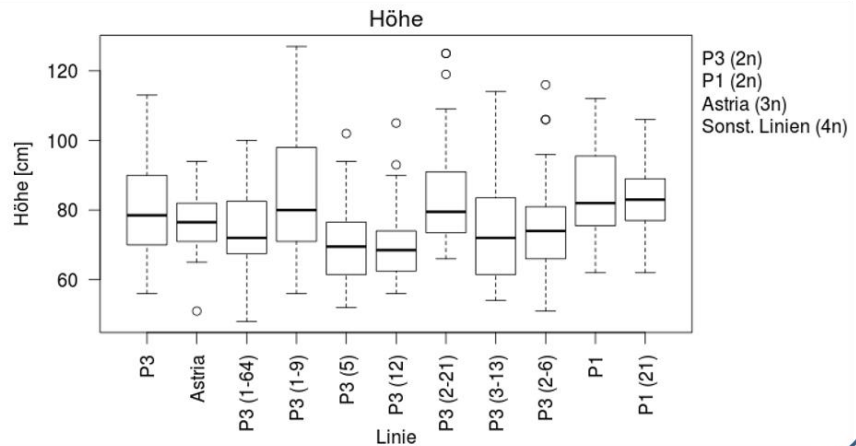
Die tetraploiden Linien, die im Rahmen der FNR geförderten Projekte entwickelt wurden, stellen ausgezeichnete Kreuzungspartner für den Aufbau von Kollektionen verschiedener triploider Hybrid-Linien dar. Damit wurde eine wichtige Ausgangsbasis geschaffen, um systematisch den Einfluss der Kombination von Genomen und Ploidie auf Züchtungsmerkmale untersuchen zu können.



### Vergleich des Höhenwachstums und der Wurzelhalsdurchmessers im Feldversuch

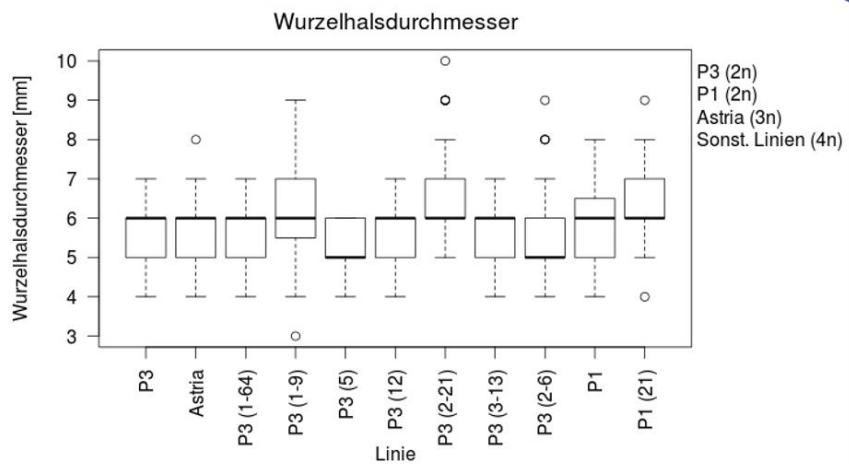


Höhenwachstum im Feldversuch  
A  
(07/2014).



Vergleich Wurzelhalsdurchmesser  
(links: P1 (2n), rechts: P1 (21) (4n)).

B



**Abb. 5:** Höhenwachstum und Stammdurchmesser der tetraploiden Aspen-Hybride (*P. x canescens* und *P. tremula x P. tremuloides*) im Vergleich zu den diploiden Ausgangsklonen (*P. x canescens* P1; *P. tremula x P. tremuloides* P3). Bis auf die tetraploide Linie P1-9 der Ausgangslinie P3 wachsen die tetraploiden Linien langsamer in die Höhe (A), sie weisen jedoch durchschnittlich dickere Stammdurchmesser auf (B).

### Dank

Die Autoren danken dem BMEL vertreten durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) für die finanzielle Unterstützung der Projekte ZÜEND (FKZ22014709, 22004910, 22005010) und Innovative Hybrid-Pappeln (FKZ 22004105).

### Literatur

- Aleza P, Juárez J, Cuenca J, Hernández M, Ollitrault M, Navarro L, 2012: Extensive citrus triploid breeding program by 2X x 4X sexual hybridizations. ISHS Acta Horticulturae 961: VII International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding.
- Allario T, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Tadeo F, Froelicher Y, Talon M, Navarro L, Ollitrault P, Morillon R, 2011: Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany* 62: 2507-2519.
- Beck SL, Dunlop RW, Fossey A, 2012: Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 177-181.

- Bruegmann T, Fladung M, 2013: Potentials and limitations of the cross-species transfer of nuclear microsatellite marker in six species belonging to three sections of the genus *Populus* L. *Tree Genetics & Genomes* 9: 1413-1421.
- Chaicharoen S, Satrabhandhu A, Kruatrachue M, 1995: *In vitro* induction of polyploid in white mulberry (*Morus alba* var. S54) by colchicine treatment. *J. Sci. Soc. Thailand* 21: 229-242.
- Efremova N, Lührs R, Krull A, Welters P, Voß M, Fladung M, Hennig A, Meier-Dinkel A, Janssen A, 2013: Züchtung neuer Energiepappeln. Posterbeitrag auf dem Internationalen Kongress – Agrarholz vom 19. bis 20.02.2013 in Berlin, Textbeitrag auf dem FNR Server.
- 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, Tissue and Organ Culture* 99: 353-357.
- Ewald D, Ulrich K, Liesebach H, 2012: Erzeugung triploider Individuen und intersektioeller Hybriden bei verschiedenen Pappelarten. *Beiträge aus der NW-FVA, Band 8*: 181-193
- Fladung M, Buschbom J, 2009: Identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in different *Populus* species. *Trees – Structure and Function* 23: 1199-1212.
- Grosser JW, Gmitter FG, 2011: Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104: 343-357.
- Lührs R, Efremova N, Krull A, Löffke C, Ning D, Müller A, Polle A, Teichmann T, 2010: Innovative Hybridpappeln – Schnelles Wachstum für Deutschland. Vortrag auf der Agrarholz 2010, Symposium 18., 19. Mai 2010, Berlin. Textbeitrag auf dem FNR Server.
- LÜHRS R, EFREMOVA N, WELTERS P, MEIER-DINKEL A, JANSSEN A, VOß M-M, FLADUNG M, 2012: ZÜEND – Züchtung neuer Energiepappeln für Deutschland Beiträge aus der NW-FVA, Band 8: 388-389.
- Mu H-Z, Liu Z-J, Lin L, Li H-Y, Jiang J, Liu G-F, 2012: Transcriptomic analysis of phenotypic changes in birch (*Betula platyphylla*) autotetraploids. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 13012- 13029.
- Nissing E, Müller A, Weiß N, 2006: Ermittlung geeigneter Elektrofusionsparameter für die somatische Hybridisierung von Minzeprotoplasten mit dem Eppendorf Multiporator. *Eppendorf BioNew Application Notes* BN26.
- Schröder H, Fladung M, 2010: SSR and SNP markers for the identification of clones, hybrids and species within the genus *Populus*. *Silvae Genetica* 59: 257-262.
- Schroeder H, Hoeltken AM, Fladung M, 2012: Differentiation of *Populus* species using chloroplast single nucleotide polymorphism (SNP) markers – essential for comprehensible and reliable poplar breeding. *Plant Biology* 14: 374–381.
- Schroeder H, Fladung M, 2014: Differentiation of *Populus* species by chloroplast SNP markers for barcoding and breeding approaches. *iForest*, doi: 10.3832/ifor1326-007.
- Stanton BJ, Neale DB, Li S, 2010: *Populus* Breeding: From the classical to the genomic approach. In: S. Jansson et al (eds) *Genetics and Genomics of Populus*, *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 8, Springer Science.
- Wang J, Shi L, Song S, Tian J, Kang X, 2013: Tetraploid production through zygotic chromosome doubling in *Populus*. *Silva Fennica* 47 (2) Article 932.

Korrespondierende Autorin:

Dr. Renate Lührs  
Phytowelt GreenTechnologies GmbH  
Stöckheimer Weg 1  
50829 Köln  
r.luehrs@phytowelt.com