Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Verbundvorhaben: ZUEND - Züchtung neuer Energiepappeln für Deutschland; Teilvorhaben 1: Somatische Hybridisierung

Zuwendungsempfänger:

Phytowelt GreenTechnologies GmbH

Förderkennzeichen:

09NR147 bzw. **22014709**

Laufzeit:

15.04.2011 bis 31.04.2015

Datum der Veröffentlichung:

17.01.2018

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

I. Ziele

I. 1. Aufgabenstellung

Das Gesamtziel des Projektes beinhaltete die Entwicklung neuer Pappelklone, die besonders für die Biomasseerzeugung auf Kurzumtriebsplantagen (KUP) geeignet sind, sowie eine Erhöhung der genetischen Diversität für Anpassungen an zukünftige Anbaubedingungen.

Die genetische Diversität der Pappelarten umfasst ein Spektrum verschiedener interessanter Eigenschaften für die Züchtung. Durch Kreuzungen könnten die positiven Eigenschaften der jeweiligen Arten neu kombiniert werden, allerdings sind interspezifische Hybridisierungen gerade zwischen Arten unterschiedlicher Sektionen nur sehr schwer zu erzielen.

Die Methode der somatischen Hybridisierung über die Protoplastenfusion bietet hier einen innovativen Ansatz zur Neukombination von Genomen verschiedener Arten. Die Aufgabe des Teilprojektes der **Phytowelt GreenTechnologies GmbH (Phytowelt)** beinhaltete daher die Entwicklung zellbiologischer Verfahren, die zur Nutzung der genetischen Diversität der Pappelarten in der Züchtung eingesetzt werden können. Phytowelt übernahm die Aufgabe der Etablierung der Technik der Protoplastenfusion, um sowohl neue somatische Hybride als auch polyploide Linien zu entwickeln. Wie bei zahlreichen Kulturpflanzen beschrieben, sollte geprüft werden, ob auch bei der Pappel durch Polyploidisierung die Biomasse erhöht und damit die Eignung als Energiepflanze gesteigert werden kann.

Da die wesentliche Voraussetzung für die Anwendung der Protoplastenfusion die Verfügbarkeit über effiziente Regenerationssysteme ist, sollten für ausgewählte Klone entsprechende Verfahren zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten etabliert werden.

Die Auswahl der Pappelklone, deren Genome mit Hilfe der Protoplastenfusion neu kombiniert werden sollten, erfolgte in Zusammenarbeit mit der NW-FVA. Ziel war es dabei, Klone auszuwählen, die (1) züchterisch interessante Eigenschaften und (2) ein gutes Regenerationspotential aufweisen.

Die molekulare Charakterisierung der Regenerate aus der Protoplastenfusion sollten in Kooperation mit dem Thünen Institut durchgeführt werden. Für die phänotypischen Bewertungen in Gewächshaus- und Feldversuchen war geplant, ausgewählte Fusionslinien als *in vitro* Material an die NW-FVA zu übergeben. Abweichend davon legte Phytowelt auch eigene Feldversuche im Rahmen des Teilprojektes an.

Die Verknüpfung der jeweiligen Kompetenzen der Partner war eine wichtige Vorrausetzung für die Durchführung des Vorhabens.

Die **Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt** (NW-FVA) verfügt über ein breites Sortiment von Pappel-Linien und -Sorten, die sich durch positive Eigenschaften für den Einsatz in KUP auszeichnen. Aufbauend auf eigene Züchtungserfahrungen konnte so die NW-FVA eine Kollektion zusammenstellen, die für die somatische Hybridisierung hoch interessant ist. Da Protokolle zur *in vitro* Kultivierung und Vermehrung von Pappelstecklingen bei der NW-FVA etabliert sind, konnte Phytowelt frühzeitig Ausgangsmaterial für die Etablierung von Fusionssystemen bereitgestellt werden. Die jahrelange züchterische Erfahrung der NW-FVA war für die phänotypische Evaluierung der Linien aus der Protoplastenfusion sehr nützlich.

Die Expertise von **Phytowelt** in der Protoplastenfusion verschiedener Kulturpflanzen war eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung moderner zellbiologischer Techniken im Rahmen des Projektes. Maßgeblich waren hier die bereits bestehenden Erfahrungen mit der Protoplastenregeneration und –fusion verschiedener Pappelklone, die im Rahmen des von der FNR geförderten Vorläuferprojektes (FKZ 22004105) gesammelt worden waren.

Das **Thünen Institut für Forstgenetik** (**Thünen-Institut**) entwickelt seit über 15 Jahren genetische Marker für die Erstellung von Genkarten, Marker-gestützte Selektion und der Individualisierung von Genotypen. Dieses Knowhow konnte im Rahmen des Projektes eingesetzt werden, um ein Marker-Sortiment für die molekulare Analyse der regenerierten Pflanzen zu entwickeln und für die Charakterisierung der Pflanzen aus der Fusion einzusetzen.

Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Verbundvorhaben war in vier Teilprojekte (TP) unterteilt worden. Im Rahmen von **TP1** übernahm die **NW-FVA** die Auswahl von Pappelklonen, die für eine Kombination züchterischer Eigenschaften mit Hilfe der Protoplastenfusion interessant sind. Eine Kollektion von *in vitro* Sprosskulturen 35 verschiedener Pappelklone wurde Phytowelt zur Verfügung gestellt.

Das zweite Teilprojekt **TP2**, die Etablierung der somatischen Hybridisierung, übernahm **Phytowelt**. Die *in vitro* Sprosskulturen, bereitgestellt durch die NW-FVA, wurden an die Kulturbedingungen bei Phytowelt angepasst. Es wurden verschiedene Vor-Tests durchgeführt, um die Auswahl auf Klone mit hohem Regenerationspotential einzugrenzen. Die weiteren Schritte beinhalteten die Etablierung von Protokollen zur Protoplastenfusion und -regeneration.

Für molekulare Analysen übergab Phytowelt Blattproben von den Regeneraten aus den verschiedenen Fusionsexperimenten an das **Thünen-Institut**. Im Rahmen des dritten

Teilprojektes **TP3** entwickelte das Thünen-Institut molekulare Marker zur Identifizierung von Hybrid-Linien.

Im dem vierten Teilprojekt **TP4** wurden ausgewählte polyploide Pflanzen und potentielle Hybrid-Linien aus den Fusionsexperimenten in Gewächshaus- und Feldversuchen geprüft. Versuche zur systematischen Phänotypisierung wurden von der NW-FVA durchgeführt. Da die molekulare Charakterisierung der Regenerate jedoch wesentlich aufwendiger als ursprünglich geplant war, legte auch Phytowelt Feldversuche für phänotypische Bewertungen an.

I.2 Stand der Technik

Kurzumtriebsplantagen (KUP) aus Pappeln zeigen gegenüber anderen Energiepflanzen sehr gute energetische, ökologische und ökonomische Bilanzen. Aufgrund der momentan nur geringen Sortenbasis besteht jedoch ein hoher Bedarf an der Züchtung neuer Sorten, die optimal an KUP angepasst sind. In Zukunft sollen landwirtschaftliche Flächen unterschiedlichster Standorte für den Anbau von Pappeln im Kurzumtrieb genutzt werden. Bedingt durch große Standortsamplituden in Bezug auf Nährstoffgehalt, Wasserverfügbarkeit und verschiedene Stressfaktoren werden entsprechend unterschiedliche Anforderungen an geeignete Sorten gestellt. Für den Anbau in KUP sind besonders Eigenschaften wie gute vegetative Vermehrbarkeit, hohes Wachstum in der Jugendphase, gute Ausschlagfähigkeit, hohe Dichtstandstoleranz sowie Resistenzen gegenüber diversen Pathogenen und Trockenstress erwünscht.
In Deutschland werden aktuell vor allem 3 ‘Max‘-Klone und der Klon ‘Hybride 275‘ für den Anbau auf Kurzumtriebsflächen verwendet. Die belgischen Klone ‘Beaupre‘, ‘Rap‘ und ‘Barn‘ werden nicht mehr empfohlen, weil diese nach ein- bis zweimaligem Rückschnitt wegen starken Blattrostbefalls flächig ausgefallen sind. Seit dem Jahr 2010 sind drei Matrix Klone dazugekommen, die aus Kreuzungen von *P. maximo*wiczii und *P. nigra* Klonen hervorgegangen sind (Janssen *et al.* 2010, 2013). Es besteht somit ein dringender Bedarf an der Züchtung weiterer Sorten, die für den Anbau auf Kurzumtriebsflächen geeignet sind.

In Italien, USA und China hat die Pappelzüchtung seit vielen Jahren einen erheblichen Stellenwert, in Deutschland hat die Züchtung für KUPs erst in den letzten Jahren wieder an Bedeutung gewonnen (Schütte 2013, Janssen et al 2013). Im Rahmen des FastWood Projektes hat die NW-FVA zum Beispiel alte Züchtungsprogramme wieder aufleben lassen. Der älteste deutsche Kurzumtriebsversuch befindet sich in der Nähe von Hann.-Münden und wurde 1975 gemeinsam vom Forschungsinstitut für schnellwachsende Baumarten (FsB) und der damaligen

Hessischen Forstlichen Versuchsanstalt angelegt. Dieser Versuch ist seit Juli 2009 in die Bewirtschaftung der Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (**NW-FVA**, bisher FsB) übergegangen. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Kreuzungen zwischen *Populus maximowiczii* und *P. nigra* sehr gute Eigenschaften für KUP zeigen. Die drei Matrix-Klone (Matrix 11, Matrix 24 und Matrix 49) sind aus diesen Versuchen hervorgegangen (Janssen *et al. 2013*, Hoffmann 2013):

Für die Züchtung neuer Klone für KUP führte die NW-FVA fast 100 unterschiedliche Kreuzungen von Arten der Sektionen *Aigeiros* und *Tacamahaca* durch. Von nur einem Viertel der unterschiedlichen interspezifischen Kombinationen konnte allerdings Saatgut erzeugt werden. Es ist bekannt, dass Hybridisierungen zwischen Pappelarten verschiedener Sektionen sehr schwierig sind, z.B. zwischen Arten der Sektion *Populus* und *Aigeiros* oder *Populus* und *Tacamahaca* (Zsuffa 1975 in: OECD 2001). Gerade diese zeichnen sich jedoch durch Eigenschaften aus, deren Kombination für die Züchtung von KUP-Sorten sehr interessant ist. Die Schwarzpappeln zeigen z.B. eine hohe Stockausschlagfähigkeit, während Aspen gute Resistenzeigenschaften gegenüber Pilzkrankheiten und Trockenstress aufweisen.

Es gibt verschiedene experimentelle Ansätze, um die intersektionalen Kreuzungsbarrieren zu überwinden. Durch Auswahl geeigneter Genotypen konnten z.B. in Einzelfällen Hybride von Arten der Sektion *Populus* und *Tacamahaca,* bzw. *Aigeiros* generiert werden (Stettler *et al*. 1980, Liesebach *et al*. 2010). Auch durch die Anwendung von Mentor-Pollen oder *embryo rescue* gelang es in einigen Fällen, interspezifische Inkompatibilitäten zu überwinden (Gaget *et al.* 1989; Raquin *et al.* 1993).

In der Züchtung von Zitrusbäumen wird die Technik der Protoplastenfusion inzwischen eingesetzt, um Kreuzungsbarrieren zu umgehen und die genetische Diversität zu nutzen (Grosser *et al.* 2000; Dambier *et al.* 2011). Die Voraussetzung für die Anwendung der Protoplastenfusion sind allerdings Protokolle zur effizienten Pflanzenregeneration aus Protoplasten. Für die Pappel sind in der Literatur nur wenige Regenerationssysteme beschrieben (zum Überblick: Liu *et al*. 2003). Phytowelt etablierte jedoch in dem Vorläuferprojekt „Innovative Hybridpappeln“ (FKZ 22006307) effiziente Verfahren zur Protoplastenregeneration für fünf verschiedene Arten und konnte zwei intersektionale Hybrid-Linien aus der Protoplastenfusion regenerieren.

Für das Ausgangsmaterial, das im Rahmen des Projektes eingesetzt wurde, bestehen derzeit keine Sortenschutzrechte. Nach dem aktuellen Kenntnisstand ist die Anwendung der Protoplastenfusion für die Pappelzüchtung nicht durch Patente anderer geschützt.

Verwendete Fachliteratur, Informations- und Dokumentationsdienste

Zur Planung und Analyse der Experimente wurden verschiedene Informationsquellen genutzt, darunter öffentliche Datenbanken wie das *National Center for Biotechnology Information* (NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), die USDA *National Agricultural Library* (http://agricola.nal.usda.gov) und andere öffentlich zugängliche Informationsquellen des Internets.

I.3 Zusammenarbeit mit Dritten

Partner in dem Verbundvorhaben waren die **NW-FVA** in Hann.-Münden (Förderkennzeichen 22005010) und das **Thünen-Institut für Forstgenetik** (Förderkennzeichen 22004910).

Zusätzlich bestand eine enge Zusammenarbeit mit den Partnern des Verbundprojektes FastWood (www.fastwood.org). Die Ergebnisse aus dem ZÜEND-Projekt wurden regelmäßig auf den FastWood-Tagungen vorgestellt.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

1.1 Auswahl der Pappelklone, Etablierung von Protokollen für die Protoplastenregeneration.

Für die somatische Hybridisierung wurden von der NW-FVA 35 verschiedene Klone der vier Sektionen *Populus, Tacamaha*ca, *Aigeiros* und *Leucoides* aufgrund ihrer züchterisch interessanten Eigenschaften ausgewählt, *in vitro* Sprosskulturen etabliert und an Phytowelt übergeben (siehe Schlussbericht der NW-FVA). Zusätzlich steuerte das Thünen-Institut den *P. trichocarpa* Klon Nisqually bei, von dem das gesamte Genom veröffentlicht ist (Tuskan *et al.* 2006) sowie den *P. tremula* Klon Brauna 11, der ein hohes Regenerationspotential aufweist. Zur Entwicklung triploider Pappel-Linien im Rahmen des Projektes wurden des Weiteren ein haploider Schwarzpappel-Klon zusammen mit dem diploiden Ausgangsklon Aue 2 (Deutsch *et al*. 2004) der Phytowelt zur Verfügung gestellt.

Neben züchterischen Eigenschaften wurden als weitere Kriterien zur Auswahl geeigneter Fusionspartner das Regenerationspotential sowie die Eignung zur Protoplastenisolierung und -kultivierung geprüft. Die übergebenen *in vitro* Sprosskulturen wurden an die Kulturbedingungen der Phytowelt angepasst. Verschiedene Medien wurden getestet, um optimales Ausgangsmaterial mit gutem Wurzel- und Blattwachstum für die Protoplastenisolierung zu entwickeln. Zur Überprüfung des Regenerationspotentials wurden im Rahmen von Vor-Tests Blattscheiben auf verschiedenen Medien zur Sprossinduktion kultiviert. Klone, von denen Sprosse von Blattexplantaten regeneriert werden konnten, wurden bevorzugt für die Entwicklung von Protokollen zur Protoplastenregeneration eingesetzt. Aufbauend auf die Methoden, die im Rahmen des Vorläuferprojektes „Innovative Hybrid-Pappeln“ etabliert worden waren, konnten von sieben weiteren Pappelklone Pflanzen aus Protoplasten regeneriert werden.

Damit verfügt Phytowelt über Protokolle zur Protoplastenregeneration für insgesamt 12 verschiedene Pappelklone, die 9 unterschiedlichen Arten (5 davon natürliche Hybride) angehören. In **Tabelle 1** sind die Daten zusammengefasst.

Tabelle 1: Pappelklone, für die Protokolle zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten etabliert wurden.

Kürzel PHY	Spezies	Linie	*Sex*	Herkunft	Protoplasten-regeneration
P2	*P. tremula*	Ahle 2	m	NW-FVA	Pflanzen
P23	*P. tremula*	Ahle 17	m	NW-FVA	Pflanzen
P18	*P. tremula*	Brauna 11	w	Thünen	Pflanzen
P31	*P. alba*	Raket	w	NW-FVA	Pflanzen
P1	*P. x canescens*	717-1B4	w	INRA Orleans	Pflanzen
P3	*P. tremula x P. tremuloides*	Münden 2	m	NW-FVA	Pflanzen
P7	*P. nigra*	102E	?	NW-FVA	Pflanzen
P39	*P. nigra*	Rüd 118 (2n)	m	NW-FVA	Pflanzen
P27	*P. deltoides x P. nigra* [1]	Aue 2	m	Thünen	Pflanzen
P12	*P. simonii* [1]	NW 9-475P	m	NW-FVA	Pflanzen
P10	*P. nigra x P. maximowiiczii*	Max 4	w	NW-FVA	Pflanzen
P9	*P. trichocarpa x P. deltoides*	B19	?	NW-FVA	Pflanzen

[1] Durch molekularen Analysen des Thünen Instituts wurde festgestellt, dass der *Aue 2* Klons (P27) eine Schwarzpappel-Hybride ist.

1.2 Durchführung von Fusionsexperimenten

Zehn Pappelklone, für die Protoplasten-Regenerationssysteme etabliert sind, wurden in Fusionsexperimenten eingesetzt. Zusätzlich wurde der haploide Schwarzpappel-Klon Aue 2 (P29) des Thünen-Instituts sowie die chinesische Pappelart *Populus ussuriensis* (P11) als Fusionspartner ausgewählt.

In der Massenfusion können nicht nur die Protoplasten der beiden Partner verschmelzen (alloploide Hybride aus Heterofusionen), sondern es kann auch zu Selbstfusionen (Autofusionen) der Protoplasten eines Partners kommen (schematische Darstellung in **Abbildung 1A**).

Neben der Kombination der Genome ermöglicht die Protoplastenfusion theoretisch auch die Neukombination der Organellen (schematische Darstellung **Abbildung 1B**). Aus diesem Grund entwickelte das Thünen Institut auch Chloroplasten- und Mitochondrien-spezifische Marker (siehe **Schlussbericht des Thünen-Instituts**).

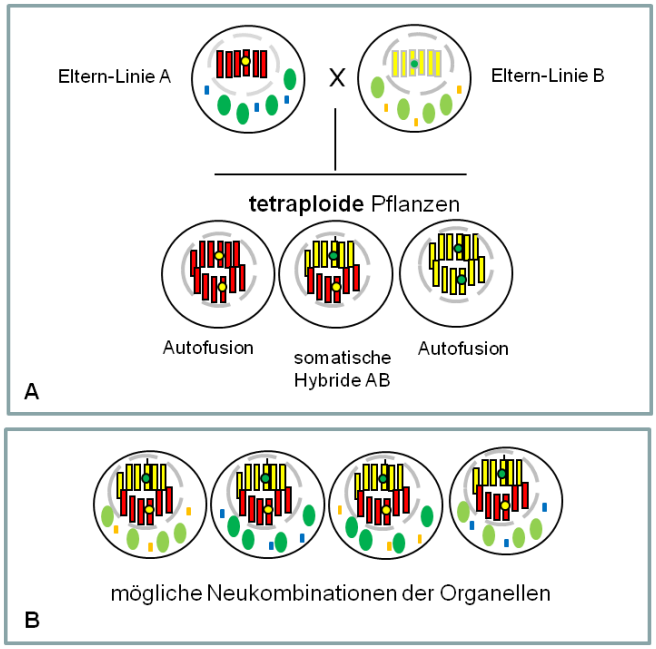

Abb. 1: Schematische Darstellung der möglichen Genom- und Cytoplasma-kombinationen tetraploider Pflanzen aus der Protoplastenfusion.

A: Tetraploide Pflanzen können sowohl aus **Heterofusionen** (potentielle Hybride) als auch aus **Autofusionen** (Protoplasten eines Partners) regenerieren.

B: Neukombination des Cytoplasmas: Anders als bei der klassischen maternalen Vererbung der Organellen, können durch die Protoplasten-fusion Chloroplasten und Mitochondrien neu kombiniert werden.

1.2.1 Entwicklung polyploider Pappelklone aus Auto- und Heterofusionen

Der Effekt der Polyploidisierung auf Wachstum und Biomasse bei Pappeln wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (Zhang *et al*. 2009; Stanton *et al*. 2010). Auch im Rahmen des Vorläuferprojektes konnte bereits für eine tetraploide *P. x canescens* Linie ein besserer Biomasse-Zuwachs in Gewächshausversuchen festgestellt werden. Aus diesem Grund sollten neben somatischen Hybridlinien auch reine tetraploide Pappelklone aus den Fusions-experimenten entwickelt und analysiert werden.

Insgesamt wurden von zehn verschiedenen Pappelklonen (Aspen, Aspen-Hybride, Schwarz-pappeln, Schwarpappel-Hybriden, Schwarz-Balsampappel-Hybriden) tetraploide Autofusions-Linien selektiert (**Tabelle 2**). Zum großen Teil sind diese aus Fusions-Experimenten mit zwei verschiedenen Partnern hervorgegangen (Heterofusionen). Sie wurden aufgrund ihres Phänotyps und der Ergebnisse aus den molekularen Analysen des Thünen-Instituts als „Autofusionen“ eingestuft. Parallel wurden auch gezielt Autofusionen durchgeführt, indem nur die Protoplasten einer Linie Elektropulsen ausgesetzt wurden. Die Bestimmung des Ploidiegrades durch cytofluorimetrischer Messungen zeigte, das neben tetraploiden Linien auch triploide, mixoploide und aneuploide Linien aus den Fusions-experimenten regenerieren.

Von allen polyploiden Pappelklonen bis auf die Klone P29 und P39 wurden Pflanzen an die NW-FVA zur Vermehrung und phänotypischen Bewertung übergeben (**Tabelle 2**). Ausgewählte Linien der Sektion Populus (P3, P1) wurden von der NW-FVA in Gewächshausn und Feldversuchen im Rahmen des Projektes genauer analysiert. Einige Linien wiesen im Vergleich zu den diploiden Elternlinien bessere Eigenschaften auf, wie z.B. stärkere Stammdurchmesser und mehr Biomasse (siehe **Schlussbericht der NW-FVA**).

Mehr als 394 polyploide Pflanzen von insgesamt 58 unterschiedlichen Klonen wurden bei Phytowelt im Feld 2013 und 2014 für phänotypische Bewertungen ausgepflanzt (**Tabelle 2**). Einige polyploide Aspen-Linien wiesen ein auffällig gutes Jugendwachstum und wesentlich größere Blätter als die Ausgangslinien auf. In **Abbildung 2** sind als Beispiel die Blätter einer triploiden *P. tremula* Autofusions-Linie im Vergleich zu dem diploiden Ausgangsklon gezeigt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der polyploiden Linien, die im Rahmen des Projektes aus Auto- und Hetero-Fusionen selektiert wurden. Von den meisten Klonen wurden polyploide Linien bereits an die NW-FVA übergeben.

Pappelart (PHY Kürzel)	**Klon**	**Anzahl polyploiden Linien**		**Herkunft Fusion**	**Status PHY Feldversuche**				**Übergabe an NW-FVA**
					Pflanzung 2013		**Pflanzung 2014**		
		3n	4n		Anzahl Klone	Anzahl Pflanzen	Anzahl Klone	Anzahl Pflanzen	
*P. tremula (*P2)	Ahle 2	2	8	Auto	7	50	2	7	ja
*P. tremula (*P18)	Brauna 11	2	4	Auto	4	19	1	3	ja
P. *tremula x P. tremuloides (*P3)	Münden 2		15	Hetero	12	26	13	112	ja
P. x canescens (P1)	717-1B4	1	6	Hetero	2	17	6	21	ja
*P. alba (*P31)	Raket	2	7	Auto	6	30	1	1	ja
*P. nigra (*P7)	102E		10	Hetero	10	39	7	33	ja
*P. nigra (*P39)	Rüd 118		3	Hetero	0	0	3	13	-
*P. deltoids x P. nigra (*P27)	Aue 2		1	Hetero	0	0	1	2	-
*P. trichocarpa x P. deltoides (*P9)	B19		1	Hetero	1	9	1	6	ja
P. nigra x P. maximowiczii (P10)	Max 4		3	Hetero	0	0	3	6	ja
Insgesamt			**58**		**42**	**190**	**38**	**204**	

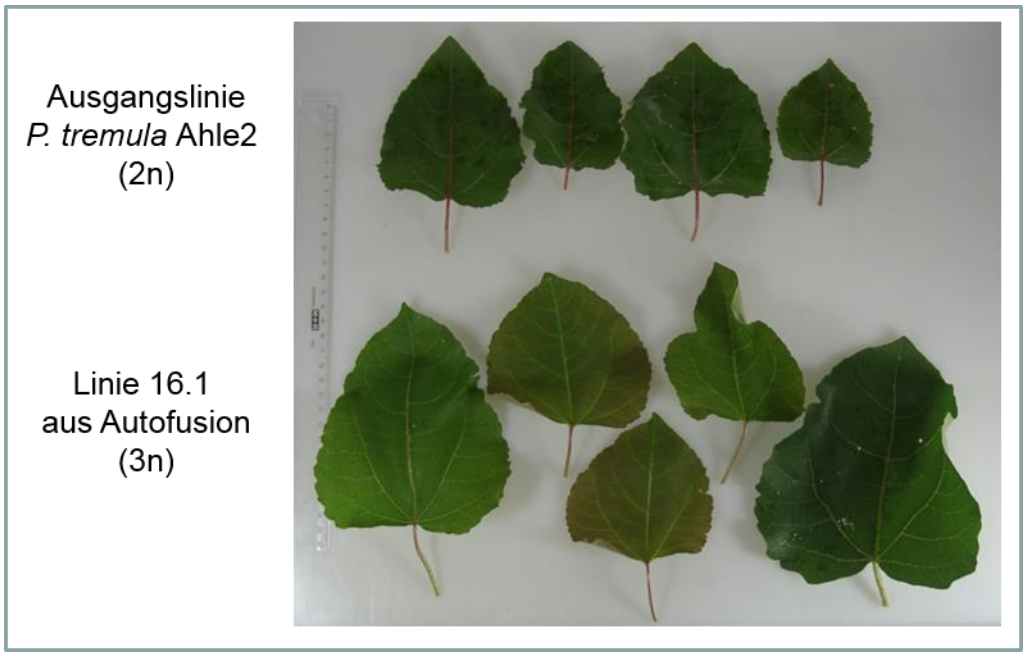

Abb. 2: Vergleich der Blattgrößen des diploiden Ausgangsklons P. tremula (P2) und der triploiden Linie 16.1 aus der P2 x P2 Autofusion.

1.2.2 Entwicklung somatischer Hybrid-Linien

Insgesamt wurden 10 verschiedene Kombinationen in den Fusionsexperimenten eingesetzt worden, um neue inter-sektionale somatische Hybride zu entwickeln (**Tabelle 3**). Zusätzlich wurden zwei intra-sektionale Fusionen von *P. alba* mit *P. tremula x tremuloides*, bzw. *P. alba* mit *P. tremula* durchgeführt. Mit Hilfe des haploiden *P. nigra* Klons Aue 2 (P29) des Thünen-Instituts sollte geprüft werden, inwieweit durch die Protoplastenfusion triploide Linien in einem Schritt erzeugt werden können. Bei Pappeln aber auch anderen Baumarten wurde gezeigt, dass gerade die triploiden Klone erhöhte eine Biomasse aufweisen (Bradshaw *et al.* 1993; Ewald *et al.* 2012).

Molekulare Analysen

Von allen Fusions-Kombinationen wurden für molekulare Analysen Blatt- oder Kallus-Material aus den *in vitro* Kulturen an das Thünen-Institut gesandt (**Tabelle 3**). Die Ergebnisse der Analysen mit verschiedenen Markern deuteten darauf hin, dass inter-sektionale Genom-kombinationen in tetraploiden Regeneraten nicht stabil sind und/oder nur einzelne Chromosomen übertragen werden (siehe **Schlussbericht Thünen Institut**).

Eine tetraploide Linie (11.20) konnte identifiziert werden, die den größten Teil der Chromosomen beider Fusionseltern (Aspen-Hybride *P. tremula x P. tremuloides* und Balsam-Schwarzpappel-Hybride *P. trichocarpa x P. deltoides*) trägt. Diese Linie wuchs jedoch sehr kümmerlich und konnte nicht erhalten werden. Durch die Analyse mit mehr als 15 molekularen Markern wurden mehrere asymmetrische Hybrid-Linien identifiziert. Ein stabiler Hybrid-Status wurde allerdings nur für zwei Linien (8.55-3, 2.5) in mehreren Wiederholungen bestätigt (siehe **Schlussbericht des Thünen-Instituts**). Aufgrund dieser Ergebnisse sollten alle weiteren Regenerate aus den Fusionsexperimenten mit einer größeren Anzahl Chromosomen-spezifischer Markern untersucht werden.

Entsprechende Analysen von Kallus- und Sprosskulturen in verschiedenen Entwicklungsstadien nach der Fusion deuteten ebenfalls auf Chromosomeninstabilitäten in den Hybrid-Kalli (vgl. **Schlussbericht Thünen-Institut**). Sprosse aus der Fusion der haploiden Schwarzpappel-Klons (P29) mit dem *P. alba* Klon (P31) wurden in ersten Analysen als potentielle somatische Hybride eingestuft. Dies konnte in späteren Analysen für die jeweiligen Linien jedoch nicht bestätigt werden. Auffällig war bei der *in vitro* Vermehrung dieser Linien, dass sich aus der Ursprungs-Line Pflanzen mit unterschiedlichem Phänotyp entwickelten **(Abb. 3).**

Die gesamten Sprosskulturen aus den P31 x P29 Fusionsversuch wurden an das Thünen-Institut für detaillierte Untersuchungen einzelner Linien und Pflanzen mit chimären Phänotyp übergeben.

Da molekulare Analysen mit mehreren Markern arbeitsintensiver sind, nahmen die Untersuchungen der zahlreichen Regenerate aus den Fusionsexperimenten wesentlich mehr Zeit in Anspruch. Um die damit verbundenen arbeitsaufwendigen Subkultivierungen zum Erhalt der *in vitro* Spross-Kulturen zu umgehen, pflanzte Phytowelt, abweichend von den ursprünglichen Planungen, die meisten Regenerate in Erde und legte 2013 und 2014 Feldversuche an. Ein Teil der nicht charakterisierten Regenerate aus den Fusionsexperimenten wurde auch an die NW-FVA übergeben (**Tabelle 3**, siehe **Schlussbericht der NW-FVA**)

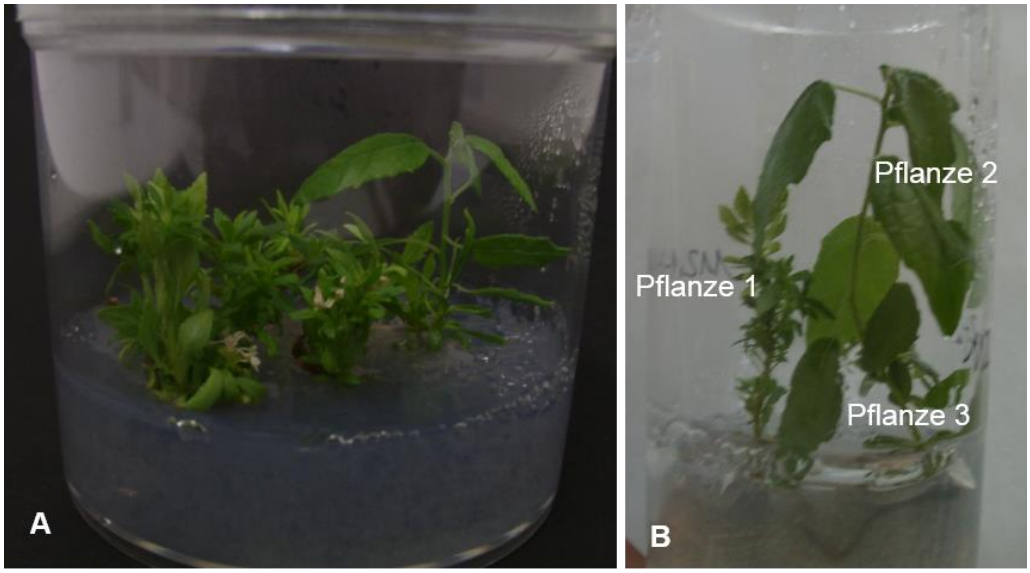

Abb. 3: Regenerate aus der Fusion des haploiden Schwarzpappelklons P29 mit dem *P. alba* Klon P31.
A: Aus einem Kallus regenerieren Sprosse mit unterschiedlichen Phänotypen, einzelne zeigen einen chimären Phänotyp.
B: Die Regenerate sind z.T. Chimäre. Pflanzen (1, 2, 3), die jeweils aus einem Spross vermehrt wurden, unterscheiden sich in ihrem Phänotyp.

..

Tabelle 3: **Anzahl Linien, die aus den verschiedenen Fusionsexperimenten regeneriert, analysiert und im Feld kultiviert wurden.** Pro Linie wurden mehrere Pflanzen vermehrt. Blattproben und z.T. Kallus-Material wurde von einem großen Teil der Regenerate für molekulare Analysen an das Thünen-Institut gesandt. Da abweichend von der ursprünglichen Planung wesentlich umfangreichere molekulare Analysen zur eindeutigen Identifizierung somatischer Hybride notwendig waren, wurden auch nicht charakterisierte Linien aus der *in vitro* Kultur in Feldversuchen geprüft. Ein Teil der Linien wurde von der NW-FVA vermehrt und phänotypisch bewertet (letzte Spalte).

Sektion	**Fusionspartner (Pappelklone)**		**Phytowelt (Regenerate aus Fusionen)**			**Thünen Institut**		**NW FVA**
	Klon 1	**Klon 2**	**Anzahl Linien insgesamt**	**Feld 2013 Linien** (Pflanzen)	**Feld 2014 Linien** (Pflanzen)	**Übergabe Proben von Anzahl Linien**	**Ergebnisse Genotypen**	**Übergabe Linien**
inter-sektional	*P. tremula x P. tremuloides (P3)*	*P. simonii (P12)*	146	86 (237)	30 (40)	34	P3	23
	P. tremula (P2)	*P. simonii (P12)*	4	4 (15)	3 (19)	0	-	0
	P. tremula x P. tremuloides (P3)	*P. ussuriensis (P11)*	109	109 (236)	0	97	P3	58
	P. tremula (P2)	*P. nigra x P. maximowiczii (P10)*	100	38 (90)	30 (58)	73	P2, P10	37
	P. alba (P31)	*P. nigra x P. maximowiczii (P10)*	116	51 (128)	17 (120)	29	P10, P31	49
	P. tremula (P18)	*P. nigra (P27)*	47	7 (18)	27 (77)	0	-	13
	P. alba (P31)	*P. nigra (P39)*	120	33 (85)	10 (24)	120	P31, P39	27
	P. alba (P31)	*P. nigra (1n) (P29)*	258	16 (56)	66 (144)	104	P31, P29, *Hybride?*	0
	P. tremula x P. tremuloides (P3)	*P. nigra (P7),*	131	75 (249)	38 (254)	157	(asymmetr.) Hybride	58
	P. tremula x P. tremuloides (P3)	*P. trichocarpa x P. deltoides (P9)*	26	2 (22)	4 (25)			
intra-sektional	*P. tremula x P. tremuloides (P3)*	*P. alba (P31)*	30	0	14 (41)	Kallus		0
	P. tremula (P2)	*P. alba (P31)*	40	0	10 (14)	Kallus		0
Insgesamt:			**1.127**	**452** (1.194)	**210** (758)	**1.004**		**265**

Phänotypische Bewertungen der Pflanzen aus der Protoplastenfusion

Systematische Vermehrungen und phänotypische Auswertungen übernahm die **NW-FVA** für ausgewählte Fusionslinien im Rahmen des Verbundvorhabens. Hier konnten einige züchterisch interessante Linien identifiziert werden (**siehe Schlussbericht der NW-FVA**).

Einige Regenerate aus der Protoplastenfusion zeigten bereits in der *in vitro* Kultur einen auffälligen Phänotyp, wie z.B. die Sprosse aus der Fusion des haploiden Schwarzpappel-Klons P29 mit *P. alba* (**Abb. 3**).

Phytowelt pflanzte einen großen Teil der Linien aus den Fusionsexperimenten in Erde, um die arbeitsaufwendige *in vitro* Erhaltung zu umgehen. Fast 2.000 Pflanzen, die von 662 unterschiedlichen Linien aus den Fusionsexperimenten abstammten, wurden in den Jahren 2013 und 2014 in das Feld gepflanzt (**Tabelle 3, Abb. 4**), um begleitend zu den molekularen Analysen phänotypische Bewertungen durchzuführen. Parallel wurden ca. 400 polyploide Pflanzen (58 unterschiedliche Klone) aus Autofusionen ausgepflanzt. Aufgrund der großen Anzahl an Regeneraten aus den verschiedenen Fusionsexperimenten, konnte Phytowelt keine standardisierte Vermehrung und Feldversuchsplanung durchführen. Phänotypische Auswertungen dieser Pflanzen konzentrierten sich daher auf besondere Auffälligkeiten (z.B. Wuchsformen, Blattmorphologie).

Abb. 4: Ca. 2.000 Pflanzen (662 Linien) aus der Protoplastenfusion wurden in den Jahren 2013 und 2014 in Köln ausgepflanzt.
A: Aufnahme des Versuchsfelds 1 (angelegt im November 2013) im Sommer 2014.
B: Anlage des Versuchsfeld 2: Pflanzung weiterer Linien im Dezember 2014.

Die erste phänotypische Bewertung der Fusionslinien im Beetkasten und Feld erfolgte im Sommer 2014. Zahlreiche Fusionslinien, die bereits bei der Akklimatisation im Gewächshaus aufgefallen waren, zeigten auch im Feld veränderte Blattmorphologien. Die Blätter hatten z.B. veränderte Blattformen und –größen (siehe auch Schlussbericht der NW-FVA). In **Abbildung 5** sind als Beispiel die Blätter der Linie 2.4.1, die aus der Fusion der Aspen-Hybride *P. tremula x P. temuloides* (P3) mit dem *P. nigra* Klon (P7) hervorgegangen sind, gezeigt. Die Blätter der Fusionslinie ähneln stärker dem Fusionspartner P3, sie sind jedoch deutlich schmaler. Mehrere Fusions-Linien hatten deutlich dickere Blätter als die Ausgangs-Linien (Beispiel Linie 42.3 in **Abb. 6**). Es bleibt zu prüfen, ob dieser Phänotyp nur durch die Polyploidisierung eines Genoms verursacht wird. Einige Fusionslinien zeigten Zwergenwachstum. Andere wiesen chimäre Eigenschaften auf, da die einzelnen Pflanzen, die von der Linien vermehrt worden waren, sich phänotypisch stark unterschieden.

Insgesamt wurden von 35 Linien, die im Frühbeet oder Feld einen auffälligen Phänotyp zeigten, Blattproben an das Thünen-Institut für molekulare Analysen gesandt. Pro Linie war von mehreren Pflanzen Proben entnommen worden. Ein Hybridstatus konnte für keine Linie nachgewiesen werden, auch nicht mehr für die Ableger der Linie 8.55 (siehe **Thünen Schlussbericht**)

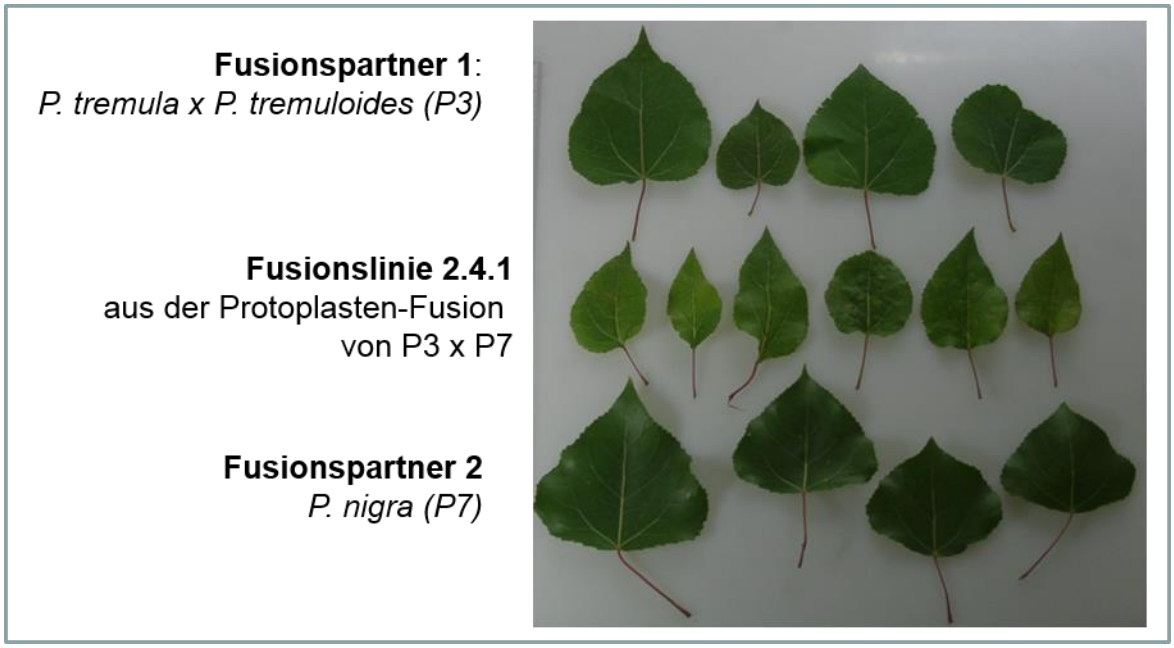

Abb. 5: Beispiel 1 für eine Fusions-Linie mit veränderter Blattmorphologie. Im Vergleich zu den Ausgangslinien sind die Blätter der Linie 2.4.1 (Regenerat aus der Fusion von P3 und P7) schmaler.

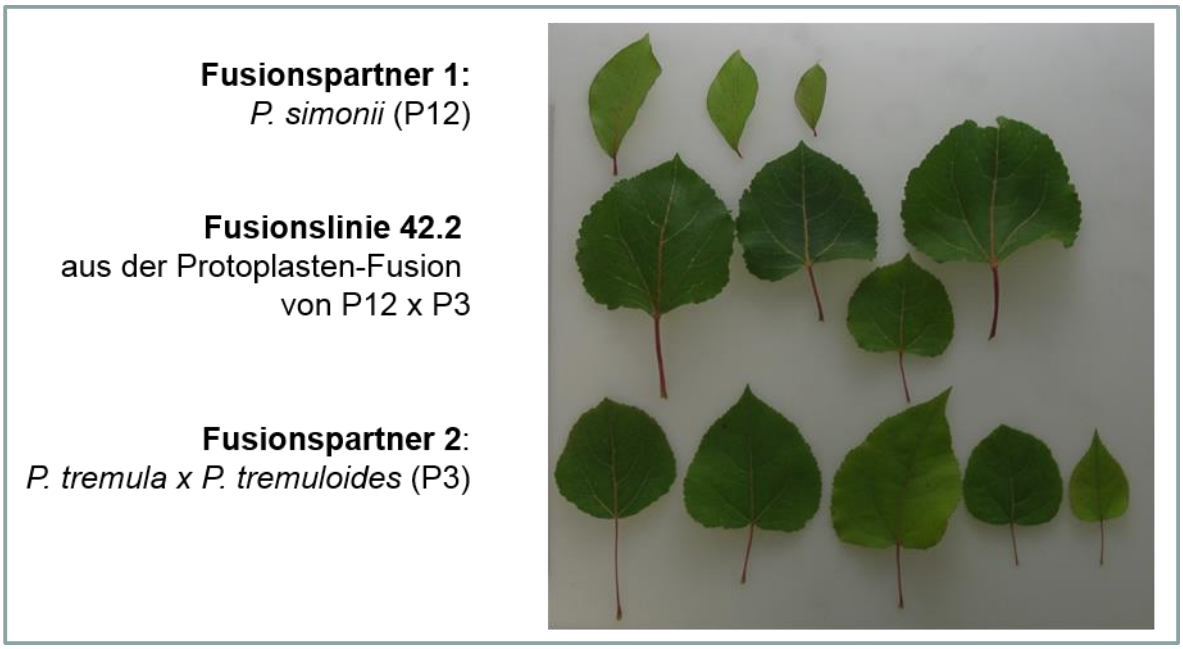

Abb. 6: Beispiel 2 für eine Fusions-Linie mit veränderter Blattmorphologie.
Im Vergleich zu den Ausgangslinien sind die Blätter der Linie 42.3 (Regenerat aus der Fusion von P12 und P3) wesentlich dicker.

Negative Effekte der intersektionalen Hybridisierung auf die Vitalität von Sämlingen („hybrid inviability“) ist bei der Pappel bereits beschrieben (Stettler et al. 1996). Zwergwachstum und reduzierte Lebensfähigkeit der Nachkommen aus intersektionalen Kreuzungen werden als postzygotische Kreuzungsbarrieren diskutiert. Die Ursachen hierfür sind bei Pappel noch nicht bekannt.

Entsprechend könnten ähnliche Mechanismen in der Zellkultur und bei der vegetativen Vermehrung der Pappeln greifen. Bei anderen Kulturarten, bei denen die Protoplasten-fusion schon seit längerer Zeit zur interspezifischen Hybridisierung eingesetzt wird, wurde das Phänomen der Chromosomen-Instabilität und Eliminierung schon früh beschrieben (Ahuja 1988; Soh & Bojwani 1999). Auch für tetraploide Regeneraten aus der Protoplastenfusion bestimmter Zitrus-Arten wurde nachgewiesen, dass sich die Genome nur eines Fusionspartners durchsetzen, während die Chromosomen des anderen verloren gehen (Pensabene-Bellavia *et al.* 2012).

2. Verwertung

- **Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit nach Verwertungsplan**
- **Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten**
- **Wirtschaftliche Erfolgsaussichten**

Phytowelt plant aktuell die Beantragung des Sortenschutzes für ausgewählte tetraploide Linien. In Zusammenarbeit mit der NW-FVA werden einige Fusionslinien im Rahmen des FastWood-Projektes auf ihre Eignung für den KUP-Anbau weiter geprüft. Sortenanmeldungen sollen für Klone, die geeignete Eigenschaften aufweisen, durchgeführt werden (Zeithorizont 5 bis 7 Jahre).

Tetraploide Klone der verschiedenen Arten sollen in das *Populetum* der NW-FVA aufgenommen werden. Sobald die Pflanzen in die generative Phase eintreten (in ca. 5-10 Jahren) werden diese in Kreuzungsprogramme zur Erzeugung triploider Hybride eingesetzt werden. Für verschiedene triploide Pappelklone wurden sehr gute Ertragsleistungen berichtet (Ewald et al 2012). Entsprechend wurde im Rahmen dieses Vorhabens die Basis für eine zukünftige Pappel-Züchtung mit großem Potential gelegt.

Neben Ertragsparameter sollen zukünftig auch Inhaltstoffe von ausgewählten Klonen untersucht werden. Für tetraploide Pappelklone wurde z.B. ein reduzierter Lignin-Gehalt im Vergleich zu den diploiden Ausgansklonen gefunden (Zhang et al. 2009). In eigenen Voruntersuchungen konnte in tetraploiden Klonen ein höherer Gehalt an kondensierten Tanninen gemessen werden. Langfristig plant Phytowelt die Selektion von Linien, die besondere Vorzüge für den Einsatz in Bioraffinerien zeigen.

Im Rahmen des Projektes legte Phytowelt Feldversuche mit mehr als 2.400 Pflanzen (ca. 700 Klone) an, die aus Protoplasten von 12 verschiedenen Pappelarten regeneriert wurden. Ein großer Teil der Linien im Feld ist polyploid. Zahlreiche Pappel-Linien aus den Fusions-experimenten weisen phänotypische Veränderungen auf. Im Rahmen des Projektes mussten sich detaillierte molekulare Analysen auf wenige Fusions-Linien konzentrieren. Entsprechend wurde erst für eine Linie eine Veränderung auf molekularer Ebene festgestellt (Detektion einer Chromosomen-Deletion).

Nach unserem Kenntnisstand gibt es weltweit keinen Versuchsansatz in dieser Dimension. Die Versuchsfelder ermöglichen grundlegende Untersuchungen zum Einfluss von *in vitro* Kultur und Polyploidisierung bei Pappeln als Modell für Bäume.

Der Verfügbarkeit über eine große Population von Pappelpflanzen aus der Zellkultur stellt optimales Material zur Untersuchung epigenetischer Faktoren. Epigenetik spielt gerade bei Bäumen, die mehrere hundert Jahre alt werden können, eine wichtige Rolle für die

Genregulation. Bäume haben nicht nur lange juvenile Phasen, sie müssen sich auch über lange Zeiträume an wechselnde Umweltbedingungen anpassen können.

Einblicke in die Regulation von juveniler und generativer Phase, könnten den Pappelanbau sowie die Züchtung wesentlich vorantreiben. Eine gezielte Induktion der (Re-)Juvenilisierung erleichterte z.B. die vegetative Vermehrung. Die frühere Induktion der generativen Phase würde die Züchtung, z.B. triploider Klone, wesentlich verkürzen.

3. Erkenntnisse von Dritten

Nach dem aktuellen Kenntnisstand wurden keine somatischen Hybrid-Linien von Pappeln an anderer Stelle entwickelt. Auch der Ansatz über Autofusionen tetraploide Pappelklone zu entwickeln, wurde nach dem aktuellen Kenntnisstand nur im Rahmen dieses Projektes durchgeführt.

4. Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse des Projektes wurden bereits in Form von Postern und als Kurzfassung in Tagungsbänden veröffentlicht:

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

LÜHRS, R.; EFREMOVA, N.; WELTERS, P.; MEIER-DINKEL, A.; JANSSEN, A.; VOß, M.-M.; FLADUNG, M. (2012): ZÜEND – Züchtung neuer Energiepappeln für Deutschland. Posterbeitrag. Kurzfassung des Posterbeitrages in: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (Hrsg.): Züchtung und Ertragsleistung schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb. Erkenntnisse aus drei Jahren FastWOOD, ProLoc und Weidenzüchtung. Fachtagung vom 21. bis 22.09.2011 in Hann. Münden. Beiträge aus der NW-FVA, Band 8, 388-389

Lührs R., Efremova N., Welters P., Teichmann T., Fladung M., Hennig A., Meier-Dinkel A, Janßen A. (2015) Entwicklung polyploider Klone von verschiedenen Pappelarten mit Hilfe der Protoplastenfusion. Posterbeitrag, Kurzfassung des Posterbeitrages im Tagungsband, ….

Zitate:

Bradshaw H.D. and Stettler R.F. (1993) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars. Theor Appl Genet 86:301-307.

Ewald D., Ulrich K. and Liesebach H. (2012) Erzeugung triploider Individuen intersektioneller Hybriden bei verschiedenen Pappelarten. Beiträge aus der NW-FVA, Band 8.

Liesebach H., Naujoks G. and Ewald D. (2010) Successful hybridisation of normally incompatible hybrid aspen (*Populus tremula x P. tremuloides*) and eastern cottonwood (*P. deltoides*). Sexual Plant Reproduction 24 (3): 189-198.

Pensabene-Bellavia G., Ruiz M., Aleza P., Olivares-Fuster O., Ollitrault P. and Navarro L. (2015) CHROMOSOME INSTABILITY IN 'CARRIZO' CITRANGE + *CITRUS MACROPHYLLA* SOMATIC HYBRIDS. Acta Hort. (ISHS) 1065:677-685. http://www.actahort.org/books/1065/1065_85.htm

Stanton B. J., Neale D. B., and Li S. (2010) *Populus* Breeding: From the Classical to the Genomic Approach. In: Genetics and Genomics of *Populus*, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. S. Jansson et al. (eds.). Springer Science+Business Media.

Stettler R.F., Bradshaw H.D., Heilman P.E. and Hinckley T.M. (1996) Biology of *Populus* and its implication for management and conservation. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada. 539 p.

Wang J. , Shi L., Song S., Tian J. und Kang X. (2013) Tetraploid production through zygotic chromosome doubling in *Populus*. Silva Fennica 47 (2) Article 932.

Zhang J.-F., Wie Z.-Z., Li D., Li B. (2009) Using SSR markers to study the mechanism of 2n pollen formation in *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier and *P.* × *popularis.* Ann. For. Sci. 66 (2009) 506.