Methoden zur Erzeugung triploider Aspen und Pappeln

Kristina Ulrich* und Dietrich Ewald*

Zusammenfassung

Triploide Bäume können neben hervorragendem Wachstum auch besondere Holzeigenschaften wie längere Fasern und einen geringeren Ligninanteil besitzen und werden oft mit einer gesteigerten Anpassungsfähigkeit in Zusammenhang gebracht.

Zur Erzeugung triploider Aspen- und Pappelklone wurden verschiedene Methoden der sexuellen Polyploidisierung etabliert und in Kreuzungen mit geprüften Klonen angewendet. Insgesamt konnten 48 triploide Klone erzeugt werden. Der größte Anteil, darunter 13 intersektionelle Hybride, resultiert aus gelenkten Kreuzungen bzw. *in vitro* Bestäubungen mit diploidem (2n) Pollen. Dazu wurde spontan entstandener 2n Pollen, der unter natürlichen Bedingungen bis zu 5 % des Gesamtpollens ausmachen kann, durch Mikrosiebung angereichert. In einigen Fällen gelang außerdem die Induktion diploider Pollen durch Wärmebehandlung der Pollenmutterzellen während der Meiose. Weitere Triploide konnten durch Induzierung von 2n Eizellen bzw. durch Selektion von Einzelpflanzen aus konventionellen Kreuzungen erzeugt werden.

Von 29 Klonen, die zur Selektion der leistungsstärksten triploiden Klone im Freiland getestet wurden, zeigten 14 ein signifikant erhöhtes Sprosswachstum im Vergleich zum schnell wachsenden triploiden Vergleichsklon „Astria".

Eine weitere effektive Möglichkeit zur Erzeugung triploider Pflanzen ist die Kreuzung diploider und tetraploider Eltern. Durch Polyploidisierung von *in vitro* Sprossmeristemen unter Verwendung von Colchicin bzw. Oryzalin wurden aus zehn geprüften Elternklonen stabile tetraploide Klone erzeugt, die nach Erreichen der Blühfähigkeit zur Gewinnung diploider Gameten verwendet werden können.

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

Schlüsselwörter: *Populus sp., triploid, tetraploid, diploide Gameten, Polyploidisierung*

Abstract

Methods for generation of triploid aspen and poplar

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

Different methods of sexual polyploidisation were established and applied to breed triploid trees. As prerequisite for the crossings, parent clones with high performance were selected. In total, 48 triploid clones could be generated. The majority, including 13 intersectional hybrids, resulted from crossings using enriched diploid pollen. Spontaneously occurring diploid (2n) pollen, which can reach up to 5 % of total pollen under natural conditions, was enriched using micro sieves. Additionally, in some clones, unreduced 2n pollen could be induced by heat treatment of microspore mother cells during meiosis. Some triploid plants were generated by heat treatment of female flowers after pollination to induce the formation of 2n eggs or were selected from conventional crossings based on their size and morphological characteristics.

Out of the 29 triploid clones, tested under outdoor conditions to select the best-growing triploid clones, 14 clones showed a significantly increased shoot height in comparison to the fast-growing triploid clone "Astria".

Another approach to produce triploids is to cross diploid with tetraploid trees. By combining polyploidisation methods with *in vitro* cultivation techniques, stable tetraploid clones from ten tested parent-clones were produced using colchicine and oryzaline for chromosome doubling. After flower formation, these plants can be used as valuable breeding material for mass production of highly productive triploids.

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, diploid gametes, polyploidisation*

* Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, 15377 Waldsieversdorf, Eberswalder Chaussee 3a

Kontakt: kristina.ulrich@thuenen.de

1 Einleitung

Die Gattung *Populus* besteht aus sechs Sektionen, von denen drei, die Sektion *Aigeiros* (Schwarzpappeln), *Tacamahaca* (Balsampappeln) und *Populus* (Weißpappeln und Aspen) eine entscheidende Bedeutung für die Biomasseproduktion besitzen und deshalb im besonderen Interesse der Züchtungsforschung stehen (Janssen et al., 2012; Stanton et al., 2010).

Ein erfolgversprechender Ansatz für die Züchtung schnell wachsender Aspen und Pappeln ist die Erzeugung triploider Klone, die neben einem starken Wachstum oft veränderte Holzeigenschaften wie längere Fasern, eine höhere Holzdichte und einen geringeren Ligninanteil haben, was vor allem für die Papier- und Zellstoffindustrie wichtig ist. Außerdem werden polyploide Pflanzen 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 gegenüber biotischen und abiotischen Faktoren kann zum Beispiel durch morphologische Veränderungen wie stärkere Blattstrukturen verbessert sein.

Die erste natürlich vorkommende triploide Aspe (*P. tremula*) wurde in Schweden gefunden und als stark wüchsiger Baum mit ungewöhnlich großen Blättern („Gigas-Form") beschrieben (Nilsson-Ehle, 1936). Müntzing bestätigte 1936 den triploiden Zustand durch Chromosomenzählung (Müntzing, 1936). Weitere triploide „Riesenaspen" wurden in verschiedenen Regionen Schwedens (Johnsson und Eklundh, 1940) gefunden, aber auch in Nordamerika begann man, finanziert durch die Papierindustrie, nach triploiden Aspen zu suchen. Die ersten triploiden *P. tremuloides* wurden in Minnesota (Einspahr et al., 1963; Van Buijtenen et al., 1957) und später in Utah (Every und Wiens, 1971) entdeckt. Im Westen der USA konnten besonders in den trockenstressgefährdeten Gebieten der Rocky Mountains sehr hohe Anteile (bis zu 69 %) an schnell wachsenden, sich vegetativ vermehrenden triploiden Aspen nachgewiesen werden (DeRose et al., 2014; Mock et al., 2012).

Unter natürlichen Bedingungen können triploide Pflanzen entstehen, wenn die Gametenbildung (Reifeteilung - Meiose) durch äußere Einflüsse wie zum Beispiel extreme Temperaturen gestört wird, so dass anstelle der normalen haploiden (n) Gameten diploide, unreduzierte (2n) Eizellen oder Pollen entstehen. Die Rate der spontanen Entstehung triploider Bäume in natürlichen Populationen ist jedoch sehr gering. Deshalb begann man schon bald nach der Entdeckung der ersten triploiden Aspen und ihrer Leistungsfähigkeit mit der Suche nach Möglichkeiten zur künstlichen Erzeugung triploider Bäume.

Die einfachste Möglichkeit zur Herstellung triploider Bäume ist die Kreuzung zwischen tetraploiden (4n) und diploiden Eltern. Die ersten triploiden Hybridaspen wurden 1958 durch Kreuzung selektierter diploider weiblicher *P. tremuloides* Klone mit einer einzigen tetraploiden *P. tremula* schwedischen Ursprungs erzeugt. Einige dieser Bäume hatten neben einer signifikant erhöhten Wachstumsrate eine höhere Holzdichte und längere Fasern im Vergleich zu natürlich vorkommenden Aspen (Einspahr, 1984). Durch Kreuzung einer tetraploiden *P. tremula* mit einem kanadischen *P. tremuloides*- Klon wurde die schnell wachsende Hybridaspe "Astria" erzeugt (Baumeister, 1980), die noch heute angebaut wird und gute Resistenzeigenschaften besitzt. Das Vorhandensein spontan auftretender tetraploider Aspen und Pappeln als Kreuzungspartner ist jedoch selten. Durch den Einsatz von Substanzen, die die Ausbildung der Spindelfasern bei der Mitose hemmen und dadurch zur Entstehung von Zellen mit doppeltem Chromosomensatz führen, können gezielt tetraploide Elternpflanzen jeweils beider Eltern von erfolgversprechenden Kreuzungs-Kombinationen hergestellt werden.

Die klassische Methode zur Erzeugung tetraploider Organismen ist die Behandlung mit dem aus der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*) gewonnenen Mitosegift Colchizin (Blakeslee und Avery, 1937), aber auch andere Verbindungen wie Oryzalin oder Trifluralin sind zur Polyploidisierung geeignet (Bartels und Hilton, 1973). Da man zu Beginn der Untersuchungen noch nicht über die Technik der Gewebekultivierung verfügte, wurden zunächst Samen, Knospen und andere Pflanzenteile mit Colchizin behandelt (Eifler, 1967; Johnsson, 1975). Durch die Einbeziehung der *in vitro* Kultivierungstechnik war es möglich, gleichzeitig mit großen Mengen an Explantaten zu arbeiten, tetraploide Sprosse *in vitro* flowcytometrisch zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu selektieren und schnell und einfach neue Pflanzen aus den selektierten tetraploiden Sprossen zu regenerieren (Aleza et al., 2009; Allum et al., 2007; Li et al., 2008; Väinölä, 2000; Van Duren et al., 1996). Auch tetraploide Bäume der Sektionen *Populus* (Ewald et al., 2009) und *Tacamahaca* (Cai und Kang, 2011; Wang et al., 2013) wurden auf diese Weise erzeugt. Der Vorteil der Methode besteht darin, dass große Grundgesamtheiten triploider Pflanzen beider möglichen Kombinationen (4n♀ × 2n♂ und 2n♀ × 4n♂) erzeugt werden können und so die bestmögliche Kreuzungskombination ermittelt werden kann. Aus der Vielzahl triploider Individuen lassen sich dann die leistungsfähigsten Klone selektieren. Da die Zeit bis zur Blüte der Bäume und damit der Bildung von diploiden Gameten sehr lang ist und auch durch Blühstimulierung bisher nicht grundlegend verkürzt werden konnte, ist diese Methode jedoch auf längerfristige Züchtungsarbeiten zur nachhaltigen Bereitstellung kosteneffizienter Züchtungsprodukte im großen Maßstab gerichtet.

Eine dagegen kurzfristig anwendbare 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 (Bradshaw und Stettler, 1993; Müntzing, 1936; Zhang und Kang, 2010). Weil die Entstehungsrate diploider Pollen mit Werten von unter 5 % nur sehr gering ist (Xi et al., 2011), suchte man nach Methoden zur künstlichen Induzierung. So gelang bald die Erzeugung triploider Aspen durch Bestäubung von weiblichen Blüten mit colchizin-induziertem (Johnsson und Eklundh, 1940) bzw. durch Thermobehandlung induziertem diploiden Pollen

(Mashkina et al., 1989). Die Erzeugung triploider Bäume über die Verwendung diploider Eizellen ist sehr kompliziert, da die verschiedenen Stadien der Makrosporenbildung schwierig zu erkennen und zu differenzieren sind (Wang et al., 2010). Li et al. (2008) konnten durch Colchizin-Behandlung der Eizellen triploide Nachkommen in *P. alba* × *P. glandulosa* gewinnen. Eine Methode zur Induzierung diploider weiblicher Gameten durch Temperatur- bzw. Colchizin-Behandlung während der Embryosackentwicklung wurde für *P. pseudosimonii* × *P. nigra* beschrieben (Wang et al., 2012).

Das Ziel unserer Arbeiten bestand darin, verschiedene Methoden der Nutzung diploider Gameten zur Erzeugung triploider Aspen und Pappeln zu etablieren und bei unterschiedlichen Kreuzungen anzuwenden. Voraussetzung für die Kreuzungen waren geprüfte, leistungsfähige Aspen, Graupappeln und Weißpappeln als Elternbäume. Um bestimmte Eigenschaften wie Trockentoleranz oder die Fähigkeit zur Stecklingsbewurzelung zu verbessern, wurden intersektionelle Kreuzungen mit Balsam- und Schwarzpappeln in die Untersuchungen einbezogen. Neben der direkten Erzeugung triploider Bäume durch sexuelle Polyploidisierung wurden durch Verdopplung des Chromosomensatzes mit Hilfe von Mitosegiften aus geprüften Klonen stabile tetraploide Pflanzen erzeugt, die nach der Blüte als Kreuzungspartner zur Züchtung leistungsfähiger triploider Bäume zur Verfügung stehen.

2 Erzeugung tetraploider Aspen- und Pappelklone als Kreuzungspartner für die Züchtung triploider Bäume

Voraussetzung für die Erzeugung stabiler tetraploider Linien war die Auswahl geprüfter, leistungsstarker Aspen- und Pappelklone wie zum Beispiel Brauna 11, Groß Dubrau 1 und Turesson 141, die sich bereits als Elternklone zur Züchtung der Hybridaspen-Sorten „Holsatia“ bzw. „Juwel 1“ bewährt hatten (Schneck und Liesebach, 2015). Insgesamt wurden aus fünf *in vitro* vermehrten Aspenklonen, einem Graupappelklon (*P.* × *canescens*) und einem Balsampappelklon (*P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*) tetraploide Linien erzeugt (Tabelle 1). Um bei der Polyploidisierung möglichst einzelne Meristeme anzusprechen, wurden für die Versuche steril herausgeschnittene, 3 bis 5mm lange Blattachseln verwendet. Diese wurden 16 Stunden in einer 0,1 %igen Colchizin-Lösung inkubiert und dann nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser auf Regenerationsmedium aufgesetzt (Ewald et al., 2009). Nach ungefähr vier Wochen erfolgte die Selektion der entstandenen Sprosse nach den für tetraploide Sprosse typischen morphologischen Merkmalen (gezackte Blätter, dicke Stängel, dunkelgrüne Färbung (Abbildung 1). Die Messung des Ploidiegrades wurde mit dem Flowcytometer im Vergleich zu einem internen Standard durchgeführt, danach wurden die selektierten tetraploiden Sprosse auf einem Regenerationsmedium weiter vermehrt und in bestimmten Abständen auf ihren tetraploiden Zustand überprüft.

Abbildung 1
Erzeugung tetraploider Pflanzen durch Colchizin-Behandlung unter *in vitro* Bedingungen: vier Wochen nach der Behandlung werden Sprosse mit doppeltem Chromosomensatz anhand bestimmter morphologischer Merkmale selektiert (gezackte Blätter, intensive dunkelgrüne Färbung, starke Wurzelbildung)

Als Alternative zum Mitosehemmer Colchizin, dem auch ein mutagenes Potential nachgesagt wird, wurde die Eignung von Oryzalin zur Tetraploidisierung von Aspen und Pappeln getestet. Oryzalin kann in sehr viel geringeren Konzentrationen angewendet werden als Colchizin und ist außerdem noch wesentlich weniger humantoxisch, weil es zu pflanzlichen Microtubuli eine deutlich größere Affinität hat als zu tierischen (Hugdahl und Morejohn, 1993). Für Pappeln oder Aspen waren bisher keine Angaben zur Verwendung von Oryzalin zur Chromosomenverdopplung bekannt. Bei Liliengewächsen, Rosen und Rhododendron führte Oryzalin schon in sehr geringen Konzentrationen zu höheren Ausbeuten an tetraploiden Pflanzen als Colchizin (Jaap et al., 1992; Kermani et al., 2003; Väinölä, 2000). Bei Citruspflanzen war die Regeneration der Pflanzen bei der Verwendung von Oryzalin zwar wesentlich höher als bei Colchizin, der Anteil an stabilen tetraploiden Pflanzen jedoch viel geringer (Aleza et al., 2009). Insgesamt sind die Angaben über die Vor- und Nachteile von Oryzalin sehr unterschiedlich und vor allem abhängig von der jeweiligen Pflanzenart bzw. dem Klon.

Zur Untersuchung der Wirkung von Oryzalin wurde der Aspenklon Turesson 141 verwendet. In Anlehnung an Literaturangaben zu anderen Pflanzen wurden drei verschiedene Oryzalin-Konzentrationen (5 µM, 10 µM, 50 µM in 2 % Dimethylsulfoxid) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle getestet. Dabei entsprach die höchste Konzentration nur 1/50 der in den Vorversuchen verwendeten Colchizin-Konzentration. Pro Variante wurden 20 Blattachseln (3 bis 5 mm) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten behandelt (4, 15 und 24 Stunden) und anschließend auf ein Regenerationsmedium aufgesetzt. Die größte Ausbeute an stabilen tetraploiden Linien – wobei eine Linie jeweils aus einer

regenerierten Sproßachsel resultiert – wurde bei der Variante erreicht, die 4 Stunden mit der 50 µM Oryzalin-Lösung inkubiert worden war, jedoch sind Variationen der Effektivität und vor allem der Sensibilität zwischen den verschiedenen Pappel- und Aspenklonen möglich und müssen ausgetestet werden.

Insgesamt konnten durch Kombination der Colchicin bzw. Oryzalin-Behandlung mit der Technik der *in vitro* Kultivierung tetraploide Linien von 8 Aspenklonen, einem Graupappelklon und einem Pappelklon erzeugt werden (Ewald et al., 2009; Ulrich et al., 2015). Die tetraploiden Linien und die entsprechenden diploiden Ausgangsklone werden als *in vitro* Kulturen und Containerpflanzen erhalten. Jeweils 10 Pflanzen von 16 tetraploiden Linien wurden im Frühjahr 2016 zusammen mit ihren diploiden Ausgangspflanzen auf einer Freilandfläche gesichert. Nach Erreichen der Blühfähigkeit stehen diese Pflanzen über die Erzeugung diploider männlicher und weiblicher Gameten zur Züchtung leistungsfähiger triploider Aspen und Pappeln zur Verfügung.

Tabelle 1
Übersicht über die durch Colchicin- bzw. Oryzalin-Behandlung erzeugten tetraploiden Linien von geprüften, leistungsfähigen Aspen-, Pappel- und Graupappelklonen für weiterführende Kreuzungsversuche zur Züchtung triploider Pflanzen

Name	Mitosehemmer
L 447 ♀ (*P.* × *canescens*)	Colchizin
Groß Dubrau 1 ♀ (*P. tremula*)	Colchizin
L 40 ♀ (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	Oryzalin
Esch 5 ♀ (*P. tremula* × *P. tremuloides*/Brauna11 × Tur 141)	Colchizin
Brauna 11 ♀ (*P. tremula*)	Colchizin
L 314 ♀ (*P. tremula*)	Oryzalin
Turesson 141 ♂ (*P. tremuloides*)	Oryzalin
L 291 ♂ (*P. tremula*)	Colchizin
L 9 ♂ (*P. tremula*)	Colchizin
"Androscoggin" (*P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*)	Colchizin

3 Erzeugung triploider Pflanzen durch Verwendung diploider Gameten

3.1 Verwendung diploider Pollen

3.1.1 Anreicherung von natürlich entstandenem 2n Pollen

Diploider Pollen, der zum Beispiel ausgelöst durch Temperaturschwankungen in der Winterperiode durch die gestörte Teilung der Pollenmutterzelle spontan entsteht, kann durch Fraktionierung mit einer Vibrations-Siebmaschine (Fritsch-GmbH) 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 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 (Tabelle 2). Nach Messung und Berechnung der Größe der haploiden Pollenkörner können durch Multiplikation mit dem Faktor 1,26 die theoretischen Größen der spontan ge-bildeten diploiden Pollenkörner errechnet und die entsprechenden Siebfraktionen festgelegt werden. Zur Anreicherung der diploiden Pollen wurden für kleinere Pollen (unter 38 µm für den errechneten Durchmesser der 2n Pollen) Fraktionen von 32 bis 45 µm und für größere Pollen Fraktionen von 36 bis 45 µm herausgesiebt (Ulrich und Ewald, 2014).

3.1.2 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 Zweige mit männlichen Blüten im frühen Stadium der Meiose drei Stunden bei 38 °C im Wärmeschrank inkubiert (Mashkina et al., 1989). Zur Erkennung der optimalen Behandlungszeit

Tabelle 2
Berechnung der Siebfraktionen für die Selektion diploider (2n) Pollen der für die Kreuzungen zur Erzeugung triploider Pflanzen verwendeten männlichen Aspen- und Pappelklone

Klone	Mittlerer Durchmesser der haploiden Pollen (µm)	Berechneter Durchmesser der diploiden Pollen (µm)	Berechnete Siebfraktion (µm)
L 2 (*P. tremula*)	29,67 ± 0.19	37,38	32 - 45
L 311 (*P. tremula*)	32,80 ± 0.15	41,33	36 - 45
ARB 2M (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	32,61 ± 0.17	41,09	36 - 45
L 448 (*P.* × *canescens*)	29,75 ± 0.13	37,49	32 - 45
L 443 (*P.* × *canescens*)	30,10 ± 0.15	37,93	32 -45
L 454 (*P.* × *canescens*)	34,48 ± 0,27	43,44	36 - 45
"Androscoggin" (*P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*)	28,75 ± 0.26	36,22	32 - 45
Sim 1 (*P. simonii*)	29,77 ± 0.12	37,51	32 - 45

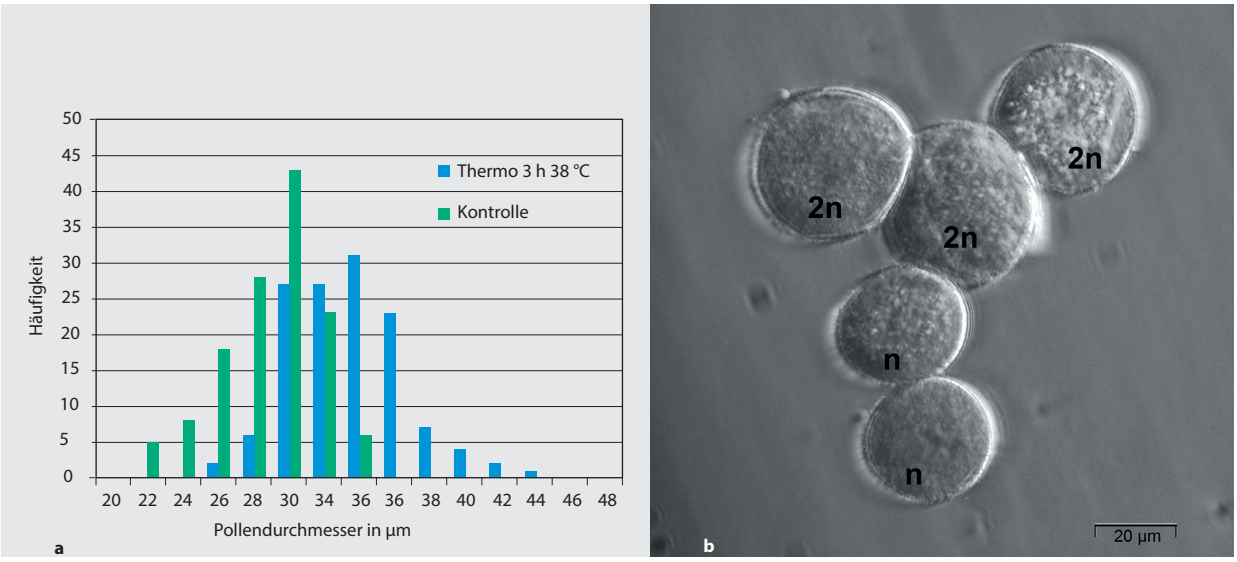

Abbildung 2
(a) Größenvergleich der Pollenkörner des Pappelklons „Androscoggin" (*P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*, Sekt. *Tacamahaca*) nach Thermobehandlung von Blühreisern (blau) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (grün).
(b) Mikroskopische Aufnahme diploider (2n) und haploider (n) Pollenkörner eines *P. tremula* Klons nach Thermobehandlung und Karminessigsäurefärbung

(Prophase I der Meiose) wurden Antheren nach Karminessigsäurefärbung mikroskopisch auf das Entwicklungsstadium der Pollenmutterzellen untersucht (Kang et al., 2000; Ulrich und Ewald, 2014).

Ein Vergleich der Größenverteilung (Pollendurchmesser) der thermobehandelten Probe des Klons „Androscoggin" mit dem entsprechenden nativen Pollen ist in Abbildung 2a 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 (Tabelle 2). Durch Separation der Fraktion 32 bis 45 µm mit Hilfe von Mikrosieben wurden die thermo-induzierten diploiden Pollen angereichert.

3.1.3 Lagerung des Pollens und Durchführung der Kreuzungen

Der durch Siebung angereicherte diploide Pollen wurde entweder unmittelbar zur Bestäubung verwendet oder unter Vakuum in Ampullen eingeschweißt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.4 Konventionelle Kreuzungen

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.

3.1.5 In vitro Bestäubungen

Bei ausgewählten Kreuzungen kam die Technik der *in vitro* Bestäubung 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.

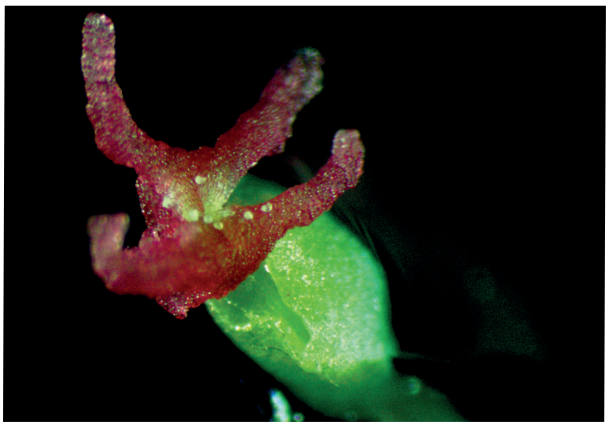

Abbildung 3
In vitro Bestäubung unter dem Stereomikroskop: Selektierte diploide Pollenkörner werden zur Bestäubung auf die Narbe einer weiblichen Aspenblüte übertragen

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 aus Pollenfraktionen mit angereicherten diploiden Pollenkörnern einzelne große Pollenkörner selektiert und mit einer speziell präparierten Borste unter Nutzung der statischen Aufladung 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 Messung mit dem Flowcytometer.

3.2 Induktion diploider Embryosackzellen (Thermobehandlung nach Bestäubung)

Durch Thermobehandlung weiblicher Blütenzweige ungefähr 70 Stunden nach der Bestäubung ist es möglich, diploide Eizellen zu induzieren, was nach der Befruchtung zur Entstehung triploider Pflanzen führt (Wang et al., 2012). Nach der Bestäubung, aber vor der eigentlichen Befruchtung kommt es durch die Wärmeeinwirkung zur Störung der 3. mitotischen Teilung während der Embryosackentwicklung und damit zur Bildung diploider Eizellen (postmeiotic restitution).

Für die Kreuzungen wurde der Graupappelklon *P.* × *canescens* L 447 als weiblicher Partner verwendet. Die Bestäubung wurde mit Pollen des *P. tremula* Klons L 2 bzw. der chinesischen Silberpappel *P. tomentosa* C 5088 (*P. alba* × *P. adenopoda*) vorgenommen. Die Thermobehandlung erfolgte 3 Tage nach der Bestäubung für 6 Stunden bei 38 °C im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollvariante pro Kreuzung. Die Samen wurden auf Vermiculit ausgesät, später in 104er Paletten pikiert und mit dem Flowcytometer auf ihre Ploidie getestet. Aus 200 getesteten Pflanzen konnten vier triploide Pflanzen (Abbildung 4) selektiert werden, in den Kontrollvarianten wurden keine Triploiden gefunden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Thermobehandlung nach Bestäubung mit einer Ausbeute von ca. 2 % eine geeignete Methode zur Erzeugung triploider Pflanzen ist.

4 Selektion triploider Pflanzen aus konventionellen Kreuzungen

Durch Selektion stark wüchsiger Pflanzen mit zum Teil auffallend großen Blättern konnten auch aus den Nachkommen verschiedener gelenkter Aspenkreuzungen triploide Einzelpflanzen gewonnen werden, deren Entstehung auf die spontane Bildung diploider Pollen oder Eizellen zurückzuführen ist.

Alle selektierten triploiden Pflanzen wurden in Gewebekultur überführt und als Voraussetzung für die Freiland-Containerversuche zur Untersuchung der Wachstumseigenschaften *in vitro* vermehrt.

5 Charakterisierung triploider Aspen- und Pappelklone und Selektion von Klonen mit verbesserten Wachstumseigenschaften

Insgesamt konnten durch Anwendung der oben beschriebenen Methoden 48 triploide Klone erzeugt werden. Der größte

Abbildung 4
Triploide Pflanzen einer Kreuzung zwischen einer Graupappel und einer Aspe (L 447 × L 2), die durch Induzierung diploider Eizellen während der Embryosackentwicklung erzeugt wurden. Eine Pflanze (links) zeigte ein besonders starkes Wachstum und extrem große Blätter, die möglicherweise auf „Gigas"-Merkmale hinweisen

Anteil (26 Klone), darunter auch die intersektionellen Hybriden (Schwarzpappel × Balsampappel), stammt aus konventionellen Kreuzungen mit angereicherten diploiden Pollen, vier Klone wurden durch *in vitro* Bestäubung mit diploiden Pollen und neun durch Induzierung diploider Eizellen gewonnen. Zusätzlich konnten neun weitere triploide Pflanzen durch das Screening von Einzelpflanzen aus konventionellen Aspenkreuzungen selektiert und zu Klonen vermehrt werden.

Weil auch das Wachstum triploider Individuen sehr variabel ist (Gauß-Verteilung) und somit nur ein Teil der erzeugten Klone verbesserte Wachstumseigenschaften zeigt, ist eine Selektion der Klone notwendig, die die gewünschten Eigenschaften tragen (Ulrich und Ewald, 2014; Zhu et al., 1997). Um möglichst schnell eine Einschätzung der Leistung der erzeugten Klone zu bekommen, wurden Quickpot-Containertests mit *in vitro*-vermehrten Pflanzen durchgeführt. Über eine Vegetationsperiode von 6 Monaten wurden insgesamt 29 Klone, die bei der *in vitro* Vermehrung ein gutes Wachstum gezeigt hatten, im Vergleich zum triploiden Klon „Astria" (*P. tremula* × *P. tremuloides*) unter Freilandbedingungen getestet (Tabelle 3). Bei 14 Klonen konnte eine signifikante Erhöhung der Haupttrieblänge gegenüber dem triploiden Vergleichsklon „Astria" festgestellt werden, neun davon waren durch reine Aspenkreuzungen entstanden und fünf unter Beteiligung von Graupappeln (*P.* × *canescens*) bzw. Weißpappeln (*P. alba*). Acht der besten Klone werden derzeit in einem Feldversuch auf drei Flächen untersucht (Tabelle 3), um Informationen über ihre Wachstumseigenschaften unter unterschiedlichen Standort-und Witterungsbedingungen zu erhalten. Alle triploiden Klone werden als *in vitro* Kulturen für die weitere Verwendung erhalten.

Aus einer intersektionellen Kreuzung zwischen *P. deltoides* S 39 × *P. simonii* Sim 1 (Sekt. *Aigeiros* × *Tacamahaca*) mit angereicherten diploiden Pollen wurden neun triploide Pflanzen selektiert, von denen fünf ein gutes Wachstum zeigten (Abbildung 5). Die Überführung in die *in vitro* Vermehrung war sehr schwierig und nur ein Klon (Tabelle 3) konnte für den Quickpot-Containertest vermehrt werden. Als Alternative zur *in vitro* Kultivierung wurde ein Bewurzelungstest durchgeführt, der eine 100 % ige Bewurzelungsfähigkeit der Stecklinge ergab.

Tabelle 3

Übersicht über die im Freiland-Containertest getesteten triploiden Klone: DP- durch Siebung angereicherter diploider Pollen, IVB - *in vitro* Bestäubung, KK - gelenkte Kreuzung, DE - Erzeugung von diploiden Eizellen durch Thermobehandlung nach der Bestäubung. Das Sprosswachstum wurde im Vergleich zum triploiden Klon „Astria" (Baumeister, 1980) bestimmt. Die mit Sternchen gekennzeichneten Klone lagen in ihrer Stammlänge signifikant über dem entsprechenden Wert für den Vergleichsklon (Dunn´s Test, p<0,05). Die gelb hinterlegten Klone werden derzeit in einem Freilandversuch auf drei Flächen getestet.

Klon	Methode	Rel. Sprosswachstum (%)		
		Klon1	Klon2	Klon3
L 40 × L 2 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	DP-IVB	79		
L 40 × L 311 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	DP-IVB	133*	130*	
L 40 × L 443 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P.* × *canescens*)	DP-IVB	67		
L 40 × L 311 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	DP-KK	131*	113	71
L 40 × ARB 2M (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	DP-KK	91	127*	
L 40 × L 448 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	DP-KK	114*		
L 40 × L 317 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	DP-KK	122*		
P. alba1 × L 2 *P. alba* × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	DP-KK	122*	102	
P. alba1 × L 311 *P. alba* × *P. tremula*	DP-KK	149*	128*	134*
S 39 × Androscoggin *P. deltoides* × (*P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*)	DP-KK	49	73	
S 39 × Sim1 *P. deltoides* × *P. simonii*	DP-KK	63		
L 447 × L 2 (*P.* × *canescens*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	DE	93	146*	153*
L 447 × C 5088 (*P.* × *canescens*) × *P. tomentosa*	DE	87		
Uhyst 27 x L 311 *P. tremula* × *P. tremula*	KK	120*		
L 40 × L 448 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × *P. tremula*	KK	126*		
L 40 × ARB 3M (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	KK	119		
KP1 × L 334 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	KK	117	124	
L 455 × ARB 2M *P.* × *canescens* × (*P. tremula* × *P. tremuloides*)	KK	109		

Abbildung 5
Triploide Pflanzen aus der intersektionellen Kreuzung *P. deltoides* S 39 × *P. simonii* Sim 1 (*Aigeiros* × *Tacamahaca*)

6 Fazit

Durch sexuelle Polyploidisierung unter Verwendung diploider Pollen bzw. Eizellen können effektiv und schnell leistungsfähige triploide Pflanzen erzeugt werden. Als effektivste und schnellste Methode wird die Verwendung angereicherter 2n Pollen bei gelenkten Kreuzungen im Gewächshaus eingeschätzt. *In vitro* Bestäubungen dagegen sind sehr arbeitsintensiv und die Ausbeute an triploiden Pflanzen ist eher gering, so dass ihre Anwendung sich vor allem auf Kreuzungen mit inkompatiblen Kreuzungspartnern mit anschließendem Embryo-Rescue beschränken sollte. Die Selektion von schnellwachsenden triploiden Einzelpflanzen aus konventionellen Kreuzungen hat sich als geeignet erwiesen, weil auf diese Weise eine erste Selektion nach der Größe erfolgt. Aufgrund der hohen Variabilität im Wachstum der triploiden Pflanzen sollte die Erzeugung triploider Pflanzen immer mit einer nachfolgenden Selektion geeigneter Klone mit entsprechenden Eigenschaften gekoppelt sein.

Für die langfristige und hocheffiziente Züchtung und Selektion schnellwachsender triploider Aspen und Pappeln bietet sich die Erzeugung tetraploider Elternpflanzen von ausgewählten Klonen an, die nach Erreichen der Blühfähigkeit zur Gewinnung diploider Gameten verwendet werden können.

Bei der Züchtung intersektioneller triploider Hybride sollte 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.

Danksagung

Die Arbeiten wurden in den Projekten „Tetraploide“ (FKZ 22013409) und FastWood (FKZ 22011107, FKZ 22002607, FKZ 22000514) durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) gefördert.

Literatur

Aleza P, Juarez J, Ollitrault P, Navarro L (2009) Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. Plant Cell Rep 28:1837-1846

Allum J, Bringloe D, Roberts A (2007) Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin : the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant Cell Rep 26:1977-1984

Bartels P, Hilton J (1973) Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham, and colchicine treatments on microtubules. Pestic Biochem Physiol 3:462-472

Baumeister G (1980) Beispiele der Ploidie-Züchtung. AFZ Wald 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

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: Lewis WH (ed) Polyploidy : biological relevance. New York : Plenum Pr, pp 3-15

DeRose RJ, Mock KE, Long JN (2014) Cytotype differences in radial increment provide novel insight into aspen reproductive ecology and stand dynamics. Can J For Res 45:1-8

Eifler I (1967) Anwendungsmöglichkeiten der Polyploidiezüchtung in der Forstwirtschaft. Arch Forstwes 16:515-528

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

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

Every DA, Wiens D (1971) Triploidy in Utah aspen. Madrono 21:138-147

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

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 Organ Cult 99(3):353-357

Hugdahl J, Morejohn L (1993) Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. Plant Physiol 102:725-740

Jaap M, Meijer B, van Dien M (1992) The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of *lilium* and *nerine*. Acta Hortic (Wageningen) 325:625-630

Janssen A, Fehrenz S, Fey-Wagner C, Hüller W (2012) Züchtung von Schwarz- und Balsampappeln für den Kurzumtrieb. Beitr Nordwestdt Forstl Versuchsanst 8:33-54

Johnsson H (1975) Observations on induced polyploidy in some conifers. Silvae Genet 24:2-3

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

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

Kermani M, Sarasan V, Roberts A, Yokoya K, Wentworth J, Sieber V (2003) Oryzalin-induced chromosome doubling in Rosa and its effect on plant morphology and pollen viability. Theor Appl Genet 107:1195-1200

Li Y, Kang X, Wang S (2008) Triploid induction in *Populus alba* x *P. glandulosa* by chromosome doubling of female gametes. Silvae Genet 57:37-40

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

Mock KE, Callahan CM, Islam-Faridi MN, Shaw JD, Rai HS, Canderson SC (2012) Widespread triploidy in western American aspen (*P. tremuloides*). PLoS ONE 7(10):e48406

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

Nilsson-Ehle H (1936) Über eine in der Natur gefundene Gigantsform von *Populus tremula*. Hereditas 21:379-382

Schneck V, Liesebach M (2015) Potenziale von Aspe im Kurzumtrieb. Thünen Rep 26:15-27

Stanton BJ, Neale DB, Li S (2010) *Populus* breeding : from the classical to the genetic approach. In: Jansson S (ed) Genetics and genomics of *Populus*. New York : Springer, pp 309-312. Plant genet genom crops models 8

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

Ulrich K, Liesebach H, Ewald D (2015) Erzeugung, Nutzung und genetische Charakterisierung polyploider Pappeln. Thünen Rep 26:98-110

Väinölä A (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. Euphytica 112:239-244

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

Van Duren M, Morpurgo R, Dolezel J, Afza R (1996) Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminate*) by *in vitro* techniques. Euphytica 88:25-36

Wang J, Kang XY, Li DL, Chen HW, Zhang PD (2010) Induction of diploid eggs with colchicine during embryo sac development in *Populus*. Silvae Genet 59(1):40-48

Wang J, Li DL, Kang XY (2012) Induction of unreduced megaspores with high temperature during megasporogenesis in *Populus*. Ann For Sci 69:59-67

Wang J, Shi L, Song S, Tian JU, Kang X (2013) Tetraploid production through zygotic chromosome doubling in *Populus*. Silva Fenn 47(2):12

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

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

Zhu Z, Kang X, Zhang Z (1997) Advances in the triploid breeding program of *Populus tomentosa* in China. J Beijing For Univ 6:1-8