

## Unterschiedliche Reproduktionserfolge von Pappelklonen

# Bestäubungsexperimente an Hybrid- und Schwarzpappeln

Felix C. Staeps, Judith Hasel, Ronald Bialozyt und Meike Borschel

Hybriden von verschiedenen Pappelarten werden gegenwärtig auf ihre Nutzbarkeit in Kurzumtriebsplantagen getestet. Dabei besteht die Gefahr, dass Pollen von Hybriden in Umlauf gerät und somit fremdes Erbgut in die Populationen der ohnehin gefährdeten Schwarzpappel (*Populus nigra* L.) eingebracht wird. Frühere Untersuchungen haben ergeben, dass sich Hybridklone aus der einheimischen Schwarzpappel und der kanadischen Schwarzpappel (*P. deltoides* Bartr.) deutlich in ihrer Nachkommenschaft unterscheiden können. Am stärksten ist dieser Unterschied zwischen den *P. x canadensis*-Klonen „Robusta“ und „Brabantica“, weshalb Pollen dieser beiden Klone in einem Versuch verwendet wurde, um Schwarzpappelblüten künstlich zu bestäuben und den Erfolg solcher Rückkreuzungen zu vergleichen. Mit „Robusta“ bestäubte Blüten bildeten dabei entweder keine Fruchtkapseln oder warfen diese nach kurzer Zeit ab. Die hierfür verantwortlichen Funktionen könnten einen wertvollen Beitrag zum Schutz der Schwarzpappel liefern, falls sie in anderen Hybridklonen ebenfalls auftreten.

Die Schwarzpappel ist als prägende Art der Weichholzaue ein wichtiger Teil von Flussauengesellschaften und wird von der IUCN als Rote-Liste-Art geführt [1]. Kreuzungen der Schwarzpappel mit verschiedenen *Populus*-Arten gewinnen wirtschaftlich an Attraktivität: Solche Hybriden zeigen eine ausgeprägte Leistungssteigerung (Heterosis-Effekt) bei Jungbäumen/Sprösslingen in Form von stark beschleunigtem Wachstum in den ersten Lebensjahren, verringertem Wasserbedarf sowie erhöhtem Celluloseanteil. Gegenwärtig werden im Rahmen

des FastWood-II-Projektes – gefördert durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (BMEL FKZ: 22003011) – neue Pappel-Hybride auf ihre Nutzbarkeit geprüft. Ziel der Züchtung sind neue Sorten, die für den Anbau in Kurzumtriebsplantagen geeignet sind. Solche Plantagen werden bereits nach drei bis fünf Jahren, also nur einem Bruchteil der bei der Forstwirtschaft üblichen Zeiten, geerntet und wachsen anschließend durch Stockausschlag wieder nach. Neben der genetischen Optimierung werden außerdem geeignete Aufzucht-, Ernte- und Nutzungsmethoden entwickelt. Langfristig ist geplant, die neuen Pappelhybride für die Nutzung in Kurzumtriebsplantagen als geprüftes Vermehrungsgut zuzulassen.

Da der durch die Kreuzung entstehende Heterosis-Effekt bei manchen Hybrid-Sorten auch dazu führt, dass sie sehr früh blühen, wird in einigen Fällen das Auftreten von Hybridpollen bereits innerhalb der kurzen Umtriebszeiten nicht vermieden werden können. Während die Bildung fertiler F2-Hybride zwischen den neuen Sorten als eher gering eingestuft wird, konnten Rückkreuzungen in die

Schwarzpappel bereits nachgewiesen werden [2, 3].

Zusätzlich zur bereits bestehenden Gefährdung der Schwarzpappel in Deutschland stellen solche Kurzumtriebsplantagen also eine weitere Gefahrenquelle für die Schwarzpappel dar: die ungewollte Einkreuzung (Introgression) von artfremdem Erbgut aus diesen Plantagen. In diesen werden, im Falle männlicher Klone, in großem Umfang Pollen produziert. Sie stellen insofern auf drei Ebenen eine Gefahr für heimische Schwarzpappel-Populationen dar.

- Erstens können die Pollen aus der Plantage durch ihr Überangebot die heimischen Pollen und somit das lokale Erbgut verdrängen.
- Zweitens werden in solchen Plantagen in der Regel nur wenige Hybrid-Klone angebaut, sodass die Pollenwolke solcher Plantagen die Biodiversität deutlich verringert.
- Dies kann drittens zu einer reduzierten Anpassungsfähigkeit an sich ändernde klimatische Verhältnisse sowie heimische Pathogene und Parasiten führen [4, 5].

Bei Untersuchungen zur Quantifizierung der Rückkreuzung in natürlichen Beständen (BMBF FKZ.: 0313285J), durchgeführt in den Jahren 2006 und 2007, wurden in einem Gebiet um das NSG „Ederauen bei Obermöllrich und Cappel“ unter ca. 4 000 untersuchten Schwarzpappeln (Altbäume, Jungbäume und Sämlinge) zahlreiche Rückkreuzungen in beide Richtungen nachgewiesen [6]. Der Hybridklon „Robusta“ jedoch, welcher im Untersuchungsgebiet der am häufigsten angepflanzte männliche Klon von *P. x canadensis* ist, konnte bei genetischen Untersuchungen in keinem Fall als „Vater“ nachgewiesen werden [6].

Um die Ursachen zu finden, warum die Reproduktion des *P. x canadensis*-Klons „Robusta“ ausbleibt, wurden manuelle Bestäubungen an Blütenreisern von fünf weiblichen Schwarzpappeln mit Pollen des Klons „Robusta“ durchgeführt sowie mit dem Klon „Brabantica“, ein weiterer häufig angebaute Klon von *P. x canadensis*. Ziel der Untersuchung war es, je-

F. C. Staeps ist Doktorand in der AG Naturschutzbiologie der Philipps-Universität Marburg und arbeitet im Verbundprojekt „Züchtung schnell wachsender Baumarten der Gattungen *Populus*, *Robinia* und *Salix* für die Produktion nachwachsender Rohstoffe im Kurzumtrieb (FastWOOD II)“. J. Hasel und R. Bialozyt sind ebenfalls bei der AG Naturschutzbiologie der Philipps-Universität Marburg. M. Borschel arbeitet in der Abteilung Waldgenressourcen der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt.



**Felix C. Staeps**  
felix.staeps@biologie.uni-marburg.de



**Abb. 1:**  
Entnahme von  
Blütenreisern  
mithilfe einer  
hydraulischen  
Hebebühne

Foto: M. Borschel

ne Phase im Entwicklungszyklus von der Blüte bis hin zum Keimling zu ermitteln, welche letztlich eine Reproduktion verhindert. Dafür wurden folgende Abschnitte berücksichtigt: Blüten- und Pollenansatz, Pollenvitalität, Befruchtungserfolg der kontrollierten Bestäubung und Samenantritt sowie Keimfähigkeit und Erfolg der potenziell zu gewinnenden Samen.

## Versuchsablauf und -ergebnisse

### Blühreiserwerbung

Sämtliche Äste wurden Bäumen aus dem Naturschutzgebiet „Ederauen bei Obermöllrich und Cappel“, Hessen, entnommen. Das Gebiet wurde bereits in einem früheren Projekt intensiv genetisch untersucht. Unter den Altbäumen konnten mit genetischen Markern 319 Schwarzpappeln und 248 *P. x canadensis* unterschieden werden. Bei letzteren wurden allein 70 Bäume dem Klon „Robusta“ zugeordnet. Neben dem Klon „Robusta“ wurde für die Kreuzungsversuche aus diesem Datensatz der Klon *P. x canadensis* „Brabantica“ ausgewählt, da er laut früheren Analysen die höchste

Anzahl an Nachkommen bei den 2006 und 2007 geernteten Samen hatte. Ein weiteres Kriterium, auch für die Auswahl weiblicher Bäume, war die Zugänglichkeit mit einem geländetauglichen Fahrzeug mit Hebebühne (Ruthmann-Steiger).

Die Äste für die Kreuzungsversuche wurden am 6. und 13. März sowie am 10. April 2013, wenige Wochen vor dem prognostizierten Start der Pappelblüte 2013, entnommen. Äste der ausgewählten Spenderbäume wurden von einer hydraulischen Hebebühne aus dem oberen Kronenbereich mit einer Astschere direkt entnommen (Abb. 1). Neben Ästen von weiblichen Schwarzpappeln und männlichen *P. x canadensis* wurden auch Äste von einem männlichen Baum der Schwarzpappel zur Verwendung als Kontrolle geerntet.

### Gewinn von Pollen, Aufbewahrung

Die Äste der männlichen Pappeln wurden bei Raumtemperatur bis zur Blüte bewässert und nach der Pollenernte verworfen. Um eine Vermischung unterschiedlicher Pollen zu vermeiden, wurden die Äste getrennt in verschiedenen Zimmern angezogen. Die Pollen wurden dann aus den sich öffnenden Kätzchen geschüttelt, in 30

ml Glasgefäßen gesammelt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Pollen wurden vom ersten Auftreten bis hin zum vollständigen Abblühen der Äste täglich geerntet.

### Bewurzelung weiblicher Äste

Weibliche Äste wurden zur Wurzelbildung für sechs Wochen in einer Klimakammer mit 20 °C warmem Wasser versorgt, während die Temperatur der Umgebungsluft zuerst bei 4 °C, nach drei Wochen bei 1 °C gehalten wurde, um eine frühzeitige Blüte zu verhindern. Nach ausreichender Wurzelbildung wurden jeweils vier weibliche Blütenreiser desselben Baumes in einen Topf gepflanzt und in Kreuzungskabinen im Gewächshaus aufgestellt. Die Kreuzungskabinen wurden mit pollendichter Gaze voneinander getrennt. Drei große Kabinen enthielten Blühreiser (Töpfe) von je vier verschiedenen weiblichen Bäumen, drei weitere kleinere Kabinen enthielten nur jeweils die Blühreiser eines weiteren weiblichen Baumes (Abb. 2).

### Test der Pollenvitalität

Die geernteten Pollen wurden vor den Bestäubungsexperimenten auf Medium aus 7g Agar/l und 10 % Saccharose ausgebracht. Die Ausbildung von Pollenschläuchen wurde nach 24 Stunden unter dem Mikroskop kontrolliert. Während 3,57 % des Pollens von Schwarzpappel Pollenschläuche ausbildete, fand dies bei Pollen von „Brabantica“ nur zu 1,41 % statt. Pollen von „Robusta“ bildete nur zu 0,5 % Pollenschläuche aus.

### Bestäubung

Sämtliche offenen Blüten der weiblichen Blütenreiser jeder Kabine wurden vom 24.4. bis 2.5.2013 täglich mit den jeweils vorgesehenen Pollen von Hand bestäubt. Dabei wurden die Pollen mit einem Pinsel direkt auf die Blüten der Reiser aufgebracht. In jeder Kabine wurde jeweils nur der Pollen eines Baumes verwendet.

### Samenbildung

An jeweils drei Blütenreisern pro Topf wurde nach dem Aufplatzen der Samenkapseln die Wolle mit den Samen entnommen. Die Samen wurden von der Behaarung getrennt und ausgezählt. Mit Pollen von „Brabantica“ bestäubte Blüten bildeten im Mittelwert nur 10,37 % so viele Samen wie mit Schwarzpappel bestäubten Blüten (Tab. 1). Mit Pollen von „Robusta“ bestäubte Blüten bildeten nur vereinzelte Fruchtkapseln aus, die nach kurzer Zeit abstarben, bevor die Samenkapseln aufplatzen. Auch mit „Brabantica“ bestäubte Blüten bildeten nur mit drei der fünf

**Tab. 1: Ergebnisse der erfolgreichen Kreuzungen von Schwarzpappel und *P. x canadensis* „Brabantica“ gegen die Kontrollgruppe (*P. nigra* x *P. nigra*)**

ID weibliche Schwarzpappel-Bäume	„Brabantica“-Pollen (E1127.7)		<i>P. nigra</i> -Pollen (E305)	
	Samen [n]	Keimrate [%]	Samen [n]	Keimrate [%]
E1	241	61,5	754	86,0
E216	0	-	738	62,5
E235	0	-	555	78,0
E310	351	57,5	2 293	83,5
E2001.1	101	43,0	2 340	64,5
<b>Mittel</b>	<b>138,6</b>	<b>54,0</b>	<b>1 336</b>	<b>74,9</b>

weiblichen Schwarzpappel-Reisern ausdauernde Fruchtkapseln und Samen aus.

### Keimraten

Da nur die Kreuzungen mit Schwarzpappel bzw. „Brabantica“-Pollen Samen produzierten, konnte nur für diese Keimraten bestimmt werden. Für die Keimung wurden die Samen in Petrischalen auf gewässertem Filterpapier ausgebracht. Die Keimung wurde nach einem Tag durch Zählen kontrolliert. Die Keimungsrate von Samen aus der Kreuzung Schwarzpappel x „Brabantica“ liegt signifikant unter der Keimungsrate der Samen aus der Kontrollgruppe Schwarzpappel x Schwarzpappel (MANN-WHITNEY-U Test,  $W = 0$ ,  $p < 0,05$ ).

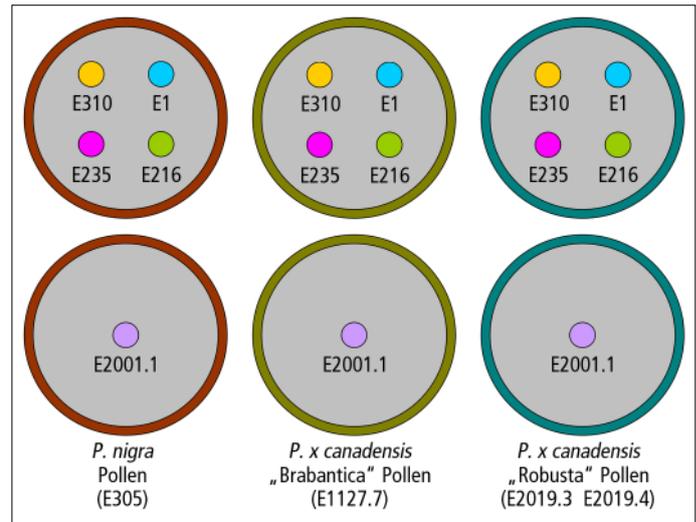
### Diskussion und Ausblick

Zwischen den hier getesteten Abschnitten im Entwicklungszyklus der Pappel finden sich zwei potenzielle Barrieren, die eine erfolgreiche Fortpflanzung zwischen Schwarzpappel und *P. x canadensis* behindern können.

- So zeigt zum einen der Pollen des Klons „Robusta“ eine gegenüber der Kontrolle extrem reduzierte Pollenvitalität, welche bereits vor der eigentlichen Befruchtung der Schwarzpappel eine effektive Fortpflanzungsbarriere darstellt. Auch liegt bereits die Pollenproduktion bei dem Klon „Robusta“ deutlich unter denen der Kontrollen. Angesichts der seltenen Ausbildung von Pollenschläuchen bei „Robusta“ überrascht ein reduzierter Fortpflanzungserfolg gegenüber dem Klon „Brabantica“ nicht.
- Zum anderen fällt das Abstoßen (Abszission) von weiblichen Blüten bei der Schwarzpappel auf, was in Kreuzungsversuchen zwischen Schwarzpappel und „Robusta“ durchgehend auftrat sowie bei zwei der fünf Kreuzungen zwischen Schwarzpappel und „Brabantica“.

Eine derartige Abwehrreaktion bei weiblichen Schwarzpappel-Reisern nach der Bestäubung mit Pollen anderer Arten der Pappel-Sektion Aigeiros ist bekannt [2, 3, 6, 7], scheint jedoch für die Schwarzpappel keinen verlässlichen Schutz gegen Rückkreuzungen mit Hybriden aus der Sektion zu bieten. So konnten in jüngerer Zeit bereits Rückkreuzungen zwischen weiblichen Schwarzpappeln und männlichen *P. x canadensis* im Felde nachgewiesen werden [8, 9]. Weiterhin stellt sich der Samen der erfolgreichen Rückkreuzungen (Schwarzpappel x „Brabantica“), trotz der vergleichsweise geringen Anzahl der Samen und der signifikant niedrigeren Keimungsrate, als durchaus keimfähig heraus. Inwieweit diese das geschlechtsreife Stadium erreichen, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Bisher konnten diese Kreuzungen nur in jungen noch nicht geschlechtsreifen Bäumen nachgewiesen werden [11].

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass bei der Rückkreuzung zwischen weiblichen Schwarzpappeln und männlichen *P. x canadensis* Bäumen des Klons „Robusta“ sowohl eine präzy-



**Abb. 2: Schema der manuellen Bestäubungsexperimente. Pro Pollen-Art wurden jeweils zwei Kreuzungskabinen mit identischer Anordnung von vier bzw. einem weiblichen Blütenreiser verwendet (dunkelrot: *P. nigra*; oliv: *P. x canadensis* „Brabantica“; petrol: *P. x canadensis* „Robusta“). Die Nummern stellen die Individuen-Nummern aus dem NSG „Ederauen bei Obermülich und Cappel“ dar.**

gotische Barriere (die also bereits die Befruchtung verhindert) als auch eine zygotische Barriere, (welche nach der eigentlichen Befruchtung zum Tragen kommt) wirken. Erstere existiert in Form einer, gegenüber der Kontrolle, geringen Produktion von Pollen sowie in dessen extrem reduzierter Vitalität, Die zygotische Barriere prägt sich in der abweisenden Reaktion der weiblichen Blüte der Schwarzpappel nach der Bestäubung aus. Untersuchungen weiterer Klone von *P. x canadensis* auf vergleichbare Art und Weise wären wünschenswert. Im Hinblick auf den Artenschutz der Schwarzpappel handelt es sich hier um Eigenschaften, welche in Kombination (eine durchgehende Funktionalität vorausgesetzt) einen eingebauten Schutz der Schwarzpappel vor Introgression durch „Robusta“ darstellen könnte. Sollte es gelingen, die für diese Barrieren verantwortlichen Eigenschaften genetisch zu isolieren, so könnten diese in Folge gezielt in zukünftige Hybride von *P. x canadensis* eingezüchtet werden. Dies würde im Idealfall zu Kurzumtriebsplantagen mit eingebauter Unverträglichkeit (Inkompatibilität) gegenüber einheimischen Populationen der Schwarzpappel führen, was deren Gefährdung, zumindest durch Introgression deutlich mindern könnte.

### Literaturhinweise:

- [1] IUCN (2006): Participants of the FFI/IUCN SSC Central Asian regional tree Red Listing workshop, Bishkek, Kyrgyzstan (11. bis 13. Juli 2006). *Populus nigra*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. [2] LABEL, P.; IMBAULT, N.; VILLAR, M. (1994): ELISA Quantitation and GC-MS identification of abscisic acid in stigma, ovary and pedicel of pollinated poplar flowers (*Populus nigra* L.). *Tree Physiol.*, Band/Jg. 14, Nr. 5, S. 521-530. [3] MELCHIOR, V. G.; SEITZ, F. W. (1968): Interspezifische Kreuzungssterilität innerhalb der Pappelsektion Aigeiros. [4] HARMS, H.; NIPPER-HANSEN, P. (2002): Zunahme der Misteln (*Viscum album* L.) in der Umgebung von Bad Essen. *Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen*, Band/Jahrgang 28, S. 113-115. [5] ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. (1993): Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, Band/Jahrgang 24, Nr. 1, S. 217-242. [6] RATHMACHER, G.; NIGGEMANN, M.; WYPUKOL, H.; GEBHARDT, K.; ZIEGENHAGEN, B.; BIALOZYT, R. (2009): Allelic ladders and reference genotypes for a rigorous standardization of poplar microsatellite data. *Trees - Struct. Funct.*, Band/Jg. 23, Nr. 3, S. 573-583. [7] STANTON, B. J.; VILLAR, M. (1996): Controlled reproduction of *Populus*. In: *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, S. 113-138. [8] STEITLER, R. F.; ZSUFFA, L.; WU, R. (1996): The role of hybridization in the genetic manipulation of *Populus*. In: *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, S. 87-113. [9] ZIEGENHAGEN, B.; GNEUSS, S.; RATHMACHER, G.; LEYER, I.; BIALOZYT, R.; HEINZE, B.; LIEPELT, S. (2008): A fast and simple genetic survey reveals the spread of poplar hybrids at a natural Elbe river site. *Conserv. Genet.*, Band/Jg. 9, Nr. 2, S. 373-379. [10] VANDEN BROECK, A.; STORME, V.; COTTRELL, J. W.; BOERJAN, J.; VAN BOCKSTAEL, E.; QUATAERT, P.; VAN SLYCKEN, J. (2004): Gene flow between cultivated poplars and native black poplar (*Populus nigra* L.): a case study along the river Meuse on the Dutch-Belgian border. *For. Ecol. Manag.*, Band/Jg. 197, Nr. 1-3, S. 307-310. [11] BIALOZYT, R.; RATHMACHER, G.; NIGGEMANN, M.; ZIEGENHAGEN, B. (2012): Reconstructing explicit mating schemes in poplar hybrids – a case study in the *Populus nigra* L.-*Populus x canadensis* Moench complex. *Silvae Genet.*, Band/Jg. 61, Nr. 4-5, S. 157-167, 2012.