

Landbauforschung

*Applied Agricultural
and Forestry Research*

Vol. 68
No. 1/2 · 12.2018



Landbauforschung

Landbauforschung *Applied Agricultural and Forestry Research* ist eine wissenschaftliche Zeitschrift, in der Forschungsergebnisse zu gesellschaftlich relevanten Themen veröffentlicht werden, die einen Bezug zur Landwirtschaft, zur Forstwirtschaft und zur ländlichen Entwicklung aufweisen. Die Zeitschrift ist damit explizit Disziplinen übergreifend ausgerichtet.

Veröffentlicht werden insbesondere anwendungsorientierte wissenschaftliche Beiträge, die interdisziplinär angelegt sind oder die ausgeprägte Bezugspunkte zu anderen Fachdisziplinen aufweisen. Der geographische Fokus der Zeitschrift liegt auf Deutschland und Europa. Die Sprache der Beiträge ist deutsch oder englisch. Alle Beiträge unterliegen einer doppelt anonymen Begutachtung (double-blind peer review).

Landbauforschung *Applied Agricultural and Forestry Research* wird vom Thünen-Institut in Braunschweig herausgegeben. Für den Inhalt der Beiträge sind die Autoren und Autorinnen verantwortlich. Eine Haftungsübernahme durch die Redaktion erfolgt nicht.

Mit der Einsendung von Manuskripten geben die Verfasser/Verfasserinnen ihre Einwilligung zur Veröffentlichung. Die von den Autoren/Autorinnen zu beachtenden Richtlinien zur Einreichung der Beiträge sind unter www.thuenen.de/de/infothek/publikationen/landbauforschung/ oder bei der Geschäftsführung erhältlich.

Als Printausgabe erscheinen vier Hefte pro Jahr. Beiträge, die noch keinem bestimmten Heft zugeordnet sind, werden als Online First – Version veröffentlicht.

Indexiert in: CAB International, Science Citation Index Expanded, Current Contents – Agriculture, Biology & Environmental Sciences, Scopus, Web of Science.

Herausgeber
Johann Heinrich von Thünen-Institut

Schriftleitung
Prof. Dr. Andreas Bolte,
Prof. Dr. Peter Weingarten

Geschäftsführung
Dr. Hans-Walter Roering
Tel. +49 (0) 40 - 73962 239
Leuschnerstraße 91
21031 Hamburg, Germany
landbauforschung@thuenen.de
www.thuenen.de

Grafikdesign und Satz
Heidrun Fornahl, Thünen-Institut
Karin Tamoschat-Depolt, Thünen-Institut

Fotos Umschlagseite
Katja Seifert, Thünen-Institut (2),
Michael Welling, Thünen-Institut (1)

ISSN 0458-6859

Alle Rechte vorbehalten.

Applied Agricultural and Forestry Research

Landbauforschung *Applied Agricultural and Forestry Research* is a scientific journal, concerning the latest research results of socially relevant issues related to agriculture, forestry and rural development. The journal is targeted explicitly to interdisciplinary topics.

Particularly welcome are application-oriented scientific contributions with an interdisciplinary approach or with a close connection to other research areas. The geographical focus of the journal is Germany and Europe. Articles may be written in English or German. All articles are subject to a double-blind peer review.

Landbauforschung *Applied Agricultural and Forestry Research* is published by the Thünen Institute with headquarters in Brunswick, Germany. Authors are responsible for the content of their articles. The publishers are not liable for the content.

With the submission of a manuscript, the authors grant permission for publication. The guidelines for the submission of manuscripts can be found under www.thuenen.de/en/infothek/publikationen/landbauforschung/ or obtained from the publishers.

The print edition is published quarterly. Articles not yet assigned to a specific issue are available online ("Online First")

Indexed in: CAB International, Science Citation Index Expanded, Current Contents – Agriculture, Biology & Environmental Sciences, Scopus, Web of Science.

Publisher
Johann Heinrich von Thünen Institute

Editor in Chief
Prof. Dr. Andreas Bolte,
Prof. Dr. Peter Weingarten

Managing Editor
Dr. Hans-Walter Roering
Tel. +49 (0) 40 - 73962 239
Leuschnerstraße 91
21031 Hamburg, Germany
landbauforschung@thuenen.de
www.thuenen.de

Graphic Design and Typesetting
Heidrun Fornahl, Thünen Institute
Karin Tamoschat-Depolt, Thünen Institute

Photos cover pages
Katja Seifert, Thünen Institute (2),
Michael Welling, Thünen Institute (1)

ISSN 0458-6859

All rights reserved.

Inhalt
Content

- Kristina Ulrich und Dietrich Ewald
Methoden zur Erzeugung triploider Aspen und Pappeln
1 Methods for generation of triploid aspen and poplar
- Doris Krabel, Maximilian Groschke, Sandra Korn, Matthias Meyer, Rosi Müller, Alexander Solger, Lina Winkler und Marie Weigand
Topfversuche mit drei Pappelstandardsorten – Möglichkeiten und Herausforderungen
11 Pot experiments with three Poplar standard varieties – opportunities and challenges
- Hilke Schroeder and Matthias Fladung
Poplar clones differ in their resistance against insects feeding
19 Pappelklone unterscheiden sich in ihrer Toleranz gegenüber Insektenfraß
- Hilke Schroeder, Birgit Kersten und Matthias Fladung
Identifizierung von 19 verschiedenen Pappelarten mit Hilfe von Chloroplasten- und Kernmarker-Sets
27 Identification of 19 different poplar species by chloroplast and nuclear marker sets
- Christina Fey, Christoph Stiehm, Martin Hofmann, Matthias Moos, Helmut Grotehusmann, Wilfried Steiner und Alwin Janßen
Züchtung und Evaluierung von Schwarz- und Balsampappelklonen hinsichtlich Ertrag und Blattrosttoleranz in vier FastWOOD Versuchsserien
35 Breeding and Evaluation of Black and Balsam Poplar Clones regarding Yield and Tolerance to Leaf Rust in four FastWOOD Trial Series
- Ben Bubner, Angela Köhler, Irmtraut Zaspel, Matthias Zander, Nadja Förster, Jan-Christoph Gloger, Christian Ulrichs, and Volker Schneck
Breeding of multipurpose willows on the basis of *Salix daphnoides* Vill., *Salix purpurea* L. and *Salix viminalis* L.
53 Züchtung von Weiden zur Mehrfachnutzung auf der Basis von *Salix daphnoides* Vill., *Salix purpurea* L. und *Salix viminalis* L.
- Christoph Stiehm und Martin Hofmann
Evaluierung von Genotyp-Umwelt Interaktionen bei Pappel und Weide auf landwirtschaftlichen Standorten in kurzen Umtriebszeiten – Ergebnisse aus dem ProLoc Verbundvorhaben
67 Assessing Genotype-Environment Interaction for Poplars and Willows on agricultural sites in short rotation coppice – Results from the Joint Research Project ProLoc
- Christian Heimpold, Kathrin Heimpold, Volker Schneck, Rainer Tölle und Mirko Liesebach
Untersuchung der Holzdichte von Aspen und Hybridaspen mittels Pilodyn
83 Investigation of wood density of aspen and hybrid aspen with Pilodyn
- Matthias Meyer, Melanie Zacharias, Kristin Morgenstern, Doris Krabel, and Heike Liesebach
Variable genotypes at the cpDNA marker locus *trnDT* in spontaneous rejuvenation of the species complex around the European black poplar (*Populus nigra* L.) and its relatives collected in Germany
93 Unterschiedliche Genotypen am cpDNA Genort *trnDT* in spontan aufgelaufener Verjüngung des Artkomplexes um die Europäische Schwarz-Pappel und deren Verwandte in Deutschland

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 Waldsiedersdorf, Eberswalder Chaussee 3a

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 Hybridaspens 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 Hybridaspes „Austria“ 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 ($4n_{\text{♀}} \times 2n_{\text{♂}}$ und $2n_{\text{♀}} \times 4n_{\text{♂}}$) 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. × canadensis*) 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 Blattachsen 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 Blattachsen (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 ♀ (<i>P. × canescens</i>)	Colchizin
Groß Dubrau 1 ♀ (<i>P. tremula</i>)	Colchizin
L 40 ♀ (<i>P. tremula × P. tremuloides</i>)	Oryzalin
Esch 5 ♀ (<i>P. tremula × P. tremuloides</i> /Brauna11 × Tur 141)	Colchizin
Brauna 11 ♀ (<i>P. tremula</i>)	Colchizin
L 314 ♀ (<i>P. tremula</i>)	Oryzalin
Turesson 141 ♂ (<i>P. tremuloides</i>)	Oryzalin
L 291 ♂ (<i>P. tremula</i>)	Colchizin
L 9 ♂ (<i>P. tremula</i>)	Colchizin
“Androcoggin” (<i>P. maximowiczii × P. trichocarpa</i>)	Colchizin

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 (<i>P. tremula</i>)	29,67 ± 0,19	37,38	32 - 45
L 311 (<i>P. tremula</i>)	32,80 ± 0,15	41,33	36 - 45
ARB 2M (<i>P. tremula × P. tremuloides</i>)	32,61 ± 0,17	41,09	36 - 45
L 448 (<i>P. × canescens</i>)	29,75 ± 0,13	37,49	32 - 45
L 443 (<i>P. × canescens</i>)	30,10 ± 0,15	37,93	32 - 45
L 454 (<i>P. × canescens</i>)	34,48 ± 0,27	43,44	36 - 45
“Androcoggin” (<i>P. maximowiczii × P. trichocarpa</i>)	28,75 ± 0,26	36,22	32 - 45
Sim 1 (<i>P. simonii</i>)	29,77 ± 0,12	37,51	32 - 45

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 gebildeten 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

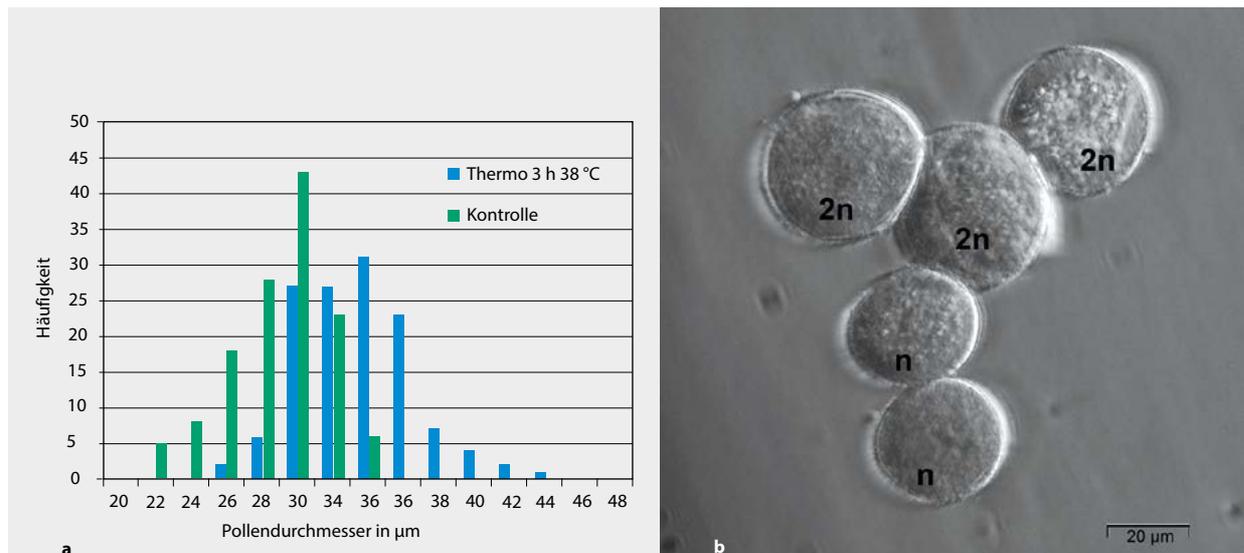


Abbildung 2

(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.

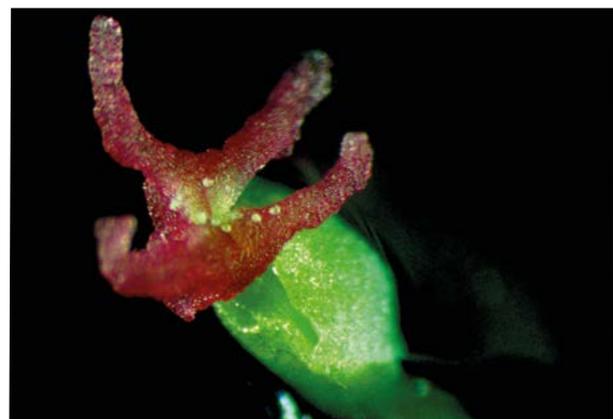


Abbildung 3

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 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>)	DP-IVB	79		
L 40 × L 311 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × <i>P. tremula</i>	DP-IVB	133*	130*	
L 40 × L 443 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × (<i>P. × canescens</i>)	DP-IVB	67		
L 40 × L 311 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × <i>P. tremula</i>	DP-KK	131*	113	71
L 40 × ARB 2M (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>)	DP-KK	91	127*	
L 40 × L 448 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × <i>P. tremula</i>	DP-KK	114*		
L 40 × L 317 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × <i>P. tremula</i>	DP-KK	122*		
<i>P. alba</i> 1 × L 2 <i>P. alba</i> × (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>)	DP-KK	122*	102	
<i>P. alba</i> 1 × L 311 <i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>	DP-KK	149*	128*	134*
S 39 × Androscoggin <i>P. deltoides</i> × (<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>)	DP-KK	49	73	
S 39 × Sim1 <i>P. deltoides</i> × <i>P. simonii</i>	DP-KK	63		
L 447 × L 2 (<i>P. × canescens</i>) × (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>)	DE	93	146*	153*
L 447 × C 5088 (<i>P. × canescens</i>) × <i>P. tomentosa</i>	DE	87		
Uhyst 27 × L 311 <i>P. tremula</i> × <i>P. tremula</i>	KK	120*		
L 40 × L 448 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × <i>P. tremula</i>	KK	126*		
L 40 × ARB 3M (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>)	KK	119		
KP1 × L 334 (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>) × (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>)	KK	117	124	
L 455 × ARB 2M <i>P. × canescens</i> × (<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>)	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, prophan, 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 JM (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
- Huggahl 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 Hort* (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* × *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 acuminata*) 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

Topfversuche mit drei Pappelstandardsorten - Möglichkeiten und Herausforderungen

Doris Krabel*, Maximilian Groschke*, Sandra Korn*, Matthias Meyer*, Rosi Müller*, Alexander Solger*, Lina Winkler* und Marie Weigand*

Zusammenfassung

Experimente mit getopften Pflanzen im Gewächshaus stellen eine gute Möglichkeit dar, physiologische sowie morphologische Eigenschaften und Reaktionen der Probanden unter kontrollierten Bedingungen zu beobachten und miteinander zu vergleichen. Besonders die Wiederholbarkeit der Versuchsanlage und die Beobachtung interessierender Merkmale unter definierten Bedingungen macht diese Experimente attraktiv.

In der forstlichen Züchtungsarbeit spielen Topfversuche im Gewächshaus mit Bäumen bisher jedoch kaum eine Rolle. Gründe dafür sind zum einen die lange Entwicklungszeit von holzigen Pflanzen und damit einhergehend die Ausprägung interessierender Merkmale erst nach Jahren oder Jahrzehnten. Zum anderen macht die Größe älterer Pflanzen Topfversuche impraktikabel. Dennoch können Gewächshausexperimente mit jungem Pflanzenmaterial (Sämlinge oder Setzlinge) eine wichtige Ergänzung zu Feldversuchen darstellen.

Anhand von Topfversuchen, die in den Jahren 2012 und 2016 unter vergleichbaren Versuchsbedingungen im Gewächshaus mit Steckhölzern der Pappelstandardsorten Max 3, Hybride 175 und AF2 durchgeführt wurden, wird versucht, die Herausforderungen und Möglichkeiten aufzuzeigen, die derartige Versuchsanlagen mit sich bringen.

Die Ergebnisse zeigen, dass abiotische und genetische Faktoren einen Einfluss auf das frühe Spross- und Wurzelwachstum von Pappelstecklingen haben und dass Topfversuche unter kontrollierten Bedingungen auch für forstlich relevante Baumarten geeignet sind.

Schlüsselwörter: *Topfversuche, Gewächshaus, Populus, frühe Pflanzenentwicklung, Steckhölzer, Phänotypisierung*

Abstract

Pot experiments with three Poplar standard varieties – opportunities and challenges

Experiments with potted plants in the greenhouse are an excellent opportunity to test morphological and physiological reactions of plants under controlled environmental conditions. Especially the repeatability of these experiments and the possibility to observe specific traits under defined conditions make such experimental design attractive for breeding purposes. Nevertheless, until today those experiments do not play a significant role in forest tree breeding projects. Among others, reasons are the relatively long developmental time of the plants and, associated with this, the development of economically or ecologically important traits after several years or decades. In addition, the above and belowground size of older plants often poses problems. Based on pot experiments carried out in 2012 and 2016 with hardwood cuttings of the same set of plant material (Max3, Hybride 275, AF2) under comparable environmental conditions, the challenges of the experimental design will be discussed.

In our study, traits of interest were shoot and root length, the root-shoot-ratio, leave dry mass and root dry mass under optimal watered conditions and under dry conditions.

Keywords: *pot experiments, greenhouse, Populus, early plant development, hardwood cuttings, phenotyping*

* TU Dresden, AG Molekulare Gehölzphysiologie, Pienner Str. 7, 01737 Tharandt

1 Einleitung

Das Verständnis des Einflusses von verschiedenen Umweltfaktoren auf das Wachstum von Pflanzen ist wesentlicher Bestandteil sowohl pflanzenökologischer als auch züchterischer Forschung. In beiden Fällen wird die Abhängigkeit der Ausprägung bestimmter Merkmale von den jeweiligen Umweltbedingungen untersucht. Um zu belastbaren Ergebnissen zu gelangen, gibt es die Möglichkeiten, entweder Feld-Versuche oder Gewächshausversuche oder eine Kombination von beiden Ansätzen durchzuführen.

In situ-Versuche haben den Vorteil, dass die Versuchspflanzen den Bedingungen einer natürlichen Umwelt ausgesetzt sind und damit einer mehr oder weniger realen Situation ausgesetzt sind. Der Nachteil dieser Ansätze besteht darin, dass bei der Interpretation der Ergebnisse die Reaktion des Wachstums auf einzelne Umwelt-Einflussfaktoren schwierig zu extrahieren ist. Außerdem wird nur diese eine Umweltsituation abgebildet, woraus sich die Notwendigkeit ergibt, abhängig von der Fragestellung identische Versuchsanlagen an verschiedenen Orten durchzuführen, um auch andere Umweltverhältnisse abbilden zu können. Damit verbunden ergibt sich das meist nicht unerhebliche Problem der Verfügbarkeit von geeigneten Flächen und dies gerade bei holzigen Pflanzen über einen langen Zeitraum.

Versuche in einer kontrollierbaren aber künstlichen Umgebung können dagegen gezielt einen oder mehrere Umweltfaktoren und deren Wirkung auf das Pflanzenwachstum sichtbar machen. Unter Berücksichtigung von bestimmten Rahmenbedingungen (Kawaletz et al., 2014) lassen sich die Versuche in Abhängigkeit von der Wachstumsrhythmik der Pflanzen wiederholen, sodass ein zuverlässiger Datenpool aufgebaut werden kann. Probleme, gerade mit holzigen Pflanzen, ergeben sich dadurch, dass im Gewächshaus nur ein begrenzter Wuchsraum, sowohl ober- als auch unterirdisch, zur Verfügung steht, was die Dauer der Versuche begrenzt und die Größe bzw. das Alter der Pflanzen erheblich einschränkt (Kawaletz et al., 2014).

Im Rahmen von Züchtungsarbeiten an Pflanzen ist die sorgfältige Erhebung von phänotypischen Daten genauso unerlässlich wie die Charakterisierung des jeweils interessierenden Genotyps. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren erhebliche Anstrengungen unternommen, um automatisierte Systeme zur Hochdurchsatz-Phänotypisierung zu etablieren (Granier et al., 2006; Nagel et al., 2012). Je nach Ausstattung dieser Systeme ist die Bearbeitung einer großen Anzahl an Versuchspflanzen in einer mehr oder weniger hohen Intensität möglich (Poorter et al., 2012a). Die Annahme, dass Bäume aufgrund ihrer langen Entwicklungsphase nicht für die Untersuchung im Hochdurchsatz-Verfahren geeignet sind, konnte für Pappelstecklinge beispielsweise von Dickmann et al. (2001), Wiese et al. (2006), Zalesny et al. (2005), Zalesny und Zalesny (2009) oder Krabel et al. (2015a, 2015b, 2017) widerlegt werden. Selbst eine kurze experimentelle Dauer, im letzteren Fall 65 Tage, reichen aus, um genotypabhängige und umweltbedingte Unterschiede der Spross- und Wurzelentwicklung an jungen Pflanzen deutlich werden zu lassen. Gleiches gilt auch für

langsam wachsende Forstpflanzen wie beispielsweise Eichenarten (Krabel et al., 2017).

Anhand von Beispielen zur Wuchsdynamik der drei Pappelstandardsorten Max3, Hybride 275 und AF2 unter Gewächshausbedingungen, die in den Jahren 2012 und 2016 durchgeführt wurden und den damit verbundenen Problemen der Reproduzierbarkeit der Umweltbedingungen in einem Kaltgewächshaus wird aufgezeigt, dass dennoch Topfexperimente zur Charakterisierung der frühen Pflanzenentwicklung geeignet sind und eine gute Methode darstellen, um auf dieser Basis eine Selektion durchführen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Versuchsaufbau

In den Jahren 2012 und 2016 wurden Experimente zum Wuchsverhalten der drei Standardsorten AF2 (*P. nigra* x *P. deltoides*), Hybride 275 (*P. maximowiczii* x *P. trichocarpa*) und Max 3 (*P. nigra* x *P. maximowiczii*) (Abbildung 1) im Versuchsgewächshaus „Hetzdorf“ (50,96°N, 13,45°O) der Technischen Universität Dresden über einen Zeitraum von jeweils 65 Tagen durchgeführt. Kommerziell erworbene Steckhölzer (20 cm lang, Durchmesser maximal 1,5 cm; P&P Dienstleistungs GmbH und Co. KG, Großthiemig) wurden im Topfexperiment in jeweils zwei Gruppen aufgeteilt, wobei die Gruppe „feucht“ jeweils optimal und die zweite Gruppe „trocken“ reduziert bewässert wurde. Die Steckhölzer wurden vor dem Stecken in 2l Pflanztöpfe (4 x 4 Bodenlöcher, L x B x H: 11,3 x 11,3 x 21,5 cm) nach Homogenität sortiert, d. h. annähernd gleicher Durchmesser pro Versuchsansatz/Genotyp und gleiche Anzahl der Knospen, Aussortieren von beschädigten Steckhölzern. Jeder Topf wurde mit nur einem Steckholz bestückt. Die Stecktiefe betrug ca. 18 cm. Alle Töpfe wurden nummeriert und nach dem Zufallsprinzip auf den Pflanztischen verteilt.

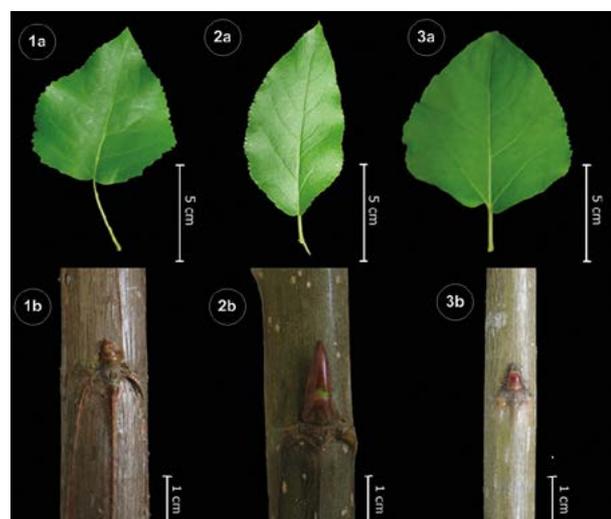


Abbildung 1
Morphologische Differenzierung von Knospe und Blatt der drei Pappelklone AF2 (1a, 1b), Hybride 275 (2a, 2b) und Max 3 (3a, b). Foto: R. Müller

Das Pflanzsubstrat bestand aus 40% gewaschenem Sand und 60% Pflanzerde (Einheitserde Typ ED 73; Hermann Meyer KG, Nossen; Substratzusammensetzung: Boden pH 5,7, Na 0,2 mg/l, K 2,2 - 2,5 mg/l, Ca 25,2 - 27,8 mg/l, Mg 2,5 - 2,7 mg/l, Mn 0,1 mg/l).

Da das Gewächshaus über keine automatische Temperaturregelung verfügt, wurde der Versuchsansatz in Abhängigkeit von den Außentemperaturen des jeweiligen Jahres gestartet.

Um zunächst ein Wurzel- und Sprosswachstum zu induzieren und allen Versuchspflanzen die gleichen Startbedingungen zu geben, wurden alle mit Steckhölzern bestückten Pflanztöpfe während der ersten 20 Tage nach dem Stecken automatisch „über Kopf“ optimal bewässert (Einstellung des Bodenwassergehaltes [Vol.-% BWG] zwischen 17 und 23 Vol.%, relative Luftfeuchte [rH] von ca. 90%). Nach dieser Phase wurde das Pflanzenmaterial auf je zwei Gruppen je Genotyp bzw. Sorte aufgeteilt. Die eine Gruppe wurde weiterhin optimal bewässert, die zweite Gruppe wurde manuell bewässert wobei die Substratfeuchte auf 8 bis maximal 14 Vol.-% BWG eingestellt wurde (HH2-Messgerät, UP Umweltanalytische Produkte GmbH, Deutschland). Der BWG war gerade hoch genug, um Welkeerscheinungen zu vermeiden (Vorversuche hier nicht gezeigt). Die relative Luftfeuchte wurde in dem Trockenabteil des Gewächshauses auf durchschnittlich 68% reduziert.

Am Ende des Versuches wurden die Pflanzen vermessen, d.h. die Länge des längsten Sprosses sowie die Blattfrischmasse bestimmt. Die Adventivwurzeln wurden vorsichtig vom Pflanzsubstrat gereinigt, ebenfalls gewogen und die jeweils längste Wurzel vermessen. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial bei 105 °C für 3 bis 4 Tage zur Bestimmung der Blatt- und Wurzeltrockenmasse ofengetrocknet.

In 2012 wurden insgesamt 60 Pflanzen und in 2016 insgesamt 208 Pflanzen in den Versuch einbezogen.

2.2 Statistische Methoden

Alle Grafiken wurden mit Xact, Version 8.03, SciLab, Hamburg erstellt. Die Statistik wurde mit RStudio, Version 1.1383 und R Version 3.4.3 durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten abhängiger Variablen wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests innerhalb der durch die ‚Sorten‘ beziehungsweise ‚Bewässerungsvarianten‘ definierten Gruppen geprüft ($\alpha = 0,05$). Signifikante Unterschiede der Sorte und Variante zwischen den beiden Jahren wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,05$) bestimmt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Zusammenhang mit der Züchtung von landwirtschaftlichen Kulturpflanzen werden keine Mühen und Kosten gescheut, um Methoden einer präzisen und robusten Phänotypisierung durch Vollautomatisierung unter kontrollierten Gewächshausbedingungen immer effizienter zu gestalten,

um somit die Generierung von Datensätzen den Erfordernissen einer Verknüpfung mit genetischen und genomischen Daten anzupassen (u. a. Fiorani et al., 2012). Die Ergebnisse derartiger Untersuchungen haben in der Regel das Ziel, die Biomasseregulation von Pflanzen besser zu verstehen und schließlich dazu beizutragen, neue Züchtungsprodukte mit verbesserten Eigenschaften für den Markt zu entwickeln. Ein derartiger Ansatz wird in der forstlichen Züchtungsforschung aus verschiedenen Gründen bislang nicht verfolgt (Krabel et al. 2015a, 2015b). Die Phänotypisierung forstlicher Züchtungsprodukte erfolgt zumeist im Feld unter natürlichen Umweltbedingungen und zu einer Zeit, in der die Bäume bereits mehrere Jahre bis Jahrzehnte alt und interessierende Eigenschaften erkennbar sind. Durch variierende Umweltbedingungen im Freiland, selbst bei Verwendung von genetisch einheitlichem Material, zeigen die Pflanzen jedoch eine an die jeweiligen Umweltbedingungen (Klima, Boden) angepasste Wuchsdynamik, die zu erheblichen Streuungen in den phänotypischen Datensätzen führen kann. Die Verknüpfung der phänotypischen mit genetischen und genomischen Daten wird dadurch stark erschwert. Abgesehen davon, ist eine Wiederholung der Experimente nicht möglich, da unter natürlichen Verhältnissen kaum zweimal exakt die gleichen Umweltbedingungen auftreten. Selbst an einem Standort kann die Reaktion auf mikroklimatische Unterschiede die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Die Schaffung von mehr oder weniger einheitlichen Wuchsbedingungen über einen definierten Zeitraum kann dieses Problem lösen oder zumindest reduzieren.

Je nach Fragestellung kann deshalb die Entwicklung von standardisierten Methoden zur Phänotypisierung von jungen Bäumen im Gewächshaus hilfreich sein. So ist die Erzeugung statistisch akzeptabler Datensätze möglich. Die Experimente können wiederholt werden und die Daten aus verschiedenen Experimenten können miteinander verglichen und im Idealfall zusammengefasst werden. Schließlich können diese Erkenntnisse als Basis oder Ergänzung für Freilandversuche dienen.

3.1 Rahmenbedingungen

Da es sich bei dem Versuchsgewächshaus in Hetzdorf um ein Kalt-Gewächshaus ohne Temperatursteuerung handelt, unterscheiden sich die Temperaturverläufe in beiden Versuchsperioden und beinhalten Temperaturschwankungen während des jeweiligen Untersuchungszeitraumes (Abbildung 2).

Die höheren Temperaturen während der Versuchsphase 2016 machen sich insofern bemerkbar, als damit verbunden die relative Luftfeuchte (rH) der beiden Behandlungsvarianten „feucht“ und „trocken“ deutlich über den Werten von 2012 liegen. Für die Variante „feucht“ liegen sie in 2016 im Mittel bei 98% und für Variante „trocken“ bei rund 72%. Im Vergleich zu 2012 lag 2016 die rH für Variante „feucht“ bei durchschnittlich etwa 86% und 64% für die Variante „trocken“.

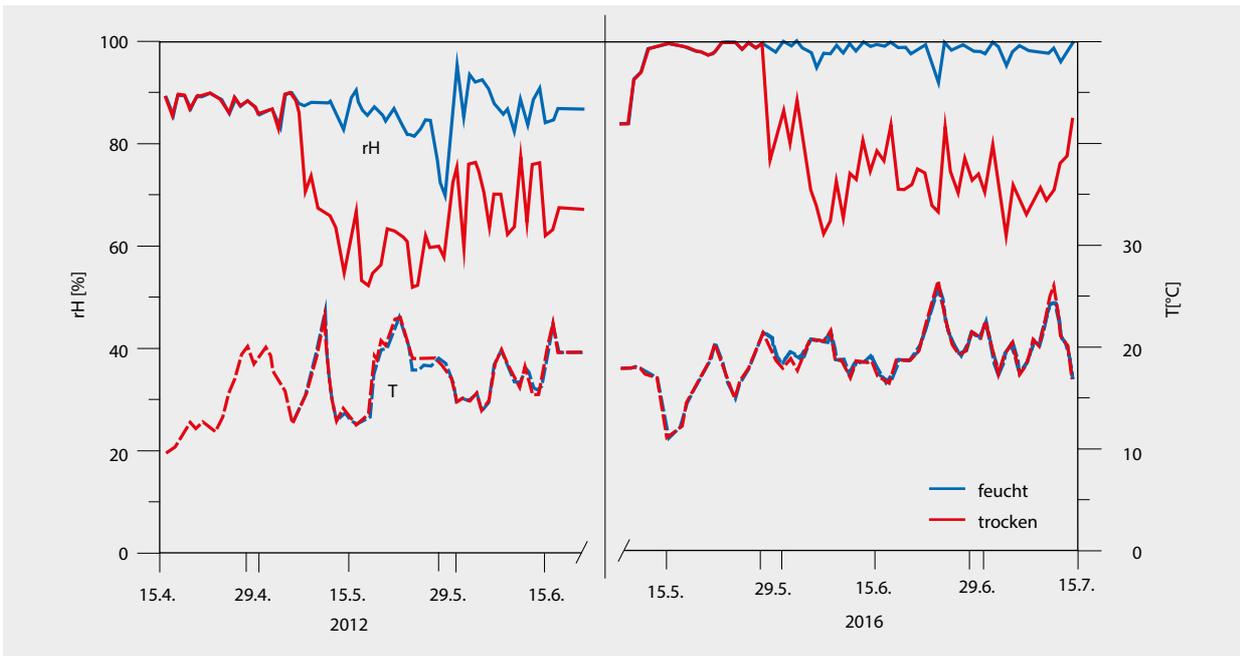


Abbildung 2

Relative Luftfeuchte (rH) und Temperatur (T) in den Gewächshaus-Kammern der Varianten „feucht“ (blau) und „trocken“ (rot) während der Untersuchungszeiträume 2012 und 2016. Während der Anpassungsphase (0 bis 20 Tage nach dem Stecken) erhielten die Pflanzen die gleiche Behandlung (hier: rote Linie).

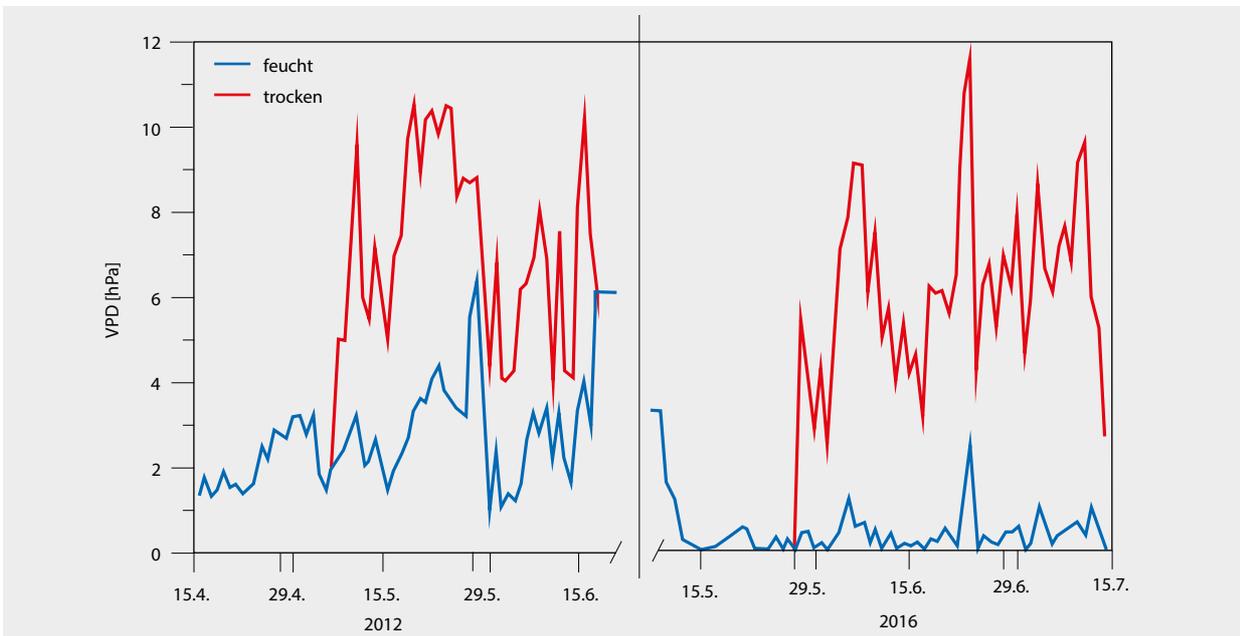


Abbildung 3

Wasserdampf sättigungsdefizit der Luft (VPD) während der Versuchsperiode in den Jahren 2012 und 2016 für die Behandlungsvariante „feucht“ (blau) und „trocken“ (rot). Während der Anpassungsphase (0 bis 20 Tage nach dem Stecken) erhielten die Pflanzen die gleiche Behandlung (blau).

Die Darstellung des Wasserdampf sättigungsdefizits der Luft (VPD), welches als Antrieb für die pflanzliche Transpiration und damit als aussagekräftigerer Parameter als die relative Luftfeuchte gilt, verdeutlicht, dass zwischen beiden Jahren in der Variante „trocken“ mit einem Wert von durchschnittlich

6,77 hPa in 2012 und 7,22 hPa in 2016 vergleichsweise geringere Unterschiede auftreten als in der gut bewässerten Variante (2012: 0,43 hPa; 2016: 3,1 hPa). Die kurzzeitigen Schwankungen im Verlauf der Kurven erklären sich durch „Störungen“, die beim Betreten und Arbeiten in den

Gewächshauskammern von der Messtechnik registriert werden. Alle weiteren Parameter wie Pflanzenqualität, Substratzusammensetzung, Bewässerungsintervalle waren für beide Jahre vergleichbar.

3.2 Ober- und unterirdisches Wachstum

Eine deutliche Reaktion im Wuchsverhalten, sowohl ober- als auch unterirdisch ist in Bezug auf den Wassergehalt des Bodens feststellbar. So führt die Behandlungsvariante

„trocken“ mit einer Reduktion des Bodenwassergehaltes um rund 10 Vol.-% im Vergleich zur Variante „feucht“ bei allen drei Sorten zu einer ausgeprägten Depression des Sprosswachstums und bei den Sorten AF2 und Max 3 auch des Wurzelwachstums (Abbildung 4a, b, c, d). Dass die frühe Wurzel- und Sprossentwicklung von Pappelsteckhölzern unter genetischem Einfluss steht sowie durch den Umweltfaktor „Bodenwasser“ beeinflusst wird, wird von anderen Autoren, deren Untersuchungen ebenfalls auf die frühe Entwicklung von Pappelstecklingen fokussiert waren bestätigt

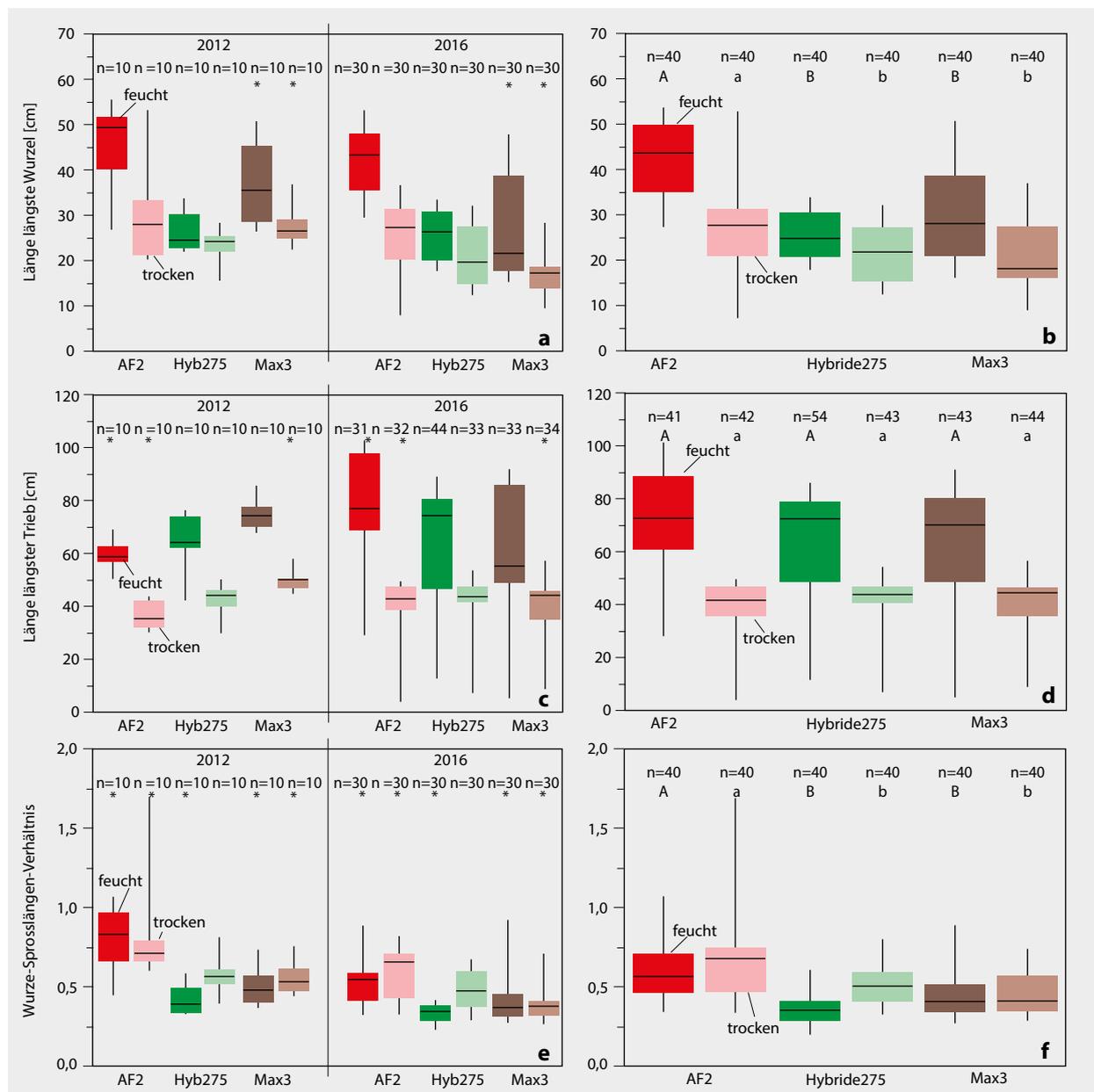


Abbildung 4a, b, c, d, e und f

Länge der längsten Wurzel, des längsten Triebes und des Wurzel-Sprosslängen-Verhältnisses jeweils getrennt für die Jahre 2012 und 2016 (links) bzw. alle Werte zusammengefasst (rechts), gemessen 65 Tage nach dem Stecken. Dargestellt sind die Daten als Boxplots der drei Sorten in der Variante „feucht“ und der Variante „trocken“. Sternchen * markieren signifikante Unterschiede der Sorte und Variante zwischen den beiden Jahren. Die Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen der feuchten Variante der drei Sorten, die Kleinbuchstaben der trockenen Variante ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test); n entspricht der Anzahl der untersuchten Pflanzen.

(Dickmann et al., 2001; Regier et al., 2009; Wiese et al., 2006; Zalesny et al., 2005; Zalesny und Zalesny, 2009).

Diese Reaktion ist besonders deutlich, betrachtet man die beiden Versuchsjahre zunächst getrennt.

Das Verhältnis der „trockenen“ zur jeweils „feuchten“ Variante einer Sorte ist in beiden Versuchsjahren ähnlich, unterscheidet sich jedoch in der tatsächlichen Länge der Wurzel bzw. des Triebes z. T. signifikant zwischen den Jahren. Auch weisen die Ergebnisse des Jahres 2016 eine höhere Varianz auf. Vergleicht man das Längenwachstum des jeweils längsten Triebes der drei Sorten miteinander, so fällt auf, dass Hybride 275 zwischen beiden Jahren keine signifikanten Unterschiede erkennen lässt, während AF2 für beide Varianten und Max 3 in der Variante „trocken“ signifikante Unterschiede zwischen 2012 und 2016 zeigt. Auch für das Längenwachstum der Wurzel scheint Hybride 275 stabiler auf die jeweiligen Gewächshausbedingungen zu reagieren als die beiden Vergleichssorten. Diese Unterschiede lassen darauf schließen, dass die Umweltfaktoren „VPD und Bodenwasser-gehalt“ zumindest für die Sorten AF2 und Max3 stärker auf das Wachstum wirken als es für Hybride 275 der Fall ist.

Die Zusammenfassung der Daten (jeweils rechte Grafik) aus der Versuchsperiode 2012 und 2016 (Abbildung 4b) zeigt, dass AF2 in beiden Behandlungsvarianten signifikant längere Wurzeln ausbildet als die beiden anderen Sorten, die ein vergleichbares Wachstum zeigen. Dieses geht einher mit einer ebenfalls signifikant höheren Wurzelmasse (Abbildung 5a).

In Bezug auf das Merkmal „längster Trieb“ bleibt der Behandlungseffekt („trocken“ bzw. „feucht“) bei den gepoolten Daten bestehen, der Sorteneffekt entfällt jedoch. Zwischen den Sorten können keine signifikanten Unterschiede in beiden Behandlungsvarianten festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als die zuvor beschriebenen Unterschiede aus den Einzeljahr-Beobachtungen aufgehoben werden. Die genotypspezifischen Differenzen, die unter identischen Umweltbedingungen zum Tragen kommen, verringern sich in ihrer Relevanz oder können gar nicht mehr nachgewiesen werden, sobald die Daten aus Versuchen mit geringfügig variierenden Umweltbedingungen stammen, und die Replizierbarkeit damit nur eingeschränkt gegeben ist.

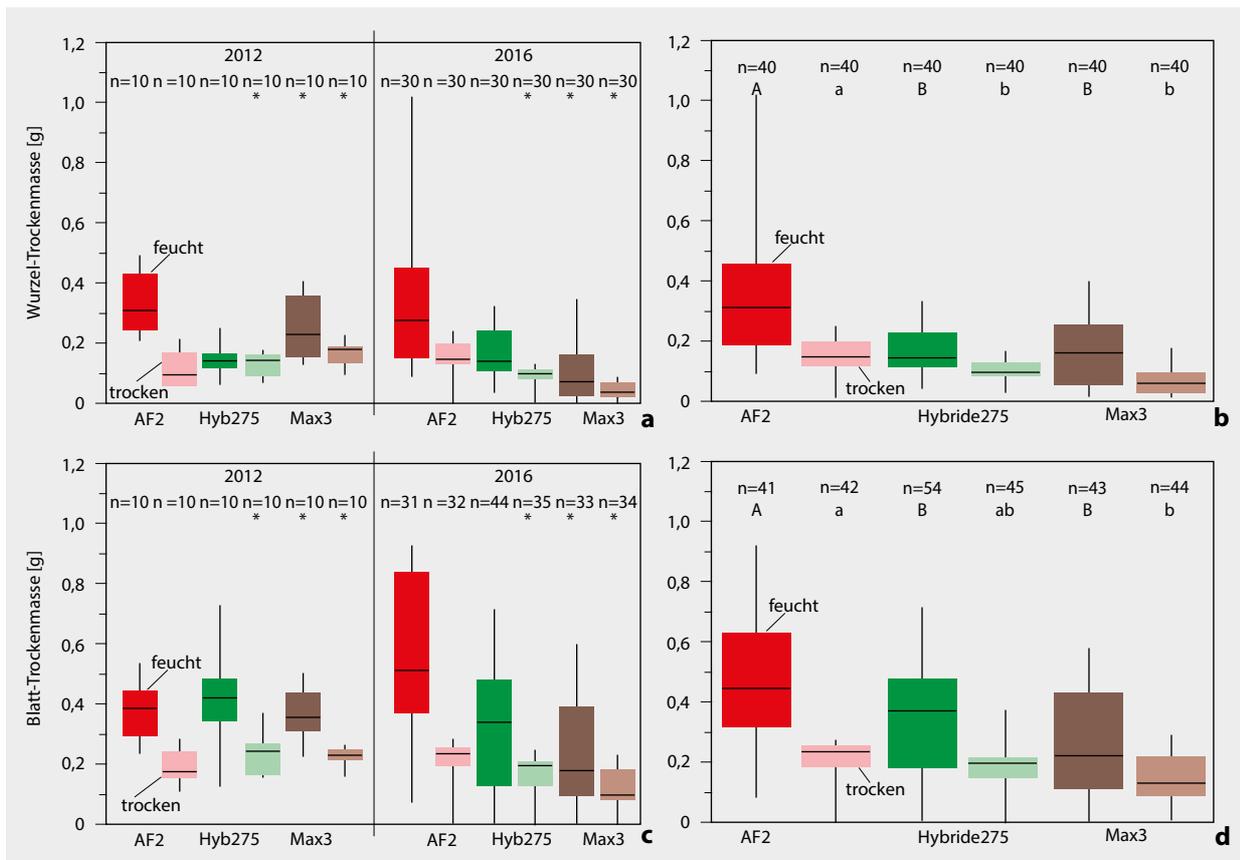


Abbildung 5a, b, c, d

Wurzel- und Blatt-Trockenmasse, geerntet 65 Tage nach dem Stecken. Dargestellt sind die Daten als Boxplots der drei Sorten in der Variante „feucht“ und der Variante „trocken“ in den beiden Jahren 2012 und 2016 (links) bzw. alle Werte zusammengefasst (rechts), gemessen 65 Tage nach dem Stecken. Sternchen * markieren signifikante Unterschiede der Sorte und Variante zwischen den beiden Jahren. Die Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Variante „feucht“ der drei Sorten, die Kleinbuchstaben der Variante „trocken“ ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test); n entspricht der Anzahl der untersuchten Pflanzen.

Das Wurzel-Sprosslängen-Verhältnis in der zusammengefassten Darstellung (Abbildung 4f) erhöht sich mit reduzierter Bodenfeuchte bei den Sorten AF2 und Hybride 275, während Max3 zwischen den Behandlungsvarianten keinen Unterschied erkennen lässt. Betrachtet man die beiden Versuchsjahre getrennt (Abbildung 4e), lassen sich diese Verhältnisse im Jahr 2016 wiederfinden. Im Versuchsjahr 2012 dagegen haben die trockengehaltenen Pflanzen der Sorte AF2 ein geringeres Wurzel-Sprosslängen-Verhältnis als die der gut bewässerten Variante und zeigen somit ein konträres Ergebnis. Dieses Merkmal weist auch die meisten signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Jahren auf. Die Daten von AF 2 und Max 3 für 2012 (beide Behandlungsvarianten) und Hybride 275 Variante „feucht“ unterscheiden sich signifikant von den Daten aus 2016.

Auffällig ist wiederum, dass Hybride 275 für beide Behandlungsvarianten und für beide Untersuchungszeiträume nur eine vergleichsweise geringe Schwankungsbreite der Daten zeigt, was als phänotypische Stabilität dieses Merkmals und Sorte gegenüber schwankenden Umweltbedingungen interpretiert werden kann.

3.3 Replizierbarkeit

Die Replizier- und Reproduzierbarkeit der Versuche kann für die Phänotypisierung von Pflanzen eine besondere Herausforderung darstellen. Aus der Pflanzenzüchtung ist bekannt, dass unter verschiedenen Genotypen, einer in einem Jahr das beste Wachstum zeigt, während er im nächsten Jahr nur durchschnittliche Werte erkennen lässt (Annicchiarico, 2002). Diese Variabilität wird im Allgemeinen als Variabilität zwischen den Jahren beschrieben und durch wechselnde Umweltbedingungen erklärt. Reproduzierbarkeit und eine bessere Replizierbarkeit der Ergebnisse können durch eine striktere Kontrolle der Umweltbedingungen in Gewächshäusern erreicht werden (Poorter et al., 2012a, 2012b). Doch selbst unter Bedingungen von vollautomatisierten Klimakammern zeigen Pflanzen in verschiedenen Versuchsanordnungen oftmals eine unterschiedliche Wuchsdynamik und Charakteristik (Poorter et al., 2012a, 2012b).

Die eigenen Untersuchungen machen deutlich, dass die beobachtete Variabilität der Ergebnisse auch bei den untersuchten Pappelsorten registriert werden kann, sobald die Umweltfaktoren von einem Jahr zum nächsten nicht mehr absolut identisch sind. Diese Reaktion ist im vorliegenden Fall für die Variablen „längster Trieb“ und „längste Wurzel“ von Hybride 275 weniger ausgeprägt als von AF2 oder Max 3.

4 Fazit

Die Ergebnisse der Topfversuche, die im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass der abiotische Umweltfaktor Wasserverfügbarkeit sowie der genetische Faktor Sorte einen Einfluss auf die frühe Spross- und Wurzelentwicklung von Pappelsteckhölzern haben, der bereits nach einer kurzen Versuchsdauer

(hier: 65 Tage) deutlich wird. Für die Extraktion bestimmter Wachstumsparameter ist somit die Anlage von Topfversuchen im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen auch für forstlich relevante Baumarten sinnvoll.

Die Auswertungen haben ergeben, dass die Variablen des oberirdischen- und des Wurzelwachstums durch spezifische Umwelteffekte beeinflusst werden. Am Beispiel von Hybride 275 wird deutlich, dass einige Genotypen stabiler gegenüber unterschiedlichen Umweltbedingungen (hier: Luftfeuchte und Temperaturunterschiede zwischen den Versuchsjahren) sind. Sie reagieren mit weniger ausgeprägten phänotypischen Unterschieden, als andere Genotypen wie z. B. die Sorten Max 3 oder AF2.

Ferner wird deutlich, dass bei der Interpretation der Daten alle Rahmenbedingungen mit einbezogen werden müssen, um die Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang einordnen zu können und dass für die Vergleichbarkeit von unterschiedlichen Studien eine detaillierte Material- und Methodenbeschreibung, so wie es u. a. von Poorter et al. (2012b) und Kawaletz et al. (2014) bereits gefordert wird, essentiell ist.

Danksagung

Wir danken der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR e.V.) sowie dem Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung (BMEL) für die Projektförderung. Zwei unbekanntem Gutachtern danken wir für wertvolle Hinweise zur Verbesserung des Manuskriptes. Das Projekt-Akronym lautet „FastWOOD III“ (Teilprojekt Nr. 5, Projektkennziffer: 22000814).

Literatur

- Annicchiarico P (2002) Genotype X environment interaction : challenges and opportunities for plant breeding and cultivar recommendations. FAO Plant Prod Prot Pap 174:115
- Dickmann DI, Isebrands JG, Blake TJ, Kosola K, Kort J (2001) Physiological ecology of poplars. In: Dichmann DI, Isebrands JG, Eckenwalder JE, Richardson J (eds) Poplar culture in North America. Ottawa : Nat Res Council Canada, pp 77-118
- Fiorani F, Jahnke S, Rascher U, Schurr U (2012) Imaging plants dynamics in heterogenic environments. Curr Opin Biotechnol 23(2):227-235
- Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Thioux JJ, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A, Muller B, Simonneau T, Tardieu F (2006) PHENOPSIS - an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in Arabidopsis thaliana permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. New Phytol 169:623-635
- Kawaletz H, Mölder I, Annighöfer P, Terwei A, Zerbe S, Ammer C (2014) Pot experiments with woody species : a review. Forestry 87(4):482-491
- Krabel D, Solger A, Meyer M, Carvalho P, Foulkes J (2015a) Early root and aboveground biomass development of hybrid poplars (Populus spp.) under drought conditions. Can J For Res 45(10):1289-1298
- Krabel D, Solger A, Meyer M (2015b) Einfluss des Steckholzes auf die frühe Sprossentwicklung von Pappeln. Forstarchiv 86(6):159-165
- Krabel D, Meyer M, Nyamjav B, Reiche B, Solger A (2017) Phenotyping trees for traits related to drought stress tolerance : importance and challenge [online]. Zu finden in <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183050571>> [zitiert am 25.06.2018]

- Nagel KA, Putz A, Gilmer F, Heinz K, Fischbach A, Pfeifer J, Faget M, Bloßfeld S, Ernst M, Dimaki C, Kastenholz B, Kleinert A-K, Galinski A, Scharr H, Fiorani F, Schurr U (2012) GROWSCREEN-Rhizo is a novel phenotyping robot enabling simultaneous measurements of root and shoot growth for plants grown in soil-filled rhizotrons. *Funct Plant Biol* 39:891-904
- Poorter H, Climent J, van Dusschoten D, Bühler J, Postma JA (2012a) Pot size matters : a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Funct Plant Biol* 39(11):839-850
- Poorter H, Fiorani F, Stitt M, Schurr U, Finck A, Gibon Y, Usadel B, Munns R, Atkin OK, Tardieu F, Pons T (2012b) The art of growing plants for experimental purposes : a practical guide for the plant biologist. *Funct Plant Biol* 39:821-838
- Regier N, Streb S, Cocozza C, Schaub M, Cherubini P, Zeemann SC, Frey B (2009) Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) clones : contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. *Plant Cell Environ.* 32: 1724-1736
- Wiese AH, Zalesny JA, Donner DM, Zalesny RS (2006) Bud removal effects shoot, root, and callus development of hardwood *Populus* cuttings. *Silvae Genet* 55(3):141-147
- Zalesny RS, Riemenschneider DE, Hall RB (2005) Early rooting of dormant hardwood cuttings of *Populus* : analysis of quantitative genetics and genotype x environment interactions. *Can J For Res* 35(4):918-929
- Zalesny RS, Zalesny JA (2009) Selecting *Populus* with different adventitious root types for environmental benefits, fiber, and energy. In: Niemi K, Scagel C (eds) *Adventitious root formation in forest trees and horticultural plants : from genes to applications*. Kerala : Res Signpost, pp 359-384

Poplar clones differ in their resistance against insects feeding

Hilke Schroeder and Matthias Fladung*

Abstract

Short rotation coppices of poplars are often ecologically and genetically restricted because of the cultivation of only one or few clones. This leads to a suboptimal relation between the plants and the associated insects. This is true for beneficial insects but in particular also for the insect pest species damaging the poplars. In the case of an insect attack in such plantations, the damage is often higher than in forests at ecological equilibrium or in plantations with higher plant-based biodiversity because of different plant species and clones. In the years 2012 to 2016, on that background an assessment of insect pest species and leaf area loss was performed to identify the resistance of different poplar (genus *Populus*: Malpighiales, Salicaceae) clones against insect pests. Due to an assessment once a year in June, only a low number of sawfly and butterfly caterpillars were found. In the first line, beetles belonging to different families have been found on the poplar clones. The main defoliator in the years 2012 to 2015 has been *Chrysomela populi* (Coleoptera, Chrysomelidae). Furthermore, beetles belonging to the genus *Phratora* sp. have been found. In the years 2012 to 2015, the abundance of the willow leaf beetles *Phratora* sp. was low whereas in the year 2016 this beetle was the main defoliator and present in a remarkable higher amount than the poplar leaf beetle *C. populi*. The leaf area loss and the presence of the main defoliating insects have been used to create a ranking of the 20 investigated poplar clones due to their susceptibility or resistance to insects feeding, respectively.

Keywords: *poplar, clones, chrysomelid beetles, resistance, susceptibility*

Zusammenfassung

Pappelklone unterscheiden sich in ihrer Toleranz gegenüber Insektenfraß

Pappel-Energieholzplantagen sind aufgrund des Anbaus nur eines oder weniger Klone häufig in ihrer genetischen und damit auch ökologischen Variation eingeschränkt. Das führt zu einem suboptimalen Verhältnis zwischen den Pflanzen und den mit ihnen assoziierten Insekten. Das gilt sowohl für die Nützlinge als aber vor allem auch für die Schädlinge. Werden diese Pflanzkulturen von Insekten befallen, ist der Schaden häufig größer als bei einem ökologisch ausgeglichenen Wald oder Forst bzw. auch als bei einer Plantage mit höherer Biodiversität auf Seiten der angepflanzten Baumarten und Klone. Vor diesem Hintergrund wurde die Toleranz verschiedener Pappelklone (Gattung *Populus*: Malpighiales, Salicaceae) gegen Schaderreger in den Jahren 2012 bis 2016 anhand von Insekten- und Blattverlust-Bonituren ermittelt. Bedingt durch eine einmalige Aufnahme im Juni jeden Jahres wurden nur wenige Blattwespen- und Schmetterlingslarven gefunden. Überwiegend waren Käfer verschiedener Familien an den Pappeln zu finden. Als Hauptschaderreger in den Jahren 2012 bis 2015 wurde *Chrysomela populi* (Coleoptera, Chrysomelidae) identifiziert. Außerdem wurden Käfer der Gattung *Phratora* (Coleoptera, Chrysomelidae) an den Pappelklonen gefunden. Die Abundanz des Weidenblattkäfers *Phratora* sp. war in den Jahren 2012 bis 2015 eher gering, während im Jahr 2016 der Weidenblattkäfer als Hauptschaderreger in deutlich größerer Anzahl auftrat als der Pappelblattkäfer *C. populi*. Aus dem Blattverlust und der Präsenz der Hauptschaderreger wurde eine Rangfolge der untersuchten 20 Pappelklone bezüglich ihrer Anfälligkeit bzw. Toleranz gegenüber Insektenfraß erstellt.

Schlüsselworte: *Pappel, Klone, Blattkäfer, Toleranz, Anfälligkeit*

* Johann Heinrich von Thünen Institut, Institut für Forstgenetik, Sieker Landstraße 2, 22927 Großhansdorf

1 Introduction

The genus *Populus* is one of the world's most important tree genera. High growth rates, particularly of some interspecies hybrids, and a broad range of applicability, in wood and paper industries and for energy production, led to their widespread cultivation in Europe and North America (Dickman and Stuart, 1983; Stettler et al., 1996). Consequently, different poplar species and clones are used for biomass production in short rotation coppices (SRC). Here in particular interspecies-hybrids are well suited because of their superior growth and advanced resistance traits. In general, SRC are composed of only a low number of clones leading to a decrease of ecological and genetic variation. The risk of insects attacks increases with the decrease of biodiversity (Splechtna and Glatzel, 2005). Thus, insect pests and other pathogens cause higher damage in monocultures than in ecologically balanced forests because of the lower genetic and therefore lower ecological diversity in monocultures (Splechtna and Glatzel, 2005; Helbig et al., 2011). Consequently, a few years after establishing of new coppices, a mass reproduction of insect pests causing severe damage is possible. In contrast, high biodiversity, offering a system with a lot of ecological niches, benefits antagonists of the pest species. Furthermore, for some herbaceous and rice plants even an increase of biomass could be observed when growing in genotype mixture instead of monoculture. For example, tall goldenrod (*Solidago altissima*) produced 46% more biomass than predicted when grown in mixtures than when grown in monocultures (Crutsinger et al., 2008). Zhu et al. (2000) found that rice yield increased with genotypic diversity explained with a reduction of disease infection in diverse mixtures compared to monocultures.

Thus, possible solutions for minimizing the danger of defoliation by pest insects are breeding of poplar species or clones resistant against insects feeding and planting of clone mixtures enhancing the genetic diversity of poplar SRCs. For this purpose, the knowledge of resistance levels of poplar clones or species against insects feeding is necessary. Following this task, one aspect of the FNR funded project FastWOOD deals with the assessment of resistance levels of different poplar clones against herbivorous insects.

2 Material and Methods

2.1 Study sites and poplar clones

Twenty poplar clones grown on nine different study sites in Germany (Table 1) have been chosen for the evaluation of the resistance level of different poplar clones. The study sites have been setup during the first and second phase of the FastWOOD project in the years 2010 to 2014 (Table 1). The poplar clones are comprised of four different *Populus* species (*P. trichocarpa*, *P. maximowiczii*, *P. deltoides*, and *P. nigra*) in different crosses within section as well as between sections. Most of them are registered clones, only the four named with "NW" are newly bred ones by the NW-FVA

(Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden, Germany). The number of different clones varied from four to 15 clones per study site (Table 2).

At all study sites, the clones were arranged in plots. Every plot contained 24 to 52 trees of the same clone depending on the study sites. Every study site was composed of four to six repeats for each clone.

Table 1

Characteristics of the study sites used for assessment of foliage damage and herbivorous insects. Two dates in the columns "Harvest" means December/January.

Study site	Location	Setup	Harvest 1	Harvest 2
1 Lehm bach (SPF)	Bavaria	April 2010	2012/2013	2015/2016
2 Thammenhain	Saxony	2010	2012/2013	Feb. 2016
3 Trenthorst	Schleswig-Holstein	April 2010	2014/2015	
4 Stiedenrode'11	Hesse	2011	2013/2014	
5 Stiedenrode'13	Hesse	2013	2015/2016	
6 Stölzingen	Hesse	2010	2012/2013	2015/2016
7 Seeburg	Hesse	2014		
8 Wallstawe'10	Saxony-Anhalt	2010	2012/2013	2015/2016
9 Wallstawe'11	Saxony-Anhalt	2011	2013/2014	2016/2017

2.2 Assessment of foliage damage and presence of insects

In the years 2012 until 2015, thirty trees of each clone at each site where the clone is present have been assessed for defoliation level and presence of insects once per year in June. In the year 2016, only four study sites with eight clones in total have been examined.

To guarantee a standardized assessment, a scheme was developed and given to all persons involved in the assessment. First of all, five trees per plot were selected in the first year, and the same five trees were assessed in the following years as far as possible. The five trees were located in the middle of each plot to avoid border effects. For the assessment of foliage damage and insects, the whole tree was inspected. The foliage damage was assessed in 10% steps, where 0% was no damage and 100% complied with total defoliation. Furthermore, species have been determined and number of insects has been documented in four steps of (1) no insects observed ("none"), (2) up to ten insects ("low"), (3) more than ten and up to 29 ("medium"), and (4) equal or more than 30 insects ("high") per tree. As far as possible, the insects were determined directly at the study sites. For this purpose, a leaflet with short descriptions and photos of the most common and therefore expected insect species (beetles and their larvae as well as caterpillars) was developed and given to the observers. In rare cases insects or photos of insects were sent to us for a more detailed determination.

Table 2

Detailed information for occurrence of each clone at the different study sites in alphabetical order and the years of assessment. "X" = the clone is nonexistent at the specific site or has not been assessed. Numbers of study sites are as given in Table 1.

Clone	Study site								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AF2	2012-2014	2012-14, 2016	2012-2016	2013-2015	2015	2014, 2016	X	2014, 2015	2013-2016
Androscoggin	2012-2014	2012-2014	X	X	X	X	2015	X	X
Hybride275	2012-2014	2012-14, 2016	2012-2016	2013-2015	2015	2014, 2016	2015	2014, 2015	2013-2016
Koreana	X	X	2012-2016	X	X	X	X	X	X
Matrix11	2012-2014	2012-2014	X	X	X	X	2015	X	X
Matrix49	2012-2014	2012-2014	X	X	X	X	2015	X	X
Max1	2012-2014	2012-14, 2016	X	2013-2015	2015	2014, 2016	X	2014, 2015	2013-2016
Max3	2012-2014	X	X	X	X	X	X	X	X
Max4	X	X	2012-2016	X	X	X	X	X	X
Muhle-Larsen	2012-2014	2012-14, 2016	X	2013-2015	2015	2014, 2016	2015	2014, 2015	2013-2016
NW7-177T	2012-2014	2012-14, 2016	X	X	X	2014, 2016	X	2014, 2015	X
NW7-17C	2012-2014	2012-14, 2016	X	X	X	2014, 2016	X	2014, 2015	X
NW7-197S	2012-2014	2012-14, 2016	X	X	X	2014, 2016	X	2014, 2015	X
NW7-204A	2012-2014	2012-14, 2016	X	X	X	2014, 2016	X	2014, 2015	X
OP367	X	X	2012-2016	X	X	X	X	X	X
Robusta	X	X	X	X	X	X	2015	X	X
Rochester	X	X	2012-2016	X	X	X	X	X	X
Trichobel	2012-2014	2012-2014	X	X	X	X	2015	X	X
Weser4	2012-2014	2012-2014	X	X	X	X	2015	X	X
Weser6	2012-2014	2012-2014	X	X	X	X	X	X	X

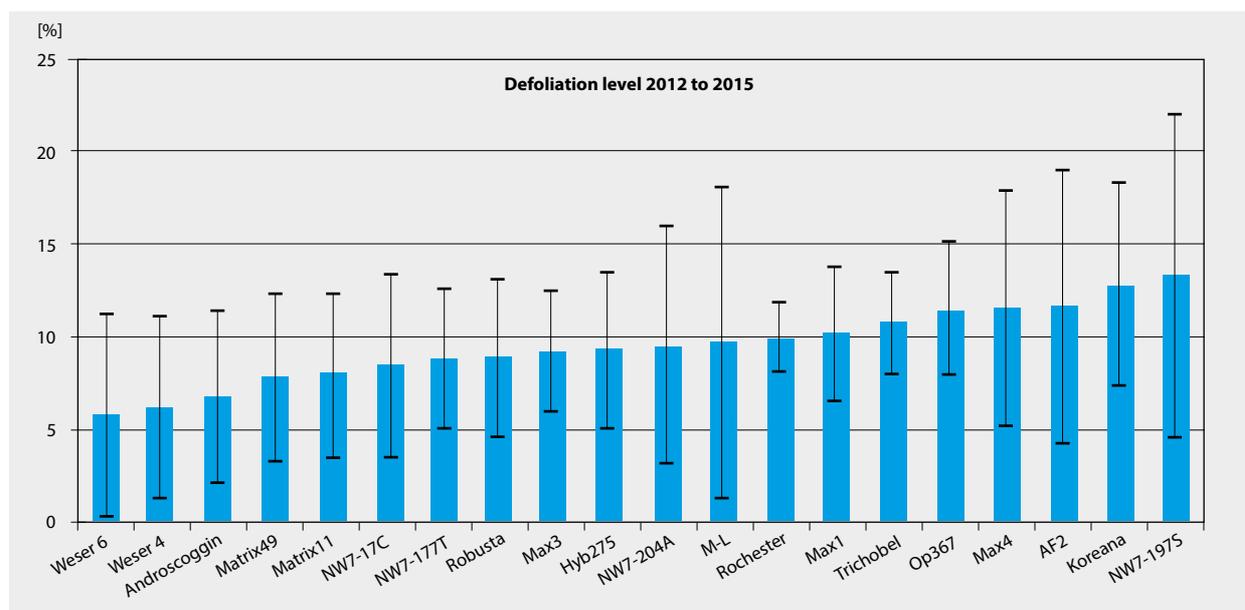


Figure 1

Mean level of defoliation [% leaf area loss] and standard deviation for all investigated study sites and 20 clones for the years 2012 to 2015. M-L = Muhle-Larsen, Hyb275 = Hybride 275.

2.3 Calculation of a clone ranking

The defoliation level and the presence of the three insect species (*Chrysomela populi*, *Phratora* sp., and *Byctiscus populi*) were used to calculate a ranking of the clones due to their "resistance level". For this purpose, the position of each clone in the Figures 1, 3 and 4 and an additional Figure for *Byctiscus populi* (not shown here) were used for the calculation of a sum score (e.g. in Figure 1, the clone 'Weser6' got the value 1 and 'NW7-197S' the value 20. In Figure 3 'Rochester' and 'OP367' both got the value 1 and 'NW7-197S' the value 19). Thus, each clone got four values and this sum was used to perform a ranking from high resistance to susceptibility. Again the calculations for the years 2012 to 2015 and the year 2016 were performed separately.

3 Results

3.1 Defoliation level

Although defoliation can have other reasons than feeding by insects, it is an indication for the overall fitness of trees and, when visible, often an indication for the presence of insects. We calculated the mean defoliation level together for all study sites and all clones because we wanted to analyse the defoliation level for each clone independent of field effects. The overall loss of leaves was low for the four years 2012 to 2015. It was between 5.8% ('Weser6') and 13.4% ('NW7-197S') (Figure 1). In the year 2016, the defoliation level was slightly higher for all eight in this year investigated clones resulting in the lowest level of 10.7% for 'NW7-17C' (8.5% in 2012 to 2015) and the highest level of 14.9% for the clone 'NW7-197S' (Figure 2).

3.2 Main defoliating insects

Besides a small number of sawflies and some individuals of *Cerura vinula* (Lepidoptera, Notodontidae), mainly beetles have been found. As expected, the most often found insect in the years 2012 to 2015 was the poplar leaf beetle, *Chrysomela populi*. This species has been detected on all but two clones ('Rochester', 'OP367') with an amount of up to 35% of all trees for single clones, and mostly in a low to medium number of up to ten to lower than 30 beetles per tree (Figure 3). The two species of the genus *Phratora* (*P. vitellinae*, *P. vulgatissima*) have been combined because they are undistinguishable in the field. They were present at 19 clones, just at the clone 'Rochester' no insects could be observed. *Phratora* sp. has been found mainly in a low number of less than ten beetles per tree (Figure 4). The third observed coleopteran was *Byctiscus populi*, only once *B. betulae* has been found. Thus, these two weevil species also have been combined in the analysis. They were found at only thirteen clones in a low number below ten insects per tree to an amount between 2% and 12% (data not shown).

In 2016, overall much more insects were observed at the trees but with an even greater difference between the clones. In Table 2, the presence of the two insect species *Chrysomela populi* and *Phratora* sp. is shown for the years 2012 to 2015 compared to 2016 for the eight clones observed in 2016. For *Chrysomela populi*, the presence increased from 17% in the years 2012 to 2015 to over 60% in 2016 for the clone 'NW7-177T'. The lowest number in 2016 was observed for the clone 'Hybride 275' with 18% (Figure 5). That was slightly lower than the average of the years before (20%) (Figure 3). For *Phratora* sp., the increase in 2016 was extreme with a presence of insects between 48% and over

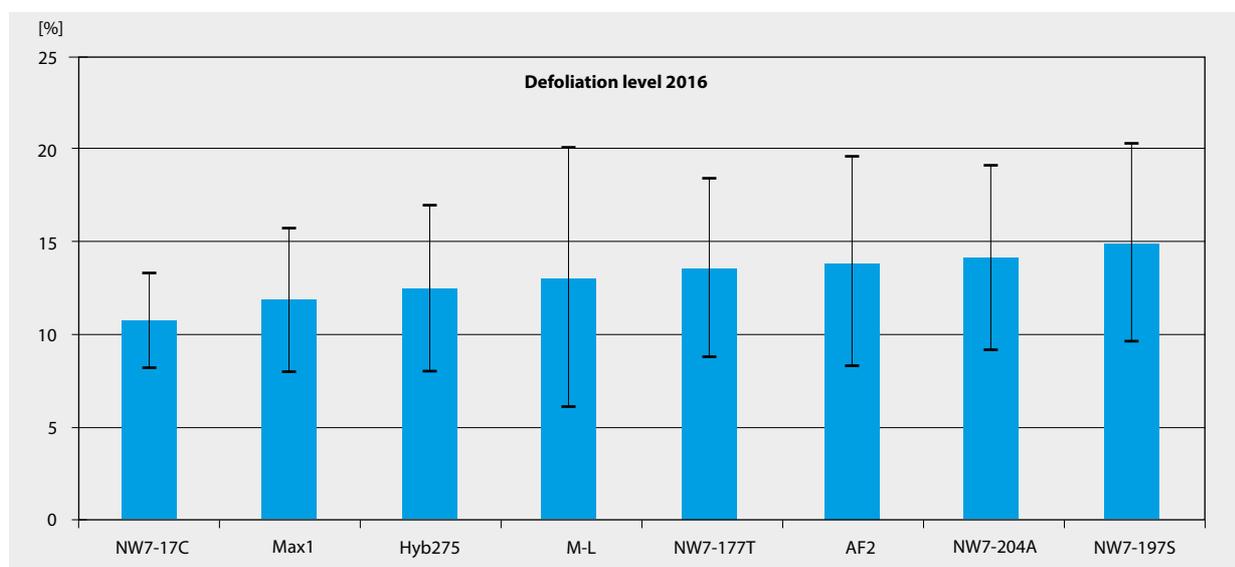


Figure2

Mean defoliation level [% leaf area loss] and standard deviation for the four study sites and eight clones investigated in 2016. M-L = Muhle-Larsen, Hyb275 = Hybride 275.

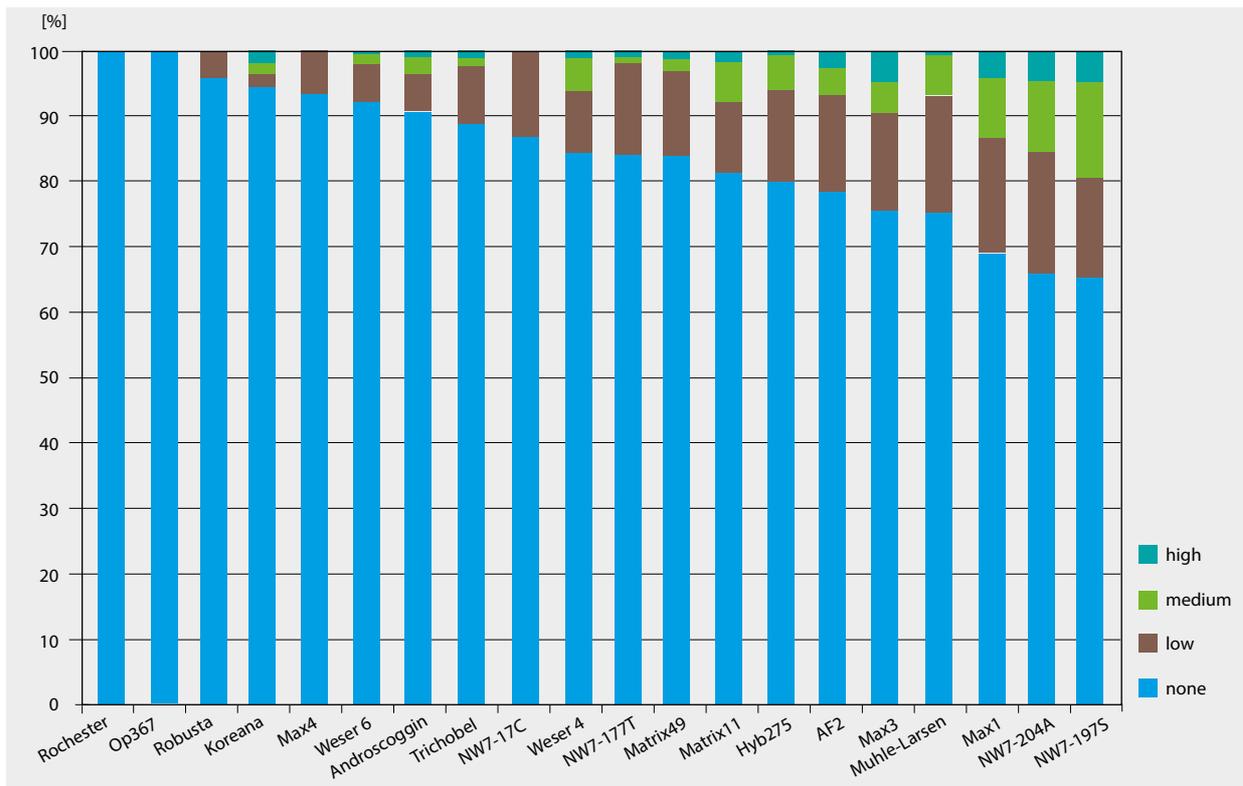


Figure 3
 Distribution of abundance classes [percent of all investigated trees per clone] of *Chrysomela populi* found on the 20 investigated clones on average for the years 2012 to 2015. Hyb275 = Hybride 275.

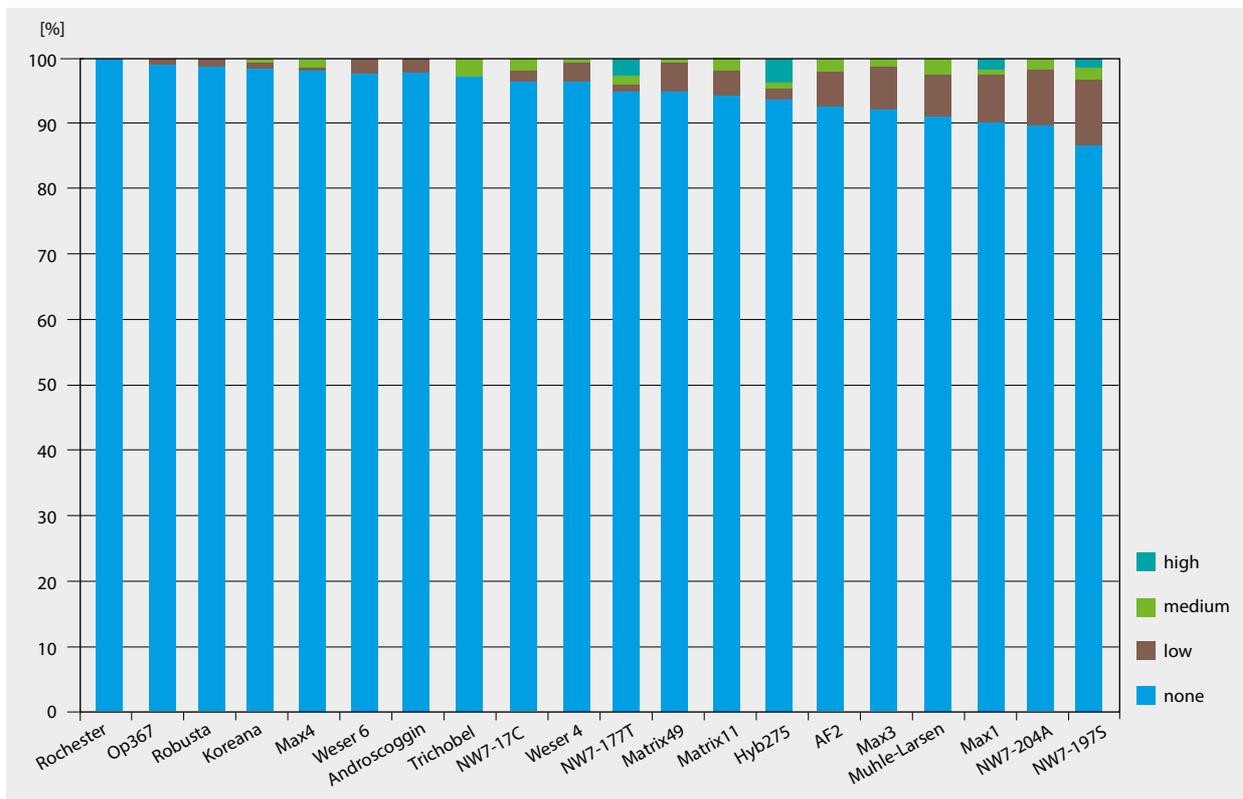


Figure 4
 Distribution of abundance classes [percent of all investigated trees per clone] of *Phratora* sp. found on the 20 investigated clones on average for the years 2012 to 2015. Hyb275 = Hybride 275.

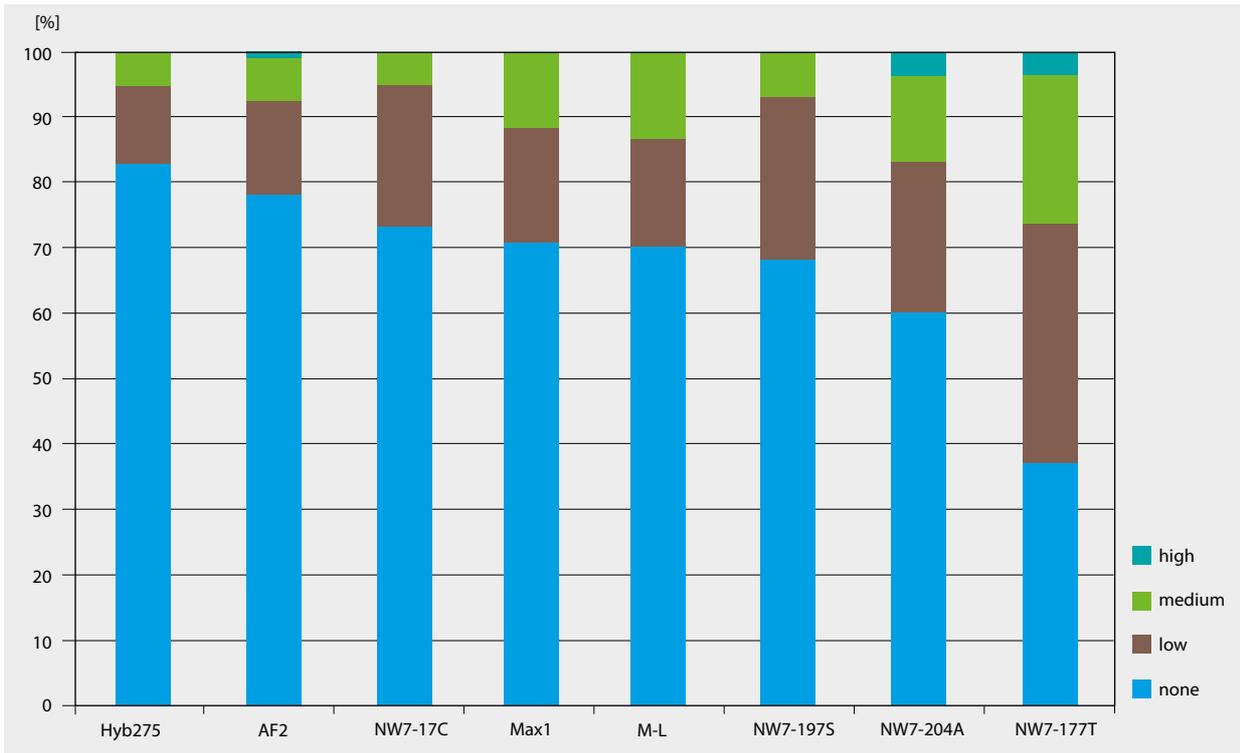


Figure 5
Distribution of abundance classes [percent of all investigated trees per clone] of *Chrysomela populi* found on the eight investigated clones for the year 2016. M-L = Muhle-Larsen, Hyb275 = Hybride 275.

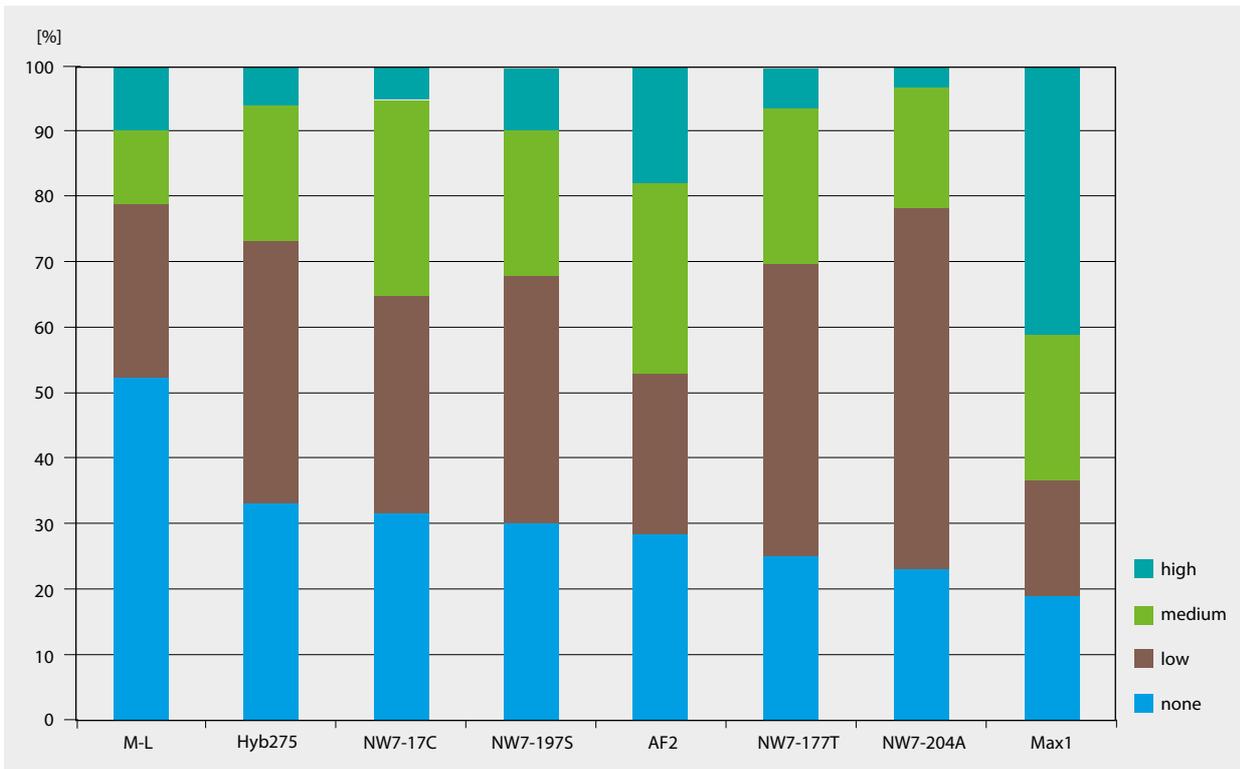


Figure 6
Distribution of abundance classes [percent of all investigated trees per clone] of *Phratora sp.* found on the eight investigated clones for the year 2016. M-L = Muhle-Larsen, Hyb275 = Hybride 275.

80% (Figure 6, Table 3). In 2016, two further observations have been performed in August and in September. The defoliation level later in the year was clearly higher than in June and was then in accordance with the high number of insects (data not shown).

Table 3
Comparison of the presence [%] of *Chrysomela populi* and *Phratora* sp. for the years 2012-2015 and 2016 for eight clones. M-L = Muhle-Larsen.

<i>Chrysomela populi</i>			
Clone	2012 to 2015	2016	difference
Hybride 275	20 %	18 %	-2 %
AF 2	21 %	21 %	0 %
NW7-17C	13 %	26 %	+13 %
Max 1	31 %	29 %	-2 %
M-L	24 %	30 %	+3 %
NW7-197S	34 %	31 %	-3 %
NW7-204A	32 %	40 %	+8 %
NW7-177T	17 %	62 %	+45 %
<i>Phratora</i> sp.			
Hybride 275	5 %	66 %	+61 %
AF 2	9 %	71 %	+62 %
NW7-17C	2 %	69 %	+67 %
Max 1	13 %	81 %	+68 %
M-L	10 %	48 %	+38 %
NW7-197S	8 %	70 %	+62 %
NW7-204A	3 %	76 %	+73 %
NW7-177T	6 %	75 %	+69 %

3.3 Ranking of the poplar clones

Ranking of the clones is based on the sum score averaged for the years 2012 to 2015 calculated as described in 2.3 and separately for 2016 (Table 4).

Some of the eight clones used in 2016 changed their position to each other when comparing the two rankings (Figure 7).

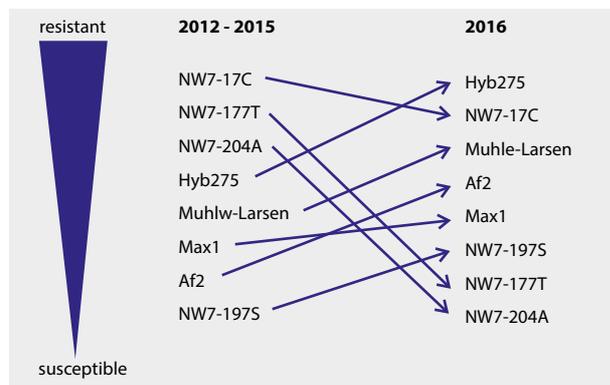


Figure 7
Comparison of the ranking of eight poplar clones for the years 2012 to 2015 and 2016. Hyb 275 = Hybride 275.

Table 4
Ranking of the 20 (eight) clones and the belonging calculated values.

Clone	2012 to 2015		2016	
	Sum score	rank	Sum score	rank
Weser6	12	1		
Rochester	16	2		
Androscoggin	16	3		
Weser4	19	4		
NW7-17C	23	5	7	2
OP367	23	6		
Max4	24	7		
Koreana	25	8		
Robusta	26	9		
Matrix11	28	10		
NW7-177T	30	11	19	7
NW7-204A	36	12	21	8
Hybride275	35	13	6	1
Matrix49	37	14		
Trichobel	38	15		
Max3	39	16		
Muhle-Larsen	51	17	10	3
Max1	51	17	14	5
AF2	52	18	13	4
NW7-197S	55	19	18	6

4 Discussion

Chrysomela populi is frequent all over Europe causing severe damage on several species of the family Salicaceae and is therefore one of the most important species from the viewpoint of forestry (Gruppe et al., 1999; Sage et al., 1999; Urban, 2006 and citations therein; Ye, 2011; Schroeder and Fladung, 2015). Following Helbig and Landgraf (2009), *C. populi* is even the most important pest species in short rotation coppices in Germany which confirmed our finding that *C. populi* is the most often occurring beetle on poplars. The poplar leaf beetle can consume a high amount of leaf mass. Urban (2006) observed a quantity of up to 200 cm² in about six weeks fed by a single *C. populi* individual. In comparison *Byctiscus populi*, sometimes also described as potential pest in poplar SRCs, is mentioned with about 17 cm² fed by a single beetle during its whole lifetime (Urban, 2013).

Also *Phratora vulgatissima* is well known and described as poplar damaging insect (Peacock et al., 1999; Sage et al., 1999), a species that we indeed didn't find in high numbers but frequently at most clones in the years 2012 to 2015. In 2016, the dominance changed dramatically. We found much more *Phratora* sp. than *C. populi* feeding at our poplar clones. Thus, we also can confirm that *Phratora* sp. is a severe poplar damaging beetle.

There are some conspicuous clones, e.g. the clone 'Rochester', where no insects could be found although a

defoliation degree of 10% was estimated. Assessment of the insects has been done only once a year. Thus, this is only a snapshot of the activity of all insects possibly feeding on the poplar clones. The clone 'Rochester' therefore may have been lost some leaves due to earlier feeding insects as caterpillars. There are some more prominent clones with a low degree of leaf area loss and also a small amount of observed insects ('Weser6' and 'Weser4', 'Androscoggin' and 'NW7-17C'). The combination of the results of defoliation level and presence of insects lead to a reasonable statement about the resistance of the clones. So, overall there is a ranking of clones due to their resistance against insects feeding, where long established clones occupy the first four places followed by a newly bred one based on the data of 2012 to 2015. This ranking has been used to select resistant and susceptible clones for a transcriptomic analysis comparing the RNA sequencing results of resistant and susceptible clones after feeding of *Phratora* sp. and also unfed control plants. The results of the transcriptomics analysis will be published elsewhere.

When looking only at the eight clones used in 2016 and comparing their position with that in the years before something has changed. So, the clone 'NW7-17C' withstand as resistant, also the susceptible clones 'Max1' and 'NW7-197S' didn't change their position dramatically. More prominent is the change of the in 2012 to 2015 as susceptible ranked clone 'Muhle-Larsen'. This clone changed to a more or less resistant one in 2016. Thus, we can conclude that the data of five years can differ so much that a clear statement for a clone if it is susceptible or resistant is difficult to draw and depends very much on the overall amount of insects feeding in the different years. A further parameter for feeding of the insects seems to be the number of harvests (rotations). We observed a higher defoliation level in the third rotation. This is only a tendency and the data until now are not sufficient for a reliable analysis. More years and more assessments per year would be important to obtain a view on the dynamics of the insect's presence on different clones.

Nevertheless, until now there are only initial studies about preferences of the herbivorous insects for different poplar clones (Schulz et al., 2009 and citations therein). Thus, the here presented study is a first contribution to a deeper understanding of the necessity of using special clone mixtures in SRCs to increase the ecological variation. In this study, the resistance of poplar against insects was determined on already existing clones. We deeply encourage poplar breeders to include the trait "insect resistance" as goal in future poplar breeding programmes.

Acknowledgement

This project was supported by the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) via the "Fachagentur Nachhaltige Rohstoffe e.V." (FNR). We like to thank the technical assistants Susanne Bein, Stefan Jencsik and Stefanie Palczewski for data recording, Dr. Mirko Liesebach for coordinating of the Thünen FastWOOD subproject, all FastWOOD

colleagues and our master students Anna-Lena Feind and Svenja Heider for the support during the assessment times.

References

- Crutsinger GM, Collins MD, Fordyce JA, Sanders NJ (2008) Temporal dynamics in non-additive responses of arthropods to host-plant genotypic diversity. *Oikos* 117:255-264
- Dickman DI, Stuart KW (1983) The culture of poplars in Eastern North America. East Lansing : Dep Forestry, Michigan State Univ, 168 p
- Gruppe A, Fußeder M, Schopf R (1999) Short rotation plantations of aspen and balsam poplar on former arable land in Germany : defoliating insects and leaf constituents. *For Ecol Manage* 121:113-122
- Helbig C, Landgraf D, (2009) Verstärkter Käferbefall bei Pappel im Kurzumtrieb. *AFZ Wald* 22:1206-1207
- Helbig C, Müller M, Landgraf D (2011) Insect pests in short rotation coppice in Germany : an overview of their effects, risk potential and control measures [online]. To be found at <https://www.researchgate.net/publication/264196592_Final_public_international_conference_of_the_Benwood_project_Conference_proceedings_Short_Rotation_Forestry_and_Agroforestry_an_Exchange_of_Experience_between_CDM_Countries_and_Europe_1_Utilization_of> [quoted 20.06.2018] pp 46-56
- Peacock L, Herrick S, Brain P (1999) Spatio-temporal dynamics of willow-beetle (*Phratora vulgatissima*) in short rotation coppice willows grown as monocultures or a genetically diverse mixture. *Agric For Entomol* 1:287-296
- Sage RB, Fell D, Tucker K, Sotherton NW (1999) Post hibernation dispersal of three leaf-eating beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) colonizing cultivated willows and poplars. *Agric For Entomol* 1:61-70
- Schroeder H, Fladung M (2015) Differences in the resistance of poplar clones against insects feeding. *Mitt dtsh Ges allg angew Ent* 20:261-264
- Schulz U, Brauner O, Grub H (2009) Animal diversity on short-rotation coppices : a review. *Landbauforsch* 59(3):171-181
- Splechtna B, Glatzel G (2005) Optionen der Bereitstellung von Biomasse aus Wäldern und Energieholzplantagen für die energetische Nutzung : Szenarien, ökologische Auswirkungen, Forschungsbedarf [online]. To be found at <<https://edoc.bbaw.de/opus4-bbaw/frontdoor/index/index/docId/392>> [quoted 20.06.2018]
- Stettler RF, Bradshaw T, Heilman P, Hinckley T (1996) *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Ottawa : NRC Canada, 539 p
- Urban J (2006) Occurrence, bionomics and harmfulness of *Chrysomela populi* L. (Coleoptera, Chrysomelidae). *J For Sci* 52(6):255-284
- Urban J (2013) *Biology of Byctiscus populi* (L.) (Coleoptera, Attelabidae) : Part II. Leafrolls, larvae and this year's imagoes. *Acta Uni Agric Silv Mendel Brun* 60 (1):155-166
- Ye X (2011) Transgenic populus trees for forest products, bioenergy, and functional genomics. *Crit Rev Plant Sci* 30(5):415-434
- Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Li Y, Chen J, Fan JX, Yang S, Hu L, Leung H, Mew TW, Teng PS, Wang Z, Mundt CC (2000) Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* 406:718-722

Identifizierung von 19 verschiedenen Pappelarten mit Hilfe von Chloroplasten- und Kernmarker-Sets

Hilke Schroeder*, Birgit Kersten* und Matthias Fladung*

Zusammenfassung

Die Gattung *Populus* ist in sechs Sektionen unterteilt und enthält etwa 30 Arten. Da einige dieser Arten untereinander kreuzkompatibel sind, existieren viele natürliche Hybriden. Zusätzlich wurden in den letzten 50 Jahren umfangreiche Züchtungsprogramme initiiert, die eine hohe Anzahl von künstlich erzeugten Hybriden hervorgebracht haben. Für Züchtungszwecke, aber auch für die Sortenregistrierung ist das Wissen über die in den Hybriden genetisch beteiligten Arten sehr wichtig. Leider ist die Identifizierung sowohl mütterlicher als auch väterlicher Arten durch morphologische Merkmale oft schwierig. Dieser Umstand macht die Verwendung von molekularen genetischen Markern zur Identifizierung der Elternarten in Hybriden und – im Falle von komplexen Hybriden – der Genealogie notwendig. In dieser Studie beschreiben wir die kombinierte Anwendung von Chloroplast- und nukleären SNP- und Indel-Markern zur Unterscheidung von bis zu 19 verschiedenen Pappelarten, die regelmäßig in Züchtungsprogrammen verwendet werden. Zu diesem Zweck verwendeten wir sowohl bereits bekannte Barcoding-Marker als auch neu entwickelte Marker für zusätzliche Chloroplast-Regionen und Kerngene. Bei Hybriden, für die eine erste Information über mutmaßlich involvierte Arten gegeben ist, können für die Validierung Spezies-spezifische Nucleotidvariationen verwendet werden. Wenn jedoch keine anfänglichen Informationen über die Art(en) verfügbar sind, kann zur Artenidentifikation ein Satz von Markern in einem Ausschlussverfahren verwendet werden. Unsere Methode erlaubt eine schnelle und einfache Identifizierung von verschiedenen Pappelarten und deren Hybriden.

Schlüsselwörter: *Pappel, molekulare Marker, Artenidentifikation, Multiplex, Marker Set, Chloroplast, Kernmarker*

Abstract

Identification of 19 different poplar species by chloroplast and nuclear marker sets

The genus *Populus* is classified into six sections and contains about 30 species. As some of these species are cross-compatible, many hybrids naturally exist. Additionally, in the last 50 years huge breeding programs were initiated and have led to a high number of artificially produced hybrids. However, for breeding purposes but also for cultivar registration, knowledge of genetically involved species is highly desired. Unfortunately, identification of both maternal as well as paternal species is often difficult by morphological characteristics. This circumstance makes necessary the use of molecular markers for the identification of parental species in hybrids, and in the case of complex ones, for genealogy. In this study, we describe the combined application of chloroplast and nuclear SNP and Indel markers to differentiate up to 19 different poplar species regularly used in breeding programs. For this purpose, we used already known barcoding markers, newly developed markers from other chloroplast regions, and nuclear genes of interest. For hybrids with given initial information on putatively involved species, species-specific nucleotide variations can be used for validation. However, when no initial information of the species is available, a set of markers can be applied in a procedure of exclusion for species identification. Our procedure allows a quick and simple feasibility to identify different poplar species and their hybrids.

Keywords: *poplar; molecular markers; species identification; multiplex; marker set; chloroplast; nuclear markers*

* Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, Sieker Landstr. 2, 22927 Großhansdorf

1 Einleitung

Pappeln sind in Europa, Nordamerika und Asien weit verbreitet. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass Pappelholz eine breite Anwendbarkeit hat, die von der direkten Nutzung des Holzes über die stoffliche Nutzung (z. B. Papier) bis hin zur Energieproduktion (Dickman und Stuart, 1983) reicht. Die Gattung *Populus* mit ihren 29 Arten (Eckenswalder, 1996) ist in sechs Sektionen unterteilt. Pappelarten innerhalb der gleichen Sektion sind häufig kreuzkompatibel; sogar sektionsübergreifend sind einige Arten miteinander kreuzbar. Für Kurzumtriebsplantagen (KUPs) sind insbesondere Hybriden zwischen verschiedenen Pappelarten interessant, da sie im Vergleich zu ihren Eltern oft über ein überlegenes Wachstum, das für die Biomasseproduktion wichtig ist sowie über erhöhte Resistenzeigenschaften verfügen (Stettler et al., 1996).

Für die klassische Pappelzüchtung sind insbesondere die Merkmale Wachstum und Resistenz gegenüber Pilzen und Insekten von sehr großem Interesse. Daher wurden in den letzten 50 Jahren nach umfangreichen Kreuzungen und Rückkreuzungen zahlreiche kommerziell genutzte Hybridklone erzeugt, für die häufig wenig oder gar keine Hintergrundinformationen verfügbar sind. Leider lassen sich aufgrund der teilweise hohen phänotypischen Variabilität von *Populus*-Hybriden morphologische Merkmale oft nicht zuverlässig zur Artenidentifikation einsetzen. Allerdings ist jedoch sowohl für die Entwicklung komplexer Züchtungsstrategien als auch für die Registrierung neuer Klone die Kenntnis der in den Hybriden beteiligten Arten erforderlich.

Für die Identifizierung von Klonen wurden bisher vornehmlich hochpolymorphe Mikrosatellitenmarker (SSR: Short Sequence Repeats) verwendet (Rahman und Rajora, 2002; Rajora und Rahman, 2003; Schroeder und Fladung, 2010). Die Übertragbarkeit der verschiedenen SSR-Marker auf andere Pappelarten ist zwar prinzipiell möglich, stellt aber häufig ein Problem dar (Bruegmann und Fladung, 2013). Eine andere Möglichkeit zur molekularen Artidentifizierung stellen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) dar (Ingvarsson, 2005; Meirmans et al., 2007; Fladung und Buschbom, 2009; Kersten et al., 2015). Für die Gattung *Populus* sind SNP-Marker zwar für einige wenige Arten verfügbar, allerdings häufig nicht für die Arten bzw. Arthybriden, die in KUPs Anwendung finden (Schroeder und Fladung, 2010). Daher wäre es wünschenswert, SNP-Marker, die für eine sichere Artidentifizierung verwendet werden können, für weitere, für die Züchtung relevante Pappelarten zu entwickeln.

SNP-Marker können für Regionen des Kerngenoms, der Chloroplasten und der Mitochondrien entwickelt werden. In Laubbäumen werden sowohl Chloroplasten (cp) als auch Mitochondrien (mt) maternal vererbt (Birky, 1995), während das Kerngenom von beiden Eltern vererbt wird. Die Vorteile der Verwendung von cp- und/oder mt-SNP-Markern sind: (a) es existiert nur ein Allel pro Zelle und Organismus, (b) Organellen-DNA ist in mehreren bis vielen Kopien pro Zelle vorhanden, und (c) die DNA kann somit leichter extrahiert werden. Daher wurden vom „Barcode of Life

Consortium“ (<http://www.barcodeoflife.org/>) zwei cp-Regionen (*rbcl* and *matK*) für die genetische Differenzierung der eukaryotischen Pflanzenarten ausgewählt (Hollingsworth et al., 2009).

Leider hat es sich für verschiedene Arten der Gattung *Populus* herausgestellt, dass diese beiden cp-Regionen für die Artendifferenzierung nicht ausreichend sind (Schroeder et al., 2012; Feng et al., 2013). In der Folgezeit wurden bis zu 40 weitere cp-Regionen an 19 verschiedenen Pappelarten getestet (Schroeder und Fladung, 2014; Schroeder et al., 2017). Zur zusätzlichen Identifizierung von cp-Regionen mit SNPs und großen Insertions-Deletions-Polymorphismen (Indels) haben wir erst kürzlich das gesamte cpDNA-Genom von *P. tremula* sequenziert und mit anderen Pappelarten verglichen (Kersten et al., 2016). Durch die Anwendung von cp- und/oder mt-SNP-Marker können Informationen über den mütterlichen Partner in einer Pappelkreuzung erhalten werden. Kern-DNA-Marker sind wichtig, um den väterlichen Anteil zu bestimmen und damit Hybriden zu identifizieren. Das Ziel dieser Studie ist es, die praktische Anwendbarkeit der cp- und Kern-SNP-Marker zur Differenzierung von 19 in der Züchtung am häufigsten verwendeten Pappelarten in einem „Proof-of-Concept“-Ansatz zu testen. Dazu wird zunächst mit einem Satz von vier cp-Markern der mütterliche Elternteil einer Hybride bestimmt. Darauf folgt in einem zweiten Schritt mit einem Satz von sechs nukleären Markern die Identifizierung des männlichen Kreuzungspartners.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Das für eine DNA-Isolierung verwendete Blattmaterial stammt entweder von Pappeln aus dem Arboretum des Thünen-Instituts für Forstgenetik (Großhansdorf, Deutschland) oder wurde freundlicherweise von Kollegen zur Verfügung gestellt (Schroeder et al., 2012; Schroeder und Fladung, 2014; Schroeder et al., 2017).

2.2 Getestete cp- und Kernregionen

Aus den in Schröder et al. (2012) und Schroeder und Fladung (2014) beschriebenen und getesteten 40 cp-Regionen wurden vier intergenische Spacer für die Entwicklung von cp-SNP-Markern ausgewählt (*trnH_psbA*, *psbK_psbI*, *rpoC2_rpoC1* und *trnV_atpE*; Schroeder et al., 2017). Zusätzlich zu den cp-SNPs wurden Indels in sechs cp-Regionen mit in die Untersuchungen einbezogen (*psbA_matK*, *rps4_trnL*, *rps2_rpoC2*, *trnC_petN*, *psaA_ycf13* und *psbE_petL*, Tabelle 1; Schroeder et al., 2017).

Aus dem Kerngenom wurden die folgenden Gene/ Introns für die Entwicklung von SNP-Markern ausgewählt: Gibberellinsäure 20-Oxidase (*GA20ox*), ein Intron des Gens der Klasse 1 *KNOTTED3*-like Homeobox (*KNOX3-int2*), das Meristem-Identifikationsgen *FLORICAULA/LEAFY* (LFY) und der Transkriptionsfaktor *TEOSINTE BRANCHED* (TB1) (Tabelle 2; Schroeder et al., 2017).

Tabelle 1

Zusammenstellung der Primer und PCR-Bedingungen für cp-Regionen zur Identifizierung des mütterlichen Kreuzungspartners von Pappelhybriden

Region	Primer Name	Sequenz (5'-3') oder Referenz	Länge	Ta(°C)
<i>trnH_psbA</i>	trnHf psbAr	Sang et al., 1997	367	58
<i>psbK_psbI</i>	4a_f 4b_r	Schroeder et al., 2012	434	55
<i>rpoC2_rpoC1</i>	8a_f 8b_r	Schroeder et al., 2012	533	60
<i>trnV_atpE</i>	12a_f 12b_r	Schroeder et al., 2012	740	58
<i>psbA_matK</i>	1a_f 1b_r	Schroeder et al., 2012	866	58
<i>rps4_trnL</i>	rps4f trnLr	Höltken et al., 2012	821	60
<i>rps2_rpoC2</i>	7a_f 7b_r	Schroeder et al., 2012	524	58
<i>trnC_petN</i>	trnCf petNr	CCAGTTCAAATCCGGGTGTCGC GCAGCCCAAGCGAGACTACTAT	444	58
<i>psaA_ycf13</i>	psaAf ycf13r	Höltken et al., 2012	782	58
<i>psbE_petL</i>	indel3_f indel3_r	TTCTTTGAATGAAGTTATACAACAC GATACGAAGATAAGCAAAAATACC	283	55

Die Spalte „Länge“ gibt die Fragmentlänge in Basenpaaren für *P. trichocarpa* an.
Abkürzungen in den Primernamen: f = forward; r = reverse. Ta = Annealing-Temperatur in der PCR.

Tabelle 2

Zusammenstellung der Primer und PCR-Bedingungen für die Kernregionen zur Identifizierung des väterlichen Kreuzungspartners von Pappelhybriden

Region	Primer Name	Sequenz (5'-3') oder Referenz	Länge	Ta(°C)
<i>GA20ox</i>	#471_f	ATAGATTGCATCAAAACC	1.688	52
	#743_r	TTAATTACCAGATCTATGGACATAAAT		
	GA20_for4	TAATGAGGCTCAACTACTACC	202	54
	GA20_rev5	CTTACCATGAAGGTGTCACC		
<i>KNOX</i>	KNOX_int2for4	TGGAGGACTACAATCAAATGAG	982	52
	KNOX3_int2rev2	TGAGATCATTACAGGCGTG		
	KNOX3_int2f	CCAAACAATTAACAGCAGC	187	52
	KNOX3_int2rev4	GCTACTGAAATGAATTAATTTGA		
<i>LEAFY</i>	LFY_for2	TACTCTTGATGCTCTCTCCAAG	263	53
	LFY_rev2	CTTGAACATAAATCCATATAAAG		
	#474_r	TTGCTGTACTGGCTCCTCAGA	633	53
<i>TB1</i>	TB1_f	CTAACCATACCATGATTGCA	461	53
	TB1_rev2	TATGGATCTTGCTGTGCCT		
	TB1_rev6	GGTCATGAGAATTGAAATGGAG	1.369	53
	TB1_for2 (kombiniert mit rev6)	GTTTCAGGCATCAAGCTG		

Die Spalte „Länge“ gibt die Fragmentlänge in Basenpaaren für *P. trichocarpa* an.
Abkürzungen in den Primernamen: f, for = forward; r, rev = reverse. Ta = Annealing-Temperatur in der PCR.

2.3 DNA Extraktion und PCR-Analyse

Die genomische DNA wurde aus 1 cm² eines in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Blattes nach einem modifizierten Alkyltrimethylammoniumbromid (ATMAB) -Protokoll (Dumolin et al., 1995) extrahiert (Schroeder et al., 2017). Die

Zusammensetzung der PCR-Reaktionen, die PCR-Bedingungen sowie die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese, einschließlich des Anfärbens der aufgetrennten Amplifikationsprodukte bzw. die Anwendung auf einem Kapillar-Sequenzierer, sind in Schroeder et al. (2017), die

Durchführung der Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen in Schroeder et al. (2012) beschrieben.

2.4 Sanger Sequenzierung und PCR-RFLP

Für die Sequenzierung wurden 15 µl des PCR-Produkts entweder mit 5 µl einer 4 M Lithiumchloridlösung oder mit dem Kit "High Pure PCR Product Purification" (Roche, Mannheim, Deutschland) gereinigt. Die Sanger Sequenzierung wurde von StarSEQ (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Mit den in Tabelle 1 angegebenen neun cp- (ohne *psbE_petL*) Primerkombinationen wurden PCR-Amplikons bei bis zu fünf Individuen (soweit verfügbar) pro Pappelart generiert und sequenziert. Für die cp-Region *psbE_petL* war nur ein langes Indel charakteristisch, dessen Anwesenheit durch PCR und Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden konnte. Die Kernregionen wurden von allen 19 Pappelarten, bei bis zu fünf Individuen, soweit verfügbar, unter Verwendung der neun in Tabelle 2 aufgeführten Primerkombinationen amplifiziert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Anwendung der Software SeqMan (Version 7.1.0, DNASTAR, Madison, WI, USA) oder Sequencher 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) in Hinblick auf das Vorhandensein potentieller artspezifischer SNPs und Indels ausgewertet. Positionen mit divergierenden Sequenzen wurden unter Verwendung der Software NEBcutter (Version 2.0, New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) auf das mögliche Vorhandensein einer Schnittstelle von Restriktionsenzymen hin überprüft.

Für die Analyse von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (PCR-RFLPs) wurden 10 µl des PCR-Amplifikates mit zwei Units des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl Restriktionsenzym-puffer gemäß den Angaben der Hersteller (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) verdaut. Die Agarose-Gelelektrophorese und das Anfärben der aufgetrennten Restriktionsprodukte wurden wie in Schroeder et al. (2017) beschrieben durchgeführt.

Die im Folgenden angegebenen Fragmentlängen entsprechen den sequenzierten Längen, die von den auf einem Kapillar-Sequenzierer angezeigten abweichen können.

3 Ergebnisse und Diskussion

Nach Eckenwalder (1996) werden 29 Pappelarten unterschieden, die in sechs Sektionen eingeteilt werden. Wir haben in unseren Untersuchungen neun cp- und vier Kernmarker zur Identifizierung/Differenzierung für 19 Arten aus fünf Sektionen entwickelt und auf ihre praktische Anwendbarkeit hin getestet. Die Kenntnis der Pappelart ist sowohl für züchterische Aktivitäten als auch für die spätere Sortenregistrierung notwendig. Allerdings muss im Folgenden berücksichtigt werden, dass für fünf der untersuchten Arten (*P. cathayana*, *P. ussuriensis*, *P. szechuanica*, *P. wilsonii*, *P. euphratica*) nur jeweils ein Individuum in die Analysen einbezogen werden konnte (Tabelle 3). Für diese Arten muss die Verwendung des Begriffs "artspezifische" Marker als vorläufig angesehen werden. In weiteren Untersuchungen werden wir versuchen, die Anzahl

der Individuen zu erhöhen, um die Verwendbarkeit der Marker auch für diese Arten zu belegen.

3.1 Variationen in Chloroplasten- und Kernregionen

Für die genannten neun cp-Regionen (Tabelle 1; ohne *psbE_petL*) wurden für alle untersuchten 19 Pappelarten nach PCR-Reaktion Amplifikationsprodukte erhalten. Alle erhaltenen Sequenzen (Schroeder et al., 2012; Schroeder und Fladung, 2014; Schroeder et al., 2017) wurden in Hinblick auf SNPs und Indels hin überprüft. Die Anzahl der SNPs und Indels variierte für die verschiedenen Arten, wobei die höchste Anzahl an SNPs und Indels für *P. tremuloides* identifiziert werden konnte (Tabelle 3). Bei 14 Arten wurden artspezifische SNPs und/oder Indels identifiziert, die sich in acht Arten mit geeigneten Restriktionsenzymen in PCR-RFLP-Tests untersuchen lassen (Tabelle 3). Alle SNPs und Indels wurden bei allen verfügbaren Individuen einer Art validiert. An der Indelposition in der Region *psbE_petL* zeigte nur *P. tremula* eine 99 (bp) große Deletion.

Mit allen vier nukleären Primerkombinationen (Tabelle 2) konnten für die 19 Pappelarten erfolgreich PCR-Amplikons generiert werden. Nach Auswertung der Sequenzen (Schroeder et al., 2012; Schroeder und Fladung, 2014; Schroeder et al., 2017) wurden zwischen 119 (*P. alba*) und 17 NPs (*P. cathayana*) identifiziert. Für alle außer drei Pappelarten konnten artspezifische SNPs und/oder Indels identifiziert werden, wobei für 10 Arten die SNP-Identifizierung mit Restriktionsenzymen in einfachen PCR-RFLP-Analysen möglich war (Tabelle 4).

Die Anzahl der SNPs und Indels variierte auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Individuenzahlen zwischen den 19 Arten beträchtlich. Es wurden alle die SNPs und Indels als Variationen gezählt, die sich von homologen *P. trichocarpa*-Sequenzen unterschieden. Auffallend ist die hohe Anzahl an SNPs und Indels bei *P. tremuloides*, obwohl für diese Art nicht die meisten Individuen (21) getestet wurden. Auf der anderen Seite zeigt *P. balsamifera* mit 18 getesteten Individuen eine erstaunlich geringe Anzahl an Variationen.

3.2 Anwendbarkeit der molekularen Marker

Für die Anwendung der oben beschriebenen genetischen cp- und Kernmarker für die Identifikation von Pappelarten sind verschiedene Voraussetzungen denkbar:

- i. Es liegen detaillierte Informationen über eine Art vor: ein Test soll die Angaben zur Artzugehörigkeit validieren (3.2.1).
- ii. Es sind keine Informationen über eine Art verfügbar: ein Verfahren mittels schrittweisem Ausschluss von Pappelarten wird für die Identifizierung des mütterlichen (3.2.2) und väterlichen Elternteils der Hybride (3.2.3) angewendet.

3.2.1 Einzelne Marker für die Artidentifikation

Für den Nachweis der angegebenen Artzugehörigkeit können die in den Tabellen 3 und 4 aufgeführten artspezifischen

Tabelle 3

Übersicht über die Gesamtzahl der gefundenen SNPs und Indels in den cp-Regionen, von artspezifischen SNPs und Indels sowie zugehörigen Restriktionsenzymen zur Verwendung in PCR-RFLPs in neun cp-Regionen (ohne *psbE_petL*)

Pappelart	SNPs/Indels	Artspezifische SNPs/Indels	Restriktionsenzym	Anzahl verfügbarer Individuen
<i>P. alba</i> ^a	22/3	2/2	2	5–13
<i>P. tremula</i> ^a	28/6	9/3	1	5
<i>P. tremuloides</i> ^a	40/9	17/7	4	5–21
<i>P. adenopoda</i> ^a (<i>P. x tomentosa</i> ¹)	19/5	1/3	1	5+5
<i>P. grandidentata</i> ^a	26/12	4/7	3	32
<i>P. nigra</i> ^b	28/5	5/2	2	5–12
<i>P. deltoidea</i> ^b	12/3	2/1	0	5–14
<i>P. fremontii</i> ^b	14/7	3/5	1	5–16
<i>P. trichocarpa</i> ^c	–	4/1	1	5
<i>P. maximowiczii</i> ^c	13/4	0/2	0	3–9
<i>P. cathayana</i> ^c	12/3	0/0	0	1
<i>P. koreana</i> ^c	12/3	0/0	0	3
<i>P. ussuriensis</i> ^c	12/3	0/0	0	1
<i>P. simonii</i> ^c	25/2	1/0	0	5
<i>P. szechuanica</i> ^c	24/3	0/0	0	1
<i>P. balsamifera</i> ^c	11/5	1/2	0	18
<i>P. wilsonii</i> ^d	17/2	3/2	0	1
<i>P. lasiocarpa</i> ^d	21/3	0/0	0	2
<i>P. euphratica</i> ^e	22/7	7/4	0	1

Alle Nukleotidvariationen, die sich von *P. trichocarpa* unterscheiden, werden als SNPs/Indel gezählt. Die Anzahl der Individuen pro Pappelart, die für die Markervalidierung verwendet wurden, ist ebenfalls angegeben. Diese Anzahl ist innerhalb der Arten zum Teil unterschiedlich, da für einzelne Marker unterschiedliche Anzahlen an Individuen für die Validierung verwendet wurden.

Sektionen: ^aPopulus, ^bAigeiros, ^cTacamahaca, ^dLeucoides, ^eTuranga, ¹*P. x tomentosa* = *P. adenopoda* x *P. alba*

Tabelle 4

Übersicht über die Gesamtzahl der gefundenen SNPs und Indels in vier Kernregionen, artspezifische SNPs und Indels sowie zugehörige Restriktionsenzymen zur Verwendung in PCR-RFLPs

Pappelart	SNPs/Indels	Artspezifische SNPs/Indels	Restriktionsenzym	Anzahl verfügbarer Individuen
<i>P. alba</i> ^a	119/14	13/4	2	6
<i>P. tremula</i> ^a	107/12	8/0	1	5
<i>P. tremuloides</i> ^a	113/10	8/0	0	4–6
<i>P. adenopoda</i> ^{2a} (<i>P. x tomentosa</i>)	35/3	1/0	0	3–5
<i>P. grandidentata</i> ^{2a}	36/4	3/2	1	5–32
<i>P. nigra</i> ^b	53/12	17/1	4	4–6
<i>P. deltoidea</i> ^{s b}	48/11	18/0	3	4–5
<i>P. fremontii</i> ^{1b}	23/0	6/0	0	10
<i>P. trichocarpa</i> ^c	–	7/0	2	5–7
<i>P. maximowiczii</i> ^c	52/11	4/0	0	4–6
<i>P. cathayana</i> ^c	17/0	1/0	1	1
<i>P. koreana</i> ^c	36/6	1/0	0	3
<i>P. ussuriensis</i> ^c	28/6	0/0	0	1
<i>P. simonii</i> ^c	49/10	7/3	2	3
<i>P. szechuanica</i> ^c	32/4	2/0	1	1
<i>P. balsamifera</i> ^c	27/7	1/0	0	3–18
<i>P. wilsonii</i> ^d	35/4	3/0	1	1
<i>P. lasiocarpa</i> ^{2d}	9/0	1/0	1	2
<i>P. euphratica</i> ^{2e}	14/2	6/1	2	1

Alle Nukleotidvariationen, die sich von *P. trichocarpa* unterscheiden, werden als SNPs/Indel gezählt. Die Anzahl der Individuen pro Pappelart, die für die Markervalidierung verwendet wurden, ist ebenfalls angegeben.

¹Nur Daten für KNOX enthalten. ²Nur Daten für KNOX und TB1 enthalten.

Sektionen: ^aPopulus, ^bAigeiros, ^cTacamahaca, ^dLeucoides, ^eTuranga, ¹*P. x tomentosa* = *P. adenopoda* x *P. alba*

SNPs und Indels herangezogen werden. In der Tabelle 5 sind die routinemäßig verwendeten und jeweils für die Artbestimmung zuverlässigsten SNP- und Indel-Marker zusammengefasst. Ebenfalls in dieser Tabelle sind detaillierte Informationen zu den Fragmentgrößen nach Verdau mit dem jeweiligen Restriktionsenzym für eine einfache Anwendung auf Agarosegelen aufgeführt.

3.2.2 Ausschlussverfahren für das cp-Indel Marker Set

Eine Kombination von vier cp-Indelmarkern erlaubt die Differenzierung von bis zu 16 der 19 Pappelarten durch ein Ausschlussverfahren (Abbildung 1). Das Set der vier cp-Indelmarker kann sehr effizient in einem Multiplex-Ansatz auf einem ABI3730 Kapillar-Sequenzierer angewendet werden (Schroeder et al., 2017). Dieses Verfahren ist aber auch für Laboratorien ohne Kapillar-Sequenzierer anwendbar, da die unterschiedlichen Fragmentlängen auch auf Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden können. Trotz teilweise nur einem (bp) Unterschied in den Indels ist die Unterscheidung auf einem PAA-Gel unter Einbeziehung von Referenzproben sicher möglich.

In der ersten PCR (*psbA_matK*) können bereits vier Arten anhand unterschiedlicher Fragmentlängen identifiziert werden: *P. alba* (alb), *P. nigra* (nig), *P. adenopoda* (aden) und *P. euphratica* (eup). Die verbleibenden Arten können in zwei Gruppen unterteilt werden. Nach der zweiten PCR (*rps4_trnL*) kann *P. tremula* (tre) ausgeschlossen werden, und die übrigen Arten werden nun in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt. Die 3. PCR (*rps2_rpoC2*) erlaubt eine Identifizierung von neun weiteren Spezies: *P. balsamifera* (bal),

P. szechuanica (sze), *P. wilsonii* (wil), *P. maximowiczii* (max), *P. tremuloides* (tro), *P. trichocarpa* (tri), *P. fremontii* (fre), *P. grandidentata* (gra) und *P. deltooides* (del). Schließlich führt die letzte PCR (*trnC_petN*) zur Differenzierung von *P. simonii* (sim) und *P. lasiocarpa* (las), wenn sie Fragmentlängen von 445 (bp) bzw. 441 (bp) aufweisen. Falls Individuen beider Arten eine Fragmentlänge von 443 (bp) zeigen, können diese nicht differenziert werden. Ebenfalls können die drei verbleibenden Arten, *P. koreana* (kor), *P. ussuriensis* (uss) und *P. cathayana* (cath), nicht durch cp-Marker unterschieden werden. Dickman und Kuzovkina (2014) diskutieren bereits, ob es sich bei diesen drei „Arten“ um nur eine Art handeln könnte. Die hier präsentierten Ergebnisse könnten ein weiterer Beleg dafür sein.

3.2.3 Ausschlussverfahren für Kernmarker

Für die Identifizierung von Pappelarten mit Kernmarkern findet eine Kombination von fünf Regionen (= fünf durchzuführende PCRs) mit 10 SNP- und zwei Indel-Markern Anwendung, die es in einem Ausschlussverfahren erlaubt, 16 von 19 Pappelarten zu unterscheiden (Abbildung 2). In der ersten PCR (TB1_for_rev2) können sechs Arten entweder durch die unterschiedliche Länge des PCR-Amplifikats (Indel) oder durch unterschiedliche Restriktionsstellen (SNPs) identifiziert werden. Die verbleibenden Arten sind in drei Gruppen unterteilt. In der zweiten PCR (KNOX_for_rev4) kann *P. trichocarpa* (tri) von *P. balsamifera* (bal) durch eine Restriktionsstelle getrennt werden und *P. tremula* (tre) von *P. tremuloides* (tro) durch eine weitere Restriktionsstelle. Aus der dritten Gruppe kann *P. nigra* (nig) durch einen weiteren SNP identifiziert werden. Die dritte PCR (TB1_for2_rev6) dient der Identifizierung von *P. lasiocarpa* (las) durch einen Restriktionsverdau und der

Tabelle 5

Anwendbare SNP- und Indel-Marker für den Nachweis der Artzugehörigkeit. Auswahl von einfach anzuwendenden SNP- und Indel-Markern zur Identifizierung von 16 Pappelarten

Pappelart	Region	Markertyp	Restriktionsenzym	Länge [bp]	Referenz
<i>P. alba</i>	<i>trnH_psbA</i>	cp SNP	<i>Alw61I</i>	139/228	1
<i>P. tremula</i>	<i>rpoC2_rpoC1</i>	cp SNP	<i>MlsI</i>	409/124	1
	<i>psbE_petL</i>	cp Indel	/	283 (-99)	2
<i>P. tremuloides</i>	<i>trnH_psbA</i>	cp SNP	<i>DraI</i>	129/238	1
<i>P. adenopoda</i>	<i>psbK_psbI</i>	cp SNP	<i>AseI</i>	144/290	2
<i>P. grandidentata</i>	<i>psbK_psbI</i>	cp SNP + Indel	<i>DraI</i>	264/174	2
<i>P. nigra</i>	<i>trnV_atpE</i>	cp SNP + Indel	<i>ApoI</i>	404/62/260	2
<i>P. deltooides</i>	TB1	nc SNP	<i>BseGI</i>	194/481	2
<i>P. fremontii</i>	<i>trnH_psbA</i>	cp SNP	<i>BsmI</i>	102/265	2
<i>P. trichocarpa</i>	<i>psbK_psbI</i>	cp SNP	<i>TaqI</i>	78/209/49/43/214	2
<i>P. maximowiczii</i>	<i>psaA_ycf13</i>	cp Indel	/	(ca. 790) + 22	2
<i>P. simonii</i>	<i>GA20ox</i>	nc SNP	<i>CviKI</i>	8/27/167	2
<i>P. szechuanica</i>	TB1	nc SNP	<i>AfeI</i>	108/353	2
<i>P. wilsonii</i>	<i>trnH_psbA</i>	cp Indel	/	(367) + 4	2
<i>P. euphratica</i>	<i>KNOX_int2</i>	nc SNP	<i>BfaI</i>	64/223	2
<i>P. cathayana</i>	<i>LFY</i>	nc SNP	<i>CviAII</i>	282/61/132/157	neu
<i>P. lasiocarpa</i>	TB1	ncSNP	<i>RsaI</i>	550/125	neu

Die Spalte „Referenz“ gibt wieder, ob die Marker bereits veröffentlicht oder neu entwickelt wurden (1: Schroeder et al., 2012; 2: Schroeder et al., 2017; neu: in diesem Artikel).

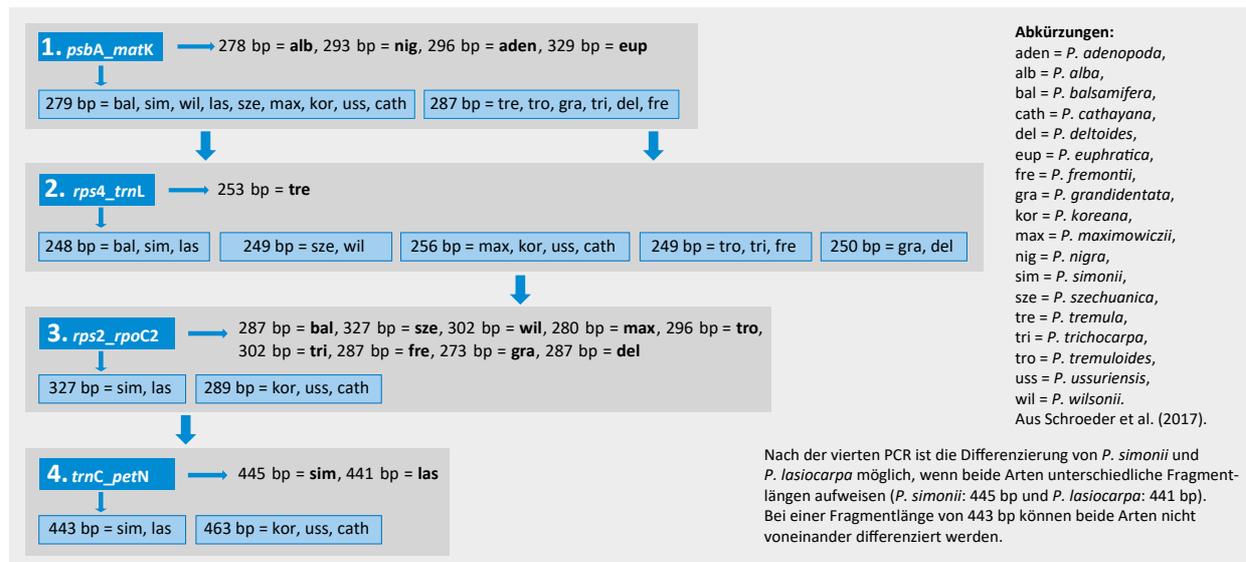


Abbildung 1

Ausschlussverfahren für die Artbestimmung über cp-Regionen: ein schrittweises Verfahren zur Nutzung von vier cp-Regionen zur Differenzierung von bis zu 16 von 19 Pappelarten

Auftrennung der übrigen Arten in zwei Gruppen durch eine Indel/SNP Kombination. Die Differenzierung von *P. deltooides* (del) und *P. fremontii* (fre) erfolgt über eine weitere PCR mit GA20ox_for5_#743 nach anschließendem Restriktionsverdau (Schritt 4 in Abbildung 2). In der letzten PCR (LFY_for2_#474) führen schließlich zwei weitere SNPs mit Restriktionsverdau zur Identifizierung von *P. wilsonii* (wil) und *P. cathayana* (cat). Es verbleiben *P. maximowiczii* (max),

P. koreana (kor) und *P. ussuriensis* (uss) als nicht voneinander unterscheidbar.

3.3 Schlussfolgerungen

Die Verwendbarkeit der cp-SNP-Marker sowie der cp-Indel und Kernmarker für die Artidentifikation in einem Ausschlussverfahren konnte für eine Reihe von Pappelarten

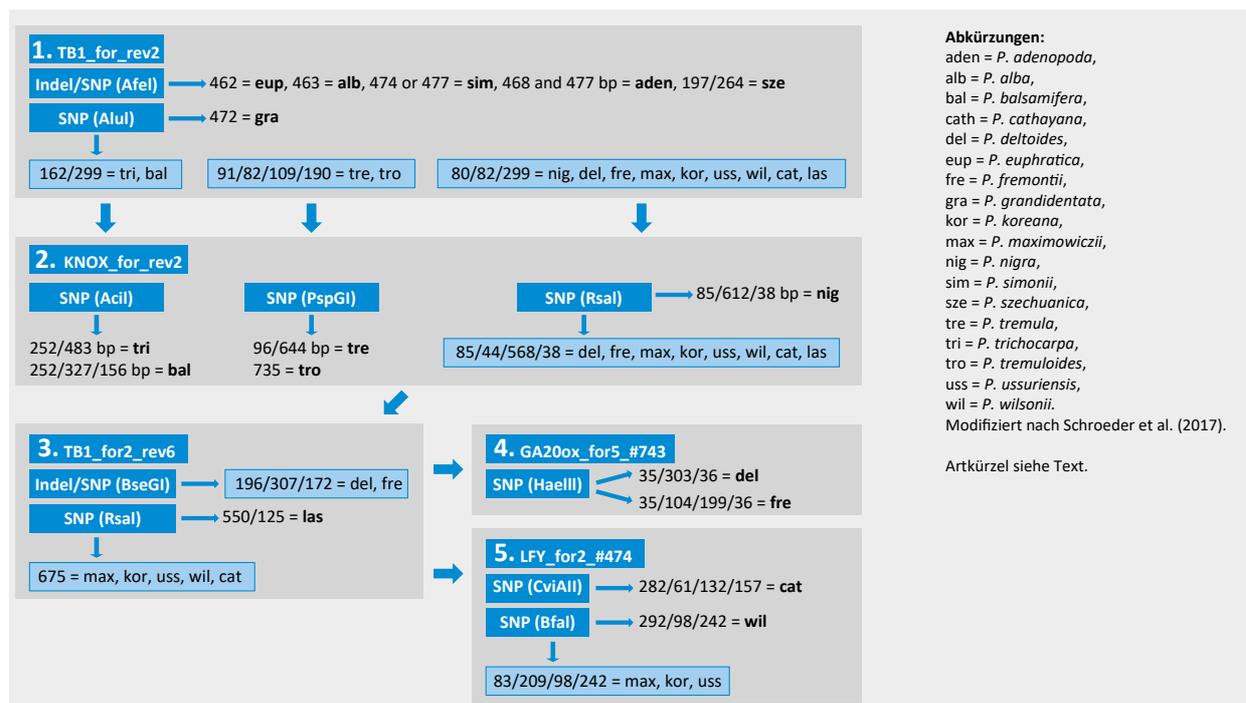


Abbildung 2

Ausschlussverfahren für die Artbestimmung über Kernregionen: ein schrittweises Verfahren zur Nutzung von fünf Kernregionen zur Differenzierung von bis zu 16 von 19 Pappelarten

erfolgreich gezeigt werden. Einzelne SNP-Marker, für die ein Restriktionsenzym gefunden werden konnte, können leicht über PCR-RFLPs auf Agarosegelen eingesetzt werden. Die Indel-Marker können entweder auf Agarose (z. B. für das lange Indel für die Identifizierung von *P. tremula*) oder auf Polyacrylamidgelen (für kürzere Indels) sichtbar gemacht werden. Unsere auf cp-Indel- und Kernmarkern basierende Verfahren zum Ausschluss von Pappelarten können somit in allen Laboratorien zur Identifizierung von bis zu 16 Pappelarten eingesetzt werden. Die Kombination von cp- und Kernmarkern ermöglicht die genetische Identifizierung der Arten in Hybriden, wobei die Kernmarker beide Kreuzungspartner identifizieren (ohne Kreuzungsrichtung) und die cp-Marker den mütterlichen Teil spezifizieren und damit die Bestimmung der Kreuzungsrichtung ermöglichen. Mittels Kombination von cp- und Kernmarkern ist es auch möglich, die Genealogie komplexer Hybride aufzudecken, wie unlängst gezeigt wurde (Schroeder et al., 2017).

Danksagung

Das Projekt „FastWood“ wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) finanziell gefördert. Wir bedanken uns bei unseren technischen Assistentinnen Susanne Bein und Stefanie Palczewski für die Laborarbeit, bei den Gewächshausmitarbeitern für die Beerntung von Bäumen aus dem Arboretum des Thünen Instituts für Forstgenetik, Großhansdorf, sowie bei unseren Kollegen Mirko Liesebach und Georg von Wühlisch (beide Thünen-Institut) für Informationen über das verwendete Pflanzenmaterial. Wir danken den Kollegen von der NW-FVA (HannMünden, Deutschland), weiteren „Fastwood“-Partnern, sowie Raju Soolanayakanahally (Landwirtschaft und Agrarnahrungsmittel Kanada), Minsheng Yang (Landwirtschaftliche Universität Hebei, Baoding, China), Egon Humenberger (Universität Minnesota, USA), und Christian Wehenkel (Institut für Landwirtschaft und Industrie der Universität von Durango, Mexiko) für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial. Wir danken den Botanischen Gärten Hamburg, Marburg, Tübingen und Dresden (alle Deutschland) für die Versorgung mit Pappel-Referenzmaterial.

Literatur

- Birky CW (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes : mechanisms and evolution. *Proc Nat Acad Sci USA* 92:11331–11338, PMID 8524780
- Bruegmann T, Fladung M (2013) Potentials and limitations of the cross-species transfer of nuclear microsatellite marker in six species belonging to three sections of the genus *Populus* L. *Tree Genet Genomes* 9:1413–1421, doi:10.1007/s11295-013-0647-310.1007/s11295-013-0647-3
- Dickmann DI, Kuzovkina J (2014) Poplars and willows of the world, with emphasis on silviculturally important species. In: Isebrand JG (ed) *Poplars and willows : trees for society and the environment*. Wallingford : CAB, pp 8–91
- Dickman DI, Stuart KW (1983) *The culture of poplars in eastern North America*. East Lansing : Michigan State Univ, Dept Forestry, 168 p
- Dumolin S, Demesure B, Petit RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculated oak investigated with efficient PCR method. *Theor Appl Genet* 91:1253–1256
- Eckenwalder JE (1996) Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF (ED) *Biology of populus and its implications for management and conservation*. Ottawa : Nat Res Council, pp 7–32
- Feng J, Jiang D, Shang H, Dong M, Wang G, He X, Zhao C, Mao K (2013) Barcoding poplars (*Populus* L.) from Western China. *PLoS ONE* 8:e71710, doi:10.1371/journal.pone.0071710
- Fladung M, Buschbom J (2009) Identification of single nucleotide polymorphisms in different *Populus* species. *Trees* 23:1199–1212, doi:10.1007/s00468-009-0359-3
- Höltken AM, Schröder H, Wischniewski N, Degen B, Magel E, Fladung M (2012) Development of DNA-based methods to identify CITES-protected timber species : a case study in the Meliaceae family. *Holzforschung* 66:97-104
- Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, Cowan R, Chase MW, Gaudeul M, Hollingsworth PM (2009) Selecting barcoding loci for plants : evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol Ecol Resour* 9:439–457, doi:10.1073_pnas.0905845106
- Ingvarsson PK (2005) Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae). *Genetics* 169:945–953, doi:10.1534/genetics.104.034959
- Kersten B, Rampant PF, Mader M, Le Paslier MC, Bounon R, Berard A, Vettori C, Schroeder H, Leplé JC, Fladung M (2016) Genome sequences of *Populus tremula* chloroplast and mitochondrion : implications for holistic poplar breeding. *PLoS ONE* 11:e0147209, doi:10.1371/journal.pone.0147209
- Kersten B, Voss MM, Fladung M (2015) Development of mitochondrial SNP markers to differentiate *Populus* species. *Trees* 29:575–582, doi:10.1007/s00468-014-1136-5
- Meirmans PG, Lamothe M, Périnet P, Isabel N (2007) Species-specific single nucleotide polymorphism markers for detecting hybridization and introgression in poplar. *Can J Bot* 85:1082–1091, doi:10.1139/B07-069
- Rahman MH, Rajora OP (2002) Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation, and genetic relationships of clones, cultivars, and varieties of six poplar species from three sections of the genus *Populus*. *Genome* 45:1083–1094
- Rajora OP, Rahman MH (2003) Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus x canadensis*). *Theor Appl Genet* 106:470–477, doi:10.1007/s00122-002-1082-2
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). *Am J Bot* 84:1120–1136, PMID:21708667
- Schroeder H, Fladung M (2010) SSR and SNP markers for identification of clones, hybrids and species within the genus *Populus*. *Silvae Genet* 59:257–263, doi:10.1515/sg-2010-003610.1515/sg-2010-0036
- Schroeder H, Fladung M (2014) Differentiation of *Populus* species by chloroplast SNP markers for barcoding and breeding approaches. *IFOREST* 8:544–546, doi:10.3832/ifor1326-007
- Schroeder H, Hoeltken AM, Fladung M (2012) Differentiation of *Populus* species using chloroplast SNP-markers : essential for comprehensible and reliable poplar breeding. *Plant Biol* 14:374–381, doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00502.x
- Schroeder H, Kersten B, Fladung M (2017) Development of multiplexed marker sets to identify the most relevant poplar species for breeding. *Forests* 8:492, doi:10.3390/f8120492
- Stettler R, Bradshaw T, Heilman P, Hinckley T (1996) *Biology of populus and its implications for management and conservation*. Ottawa : Nat Res Council, 539 p

Züchtung und Evaluierung von Schwarz- und Balsampappelklonen hinsichtlich Ertrag und Blattrosttoleranz in vier FastWOOD Versuchsserien

Christina Fey*, Christoph Stiehm*, Martin Hofmann*, Matthias Moos*,
Helmut Grotehusmann*, Wilfried Steiner* und Alwin Janßen**

Zusammenfassung

Vorgestellt werden Ergebnisse aus Pappelklonprüfungen, deren Material im Verbundprojekt FastWOOD speziell für die Biomasseproduktion in Kurzumtriebsplantagen (KUP) selektiert und teils neu gezüchtet wurde. Seit 2010 wurden in vier Versuchsserien insgesamt 16 Versuchsflächen zur Beobachtung im dreijährigen Rotationszyklus verteilt über ganz Deutschland angelegt. In den Serien wurden 110 Klone aus Arten und Hybriden der Sektionen *Aigeiros* und *Tacamahaca* zusammen mit einem Set von bis zu 12 Standardklonen getestet. Beobachtet werden neben dem Hauptmerkmal Biomasseleistung weitere, für den erfolgreichen Betrieb einer KUP wichtige Parameter. Hierzu zählen besonders Toleranzeigenschaften gegenüber Pflanzenpathogenen, wie dem Erreger des Pappelblattrosts *Melampsora larici-populina*. Die Versuchsflächen der ersten Serien 603 und 604 wurden bereits über zwei Rotationszyklen hinweg beobachtet. Sie zeigen im Mittel deutliche Ertragszunahmen von der ersten zur zweiten Rotation. Zahlreiche Klone haben über beide Umtriebszeiten hinweg ihre Überlegenheit zur Kontrolle, dem bewährten Klon 'Max 1', bewiesen. Auch die Toleranzeigenschaften dieser wüchsigen Klone gegenüber dem Pappelblattrost *Melampsora larici-populina* zeigten sich im Vergleich zum jeweiligen Serienmittel und auch zu 'Max 1' als teilweise deutlich besser. Über alle Serien hinweg sind der überwiegende Teil dieser überlegenen Klone Balsampappelhybriden aus der Kreuzungskombination *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*. In der jüngsten Serie 606 ergaben sich bereits in der ersten Rotation mit einem Mittel von 6,14 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ deutlich überdurchschnittliche Biomasseerträge im Vergleich aller Serien.

Schlüsselwörter: Forstpflanzenzüchtung, *Populus* spp., Kurzumtriebsplantage, Standortleistung, Ertragsdynamik, *Melampsora larici-populina*, Blattrosttoleranz

Abstract

Breeding and Evaluation of Black and Balsam Poplar Clones regarding Yield and Tolerance to Leaf Rust in four FastWOOD Trial Series

Results from poplar clone trials containing material selected and bred within the FastWOOD joint research project for the purpose of biomass production in short rotation coppice (SRC) are presented. Since 2010 within four trial series an overall number of 16 trial sites managed in three year long rotation cycles were established covering the area of Germany. In these series 110 clones from species and hybrids from the poplar sections *Aigeiros* and *Tacamahaca* were tested together with a set of up to 12 standard clones. Besides biomass yield additional parameters that are important for a successful cultivation of SRC were observed. These include especially the susceptibility to plant pathogens like the poplar leaf rust *Melampsora larici-populina*. Trial sites from the first two series 603 and 604 have already been surveyed during two rotation cycles. A considerable increase in yield from the first to the second rotation was monitored. Multiple clones have shown a superior performance regarding yield within both rotations towards the proven and tested control-clone 'Max 1'. Furthermore the tolerance properties of these high yielding clones against the leaf rust *Melampsora larici-populina* proved to be better than the overall series average and 'Max 1'. Combining all series most superior clones are balsam poplar hybrids from the crossing of *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*. The most recent established trial series 606 produced a mean yield of 6,14 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ within the first rotation cycle which is clearly above average in comparison with the older series.

Keywords: Forest Tree Breeding, *Populus* spp., Short Rotation Coppice, Site productivity, Yield dynamic, *Melampsora larici-populina*, Leaf Rust Tolerance

* Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung C – Waldgenressourcen, Professor-Oelkers-Straße 6, 34346 Hann. Münden

** Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht, Forstamtsplatz 1, 83317 Teisendorf

1 Einleitung

Ihr starkes Jugendwachstum und die Fähigkeit zum Stockausschlag machen Pappeln und Weiden besonders interessant für die Produktion von Energiehackschnitzeln in kurzen Umtriebszeiten. Dabei werden bestimmte Arten und Arthybriden über Steckhölzer vermehrt und auf landwirtschaftlichen Standorten in 3- bis 4-jährigen Ernteintervallen bewirtschaftet. Sofern die Holzernte im Winterhalbjahr erfolgt, garantieren vitale Stockausschläge eine Bewirtschaftungsdauer von mindestens 30 bis 40 Jahren. Feldhackschnitzel aus landwirtschaftlichen Kurzumtriebsplantagen können eine sinnvolle Ergänzung zu den zunehmend stark nachgefragten Energieholzsortimenten aus dem Wald sein. Das Anbauverfahren weist Parallelen zum Niederwald auf, der sich in einigen Mittelgebirgslagen Deutschlands bis heute erhalten hat. Auch im Niederwald nutzt man die Fähigkeit bestimmter Baumarten zum Stockausschlag.

Durch die vegetative Vermehrung leistungsfähiger Klone über Steckhölzer entstehen genetisch einheitliche Bestände, in denen der Züchtungsfortschritt in vollem Umfang nutzbar wird. In der Klonauswahl liegt deshalb der Schlüssel für wuchsfreudige und gesunde Plantagen und damit für den Erfolg dieser modernen Niederwaldwirtschaft.

Im Verbundvorhaben FastWOOD (Teilprojekt 1, TP1) stehen leistungs- und resistanzorientierte Neuzüchtungen von Pappel- und Weidenhybriden im Vordergrund. Im Rahmen des Verbundvorhabens wurde die genetische Basis des für den Anbau auf Kurzumtriebsplantagen zur Verfügung stehenden Vermehrungsguts deutlich erweitert.

Die Abteilung Waldgenressourcen der NW-FVA wurde mit der Koordination des Gesamtvorhabens betraut und bearbeitete ein Teilvorhaben mit dem Ziel, für die Erzeugung von Biomasse im Kurzumtrieb geeignete Schwarz- und Balsampappeln- sowie Weiden-Sorten zu züchten. Dabei sollten neben konventionellen Ansätzen und bereits vorliegenden

Erfahrungen neue Methoden erprobt und genutzt werden. Zur Erzeugung geeigneter Sorten wurde die Elternbasis erweitert und inter- sowie intraspezifische Kreuzungen durchgeführt.

Mit den neu gezüchteten Klone wurden Versuchsflächen angelegt. Eine Charakterisierung der Genotypen erfolgte mittels molekulargenetischer Marker zur Klontidentifizierung. Weiterhin wurden die innerhalb des Projektes zu prüfenden Klone auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber biotischen Krankheitserregern getestet. Insbesondere die Toleranz gegenüber dem Erreger des Pappelblatrstoses, *Melampsora larici-populina*, war ein wichtiges Selektionsmerkmal.

Inzwischen wurden zwei für die Biomasseproduktion im kurzen Umtrieb geeignete Schwarz- und Balsampappelklone nach den Vorschriften des Forstvermehrungsgutgesetzes (FoVG, 2002) in der Kategorie „Geprüft“ zugelassen. Für weitere 13 Klone hat der Sachverständigenbeirat für geprüftes Vermehrungsgut eine Empfehlung zur Zulassung ausgesprochen.

Der folgende Beitrag stellt die Hauptergebnisse des Teilvorhabens 1 „Evaluierung, Züchtung, genetische Charakterisierung sowie Leistungs-, Resistenz- und Anbauprüfung von Schwarz- und Balsampappeln und Weiden“ (Förderkennzeichen: 22000414) mit Fokus auf die Pappelzüchtung vor und gibt eine Einschätzung des verbesserten Anbauwerts der Neuzüchtungen aus dem Projekt.

2 Material und Methoden

2.1 Züchtungsprogramm FastWOOD TP1

Das Züchtungsprogramm im Teilprojekt 1 (TP 1) von FastWOOD umfasst in drei Projektphasen (FW I bis FW III) acht Züchtungsjahrgänge. Aus Vorarbeiten der Abteilung Waldgenressourcen der NW-FVA gehen vor Beginn des Verbundprojektes zwei Kreuzungsjahrgänge hervor. Tabelle 1 enthält

Tabelle 1

Übersicht über das Kreuzungsprogramm im FastWOOD TP1 nach Projektphasen und Züchtungsjahrgängen

Projektphase	Jahr	♀	♂	Kreuzungen	Nachkommen-schaften	Nachkommen	VP1	VP2
NW- FVA	2007	12	12	35	35	17.493	456	405
	2008	9	9	71	18	89	150 ¹	52
FastWOOD I	2009	29	18	86	40	4.902	452	228
	2010	18	10	54	32	2.887	95	30
	2011	16	16	45	25	2.952	287	287
FastWOOD II	2012	22	17	48	14	2.300	157	137
	2013	22	19	69	37	1.850	189	15
	2014	17	9	47	17	1.080	181	15
FastWOOD III	2015	13	13	34	8	1.110	43	43
	2016	6	2	24	2	43	10	10
	2017	–	–	–	–	–	–	–
Gesamt		164	125	513	228	34.706	1.870	1.222

VP = Vorprüfung
¹ Nachkommen plus zusätzlich evaluierte Altklone

einen Überblick über die Gesamtanzahl der erfolgten Kreuzungen.

In der Begriffsverwendung wird im Folgenden wie bei Grotehusmann et al. (2015, 2017) verfahren. Als Klon wird allgemein ein vegetativ vermehrter Genotyp verstanden. Mit dem Begriff Sorte werden nach FoVG oder Sortenschutzgesetz zugelassene und mit einem Namen versehene Klone bezeichnet.

Die Abteilung Waldgenressourcen der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt besitzt die älteste und umfangreichste deutsche Klonsammlung der Gattung *Populus* mit insgesamt fast 1.800 Klonen in Populeten, Sortenschauen und ehemaligen Versuchsflächen. Die Klone wurden nach eingehender Bewertung entweder für eine direkte Prüfung auf Kurzumtriebseignung ausgewählt (Serie 603), oder als Elternbäume bei den gezielten Kreuzungen (Serien 605 und 606) verwendet. Auch freie Abblüten von vielversprechenden oder bereits bewährten Elternbäumen (Serie 604) wurden in die Prüfung mit einbezogen. Nach Elternschaftsanalysen konnten bei einem Großteil dieser Nachkommen die Väter mittels genetischer Analysen zugeordnet werden. In allen vier Serien konnte bei sechs Individuen keine Zuordnung der Väter erfolgen, diese sind weiterhin als freie Abblüte bezeichnet. Durch intensive Kontaktpflege mit Instituten in Kanada, den USA und der Volksrepublik China konnten frische Pollen erhalten und in gelenkte Kreuzungen mit einbezogen werden. Die zur Erweiterung der Materialbasis verwendeten Kreuzungspartner wurden prioritär nach ihrer Eignung für den Kurzumtrieb ausgewählt. Es wurden sowohl inter- als auch intrasektionelle Kreuzungen durchgeführt. Für jede Kreuzungsserie wurden im Frühjahr sowohl männliche als auch weibliche Blühreiser mit Hilfe einer Hebebühne oder mit einer mittels Armbrust über die abzusägenden Äste beförderten Sägekette (Janßen et al., 1992) geerntet. Die weiblichen Blühreiser wurden zunächst nach einem Verfahren der Universität von Minnesota bewurzelt (McMahon et al., 2011), da nur so eine ausreichende Nährstoffversorgung der Früchte und somit das vollständige Ausreifen der Samen gewährleistet wird. Die Reifung der männlichen Blüten erfolgte in Vasen mit Wasser. Insgesamt standen der NW-FVA zur Durchführung der gezielten Kreuzungen bis zu 34 Kreuzungskabinen zur Verfügung. Nach Wurzelbildung und vor Blütenöffnung wurden die weiblichen Blühreiser auf die Kabinen verteilt, die jeweils einem Pollenspender zugeordnet wurden. Die Bestäubung der weiblichen Blüten mit dem gesammelten Pollen fand über die gesamte Blütezeit hinweg einmal täglich mit Hilfe eines Pinsels statt. Die hieraus gewonnenen Nachkommen wurden bereits im Jahr der Kreuzung in Beetkästen gepflanzt und hinsichtlich ihrer Wuchseigenschaften und Rosttoleranz evaluiert. Die selektierten Individuen wurden verklont und in zwei weiteren Vorprüfungen einer Auswahl unterzogen. Die vielversprechendsten Klone wurden in Feldversuchen zur Anbauprüfung getestet. Weitere Details zum Verfahren der gelenkten Kreuzungen mit Pappeln an der NW-FVA finden sich bei Borschel et al. (2015).

2.2 Versuchsserien im FastWOOD TP1

2.2.1 Versuchsflächen

Um verlässliche Aussagen über das Ertragsniveau und die Rosttoleranz der Klone zu erhalten, wurden die Feldversuche als Versuchsserien angelegt, die mehrere Versuchsflächen auf unterschiedlichen Standorten nach einheitlichem Muster und mit gleichem Prüfgliedsatz beinhalten. Die Feldversuche wurden nach Vorgaben des forstgenetischen Versuchswesens und in Ausrichtung nach Bewirtschaftungsbedingungen der Praxis angelegt.

Tabelle 2 enthält einen Überblick über die Klone, die in den vier Versuchsserien im Feldanbau geprüft wurden. Es wurden vorrangig inter- und intraspezifische Kreuzungen der Sektionen *Tacamahaca* und *Aigeiros* vorgenommen.

Bei der Serie 603 handelt es sich überwiegend um Kreuzungen aus den Jahren 1985 bis 1990. Diese konnten zum Teil aus dem Züchtungsprogramm des Forschungsinstitutes für schnellwachsende Baumarten übernommen werden. Die Versuchsserie 604 beinhaltet weitgehend Nachkommen aus freier Abblüte von Mutterbäumen in Populeten aus dem Sachgebiet Erhaltung forstlicher Genressourcen der Abteilung Waldgenressourcen. Die Versuchsserien 605 und 606 enthalten erstmalig überwiegend Genotypen aus gelenkten Kreuzungen. Über alle Serien hinweg stellen Hybriden der interspezifischen Kreuzungen von *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* den größten Anteil dar. In Serie 603 ist zudem eine größere Anzahl von reinen *P. trichocarpa* Klonen geprüft worden. In der Versuchsserie 606 sind von quantitativer Bedeutung noch die Kreuzungen *P. trichocarpa* × *P. maximowiczii* hervorzuheben. Klone mit Namen, also Sorten, die in den Kreuzungskombinationen enthalten sind, sind in Tabelle 2 separat aufgelistet. Hierzu zählen Altklone und Sorten, die im Praxisanbau weit verbreitet sind (Erhebung zur Versorgungssituation von forstlichem Vermehrungsgut im Bundesgebiet, 2018). Es handelt sich mit 'Max 1', 'Hybride 275' und 'AF2' um den Prüfgliedsatz, der im ProLoc Verbundvorhaben auf 54 Versuchsflächen getestet wurde (Amthauer Gallardo, 2014; Janßen et al., 2017). Grotehusmann et al. (2015, 2017) geben eine Übersicht über die Prüfung der Serien 603 und 604 sowie die Evaluierung der einzelnen Prüfglieder. Als Kontrollgruppe wurden in den Auswertungen von Grotehusmann et al. (2017) stets 'Hybride 275' und 'Max 1' verwendet. Da 'Max 1' im Praxisanbau den am weitesten verbreiteten Klon darstellt, wird in dieser Arbeit ausschließlich 'Max 1' als Kontrolle verwendet.

Die Verteilung der Versuchsflächen sollte ein möglichst breites standörtliches Spektrum mit verschiedenen Boden- und Klimaeigenschaften abdecken. Daher wurden die Flächen über das gesamte Bundesgebiet verteilt (Abbildung 1) in sieben Bundesländern angelegt.

In den vier Versuchsserien sind insgesamt 16 Versuchsflächen enthalten. Die Klimacharakteristika reichen von küstennahen Standorten mit atlantisch geprägtem Klima, atlantisch-kontinental und kontinental geprägten Standorten mit unterschiedlichen Niederschlagsmengen über Mittelgebirgsstandorte mit rauem Klima und subkontinental beeinflussten Lagen bis hin zum feucht-warmen Klima des Oberrheingraben.

Tabelle 2

Übersicht über die Verteilung von Prüfgliedern (PG) auf die Versuchsserien sowie die Kreuzungskombination (KK) und Zugehörigkeit von bekannten Sorten (Altklone)

Serie	Prüfglieder [n]	Art / Kreuzungskombination	Art_ID	PG je KK [n]	Gruppe enthält
603	41	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i> (= <i>P.</i> × <i>canadensis</i>)	PDN	2	'Robusta', 'AF 2'
		<i>P. maximowiczii</i>	PM	1	
		<i>P. maximowiczii</i> (freie Abblüte)	PMFA	1	
		(<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. berolinensis</i>) × <i>P. trichocarpa</i>	PMBT	1	
		<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>	PMT	14	'Androscoggin', 'Hybride 275', 'Matrix-Klone'
		<i>P. nigra</i> × <i>P. laurifolia</i>	PNLf	1	
		<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>	PNM	3	'Max 1', 'Max 3'
		(<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>) × <i>P. maximowiczii</i>	PNMM	1	
		<i>P. trichocarpa</i>	PT	12	'Weser 4', 'Weser 6', 'Muhle Larsen', 'Trichobel'
		<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. deltoides</i>	PTD	2	
		<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. koreana</i>	PTK	1	
(<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. koreana</i>) × <i>P. maximowiczii</i>	PTKM	2			
604	25	<i>P. deltoides</i>	PD	2	
		<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i> (= <i>P.</i> × <i>canadensis</i>)	PDN	1	'AF 2'
		<i>P. maximowiczii</i>	PM	1	
		<i>P. maximowiczii</i> (freie Abblüte)	PMFA	1	
		<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>	PMT	17	'Hybride 275'
		<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>	PNM	1	'Max 1', 'Max 3'
		<i>P. trichocarpa</i>	PT	2	'Muhle Larsen', 'Brühl 8'
605	36	<i>P. alba</i>	PA	1	'Villafranca'
		<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i> (= <i>P.</i> × <i>canadensis</i>)	PDN	1	'AF 2'
		<i>P. maximowiczii</i> (freie Abblüte)	PMFA	2	
		<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. nigra</i>	PMN	2	
		<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>	PMT	25	'Hybride 275', 'Matrix 49'
		<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>	PNM	1	'Max 1'
		<i>P. trichocarpa</i>	PT	1	'Muhle Larsen'
		(<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. deltoides</i>) × <i>P. maximowiczii</i>	PTDM	2	
		<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. maximowiczii</i>	PTM	1	
606	39	<i>P. maximowiczii</i> (freie Abblüte)	PMFA	2	
		<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. nigra</i>	PMN	1	
		<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>	PMT	15	'Hybride 275', 'Matrix 11'
		<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>	PNM	1	'Max 1'
		<i>P. szechuanica</i> × <i>P. trichocarpa</i>	PSzT	3	
		<i>P. trichocarpa</i>	PT	5	
		<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. cathayana</i>	PTC	1	
		<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. maximowiczii</i>	PTM	10	
		<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. ussuriensis</i>	PTU	1	

Sämtliche Versuchsflächen in FastWOOD wurden einer detaillierten Standortkartierung nach den Vorgaben der Ad-Hoc-AG Boden (2005) und der AG Forsteinrichtung und des Arbeitskreises für Standortkartierung (2003) unterzogen. Die Versuchsflächen wurden zu Versuchsorten zusammengefasst, da einige Flächen aus unterschiedlichen Serien unmittelbar benachbart sind. So wurden z. B. die Flächen 006 Wallstawe I und 012 Wallstawe II in einer Kartierung und einem Kartierwerk erfasst. Je Versuchsort wurden mindestens zwei Einschläge mit einem Bagger angelegt. Die Profilgruben wurden nach den Richtlinien der Bodenzustandserhebung im Wald II (BZE II) nach Wellbrock (2006) aufgenommen. Zur

Bestimmung bodenphysikalischer Parameter wie der Lagerungsdichte wurden Stechzylinderproben in den drei Tiefenstufen 0 bis 30 cm, 30 bis 60 cm und 60 bis 90 cm entnommen und im Labor der Abteilung Umweltkontrolle der NW-FVA nach den BZE II Vorgaben des Gutachterausschusses Forstliche Analytik (2009) analysiert. Die Berechnung der nutzbaren Feldkapazität (nFK) erfolgte auf Basis dieser Werte nach dem Verfahren der Ad-Hoc-AG Boden (2005).

Je Versuchsort wurden Standortstypen nach dem Verfahren der niedersächsischen Standortkartierung (Niedersächsisches Forstplanungsamt, 2007; Niedersächsisches Forstplanungsamt und Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und

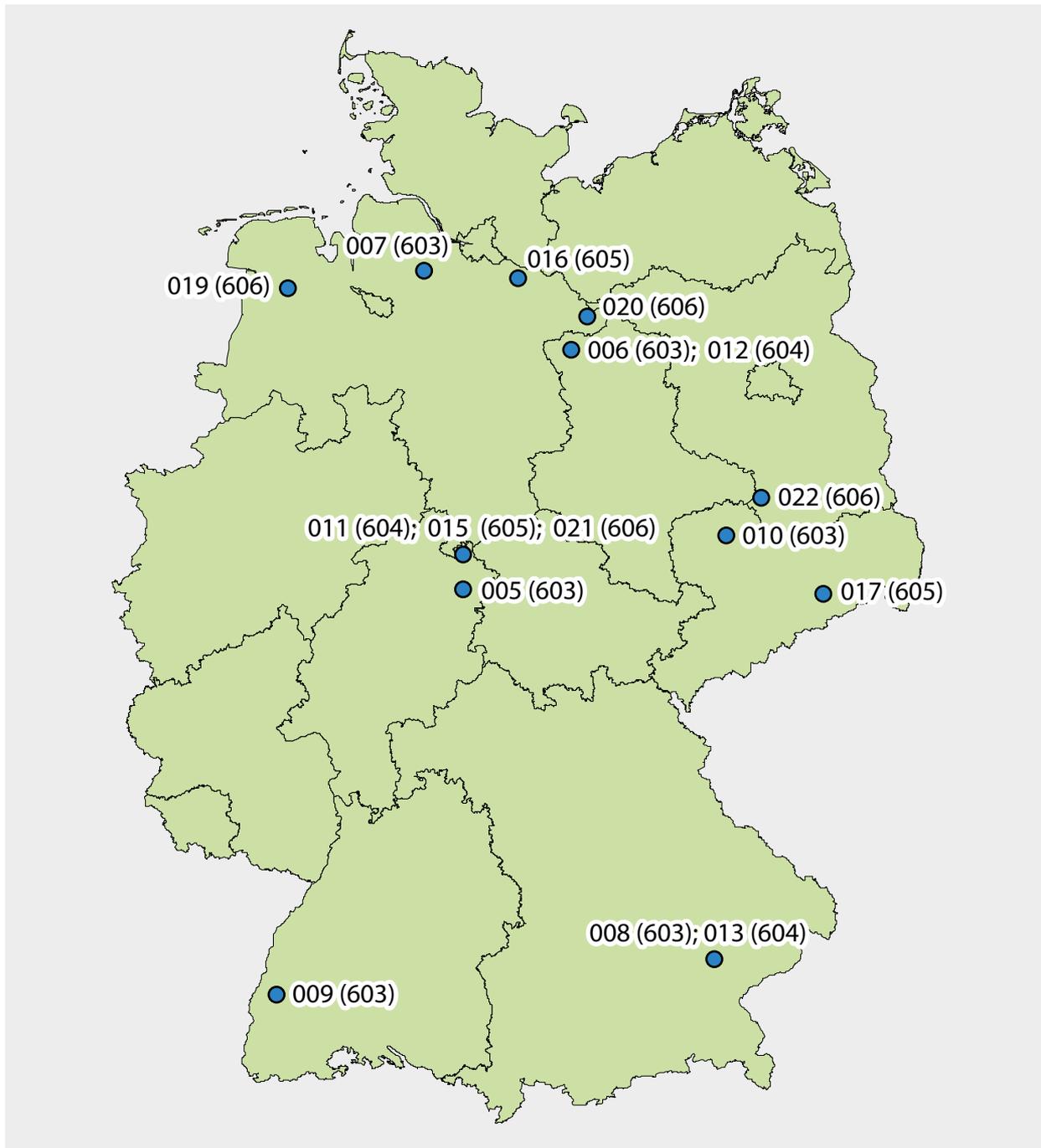


Abbildung 1

Geographische Lage aller im Teilprojekt 1 angelegten Versuchsflächen. Jede Fläche ist mit ihrem zugehörigen Aktenzeichen beschriftet. In Klammern ist die Zugehörigkeit zur Versuchsserie angegeben. Sind Flächen unmittelbar benachbart und aneinander angrenzend, werden diese durch ein Semikolon getrennt angegeben.

ländliche Räume Schleswig-Holstein, 2009a, b) identifiziert und in ihrer räumlichen Ausbreitung in Standortstypenkarten festgehalten. Hierzu wurden auf den Versuchsflächen Pürckhauerbohrungen durchgeführt, die nach Möglichkeit bis zu einer Tiefe von 100 cm bzw. bis zum Ausgangsgestein sondieren sollten. Die Verteilung der Bohrungen richtete sich nach der Ausformung der Versuchsflächen und der Lage der Parzellen im Gelände. Idealerweise sollte in jeder vierten

Parzelle ein Einstich erfolgen, das Netz der Beprobungen konnte auch an die Ausbreitung der Standortstypen angepasst werden. An den Bohrungen wurde die Bodenart bestimmt, zusätzlich wurden für standörtlich homogene Bereiche Mischproben in den Tiefenstufen 0 bis 30 cm, 30 bis 60 cm und 60 bis 90 cm gebildet. Die Mischproben wurden im Labor hinsichtlich bodenchemischer Parameter und Nährstoffgehalte untersucht.

Die Klimadaten in tagesweiser Auflösung von Niederschlag und Temperatur konnten über einen Kooperationsvertrag zwischen dem Deutschen Wetterdienst (DWD) und der NW-FVA bezogen werden. Für die Versuchszeiträume wurden diese Daten von den Niederschlags- und Klimastationen auf die Versuchsstandorte nach den Methoden von Schulla (2017) interpoliert.

Tabelle 3 gibt Informationen zur Begründung der Flächen in den vier Serien, sowie deren standörtliche Eigenschaften wieder.

Die Ansprache des Wasserhaushalts lässt eine positive Beeinflussung der Biomasseleistung erwarten, da bei zahlreichen Standorten eine gute Wasserversorgung vorzufinden war. Das Wasserangebot wurde bereits in zahlreichen Untersuchungen als einer der zentralen ertragsbestimmenden Faktoren für KUP benannt (Ali, 2009; Amthauer Gallardo, 2014; Kröber et al., 2014). Als Kennwert für das pflanzenverfügbare Bodenwasser wurde die nutzbare Feldkapazität zugrunde gelegt. Diese nimmt an den Versuchsorten Bardowick (016) und Herzberg (022) den niedrigsten Wert an, die höchsten

Tabelle 3

Übersicht zu den Eigenschaften der FastWOOD TP 1 Versuchsflächen und deren standörtlichen Bedingungen

VFL	VFL Name	Serie	Bun- des- land	Anlage	Pflanzver- band [m]	Pflanzen- pro Par- zelle [n]	Boden- typ(en)	nFK bis 90 cm [mm]	Wasser- haushalt	Boden- zahl	Rota- tion	Mittlere Nieder- schlagssumme VP [mm]	Mittlere Tagestempe- ratur VP [°C]
005	Stölzingen	603	HE	Apr 10	1,8 m x 0,5 m	48	Braunerde / Rendzina	84-139	frisch; einge- schränkt frisch	53 ¹	1	402,01 (± 48,27)	15,24 (± 0,36)
											2	394,13 (± 68,48)	15,43 (± 0,3)
006	Wallstawe I	603	ST	Apr 10	1,8 m x 0,5 m	48	Pseudogley	137-150	Stauwasser	39 ²	1	352,1 (± 61,24)	15,79 (± 0,23)
											2	323,16 (± 23,73)	15,95 (± 0,19)
007	Anderlingen	603	NI	Apr 10	1,8 m x 0,5 m	48	Pseudogley / Gley	139-180	Grundwasser- anschluss	37 ³	1	354,4 (± 45,62)	15,46 (± 0,22)
											2	350,15 (± 11,93)	15,64 (± 0,37)
008	Lehmbach I	603	BY	Apr 10	1,8 m x 0,5 m	48	Pseudogley	153-215	Hang-, Stauwasser	59	1	529,46 (± 70,11)	15,97 (± 0,57)
											2	456,82 (± 103,21)	16,19 (± 0,74)
009	Emmendingen	603	BW	Apr 10		48	Kalkpaternia / Kolluvisol	184-231	Grundwasser- anschluss	71	1	429,11 (± 54,74)	16,77 (± 0,48)
					1,8 m x 0,5 m						2	402,4 (± 125,98)	17,16 (± 0,64)
010	Thammenhain	603	SN	Apr 10		48	Pseudogley / Braunerde	151-213	Stauwasser	40	1	403 (± 84,97)	16,14 (± 0,36)
					1,8 m x 0,5 m						2	341,31 (± 59,22)	16,29 (± 0,21)
011	Stiedenrode I	604	HE	Apr 11		48	Kolluvisol / Pa- raabraunerde	209	nachhaltig frisch	65	1	349,66 (± 12,29)	15,63 (± 0,12)
					2,0 m x 0,5 m						2	340,04 (± 77,69)	16,06 (± 0,56)
012	Wallstawe II	604	ST	Apr 11		48	Pseudogley	137-150	Stauwasser	39 ²	1	321,61 (± 42,42)	15,9 (± 0,13)
					1,8 m x 0,5 m						2	301,22 (± 52,72)	16,37 (± 0,73)
013	Lehmbach II	604	BY	Apr 11		48	Pseudogley	153-215	Hang-, Stauwasser	53	1	503,58 (± 23,01)	16,13 (± 0,28)
					1,8 m x 0,5 m						2	457,7 (± 102,71)	16,44 (± 0,71)
015	Stiedenrode II	605	HE	Apr/Mai 13		48	Pseudogley	208-211	nachhaltig frisch	62	1	368,41 (± 59,52)	15,64 (± 0,19)
016	Bardowick	605	NI	Apr/Mai 14	2,0 m x 0,5 m	48	Podsol / Regosol	91-128	Grundwasser- anschluss	22	1	300,83 (± 50,07)	16,24 (± 0,76)
017	Graupa	605	SN	Mai 13	2,0 m x 0,5 m	48	Braunerde	131	mäßig frisch	n.v.	1	378,57 (± 73,47)	16,46 (± 0,42)
019	Augustfehn	606	NI	Mrz 15	2,0 m x 0,5 m	24	Podsol / Hoch- moor mit Tie- fenumbruch	139-180	Grundwasser- anschluss	30 ³	1	359,28 (± 74,41)	15,99 (± 0,76)
020	Siemen	606	NI	Apr 15	2,0 m x 0,5 m	24	Podsol	124-168	Grundwasser- anschluss	33	1	321,93 (± 92,39)	16,33 (± 0,8)
021	Stiedenrode III	606	HE	Apr/Mai 15	2,0 m x 0,5 m	24	Pseudogley	208-211	nachhaltig frisch	61 ¹	1	347,73 (± 90,82)	16,17 (± 0,45)
022	Herzberg	606	BB	Mai 15	2,0 m x 0,5 m	24	Gley	110-164	Grundwasser- anschluss	34	1	299,24 (± 45,2)	16,9 (± 0,57)

Je Versuchsfläche sind die Bodentypen, die nutzbare Feldkapazität (nFK), eine Beschreibung des Wasserhaushalts sowie die Bodenzahl angegeben. Zur Markierung der Bodenzahlen: ¹ gemittelt, ² geschätzt, ³ Grünlandzahl. Die Klimavariablen gelten je Versuchsort, für die Orte der Serien 603 und 605 sind diese Angaben nach erster und zweiter Rotation getrennt. VP = Vegetationsperiode.

Werte wurden an den drei Standorten in Stiedenrode (011, 015 und 021) und Emmendingen (009) berechnet. Hinsichtlich der Bodenzahl sind die Standorte überwiegend mittlerer Güte. Den höchsten Wert weist hier erneut Emmendingen auf, den niedrigsten wiederum Bardowick. In Bezug auf das Klima sind in Tabelle 3 die mittleren Niederschlagssummen und die mittlere Tagestemperatur über die Vegetationsperioden der Versuchsjahre dargestellt. Für die Serien 603 und 604 sind diese Ergebnisse getrennt nach Rotationen dargestellt. Die höchsten Niederschlagssummen wurden in der ersten Rotation in Lehmbach I (008) festgestellt, die niedrigsten in Herzberg. Für die Tagestemperaturen liegt Emmendingen in der zweiten Rotation erneut an der Spitze, die niedrigsten Temperaturen wurden für Stölzingen (005) in der ersten Rotation ermittelt.

Für die Flächen Thammenhain (010), Stiedenrode II (015), Bardowick (016) und Stiedenrode III (021) bestanden Schwierigkeiten nach der Versuchsanlage. Auf drei Standorten stellte der hohe Beikrautdruck nach der Pflanzung ein Wachstumshemmnis dar. In Stiedenrode II und III sowie in Bardowick kam die sehr trockene Witterung während der Flächenbegründung erschwerend hinzu. In Bardowick waren die Ausfälle so groß, dass die Neuanlage der Fläche im darauffolgenden Jahr (2014) erforderlich wurde. Bei der Fläche Bardowick handelt es sich um ein ehemaliges Rieselfeld.

2.2.2 Versuchsdesign, Aufnahmemethodik und Datenauswertung

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über das Versuchsdesign, die Aufnahmemethodik und die statistische Auswertung im FastWOOD TP1 gegeben. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Grotehusmann et al. (2015, 2017). Die Versuchsflächen aller Serien wurden nach einheitlichem Muster als unvollständige Blockanlagen (Dreisatzgitter) umgesetzt. In den Serien 603, 604 und 606 wurden die Prüfglieder in sechsfacher Wiederholung ausgebracht, in Serie 605 in fünffacher Wiederholung. Die Parzellengrößen und die Pflanzverbände sind in Tabelle 3 enthalten. Die Aufnahmen im Feld erfolgten jährlich im Sommer (Pathogene) und im Winterhalbjahr (Ausfälle, Zuwachs). Alle Flächen wurden in dreijähriger Umtriebszeit bewirtschaftet. Die Biomasseleistung wurde zum Ende jeder Umtriebszeit ermittelt. Dazu wurden klon- und versuchsweise allometrische Biomassefunktionen parametrisiert, um nicht alle Individuen in den Parzellen wiegen zu müssen. Der Ansatz folgt den Vorschlägen von Röhle (2009) und Hartmann (2010). Basierend auf den Einzelbaummassen wurde parzellenweise die Biomasse berechnet, auf einen Hektar bezogen und durch die Länge der Umtriebszeit (3 Jahre) geteilt. Dadurch ergibt sich der parzellenweise durchschnittliche Gesamtzuwachs in t_{atro} $\text{ha}^{-1} \text{a}^{-1}$.

Zur Auswertung der Serien wurde ein zweiphasiger Ansatz verwendet, der zunächst die einzelflächenweise Auswertung mit gemischten linearen Modellen vorsieht (vgl. Grotehusmann et al., 2015, 2017; Möhring und Piepho, 2009). Aus den Einzelflächenmodellen werden die um den Blockfehler bereinigten Prüfgliedmittelwerte in einer zweiten Phase mit einem gemischten linearen Modell innerhalb der Serie

flächenübergreifend analysiert. Für die Serien 603 und 604 sind die Ergebnisse der serienweisen Verrechnung in Grotehusmann et al. (2015, 2017) enthalten. Für die Serien 605 und 606 ist die serienweise Auswertung des Ertrags als dGZ in den Ergebnissen (s. u.) beschrieben.

Das einzelversuchsweise gemischte lineare Modell wird wie folgt formuliert:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} ist der Beobachtungswert einer Parzelle von Prüfglied i , in Wiederholung j und Block k . μ ist das Gesamtmittel, α_i ist der Effekt des Prüfglieds i , β_j ist der Effekt der j -ten Wiederholung, γ_k ist der Effekt des Blocks k und ε_{ijk} ist der Restfehler (Residuen). α_i ist der einzige feste Effekt, der Einfluss von Wiederholung und Block und der Restfehler werden als Zufallseffekte behandelt (Piepho et al., 2003).

Da in Serie 603 nach der ersten Rotation wegen zu großen Aufwands nicht alle Prüfglieder fortgesetzt gemessen wurden, erfolgte eine Neuauswertung dieser Versuche als Anlage mit randomisierten vollständigen Blöcken (Grotehusmann et al., 2017). Der Effekt γ_k fällt damit aus dem obig formulierten Modell heraus, der Bezug von Beobachtungswert und Restfehler passt sich entsprechend an. Basierend auf den versuchsweise parametrisierten Modellen wurden die um den Wiederholungs- und Blockeffekt bereinigten Prüfgliedmittelwerte berechnet und für die folgenden Darstellungen verwendet. Für die Pathogenuntersuchungen wurde der einzelbaumweise Befall mit Blattrost auf Parzellenebene gemittelt und für die Darstellungen entsprechend aggregiert (s. u.).

Zur statistischen Analyse wurde die Programmiersprache R (R Core Team, 2018) benutzt. Die Parametrisierung der gemischten Modelle erfolgte mit dem nlme Paket (Pinheiro et al., 2018). Die Modellannahmen der Normalverteilung und der Homoskedastizität der Residuen wurden mit QQ-Plots und der Darstellung der standardisierten Residuen insgesamt und je Wiederholung bzw. Block über den geschätzten Werten geprüft (hier nicht dargestellt). Bei Verletzung der Modellannahmen (keine Normalverteilung der Daten, Heteroskedastizität) wurde eine Transformation der abhängigen Variablen geprüft. Besonders für niedrige Werte in der ersten Rotation konnten Quadratwurzel- oder Log-Transformation die Verteilung der Werte verbessern. Zur besseren Interpretierbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse dann rücktransformiert.

Die um die Blockeffekte bereinigten Prüfgliedmittelwerte wurden mit dem Paket emmeans (Lenth, 2018) in Anlehnung an die LSMEANS Routine von SAS berechnet. Die flächenweisen Prüfgliedmittel wurden dann in einem weiteren linearen gemischten Modell flächenübergreifend innerhalb der Serien ausgewertet. Das Modell wurde entsprechend der folgenden Formel parametrisiert

$$y_{ij} = \mu + \gamma_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

y_{ij} ist der Ertrag des Prüfglieds i am Standort j , μ ist das Gesamtmittel der Versuchsserie, γ_i ist der Effekt von Prüfglied

i, β_j ist der Effekt des Standorts j und ε_{ij} ist der Restfehler. Der Standorteffekt β_j sowie der Restfehler ε_{ij} sind Zufallseffekte, der Einfluss des Genotyps γ_i wird als fester Effekt behandelt. Die Prüfgliedmittel aus der einzelversuchsweisen Auswertung wurden mit dem Kehrwert des Standardfehlers in der flächenübergreifenden Analyse gewichtet (vgl. Grotehusmann et al., 2015, 2017; Möhring und Piepho, 2009). Die Prüfgliedmittelwerte wurden zur Analyse wurzeltransformiert und dann für die Interpretation der Ergebnisse rücktransformiert. Basierend auf dem flächenübergreifenden Modell wurden je Serie Post-hoc-Tests durchgeführt, indem die Prüfgliedmittel mit dem Mittel der Kontrolle 'Max 1' verglichen wurden. Die Vergleiche wurden mit dem Paket emmeans (Lenth, 2018) durchgeführt, für die Vergleiche mit der Kontrolle wurden Dunnett Kontraste verwendet. Die Adjustierung der p-Werte erfolgte mit der Sidak Methode. Die den Vergleichen zugrundeliegende Fragestellung wurde einseitig formuliert, d. h. dass geprüft wurde, ob die Prüfgliedmittel statistisch signifikant größer sind als der 'Max 1'-Mittelwert.

Die Abbildungen 2 bis 5 wurden mit dem Paket ggplot2 erstellt (Wickham 2009). Die verwendeten Boxplots stellen am Strich in den Boxen den Median dar. Die oberen und unteren Grenzen der Boxen markieren den Interquartilabstand. Die Striche an den Boxen schließen Werte bis zum anderthalbfachen des Interquartilabstands ein. Werte außerhalb werden durch einzelne Punkte gekennzeichnet. Anderweitige Markierungen sind zu den jeweiligen Abbildungen erläutert.

Für die Daten zum Rostbefall und zur Ertragsleistung wurde getrennt nach Serien eine Varianzkomponentenanalyse durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem R Paket VCA (Schuetzenmeister und Dufey, 2017). Die Rostbefallsdaten wurden für diese Analyse arcsin-wurzeltransformiert. Das Modell für die Varianzkomponentenanalyse der Rostbefallsdaten wurde dem Modell von Yan (2014, Equation 1.4) folgend parametrisiert:

$$y_{ijkrs} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkrs}$$

y_{ijkrs} ist der Beobachtungswert einer Parzelle für Klon i am Standort j in Wiederholung r im Block s im Jahr k . μ ist das Gesamtmittel der Versuchsserie, α_i ist der Effekt des Prüfglieds i , β_j ist der Effekt des j -ten Standorts, γ_k ist der Effekt des Jahres k . In Klammern sind die Interaktionen der genannten Faktoren angegeben und ε_{ijkrs} ist wiederum der Restfehler (Residuen). Für die Varianzkomponentenanalyse der Ertragsdaten fiel der Faktor Jahr sowie alle Interaktionen an denen dieser Faktor beteiligt ist aus dem Modell. Die Analyse wurde hier getrennt nach Umtriebszeiten durchgeführt.

2.2.3 Pathogenuntersuchungen

Bereits ab dem jeweiligen Anlagejahr begann das Pathogen-Monitoring aller auf den Versuchsflächen der vier Serien befindlichen Klone (Tabelle 2). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Kontrolle der Befallsstärke mit dem Pappelblattrost *Melampsora larici-populina*. Aufgrund des Entwicklungszyklus des Pilzes (siehe Fey-Wagner et al., 2012) wurden

die Bonituren jährlich, Ende August/Anfang September durchgeführt. Für die Erfassung der Befallsstärke wurde ein vom INBO (Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Belgien) und der INRA (Institute National de la Recherche Agronomique, Frankreich) entwickeltes und für die Belange des Verbundprojektes optimiertes Bewertungsschema (Tabelle 4) angewendet. Die Charakterisierung des Befallsgrades erfolgt über eine Baumbonitur bei der die Stärke des Blattrostbefalls anhand des Schadbildes der gesamten Pflanze eingeschätzt und in Befallsintensitäten übersetzt wird (Tabelle 4). In den ersten beiden Beobachtungsjahren wurden zwei Bewertungsschemata getestet. Als besser für die Belange des Verbundprojektes stellte sich das Baumboniturschema (Tabelle 4) heraus. Da in den ersten beiden Beobachtungsjahren beide Boniturschemata getestet wurden, wurde für die Serie 603/604 in den Jahren 2010/2011 parzellenweise eine Gesamtansprache durchgeführt. In den folgenden Jahren erfolgte an vier festgelegten Pflanzplätzen je Parzelle die Charakterisierung des Befallsgrades. Die parzellenweise Stärke des Rostbefalls wurde aus diesen Werten gemittelt. So wurden auf den Versuchsflächen der hier beschriebenen vier Serien jährlich bis zu 14.744 Bäume in 3.186 Parzellen auf den Befallsgrad mit Pflanzenpathogenen hin bonitiert. Mit *Melampsora larici-populina* befallene Blätter wurden während der Bonituren geerntet und die Uredosporen für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 4

Boniturschema für Pappelblattrost (*Melampsora larici-populina*)

Bonitur-note	Beschreibung	Befalls-rate [%]
1	keine Uredinien	0
1,25	am ganzen Baum nur ein paar Uredinien, schwer zu finden	12,5
1,5	schwache Infektion der Blätter bis in 25 % der gesamten Baumhöhe	25
2	leicht zu detektierende Infektion der Blätter bis in 50 % der gesamten Baumhöhe, darüber schwer zu finden, aber vorhandene Infektion	50
2,5	Infektion der Blätter bis in 75 % der gesamten Baumhöhe	75
3	Infektion des gesamten Baumes, aber Blätter sind noch nicht verbräunt	
3,5	Infektion des gesamten Baumes und beginnende Verbräunung der unteren Blätter	
4	Infektion des gesamten Baumes, Verbräunung der unteren 25 % der Blätter	
4,5	Infektion des gesamten Baumes, Verbräunung der unteren 50 % der Blätter und beginnender Blattverlust	100
5	starke Infektion des gesamten Baumes, bis zu 50 % Blattverlust	
5,5	starke Infektion des gesamten Baumes, bis zu 80 % verbräunte/abgefallene Blätter, nur wenige an der Triebspitze noch grün	
6	alle Blätter tot/abgefallen	

3 Ergebnisse

3.1 Ertrag

Abbildung 2 enthält einen Überblick über den mittleren durchschnittlichen Gesamtzuwachs (dGZ) je Prüfglied je Versuchsfläche getrennt nach Rotation (Mittelwert wie beschrieben als LSMEAN aus einzelversuchsweiser Auswertung).

Die Versuchsflächen der Serie 603 und 604 konnten im Mittel deutliche Ertragszunahmen von der ersten zur zweiten Rotation verbuchen. In Serie 604 fiel der Anstieg von 4,71 auf 11,7 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ etwas größer aus als in Serie 603 mit 5,23 auf 10,7 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$. Im Vergleich mit den Serien, in denen bisher nur eine Rotation gemessen wurde, fällt das schlechte Abschneiden der Serie 605 mit durchschnittlich 2,62 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ auf. Die Serie 606 zeigt sich dagegen in der ersten Rotation am ertragsstärksten mit 6,14 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ im Mittel über alle Prüfglieder und Versuchsflächen.

In der Serie 603 ist in der ersten Rotation eine deutliche Differenzierung der Versuchsflächen hinsichtlich des dGZ erkennbar. Die Fläche Thammenhain (010) schneidet mit 0,75 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ am schlechtesten im Vergleich über alle Serien hinweg ab. Interessant ist die enorme Ertragssteigerung in der zweiten Rotation auf 8,55 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ im Mittel. Im Vergleich erreicht die Fläche damit dennoch erst ein Ertragsniveau, das in Emmendingen (009: 8,03 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$) und Lehmbach I (008: 9,01 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$) bereits in der ersten Rotation erreicht wurde. Lediglich Anderlingen (007) konnte in der Rangfolge überholt werden mit einem dGZ in der ersten Rotation von 1,93 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ und in der zweiten Rotation von 5,15 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$. Grotehusmann et al. (2017) weisen bereits darauf hin, dass diese Fläche für den Kurzumtrieb

ungeeignet sei. Die beiden Flächen Lehmbach I und Emmendingen erzielten die höchsten Erträge in der ersten Rotation, wurden jedoch in der zweiten Umtriebszeit von Wallstawe I (006), die in der ersten Rotation mit 4,81 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ an vierter Stelle und unter dem Serienmittel lag, überholt (006: 15,04 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$). Die Versuchsfläche Stölzingen (005) schnitt in beiden Umtriebszeiten mit einem überdurchschnittlichen Ertrag von 7,01 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ bzw. 11,76 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ähnlich ab.

Es fällt auf, dass in Anderlingen (007) und Thammenhain (010) 'Max 1' nahe am Versuchsmittel oder sogar darüber liegt. Auf allen anderen Standorten ist dagegen in beiden Rotationen ein Großteil der Prüfglieder deutlich wüchsiger als 'Max 1'.

In der Serie 604 mit Prüfgliedern aus überwiegend freier Abblüte zeigt sich in der ersten Rotation zwischen den Versuchsflächen ein homogeneres Bild als in Serie 603: Stiedenrode I (011) brachte mit im Mittel 6,02 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ die höchsten Erträge hervor, gefolgt von Lehmbach II (013) mit 4,87 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ und Wallstawe II (012) mit dem niedrigsten Ertragsniveau von 3,26 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$. Zur zweiten Rotation weist Wallstawe II (012) eine ähnliche Ertragsdynamik wie ihre Nachbarfläche Wallstawe I (006) auf. Die Steigerung auf 12,22 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ versetzt diese Fläche an die Spitze der jetzt umgekehrten Rangfolge, gefolgt von Lehmbach II (013) mit 11,87 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ und Stiedenrode I (011) mit 10,96 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$. Unter praktischen Gesichtspunkten handelt es sich hier um keine deutlichen Differenzen. Die Leistungsunterschiede der Spitzenprüfglieder fallen jedoch deutlicher aus. Auffällig ist jedoch die breite Streuung der Prüfgliedererträge an allen drei Standorten, die in der zweiten Rotation deutlich zugenommen hat. Während in der ersten Rotation die Differenzen zu 'Max 1' in Stiedenrode I

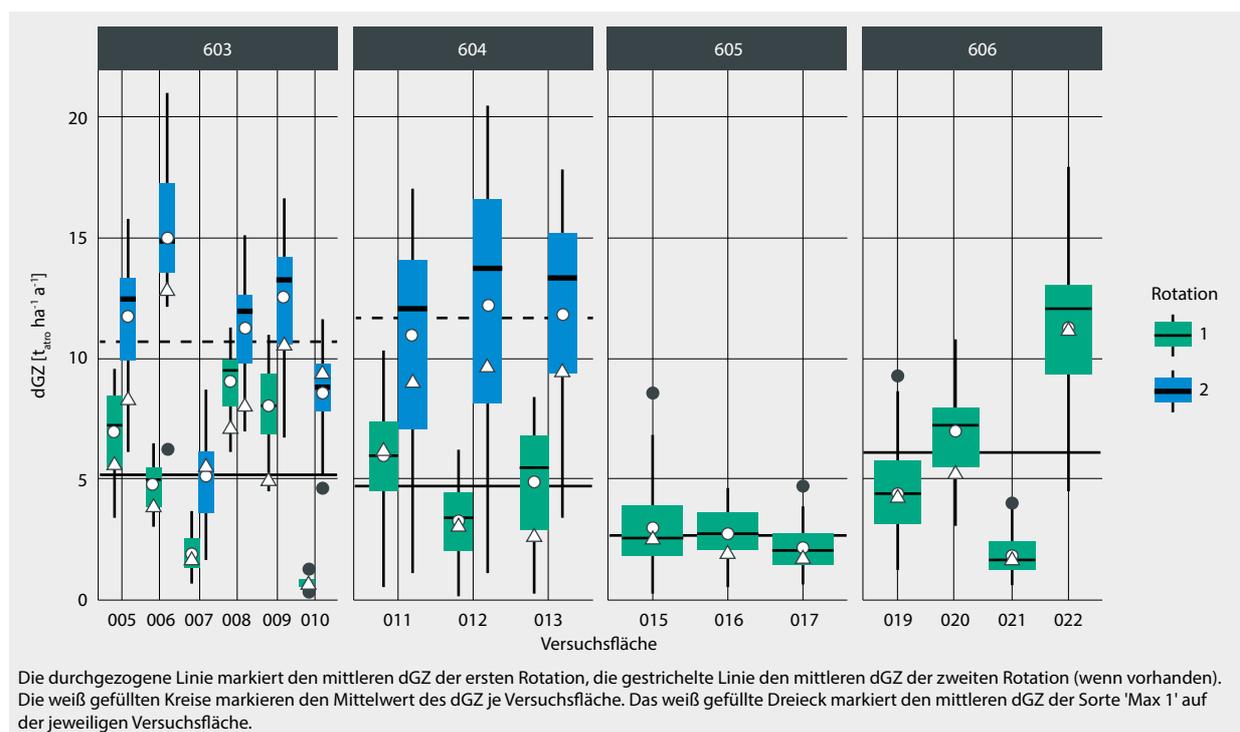


Abbildung 2

Ertrag als dGZ der Prüfglieder auf den Versuchsflächen der Serien 603 bis 606

und Wallstawe II noch gering waren, konnte bei mehreren Prüfgliedern in der zweiten Rotation eine deutlich positive Abweichung zur Kontrolle festgestellt werden.

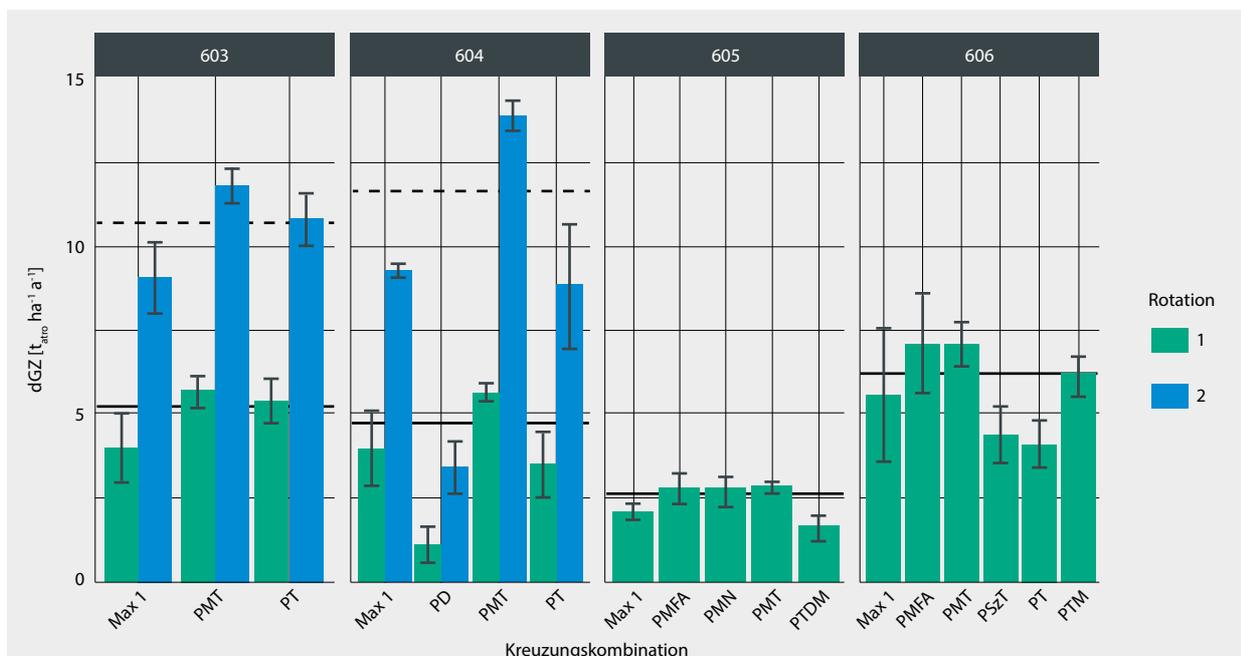
Serie 605 mit den ersten gelenkten Kreuzungen im Feldanbau weist vergleichsweise geringe Unterschiede im dGZ der ersten Rotation zwischen den Versuchsflächen auf. Stiedenrode II (015) liegt an erster Stelle mit $2,96 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ gefolgt von Bardowick (016) mit $2,74 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ und Graupa (017) mit $2,14 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$. Auf allen drei Flächen ist eine geringe Streuung der Prüfgliedmittel festzustellen, die in Stiedenrode II noch am höchsten ist. Einzelne Prüfglieder schneiden hier im Vergleich zu 'Max 1' deutlich besser ab. Die Differenz vom Gesamtmittel zu 'Max 1' ist in Bardowick (016) am größten.

Deutliche Unterschiede zwischen den Standorten und Prüfgliedern sind in der ersten Rotation der Serie 606 zu beobachten. Der Standort Herzberg (022) liegt mit einem mittleren dGZ von $11,25 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ erheblich über dem Seriennittel und weist damit von allen Versuchen serienübergreifend den höchsten Ertrag auf. Auffällig ist, dass hier auch die größte Streuung vorliegt und dass 'Max 1' mit dem Versuchsmittel fast gleichauf liegt. Die Versuchsfläche Siemen (020) liegt mit mittleren $7,00 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ebenfalls über dem Seriendurchschnitt. Im Gegensatz zu Herzberg ist hier ein Großteil der Prüfglieder 'Max 1' überlegen. Die Versuchsflächen Augustfehn (019) mit $4,46 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ und Stiedenrode III (021) mit $1,86 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ liegen beide unter dem Mittel der Serie und weisen ein ähnliches Abschneiden von 'Max 1' zum Versuchsmittel auf. Die Streuung der Prüfgliedmittel ist in Augustfehn jedoch größer als in Stiedenrode III.

Abbildung 3 enthält eine Darstellung zum Vergleich der Kreuzungskombinationen in und zwischen den Serien. 'Max 1' wurde hier wie für die Rostdaten als Vergleichsprüfglied gesondert dargestellt. Datenbasis für die gebildeten Mittelwerte und deren Standardfehler waren die LSMEANS der einzelversuchsweisen Auswertung.

In Serie 603 schneiden die *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* Kreuzungen (PMT) ähnlich wie die reinen *P. trichocarpa* Klone (PT) ab. In der ersten Rotation liegen beide knapp über dem Seriendurchschnitt (PMT mit $5,68 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ und PT mit $5,40 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$). In der zweiten Rotation schneiden die PMT Kreuzungen mit $11,81 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ gegenüber $10,82 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ etwas besser ab. 'Max 1' liegt jeweils unter dem Mittelwert der Versuchsflächen.

Die PMT Hybriden zeigen in Serie 604 eine ähnliche relative Ertragsstärke zum Gesamtdurchschnitt, sowohl in der ersten Rotation mit $5,62 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$, als auch in der zweiten Rotation mit $13,91 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$. Anders als in der ersten Serie liegen die *P. trichocarpa* Prüfglieder in der ersten Rotation mit $3,51 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ noch über dem Gesamtmittel, in der zweiten Rotation mit $8,83 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ jedoch deutlich darunter. Reine *P. deltoides* Klone (PD) schneiden in beiden Rotationen stark unterdurchschnittlich ab mit $1,06 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ bzw. $3,39 \text{ t}_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$. Der dGZ von 'Max 1' liegt in beiden Rotationen ebenfalls unter dem Gesamtmittel und jeweils auf einem ähnlichen Ertragsniveau wie die Klone der PT Kreuzungen. Die PD Genotypen schneiden in der ersten und zweiten Rotation im Vergleich schlechter als 'Max 1' ab.



Die durchgezogene Linie markiert den mittleren dGZ der ersten Rotation, die gestrichelte Linie den mittleren dGZ der zweiten Rotation (wenn vorhanden). Die Whisker kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts. Dargestellt sind nur Kreuzungsgruppen, die mit mindestens zwei Prüfgliedern in der Serie vertreten sind. Die Anzahl der enthaltenen Prüfglieder je Kreuzungskombination kann Tabelle 2 entnommen werden. In Serie 603 sind nur die Prüfglieder und Kreuzungskombinationen enthalten, die von Grotehusmann et al. (2017) zum Ende der zweiten Rotation ausgewertet wurden.

Abbildung 3

Ertrag als durchschnittlicher Gesamtzuwachs (dGZ) im Mittel der Prüfglieder gruppiert nach Kreuzungskombination getrennt für die Versuchsserien 603 bis 606

Analog zu den geringen Unterschieden zwischen den Standorten zeigen die Kreuzungskombinationen in Serie 605 eine geringe Differenzierung und liegen weitgehend auf einem ähnlich niedrigen Niveau. Die PMT weisen einen schwach überdurchschnittlichen dGZ von 2,81 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ auf. Die Nachkommen von *P. maximowiczii*-Müttern in freier Abblüte (PMFA) erbringen mit 2,73 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ eine ähnliche Biomasseleistung wie die Nachkommen aus *P. maximowiczii* × *P. nigra* Kreuzungen (PMN) mit 2,70 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹. Nachkommen einer *P. (P. trichocarpa* × *P. deltoides*) Mutter mit *P. maximowiczii* Vätern schneiden mit 1,58 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ schlecht ab. 'Max 1' erreicht im Vergleich dazu etwas bessere Erträge, liegt aber mit 2,06 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ auch unter dem Durchschnitt.

Die Kreuzungen in Serie 606 zeigen größere Unterschiede in ihrer Wuchsleistung. PMT und PMFA Kreuzungen liegen mit gemittelten 7,08 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ gleichauf. Der Standardfehler der PMFA Prüfglieder fällt hier wegen der geringeren Anzahl gegenüber PMT größer aus. Reine *P. trichocarpa* Klone sind mit 4,07 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ unterdurchschnittlich, vergleichbar zu den artgleichen Klonen in Serie 604 und schwächer als jene in Serie 603. 'Max 1' liegt in der jüngsten Serie unter dem Durchschnitt mit 5,56 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹. Auffällig ist hier ebenfalls der große Standardfehler, der mitunter in der geringeren Anzahl an Beobachtungen als bei den zusammengefassten Kreuzungskombinationen begründet liegt. Zum Teil spiegeln sich hier jedoch auch die großen Unterschiede zwischen den Standorten in Serie 606 wieder (Abbildung 2).

Tabelle 5 enthält die Ergebnisse der Varianzkomponentenanalyse der Ertragsdaten getrennt nach Serien.

Der Einfluss des Faktors Genotyp ist in Serie 604 am deutlichsten und nimmt zur zweiten Rotation von 34% auf 67% noch weiter zu, was sich mit den Beobachtungen aus Abbildung 2 deckt. Die durch den Standort verursachte Ertragsvariation ist in der ersten Rotation der Serie 603 mit 63% am größten, gefolgt von Serie 606 mit 51%. Die niedrigsten Anteile wurden in der zweiten Rotation der Serie 604 (1%) und der ersten Umtriebszeit in Serie 605 (4%) beobachtet. In den ältesten Serien 603 und 604 ist im Übergang zwischen den Umtriebszeiten eine ähnliche Dynamik erkennbar. Der Anteil der durch den Faktor Klon verursachten Streuung steigt an, während der Anteil für den Faktor Versuchsfläche sinkt. Der Anteil der durch die Interaktion von Klon und

Standort erklärten Varianz nimmt geringfügig zu, bleibt aber auf vergleichsweise geringem Niveau. Letzterer ist lediglich in Serie 605 mit 18% von größerem Anteil und Bedeutung. Der Restfehler und dessen Anteil an der Gesamtvariation ist über alle Serien und Rotationen hinweg vergleichsweise groß. Hier muss jedoch bedacht werden, dass in dieser Analyse aufgrund des gewählten Modells die Wiederholungs- und Blockeffekte sowie weitere mögliche räumliche Trends im Restfehler enthalten sind.

3.2 Blattrost

Abbildung 4 gibt zunächst einen Überblick über die nach zwei Rotationen (Serien 603 und 604) bzw. nach einem abgeschlossenen Rotationszyklus (Serie 605 und 606) beobachtete Blattrostinfektionsintensität über alle Klone je Versuchsfläche.

In der Serie 603 (Abbildung 4) liegt die Infektionsintensität der Versuchsfläche Emmendingen (009) deutlich (79%) über dem Serienmittel (44%), hier ist der positive Einfluss des feucht-gemäßigten/ozeanischen Klimas des Oberrheingraben in Emmendingen (Baden-Württemberg) auf die Sporenbildung und somit die Infektionsrate zu erkennen. Auch in Lehmbach (008, Bayern) begünstigte das feucht-kontinentale Klima auf diesem Standort die Infektionsintensität (47%), diese lag jedoch, ähnlich den Versuchsflächen 006 (trockener Standort mit kontinental geprägtem Klima, Wallstawe, Sachsen-Anhalt; 41%) und 007 (küstennahen Standort mit atlantisch geprägtem Klima, Anderlingen, Niedersachsen; 42%), dicht am Serienmittel. Im raueren Klima des Mittelgebirgsstandort Stölzingen (005, Nordhessen; 34%) lag die Befallsintensität deutlich unter dem Serienmittel und auf der Versuchsfläche 010 (Thammenhain, Sachsen) wurde über beide Rotationszyklen hinweg kontinuierlich der geringste Blattrostbefall (19%) gefunden. Hier kommen Trockenheitsereignisse zum kontinental geprägten Klima hinzu.

Bei der Serie 604 (Abbildung 4) sind Tendenzen analog zur Serie 603 zu erkennen. Jedoch wichen alle drei Standorte hier nur leicht vom Serienmittel (15%) ab. Auch in dieser Serie lag die Infektionsrate im feucht-kontinentalen Klima des südlichsten Standortes 013 (Lehmbach, 19%) über dem Serienmittel. Am Mittelgebirgsstandort 011 (Stiedenrode, Hessen, 11%) mit, dem Standort 005 sehr ähnlichem Klima,

Tabelle 5

Ergebnisse der Varianzkomponentenanalyse der Ertragsdaten (dGZ in [t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹])

Ursache	Serie 603				Serie 604				Serie 605		Serie 606	
	1. Rotation		2. Rotation		1. Rotation		2. Rotation		1. Rotation		1. Rotation	
	VK	Anteil [%]										
Gesamt	16,14	100	24,89	100	10,38	100	25,58	100	0,32	100	26,91	100
Klon	0,64	4	3,29	13	3,56	34	17,20	67	0,03	10	1,61	6
VFL	10,16	63	8,18	33	1,65	16	0,34	1	0,01	4	13,74	51
Klon * VFL	0,48	3	0,88	4	0,26	3	1,21	5	0,06	18	1,05	4
Fehler	4,86	30	12,54	50	4,91	47	6,82	27	0,22	68	10,52	39

In Serie 605 wurden die Ertragswerte wurzeltransformiert. Interaktionen der Streuungsursachen werden mit * gekennzeichnet. Je Serie werden die Varianzkomponenten (VK) der beteiligten Faktoren und deren Anteil an der Gesamtvarianz angegeben. In den beiden ältesten Serien erfolgt die Angabe der Varianzkomponenten getrennt nach Rotationen.

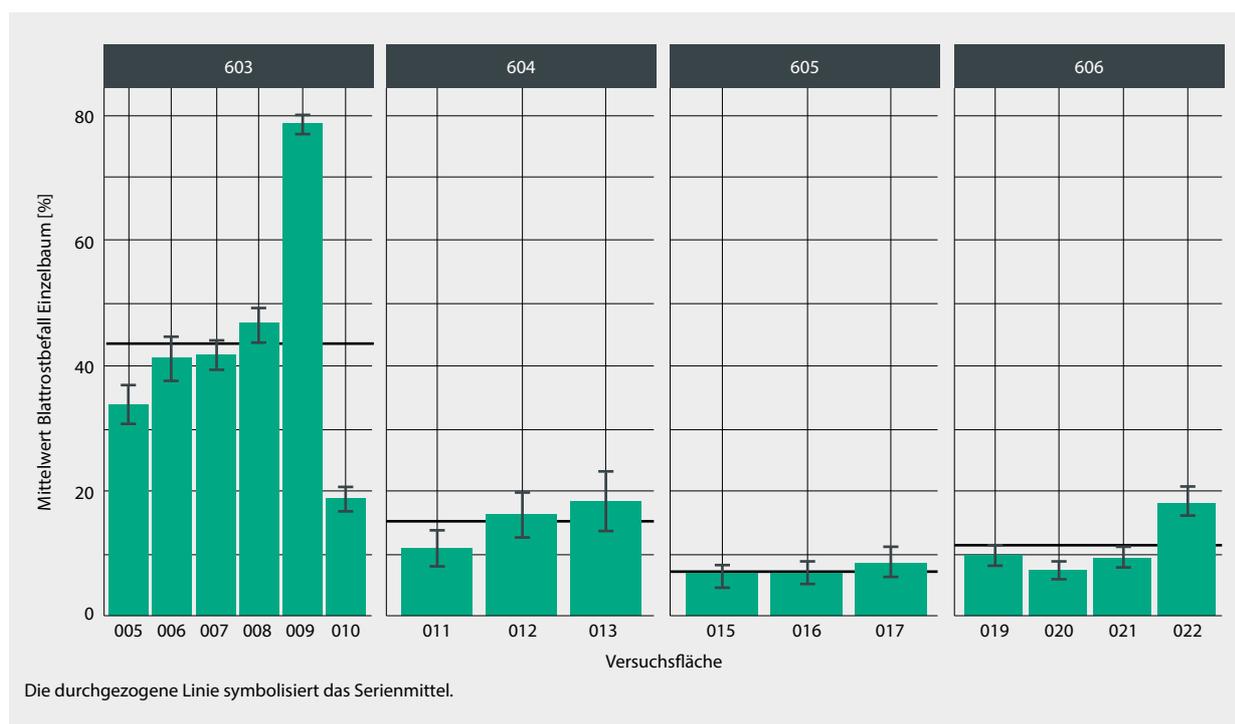


Abbildung 4

Beobachtete mittlere Blattrostinfektionsintensität über alle Klone je Versuchsfläche und Serie mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (Whisker)

lag der Blattrostbefall der Klone deutlich unter dem Serienmittel. Am Standort 012 (Wallstawe) zeigte sich trotz kontinental geprägtem Klima mit jedoch mehr Feuchtigkeit als in Thammenhain (010) mit 16% eine leicht über dem Serienmittel liegende Befallsintensität.

Nach einem abgeschlossenen Rotationszyklus konnte an den Klonen auf den Standorten der Serie 605 (Abbildung 4) im Mittel eine sehr geringe Befallsintensität nachgewiesen werden. Lediglich die Versuchsfläche in Graupa (017, Sachsen) lag mit rund 9% leicht über dem Serienmittel von 7%. Die Versuchsflächen 015 und 016 in Stiedenrode (Hessen) und Bardowick (Niedersachsen) zeigten mit rund 7% sehr ähnlichen Blattrostbefall unter dem Serienmittel.

In der Serie 606 (Abbildung 4) zeigte nur die Versuchsfläche 022 (Herzberg) eine deutlich über dem Serienmittel von 11% erhöhte Blattrostbefallsintensität (18%). Auf den Standorten 019 Augustfehn (rund 10%) und 021 Stiedenrode III (9%) wurden trotz unterschiedlicher Klimabedingungen (Tabelle 3) sehr ähnliche, knapp unter dem Serienmittel liegende Infektionsprozente ermittelt. Die Klone auf dem klimatisch subkontinental beeinflussten Standort im Wendland (020, Siemen) erwiesen sich mit einem Flächenmittel von 8% nach der ersten Rotation als am wenigsten vom Blattrost beeinflusst.

Insgesamt können durch den Vergleich der doppelt (006-012 und 008-013) und im Fall Stiedenrode sogar dreifach vorkommenden, benachbarten Versuchsflächen standörtliche Einflüsse auf diesen Flächen minimiert werden.

Als weitere Einflussgrößen auf die Befallsintensität sind die jahresklimatischen Bedingungen und die genetische

Prädisposition aufgrund der Art- und Kreuzungskombinationen zu berücksichtigen. Aber auch innerhalb einer Art oder Kreuzungskombination sind klonale Tendenzen/Anfälligkeiten zu erkennen. Betrachtet man den Intensitätsverlauf des Blattrostbefalls der einzelnen Standjahre (über die gesamte jeweilige Serie gerechnet, hier nicht dargestellt) so wird deutlich, dass es Jahre mit generell stärkerer Blattrostbefallsintensität gibt. Drei Versuchsserien (603-605) überschneiden sich in ihrem Beobachtungszeitraum in den Jahren 2013 bis 2015. Beim Vergleich dieser Serien und Jahre zeigte sich, unabhängig vom Standort und Standjahr, eine deutliche Übereinstimmung der relativen Befallsintensität. Bei allen drei Serien war das Jahr 2014 das „stärkste“ Rostjahr, in welchem alle Serienmittel weit über dem jeweiligen Gesamtmittel liegen. Flankiert wurde dieses Rostjahr von zwei Jahren, in denen die Befallsintensitäten deutlich geringer waren. Trotz ihrer insgesamt höheren Befallsintensität im Vergleich mit den anderen drei Serien zeigt sich dies am deutlichsten in der Serie 603. Bei dieser Serie wurde für das „Rostjahr“ 2014 eine Befallsintensität von 75% ermittelt, während in 2013 und 2015 nur 21% und 19% zu verzeichnen waren. Hinweise auf einen Alterstrend lassen sich hier nicht beobachten.

In Abbildung 5 sind die Pathogenbefallsintensitäten der in den Serien enthaltenen Klone, gruppiert nach Art bzw. Kreuzungskombination jeweils gegenüber dem, bisher auf KUP häufig angebauten Klon 'Max 1', dargestellt. Die Säulen repräsentieren dabei das Mittel der Gruppe über die gesamte Standzeit (zwei bzw. ein Rotationszyklus) auf allen Versuchsflächen.

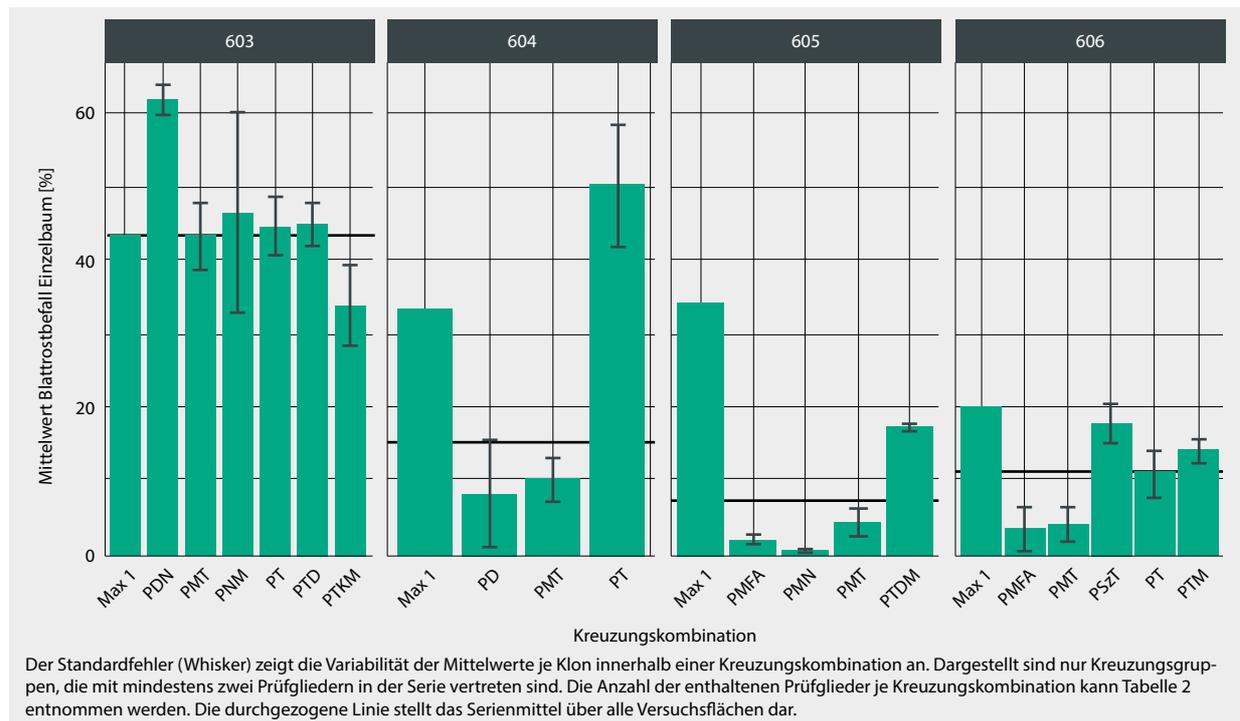


Abbildung 5

Mittlere Pathogenbefallsintensitäten gruppiert nach Art bzw. Kreuzungskombination. Jeweils gegenüber 'Max 1' dargestellt.

Die stärkste Befallsintensität zeigte in der Serie 603 (Abbildung 5) die Kreuzungskombination aus der amerikanischen und europäischen Schwarzpappel *Populus deltoides* × *Populus nigra* (PDN), die mit 62% deutlich über dem Serienmittel von 44% lag. Die Prüfglieder aus der Dreifachkreuzung (*P. trichocarpa* × *P. koreana*) × *P. maximowiczii* (PTKM) waren mit 34% vom Blattrost am wenigsten befallen. Kreuzungskombinationen aus reinen Balsampappelarten (*P. trichocarpa*, PT und *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa*, PMT) wiesen Befallsintensitäten (45% und 43%) nahe dem Serienmittel auf. Die Prüfglieder der intersektionellen Kreuzungskombinationen (*P. nigra* × *P. maximowiczii*, PNM und *P. trichocarpa* × *P. deltoides*, PTD) lagen bei fast gleichem Blattrostbefallsniveau jedoch noch leicht über den Balsampappeln.

Die Prüfglieder auf den Standorten der Serie 604 (Abbildung 5) konnten in drei Gruppen zusammengefasst werden. Dabei ergab sich, dass die Klone der reinen amerikanischen Balsampappel PT in dieser Serie die mit Abstand stärkste Befallsintensität (50%) zeigten und deutlich über dem Serienmittel (15%) und auch über den beiden anderen Gruppen aus reiner amerikanischer Schwarzpappel *P. deltoides* (PD, 8%) und den Balsampappelhybriden PMT (10%) lagen. Nach zwei Rotationszyklen lag das Versuchsmittel in dieser Serie bei nur knapp der Hälfte dessen, welches die Serie 603 aufwies. Die Befallsintensität der Klone der Art PT ist jedoch in beiden Serien vergleichbar hoch, während die Hybriden aus PMT in der Serie 604 wesentlich geringer befallen waren als jene aus der Serie 603.

Die Serie 605 (Abbildung 5) enthält keine Klone reiner Arten. Somit kann hier leider kein Vergleich zwischen PT und PMT gezogen werden. Nach einem abgeschlossenen

Rotationszyklus erwiesen sich die Klone der intersektionellen Kreuzung aus (*P. trichocarpa* × *P. deltoides*) × *P. maximowiczii* (PTDM) gegen das Pflanzenpathogen am sensibelsten. Mit 17% lagen sie fast um das Dreifache höher als das Serienmittel (7%). Im Gegensatz dazu zeigten die Klone der in dieser Serie enthaltenen zweiten intersektionellen Kreuzung aus *P. maximowiczii* × *P. nigra* (PMN) einen extrem geringen Rostbefall von 0,4%. Die auch in dieser Serie enthaltenen PMT lagen wie in den Serien 603 und 604 nahe bei (4%), aber noch unterhalb des Serienmittels.

Die Klone auf den Standorten der Serie 606 (Abbildung 5) zeigten im Serienmittel eine gegenüber der Serie 605 fast verdoppelte Blattrostinfektionsrate (11%). Hier lagen lediglich die Prüfglieder der Art *P. trichocarpa*, ähnlich den Klonen der gleichen Art aus der Serie 603 am Versuchsmittel (11%). Am schlechtesten schnitten in dieser Serie die Klone der Kreuzungskombination, die die asiatische Art *P. szechuanica* mit der amerikanischen Balsampappel *P. trichocarpa* (PSzT) vereint, ab (18%). Die Kontinuität der Balsampappelhybridkombination PMT, eine geringere Infektionsrate (4%) als das Serienmittel aufzuweisen, bestätigt sich auch in dieser Versuchsserie. Im Gegensatz dazu zeigten die Klone der reziproken Kreuzung aus *P. trichocarpa* × *P. maximowiczii* (PTM) in dieser Versuchsserie hohe Infektionsraten von im Mittel 14%. In den Serien 605 und 606 sind Klone von *P. maximowiczii* in freier Abblüte (PMFA) enthalten. Bei beiden Serien wurden diese Prüfglieder wenig durch den Blattrost geschädigt. Die genaue Kreuzungskombination dieser vier Prüfglieder konnte bisher jedoch noch nicht bestimmt werden, so dass hier keine Aussage über den Einfluss der Kreuzungskombinationen getroffen wird.

Es wird deutlich, dass die durch die Selektions- und Züchtungsbemühungen des FastWOOD-Projekts entstandenen und getesteten Klone ein mindestens ebenso gutes bzw. ein deutlich verbessertes Toleranzverhalten in Bezug auf die Infektionsintensität mit *M. larici-populina* gegenüber dem Standardklon 'Max 1' aufweisen.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Varianzkomponentenanalyse für den Blattrostbefall enthalten.

Der Anteil der durch den Genotyp verursachten Varianz ist in Serie 604 mit 37% und in Serie 605 mit 27% am Größten. In Serie 603 und 606 fallen diese Anteile mit 11% und 6% deutlich niedriger aus. Der Anteil des Standorts ist in Serie 603 mit 16% auffällig größer als in den anderen Serien, deren Anteil jeweils gleich oder kleiner 2% ist. Die durch die Interaktion von Klon und Standort verursachte Varianz ist dagegen über alle Serien mit weniger als 5% Anteil an der Gesamtvariation sehr gering. Der Faktor Versuchsjahr konnte in Serie 603 mit 21% und 605 mit 40% vergleichsweise größere Anteile der Gesamtstreuung erklären. In Serie 604 (4%) und 605 (1%) fiel dieser Einfluss deutlich geringer aus. Die Wechselwirkung von Klon und Jahr beeinflusste lediglich in Serie 606 die Gesamtvariation zu nennenswerten Anteilen mit 19%. Die dreifache Interaktion aus Genotyp, Versuchsfläche und Jahr ergab in Serie 605 den größten Anteil an der Gesamtvarianz. Der Restfehler, der hier die Effekte der Blöcke und der Wiederholungen enthält, zeigte bis auf Serie 605 mit 17% ein vergleichbar hohes Niveau von 25% bis 28% hinsichtlich der Anteile an der Gesamtvariation. Die Anteile der Restfehler sind hier jedoch nicht so hoch wie für die Ertragsdaten.

3.3 Auswahl überlegener Klone in Serie 605 und 606 nach der ersten Rotation

Basierend auf der zweiphasigen Auswertung der Ertragswerte in den Versuchsserien 605 und 606 konnten je Serie zwei Klone identifiziert werden, die der Kontrolle 'Max 1' in der ersten Rotation signifikant überlegen sind. Tabelle 7 enthält die Ergebnisse dieser Auswertung.

Bei allen ausgewählten Klone handelt es sich um PMT Kreuzungen. Die Erträge der Spitzenklone liegen in beiden Serien jeweils über dem Gesamtmittel, über dem Mittel aller Klone der Kreuzungskombination PMT und über dem mittleren Ertrag von 'Max 1'. Das Ertragsniveau der beiden Spitzenklone in Serie 606 liegt über dem der Klone in Serie 605, was aber wie beschrieben vorrangig durch den Standorteinfluss bedingt sein dürfte. Letzteres erklärt auch die Unterschiede in den Standardfehlern, da die standörtlich bedingte Varianz in Serie 606 größer ist als in Serie 605. Die Rostdaten basieren auf den Mittelwerten und erlauben keine Aussagen beruhend auf schließender Statistik. Dennoch wird hier deutlich, dass die insgesamt vier Spitzenklone im Vergleich innerhalb der Serien sehr niedrige Befallsintensitäten aufweisen. Bei der hier dargestellten Analyse ist zu berücksichtigen, dass sich zwischen den Standorten Rangverschiebungen ergeben können. Die Spitzenklone sind zwar insgesamt flächenübergreifend überlegen, aufgrund von Genotyp-Umwelt-Interaktion können die Rangfolgen der Klone an den einzelnen Standorten anders ausfallen. Dies sollte noch näher analysiert bzw. bei Vorliegen der Daten aus der zweiten Umtriebszeit evaluiert werden.

4 Diskussion

Sowohl bei der CO₂-Vermeidungsleistung als auch bei den CO₂-Vermeidungskosten ergeben sich deutliche Vorteile bei der Verwendung von Hackschnitzeln aus Kurzumtriebsplantagen gegenüber beispielsweise Biogas aus Mais, wie der agrarpolitische Wissenschaftsbeirat des BMEL in einem Gutachten feststellte (Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik beim Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (WBA) 2007). Auch der Naturschutzbund sieht deutliche ökologische Vorteile von Kurzumtriebsplantagen gegenüber intensiv bewirtschafteten Ackerflächen (Bielefeldt et al., 2008). Insofern ist die Erzeugung von Biomasse in Kurzumtriebsplantagen eine effektive Alternative zum Einsatz von fossilen Brennstoffen. Im Gegensatz zu

Tabelle 6

Ergebnisse der Varianzkomponentenanalyse der parzellenweisen Blattrostbefallsdaten

Ursache	Serie 603		Serie 604		Serie 605		Serie 606	
	VK	Anteil [%]						
Gesamt	0,411	99	0,186	100	0,120	100	0,193	101
Klon	0,046	11	0,068	37	0,032	27	0,011	6
VFL	0,068	16	0,001	1	0,000	0	0,003	2
Jahr	0,087	21	0,008	4	0,002	1	0,077	40
Klon * VFL	0,005	1	0,008	4	0,000	0	0,000	0
Klon * Jahr	0,003	1	0,009	5	0,009	8	0,037	19
VFL * Jahr	0,066	16	0,016	9	0,013	11	0,005	3
Klon * VFL * Jahr	0,034	8	0,023	12	0,043	36	0,009	5
Fehler	0,101	25	0,053	28	0,020	17	0,050	26

Die mittleren Befallsprozente je Parzelle sind asin-wurzeltransformiert. Interaktionen der Streuungsursachen werden mit * gekennzeichnet. Je Serie werden die Varianzkomponenten (VK) der beteiligten Faktoren und deren Anteil an der Gesamtvarianz angegeben.

Tabelle 7

Ergebnisse der flächenübergreifenden Serienauswertung basierend auf den Einzelauswertungen in den Versuchsserien 605 und 606

Serie	Klon	Kreuzung	Ertrag					Rost	
			Mittel		Vergleiche			Mittel	
			dGZ [t_{atro} ha ⁻¹ a ⁻¹]	SE	FG	t-Statistik	p-Wert	Befall [%]	SE
605	NW11-0161R	PMT	5,95	0.92	2	3.57	0.01	0.35	0.35
605	NW11-0153F	PMT	5,45	0.89	2	3.17	0.04	0.00	0.00
605	'Max 1'	PNM	2,07	0.70	2			34.24	6.53
606	NW12-0725M	PMT	8,70	2.61	3	3.25	0.03	0.52	0.07
606	NW12-0727P	PMT	8,46	2.56	3	3.13	0.04	0.10	0.10
606	'Max 1'	PNM	5,19	2.03	3			20.01	3.17

Basierend auf paarweisen Vergleichen mit der Kontrolle 'Max 1' sind je Serie die beiden signifikant überlegenen Prüfglieder angegeben. Zu den Klonen und zur Kontrolle sind die mittleren Erträge der ersten Rotation (dGZ) sowie der zugehörige Standardfehler (SE) angegeben. Die Spalte FG bezeichnet die Freiheitsgrade für das flächenübergreifende Modell der jeweiligen Serie. Aus den Post-hoc-Tests sind die für den Vergleich des jeweiligen Klons mit 'Max 1' zugehörige Teststatistik (t-Statistik) und der darauf beruhende p-Wert angegeben. Zum Blattrost sind der mittlere parzellenweise Befall sowie der Standardfehler (SE) des jeweiligen Mittelwerts angegeben.

anderen Ländern wie beispielsweise in Schweden, wurde in Deutschland allerdings relativ wenig Züchtungsarbeit zur Entwicklung neuer, speziell zur Biomasseproduktion geeigneter Gehölze geleistet. Forstpflanzenzüchtung ist eine Daueraufgabe, die Kontinuität in der züchterischen Bearbeitung erfordert. Hier ergeben sich deutliche Parallelen zur landwirtschaftlichen Züchtung und dem Sortenwesen, in dem diese Kontinuität gegeben ist. In 10 Jahren intensiver Züchtungsarbeit hat das Verbundprojekt FastWOOD die Neuzüchtung von Pappeln und Weiden für die Biomasseproduktion erfolgreich vorangetrieben.

Hinsichtlich des Ertragsniveaus können die FastWOOD Ergebnisse mit denen des ProLoc Verbundes verglichen werden. In diesem Projekt wurden über ein breites standörtliches Spektrum Versuche mit gleichem Prüfgliedsatz zum Zweck der Standortleistungsmodellierung angelegt. Die Flächen aus dem Arbeitspaket 1 in ProLoc sind denen aus FastWOOD hinsichtlich ihrer Anlage und Bewirtschaftung (Pflanzenabstand von 1,8 m x 0,5 m; dreijährige Rotation) ähnlich. Die in ProLoc angebaute Sorte 'Max 1' schnitt in der ersten Rotation mit 4,95 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ und in der zweiten Rotation mit 9,37 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ ab. Das Gesamtmittel der Pappelklone in ProLoc lag bei 4,42 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ im ersten und 8,62 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ im zweiten Umtrieb. In FastWOOD hat die Serie 603 mit 5,23 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ dGZ der ersten Rotation ähnlich abgeschnitten. Der mittlere Ertrag von 10,7 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ in der zweiten Rotation verdeutlicht jedoch die großen Steigerungspotenziale. Standorte wie Lehmbach I (008) und Emmendingen (009) sind dazu geeignet, bereits in der ersten Rotation mit den entsprechenden Klonen überdurchschnittlich gute Ergebnisse zu erzielen. Auffällig ist die hohe Ertragszunahme in Wallstawe I (006). Der Standort in Anderlingen ist in einigen Partien stark vernässt und anmoorig. Basierend auf dem unterdurchschnittlichen Abschneiden in beiden Rotationen ist dieser Standort für den Pappelanbau nicht geeignet. Dies bestätigt die Aussagen von Hofmann (1997), der eine Anbau-grenze bei einer Bodenwertzahl von 30 sieht mit der

Einschränkung, dass bei Standorten besserer Güte keine anhaltende Nässe vorliegen sollte. In ProLoc konnten die Weidensorten 'Inger' und 'Tordis' auf einem Moorstandort gute Ergebnisse erzielen (Janßen et al., 2017).

Die Serie 604 schnitt in der ersten Rotation mit 4,71 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ ebenfalls vergleichbar zum ProLoc Gesamtmittel ab, in der zweiten Rotation waren jedoch noch größere Wuchssteigerungen auf 11,7 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ als in ProLoc und in der Serie 603 möglich. Die Versuche hatten im Anwuchsjahr teils auch Probleme mit trockener Witterung. Wiederum am Versuchsort Wallstawe (hier Wallstawe II (012)) fallen die vergleichsweise hohen relativen und absoluten Steigerungswerte besonders der Spitzenklone auf (vgl. dazu Horn et al., 2013). Dies bestätigt die Eignung dieser Standorte für den Pappelanbau, die es den *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* Kreuzungen ermöglichen, ihre Überlegenheit in der Wuchsleistung zur Geltung zu bringen.

Die Serie 605 fällt mit einem mittleren Ertrag von 2,62 t_{atro} ha⁻¹ a⁻¹ dagegen deutlich schlechter aus, was jedoch durch Anlageschwierigkeiten und standörtliche Gegebenheiten bedingt wird. Basierend auf Trockenschädenbonituren und Austrocknungsversuchen unterstreicht Schildbach (2014) die kritische Wirkung von Trockenheit zur Pflanzung, die direkt hohe Ausfallraten bewirkt. Später im Anwuchsjahr auftretender Wassermangel und Dürreperioden in den weiteren Jahren einer Rotation führen zu Wuchsminderungen, für die sich jedoch klonspezifische Unterschiede ergeben (Schildbach, 2014). Für die Flächen dieser Serie bleibt abzuwarten, ob sich eine ähnliche Ertragssteigerung wie in den älteren Serien einstellen wird. Weiterhin muss beobachtet werden, ob die Nachkommen der ersten gelenkten Kreuzungen ihre positiven Differenzen zur Kontrollgruppe ausbauen können. Bardowick (016) ist aufgrund der sehr trockenen klimatischen Bedingungen und des sehr sandigen Substrats (ehemalige Rieselfelder) ein Problemstandort.

Interessant ist, dass Herzberg im Vergleich dazu von den klimatischen Bedingungen nicht viel besser erscheint.

Bodenzahl und nFK sind nur etwas günstiger, der mehr als dreifache so hohe mittlere Ertrag fällt vor diesem Hintergrund umso deutlicher auf. Dass die Fläche auf einem Altarm des Flusses Schwarze Elster liegt und der Grundwasseranschluss in der Standortkartierung festgestellt wurde, dürften die Hintergründe für diese Ertragsleistung sein. Da andere Flächen mit Grundwasseranschluss nicht so gute Ergebnisse erzielten, bestätigen sich die Unterschiede im Einfluss von Grundwasser, die bereits von Hesmer (1951) erwähnt wurden, nämlich dass stehendes Grundwasser und Stauwasser eher nachteilig seien. Neben Herzberg fällt die Serie 606 mit einem Mittel von $6,14 t_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ sehr gut aus. Stiedenrode III (021) fällt durch den Beikrautdruck im Anwuchsjahr zurück. Die Fläche Siemen wirkt dagegen vielversprechend, da sich hier bereits eine Differenzierung der Prüfglieder im Vergleich zu 'Max 1' abzeichnet.

Über alle Serien hinweg zeigen die Hybride aus der Kreuzungskombination *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* beim Ertrag ähnlich wie für den Rost eine Überlegenheit zum Gesamtmittel der Serien und zur Kontrolle 'Max 1'. Auf einigen Flächen ist dies wie beschrieben aufgrund standörtlicher Bedingungen oder Schwierigkeiten bei der Anlage geringer bis nicht ausgeprägt. Hier stellt sich jedoch nicht so sehr die Frage nach der Anbauwürdigkeit anderer Klone sondern eher, ob es sich überhaupt um für Balsam- und Schwarzpappel geeignete Standorte handelt, da die Streuung zwischen den Prüfgliedern und die Leistung der Kontrolle auf diesen Standorten insgesamt sehr niedrig ist. Eine mögliche Genotyp-Umwelt-Interaktion sollte daher genauer untersucht werden. Für die Ansprache dieser Zusammenhänge haben sich bei Sixto et al. (2016) Biplot-Analysen bewährt.

Nach den bisherigen Beobachtungen werden die leistungsstarken Klone in ihrer Ertragsüberlegenheit nicht wesentlich beeinträchtigt. Inwieweit sich diese These langfristig verifizieren lässt, muss weiter beobachtet werden. Die in den drei Förderphasen des Verbundprojektes FastWOOD erarbeitete Datenbasis bietet eine gute Grundlage für eine spezifische Auswertung dieser Fragestellung. Dieses geht in die Anbauempfehlungen der ausgewählten und zugelassenen Klone ein. Für die Serien 605 und 606 erfolgt noch die Analyse ertragsbestimmender Faktoren wie z.B. Brusthöhendurchmesser/Grundfläche, Ausfallrate und Höhen vergleichbar mit Grotehusmann et al. (2015, 2017). Die Nachkommen der gelenkten Kreuzungen aus diesen Serien sollen zur Zulassung nach FoVG in der Kategorie „Geprüft“ vorbereitet werden.

Einige Versuchsflächen bleiben nach Abschluss des Projekts in der Betreuung der Abteilung Waldgenressourcen. Versuche aus den ersten beiden Serien können in einer dritten Rotation beobachtet werden, was hinsichtlich der Ertragsdynamik nach zweitem Rückschnitt von Interesse ist (vgl. dazu Boelcke, 2006; Biertümpfel et al., 2009). Weiteres Material aus den letzten Kreuzungsjahrgängen soll außerdem in einer neuen Versuchsserie getestet werden, die vom Sachgebiet Züchtung und Prüfung forstlichen Vermehrungsgutes der Abteilung Waldgenressourcen der NW-FVA angelegt wird.

Risikofaktoren für den erfolgreichen Betrieb einer Kurzumtriebsplantage (KUP) sieht Amthauer Gallardo (2014)

neben einer falschen Klon- und Standortauswahl in Blatt- und Rindenkrankheiten und unsachgemäßer Kulturführung. Von Pilzen und Bakterien ausgelöste Krankheiten sind hauptverantwortlich für Zuwachseinbußen und schlechtere Holzqualität. Diese Schäden können bestandesbedrohende Ausmaße annehmen (Steenackers et al., 1996). Hier ist in erster Linie der Pappelblattrost (*Melampsora larici-populina*) zu nennen. Daher wurden die im FastWOOD-Projekt getesteten Pappel-Klone ab den Vorprüfungen bis hin zur Klonprüfung auf Versuchsflächen speziell für die Eignung auf Kurzumtriebsplantagen nicht nur hinsichtlich Biomasseleistung, Wiederausschlagsvermögen und Dichtstandstoleranz, sondern auch auf Resistenz gegen Pappelblattrost getestet und ausgewählt. Durch das jährlich bereits ab dem Sämlingsalter durchgeführte Pathogenmonitoring aller neuen Klone konnte das Toleranzverhalten gegenüber dem Pappelblattrost in jedem Stadium (Vorprüfung, Versuchsfläche, nach Wiederaustrieb usw.) und auf unterschiedlichsten Standorten dokumentiert werden. In den hier vorgestellten vier Serien werden aufgrund ihrer Leistungen bei den Vorselektionen überwiegend Hybriden der Sektion Tacamahaca aus *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* auf den Versuchsflächen getestet. Die Auswahl der Eltern basierte zum einen darauf, dass sie aufgrund ihrer Herkunftsgebiete gut mit den in Deutschland herrschenden klimatischen Bedingungen zurechtkommen und gute Wüchsigkeit zeigen. Zum anderen erwiesen sich Klone dieser beiden Arten bereits bei Albrecht und Böden (1988) als sehr tolerant gegenüber dem Pflanzenpathogen *M. larici-populina*. Umfangreiche Untersuchungen zur Anfälligkeit der Elternarten in verschiedenen europäischen Ländern beschrieb Pinon (1992), die zusätzlich auf klonale Toleranzeigenschaften hindeuten. Die von uns getesteten Neuzüchtungen der *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* -Hybriden (Serie 604-606) zeigten durchgehend nicht nur eine schwächere Infektionsintensität als der bei Rau et al. (1988) als resistent beschriebene und hier als Referenzklon verwendete 'Max 1' und ihre Elternart *P. trichocarpa*, sondern lagen auch überwiegend unter dem Serienmittel (Abbildung 5). Einzige Ausnahme bilden die *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* -Hybriden in der Serie 603. Diese zeigten, verglichen mit 'Max 1' und dem Serienmittel eine leicht höhere Sensitivität. Bei diesen Individuen handelt es sich um ältere Klone, die nach eingehender Bewertung direkt für den Test auf Kurzumtriebsfähigkeit hin selektiert wurden.

Der nicht unbedeutende Einfluss standortabhängiger biotischer und abiotischer Faktoren in Kombination mit jahresklimatischen Einflüssen kann hier nur in Ansätzen aufgezeigt werden. Jedoch ist die Tendenz zu höherem Pathogenbefall auf Standorten mit eher feuchtwarmem Klima (wie beispielsweise Lehm bach (008) und Emmendingen (009)) im Vergleich der Standorte der einzelnen Versuchsserien miteinander erkennbar (Abbildung 4). Jedoch zeigen die Klone auf eben diesen Standorten dem hohen Infektionsniveau zum Trotz sehr gute Zuwachsraten.

In den Serien 605 und 606 konnten jeweils zwei Spitzenklone identifiziert werden, die überdurchschnittliche Erträge aufweisen. Die Klone sind in den jeweiligen Serien der Kontrolle 'Max 1' hinsichtlich des Biomassezuwachses

statistisch überlegen. Gleichzeitig weisen die Klone eine niedrige Befallsintensität mit Blattrost auf. Hier bleiben die Ergebnisse nach weiteren Rotationen abzuwarten, um zu bestätigen, dass die Klone auch nach Rückschnitt überlegen bleiben und als die besten Genotypen des Prüfkollektivs ausgewählt werden können.

Danksagung

Die Autoren sind dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) für die finanzielle Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet. Dem Projektträger Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) möchten wir für die professionelle Projektabwicklung danken.

Seit 2008 haben insgesamt 9 Institutionen an der Verwirklichung der im Verbundvorhaben FastWOOD gesteckten Ziele mitgewirkt. Nur durch die partnerschaftliche Zusammenarbeit aller Beteiligten war dies möglich. So wurden die nach oft engagierten Diskussionen vereinbarten Maßnahmen immer mit Blick auf den Erfolg des Gesamtvorhabens umgesetzt. Allen an diesem Werk beteiligten Projektpartnern gilt deshalb unser großer Dank. Das Teilprojekt 1 (NW-FVA) konnte nach 369 verschiedenen Kreuzungen in acht Kreuzungsreihen insgesamt 23 Versuchsflächen mit Pappeln und Weiden anlegen und 2 neue Klone zur Zulassung in der Kategorie „Geprüft“ nach FoVG bringen. Dies wäre ohne die große Arbeitsleistung der FastWOOD-Mitarbeiter und -Mitarbeiterinnen nicht möglich gewesen. Für die Unterstützung bei der Versuchsflächenbetreuung gilt besonderer Dank den Kollegen und Kolleginnen von Sachsenforst (SBS), dem Bayerischen Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP) und der Forstlichen Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg (FVA BW).

Herrn Johannes Suttmöller danken wir für die Interpolation und Bereitstellung der Klimadaten des DWD, und der Abteilung Umweltkontrolle der NW-FVA für Beratung zur Standortkartierung. Wir danken zudem den beiden anonymen Gutachtern/innen für ihre konstruktive Kritik und hilfreichen Anmerkungen.

Literaturverzeichnis

- Ad-Hoc-Arbeitsgruppe Boden der Staatlichen Geologischen Dienste und der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (2005) Bodenkundliche Kartieranleitung. Stuttgart: Schweizerbart, 438 p
- Albrecht J, Böden E (1988) The susceptibility to disease of approved clones of poplars in sections Aigeiros and Tacamahaca. *Holzzucht* 42:25–29
- Ali W (2009) Modelling of biomass production potential of poplar in short rotation plantations on agricultural lands of Saxony, Germany. Dresden: Univ, 130 p
- Amthauer Gallardo D (2014) Standortbasierte Ertragsmodellierung von Pappel- und Weidenklonen in Kurzumtriebsplantagen. Dresden: Univ, 201 p
- BLE – Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (2018) Erhebung zur Versorgungssituation von forstlichem Vermehrungsgut im Bundesgebiet (Erfassungszeitraum 01.07.2016 - 30.06.2017) [online]. Zu finden in <https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/Landwirtschaft/Saat-und-Planzgut/Erhebung2016_2017.pdf?__blob=publicationFile&v=4> [zitiert am 06.07.2018]
- Arbeitsgemeinschaft Forsteinrichtung, Arbeitskreis für Standortkartierung (2003) Forstliche Standortsaufnahme: Begriffe, Definitionen, Einteilungen, Kennzeichnungen, Erläuterungen. Eching: IHW, 352 p
- Bielefeldt J, Bolte A, Busch G, Dohrenbusch A, Kroiber F, Lamersdorf N, Schulz U, Stoll B (2008) Energieholzproduktion in der Landwirtschaft: Chancen und Risiken aus Sicht des Natur- und Umweltschutzes [online]. Zu finden in <https://www.nabu.de/imperia/md/content/nabude/energie/biomasse/nabu-studie_energieholz.pdf> [zitiert am 06.07.2018]
- Biertümpfel A, Rudel H, Werner A, Vetter A (2009) 15 Jahre Energieholzversuche in Thüringen. Jena: TLL, 8 p
- Boelcke B (2006) Schnellwachsende Baumarten auf landwirtschaftlichen Flächen: Leitfaden zur Erzeugung von Energieholz. Schwerin: MELFF Mecklenburg-Vorpommern, 44 p
- Borschel M, Fey-Wagner C, Fehrenz S, Janßen A (2015) Kreuzungszüchtung bei Schwarz- und Balsampappeln. *Thünen Rep* 26:52–58
- Fey-Wagner C, Janßen A, Klippert N (2012) Untersuchungen zur Pathotypenstruktur des Pappelblattrosts *Melampsora larici-populina* auf neu angelegten Versuchsflächen mit Schwarz- und Balsampappeln und ihre Bedeutung für den Kurzumtrieb. *Beitr Nordwestdtsh Forstl Versuchsanst* 8:219–235
- Grotehusmann H, Janßen A, Haikali A (2015) Pappelsortenprüfungen im Projekt FastWOOD. *Forstarchiv* 86:67–79, doi: 10.4432/0300-4112-86-67
- Grotehusmann H, Stiehm C, Janßen A (2017) Pappelsortenprüfungen im Projekt FastWOOD: Ergebnisse nach 2. Rotation. *Forstarchiv* 88:47–54, doi: 10.4432/0300-4112-88-47
- Gutachterausschuss Forstliche Analytik (2009) Handbuch Forstliche Analytik. Berlin: BMELV, 568 p
- Hartmann K-U (2010) Entwicklung eines Ertragsschätzers für Kurzumtriebsbestände aus Pappel. Dresden: Univ, 150 p
- Hesmer H (1951) Das Pappelbuch. Bonn: Verl Dtsch Pappelvereins, 304 p
- Hofmann M (1997) Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Bereitstellung von genetisch hochwertigem Vermehrungsgut für Kurzumtriebsbestände und energetische Bewertung der Kurzumtriebswirtschaft". Hann Münden: Forschungsinst schnellwachsende Baumarten, 122 p
- Horn H, Skibbe K, Röhle H (2013) Wuchsleistung von KUP aus Pappel in Folgerotationen. *AFZ Wald* 2013:53–55
- Janßen A, Böden E, Walter P (1992) Untersuchungen zur genetischen Variation: Werbung von Buchenknospen für Isoenzymanalysen. *AFZ Wald* 1992:639
- Janßen A, Stiehm C, Hofmann M, Schmidt C (2017) Schlussbericht zum Vorhaben „Erfassung von Klon-Standort-Wechselwirkungen bei Pappel und Weide auf landwirtschaftlichen Standorten in kurzen Umtriebszeiten: ProLoc (Ertrags - Programm - Locus) - Projektphase II“. Hann Münden: Nordwestdtsh Forstl Versuchsanst, Abt Waldgenessourcen, 90 p
- Kröber M, Heinrich J, Wagner P (2014) Wasserversorgung wichtiger als Bodengüte: ökonomische Bewertung von Pappel-Kurzumtriebsplantagen in Sachsen zeigt auf einigen Standorten wirtschaftliche Vorteile. *Holz-Zentralblatt* 39:941–942
- Lenth R (2018) emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means [online]. Zu finden in <<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>> [zitiert am 26.07.2018]
- McMahon BG, Berguson WE, Buchman DJ, Levar TE, Maly CC, O'Brien TC, Riemenschneider DE (2011) Populus breeding and hybrid poplar development in Minnesota: 16-year update [online]. Zu finden in <<http://www.poplar.ca/upload/documents/edmonton11mcmahon.pdf>> [zitiert am 06.07.2018]
- Möhring J, Piepho H-P (2009) Comparison of weighting in two-stage analysis of plant breeding trials. *Crop Sci* 49:1977–1988, doi: 10.2135/cropsci2009.02.0083
- Niedersächsisches Forstplanungsamt (2007) Forstliche Standortsaufnahme: Geländeökologischer Schätzrahmen Bergland [online]. Zu finden in <https://www.landesforsten.de/fileadmin/doku/Benutzergruppen/NFP/nfp/Bergland_Rahmenschema_01_2007_aktuell.pdf> [zitiert am 07.05.2018]
- Niedersächsisches Forstplanungsamt, Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein (2009a) Forstliche Standortsaufnahme: Geländeökologischer Schätzrahmen Tiefland [online]. Zu finden in <https://www.landesforsten.de/fileadmin/doku/Benutzergruppen/NFP/nfp/Tiefland_Rahmenschema_06_2009_aktuell.pdf> [zitiert am 07.05.2018]

- Niedersächsisches Forstplanungsamt, Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein (2009b) Forstliche Standortsaufnahme : Variantschema [online]. Zu finden in <https://www.landesforsten.de/fileadmin/doku/Benutzergruppen/NFP/nfp/Variantschema_aktuell_06_2009.pdf> [zitiert am 07.05.2018]
- Piepho HP, Buchse A, Emrich K (2003) A hitchhiker's guide to mixed models for randomized experiments. *J Agron Crop Sci* 189:310–322, doi: 10.1046/j.1439-037X.2003.00049.x
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S (2018) nlme : linear and nonlinear mixed effects models [online]. Zu finden in <<https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>> [zitiert am 26.07.2018]
- Pinon J (1992) Variability in the genus *Populus* in sensitivity to *Melampsora* rusts. *Silvae Genet* 41:25–34
- R Core Team (2018) R: a language and environment for statistical computing [online]. Zu finden in <<https://cran.r-project.org/>> [zitiert am 26.07.2018]
- Rau H-M, Schulzke R, Albrecht J (1988) Steigerung und Sicherung der Holzproduktion durch Auswahl, Prüfung und züchterische Verbesserung geeigneten Ausgangsmaterials bei schnellwachsenden Baumarten. *Schr Forschungsinst schnellwachsende Baumarten* 5:114-148
- Röhle H (2009) Arbeitskreis Biomasse : Verfahrensempfehlungen zur Methodik der Biomasseermittlung in Kurzumtriebsbeständen. In: Nagel J (2009) Jahrestagung vom 25. - 27. Mai 2009, Ascona (Schweiz) /Deutscher Verband Forstlicher Forschungsanstalten, Sektion Ertragskunde. Göttingen : DVFFA, pp 220-226
- Schildbach M (2014) Untersuchungen zur abiotischen Resistenz von Pappeln. *Landbauforsch Appl Agric Forestry Res* 64(2):85–98, doi: 10.3220/LBF_2014_85-98
- Schuetzenmeister A, Dufey F (2017) VCA : Variance Component Analysis [online]. Zu finden in <<https://cran.r-project.org/web/packages/VCA/index.html>> [zitiert am 26.07.2018]
- Schulla J (2017) Model description WaSiM (Water balance Simulation Model) [online]. Zu finden in <http://www.wasim.ch/downloads/doku/wasim/wasim_2017_en.pdf> [zitiert am 06.07.2018]
- Sixto H, Gil PM, Ciria P, Camps F, Cañellas I, Volats J (2016) Interpreting genotype-by-environment interaction for biomass production in hybrid poplars under short-rotation coppice in Mediterranean environments. *GCB Bioenergy* 8:1124–1135, doi: 10.1111/gcbb.12313
- Steenackers J, Steenackers M, Steenackers V, Stevens M (1996) Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass Bioenergy* 10:267–274, doi: 10.1016/0961-9534(95)00121-2
- Wellbrock N (2006) Arbeitsanleitung für die zweite bundesweite Bodenzustandserhebung im Wald : (BZE II) ; [Arbeitsanleitung für die Außenaufnahmen]. Berlin : BMELV
- Wickham H (2009) ggplot2 : elegant graphics for data analysis. Dordrecht : Springer, 212 p
- Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik beim Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (WBA) (2007) Nutzung von Biomasse zur Energiegewinnung : Empfehlungen an die Politik [online]. Zu finden in <http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ministerium/Beiraete/Agrarpolitik/GutachtenWBA.pdf?__blob=publicationFile> [zitiert am 22.08.2018]
- Yan W (2014) Crop variety trials : data management and analysis. Hoboken : Wiley, 360 p

Breeding of multipurpose willows on the basis of *Salix daphnoides* Vill., *Salix purpurea* L. and *Salix viminalis* L.

Ben Bubner*, Angela Köhler**, Irmtraut Zaspel*, Matthias Zander**, Nadja Förster**, Jan-Christoph Gloger**, Christian Ulrichs** and Volker Schneck*

Abstract

Willows are planted in short rotation coppices (SRC) to produce biomass. Another potential use of willows is the extraction of natural salicylates as alternatives to chemically synthesized acetyl salicylic acid (medical use). Available clones in Europe based on *Salix viminalis* L. do not contain salicylates and have high water requirements.

In order to breed willows that can serve both as bioenergy and salicylate source under dry soil conditions, a collection of several hundred wild type genotypes of *Salix daphnoides* Vill. and *Salix purpurea* L. was used for an extensive crossing program with selected *S. viminalis* biomass clones. Altogether 578 inter- and intraspecific crossings resulted in 203 progenies and 622 genotypes. After selection in nursery trials 62 genotypes have been cloned and planted into two field trials with different soil moisture.

Crossings of salicylate free *S. viminalis* clones with salicylate containing *S. daphnoides* and *S. purpurea* clones resulted in progenies that contained both salicylate and triandrin (from *S. viminalis*). The highest salicylate contents were found in *S. daphnoides* x *daphnoides* crosses followed by *S. viminalis* x *daphnoides* and *S. purpurea* x *viminalis*. Rust infection was low for almost all genotypes. While at the wet site the highest biomass was recorded for *S. viminalis* clones, the highest biomass at the dry soil site was recorded for *S. daphnoides* x *daphnoides* clones. This shows that it is possible to produce clones with high biomass and high salicylate content by intraspecific crossings of *S. daphnoides*. Because of the different cutting regimes at the two sites (first year cut at the dry site, no first year cut at the wet site), further investigations are necessary to confirm the superiority of *S. daphnoides* clones over *S. viminalis* clones at dry sites.

Keywords: Short rotation coppice, salicortin, phenolic glycosides, interspecific crossing, *Melampsora* resistance

Zusammenfassung

Züchtung von Weiden zur Mehrfachnutzung auf der Basis von *Salix daphnoides* Vill., *Salix purpurea* L. und *Salix viminalis* L.

Weiden werden in Kurzumtriebsplantagen (KUP) angebaut, um Biomasse für die Energiegewinnung zu produzieren. Eine weitere Nutzungsmöglichkeit ist die Herstellung von Salicylat-haltigen Rindenpräparaten als Ersatz für synthetische Schmerzmittel auf der Basis von Acetylsalicylsäure. Da die bisher in Europa verwendeten Biomasse-Klone auf *Salix viminalis* L. basieren, die kaum Salicylate enthalten, fallen diese für eine mögliche Mehrfachnutzung aus.

Auf der Basis eines Klonarchivs der Salicylat-haltigen Arten *Salix daphnoides* Vill. und *Salix purpurea* L. wurden 578 Kreuzungen mit Klonen von *S. viminalis* durchgeführt, welche in 203 Nachkommenschaften mit insgesamt 622 Genotypen resultierten. Nach Vorprüfungen wurden 62 Genotypen in zwei Feldversuchen mit unterschiedlichen Bodenfeuchten gepflanzt.

Die höchsten Salicylat-Gehalte bei gleichzeitig hoher Frischmasse hatten intraspezifische Kreuzungen *S. daphnoides* x *daphnoides*, gefolgt von *S. viminalis* x *daphnoides* und *S. daphnoides* x *purpurea*. Während am feuchten Standort die höchste Biomasse für *S. viminalis*-Klone gemessen wurden, war sie am trockenen Standort am höchsten für *S. daphnoides* x *daphnoides*-Klone. Aufgrund des unterschiedlichen Schnittmanagements (Erstjahresschnitt am feuchten Standort, kein Erstjahresschnitt am trockenen Standort) sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Überlegenheit von *S. daphnoides* an trockenen Standorten zu bestätigen.

Schlüsselwörter: Kurzumtriebsplantage, Salicortin, Phenolglykoside, interspezifische Kreuzung, *Melampsora*-Resistenz

* Johann Heinrich von Thünen Institute, Institute of Forest Genetics, Eberswalder Chaussee 3a, 15377 Waldsiedersdorf

** Division Urban Plant Ecophysiology, Albrecht Daniel-Thaer-Institute of Agricultural and Horticultural Sciences, Faculty of Life Sciences, Humboldt-Universität zu Berlin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin

Kontakt: ben.bubner@thuenen.de

1 Introduction

Species of the genus *Salix* can be grown in short rotation coppices (SRC). This form of cultivation in agricultural fields uses the ability of willows to sprout from stools of cut plants to produce high biomass yields within 2 to 3 years after cutting, so that the rotation time is shorter than in conventional forest plantations (Lindegård et al., 2016; Makeschin, 1999). The main use is as fuel in biomass heating and power plants (Djomo et al., 2011). Short rotation coppices are widely planted in Sweden and Great Britain (Aylott et al., 2008; Mola-Yudego and Gonzalez-Olabarria, 2010). In these and other countries breeding programs are finished or underway to provide high biomass genotypes by crossing and selection (Gebhardt, 2012; Larsson, 1998; Lindegård and Barker, 1996; Pohjonen, 1991).

The species *Salix viminalis* L. is widely used in short rotation coppices (Begley et al., 2009; Lindroth and Bath, 1999). According to the classification of Skvortsov (1999), *S. viminalis* belongs to the section *Vimen* and is widely distributed across Northern Eurasia. Among other *Salix* species used for selection or as breeding partners are *Salix dasyclados* Wimm/burjatica Nasarov or *Salix schwerinii* E. Wolf (Berlin et al., 2011; McCracken and Dawson, 1992; McCracken et al., 2011). They also belong to the Section *Vimen*. Thus, considering that Skvortsov (1999) recognizes 26 sections with 135 species in Eurasia, the genetic basis for biomass willows is relatively small.

Apart from use as biomass for bioenergy *Salix* species can also be planted for the use of substances within the bark. The most prominent among them are phenol glycosides such as salicylates (e.g. salicin and salicortin (Boeckler et al., 2011)). The concentration ranges from 0.1 % to 10 % in dry bark depending on species (Shao, 1991). Salicylates from willow bark are used as substitute for synthetic analgesics based on acetyl salicylic acid (Meier, 2001). Other phenolic substances in the bark of willows are condensed tannins like catechin with a concentration of 0.2 % to 1 % and flavonoids in the form of glycosides of naringenin, eriodictyol and isoquercitrin (0,4 % to 3,8 %, Shao, 1991). A potential further use of bark extracts is as replacement of chromium in leather tanning, as it is already proposed for other tree barks (Seabra et al., 2018).

SRC willows are especially suitable for the extraction of substances from the bark since the large numbers of shoots emerging after cutting allows for a high percentage of young bark in relation to the total volume. Thus, willows could be used both for bioenergy generation and the production of phenolic substances. One problem is that the biomass producing species *S. viminalis* contains only relative low amounts of salicylates (under 1 %, Minakhmetov et al., 2002; Shao, 1991) while other species such as *Salix purpurea* L. and *Salix daphnoides* Vill. contain more than 1 % salicylates in dry weight of bark (Julkunen-Tiitto, 1989; Shao, 1991). If a dual use of biomass and salicylates is required *S. viminalis* is not a suitable species. One possible solution is the breeding of willow genotypes that produce both biomass and salicylates. This goal can be reached by

interspecific crossing of *S. viminalis* with salicylate containing species or by improving the biomass yield of salicylate containing species through intraspecific crossings and clone selection.

Not only biomass and phenol glycoside content are goals for new genotypes of biomass willows but also resistance to biotic and abiotic stresses. Among biotic stresses the colonization of leaves by rust fungi of the genus *Melampsora* can lead to substantial losses of biomass (Pei et al., 2004). Therefore, one breeding goal is the provision of rust resistant willow genotypes (Pei et al., 2008). Because of the high specificity of some races of *Melampsora spp.*, the yield of willow plantations can be improved by mixed planting of several genotypes of willow (McCracken and Dawson, 1998).

Another motivation for breeding new willow genotypes is the requirement for drought tolerance. The established *S. viminalis* clones are selected for and planted in areas with relatively high precipitation. In the lowlands of Eastern Germany precipitation is around 600 mm or even below (Hänsel et al., 2007). When breeding for dryer regions those species should be considered as crossing partners that are known to have lesser requirements for water supply. For instance, *S. daphnoides* Vill. var. *pomeranica* from the Baltic Sea coast is growing on sand dunes and known to resist drought to some degree (Chmelar and Meusel, 1979).

In the following we present results of a German breeding program that was supported by the German Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe. In contrast to other breeding programs, important crossing partners were *S. daphnoides* and *S. purpurea*. Both intraspecific crossings and interspecific crossings with established *S. viminalis* genotypes were performed. The breeding goals were as follows:

- High biomass yield
- High content in phenol glycosides especially salicylates
- Resistance against willow rusts
- Drought tolerance.

2 Material and Methods

2.1 Genotype collection

A genotype collection of *Salix daphnoides* and *S. purpurea* was the basis for breeding (Figure 1). The genotypes have been collected in two areas: the coast of the Baltic Sea in northeastern Germany and Poland and the Alps in Germany, Austria and Italy. They have been planted in the stock collections Zepernick and Berlin-Dahlem at Humboldt-Universität zu Berlin (Zander et al., 2010). A second source for crossing partners was a stock collection in Waldsiedersdorf at the Thünen Institute. It comprised established genotypes of the species *S. viminalis* that are widely used for short rotation coppices in Sweden but also genotypes of other *Salix* species such as *Salix humboldtiana* Willd. *S. humboldtiana* has been chosen for testing the principal possibilities to cross foreign species into native species

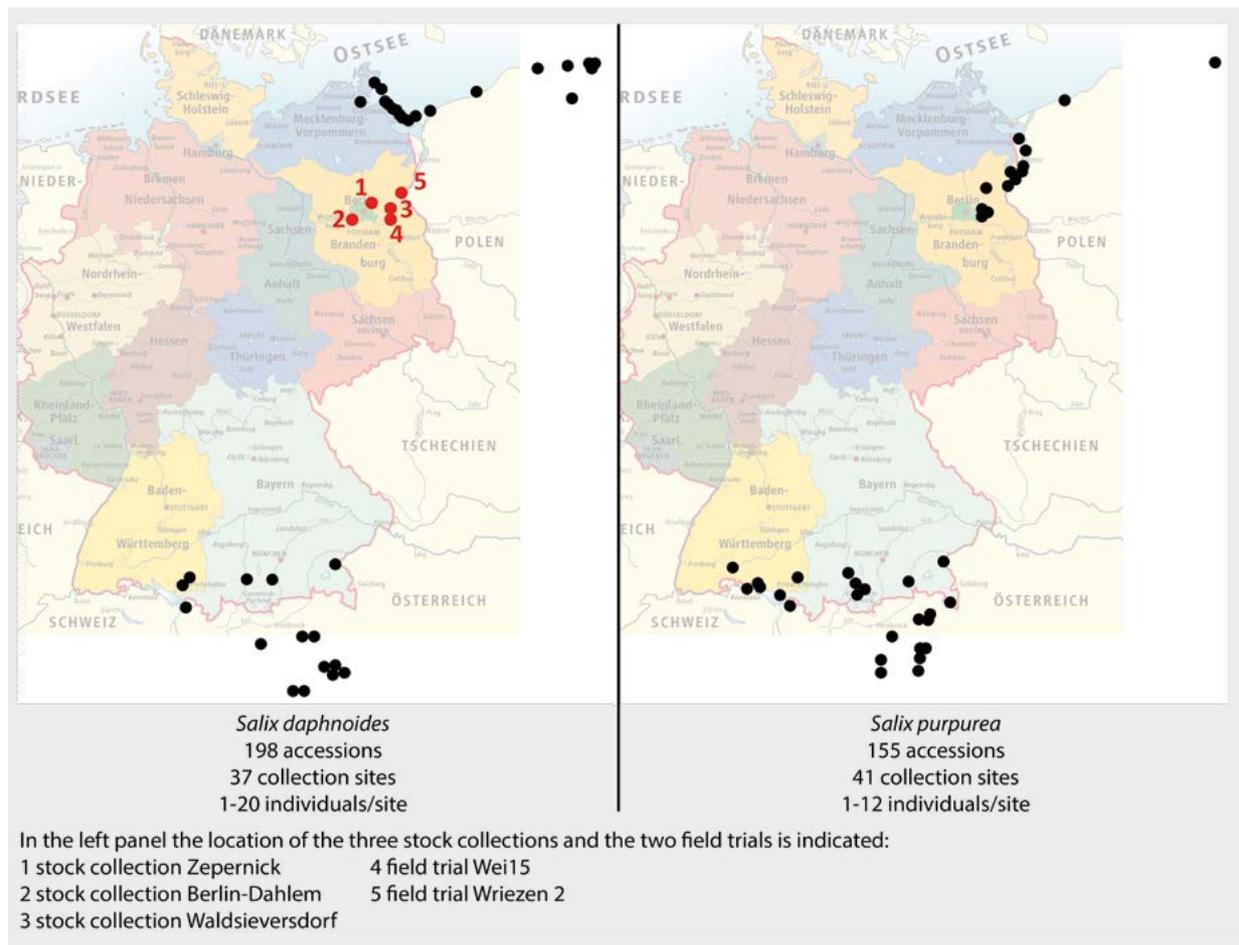


Figure 1
 Provenience of the breeding material

2.2 Controlled crossings

Directed crossings were performed in spring 2011, 2012, 2013 and 2014. Branches of male *Salix* genotypes were cut in early spring. Pollen was collected after flowering in the greenhouse (Figure 2b) and stored at 4°C for max 4 weeks. Two methods have been applied for pollination:

- A. Direct method: Catkins of female genotypes in the genotype collection Zepernick were bagged before flowering and directly pollinated on the plant with a sterile brush. The capsules ripened within a few weeks in the bag and the catkins were collected when the seeds were released. This method was mainly used for intraspecific crossings of *S. daphnoides*.
- B. Greenhouse method: Catkins on branches of female genotypes (Figure 2a) were pollinated in crossing chambers in the greenhouse with a sterile brush. The capsules ripened on the branch in the crossing chamber (Figure 2c). This method was mainly used for interspecific crossings of *S. purpurea*, *S. daphnoides* and *S. viminalis*.

Seeds were cleaned from hairs with a sieve (Figure 2d and e) and sown on vermiculite that was moistened with ½ concentration of liquid Schenk/Hildebrand Medium (Duchefa, Haarlem, Netherlands). Until germination and the first two weeks

after germination cultivation took place under 100% air moisture (Figure 2f). Seedlings were transferred to soil and cultivated in pots in the greenhouse for a few weeks (Figure 2g) until they were transferred outside the greenhouse.

2.3 Terminology for seedlings and clones

Each seedling was given a name consisting of an abbreviation of the crossing partners and a running number; the first genotype is the female and the second genotype the male parent. At the end a letter follows for the nursery trial as place of selection (D = Berlin-Dahlem, W = Waldsiefersdorf, Z = Zepernick). An example is 79036 x DA57_1_W. This is a crossing of the female *S. viminalis* genotype 79036 and the male *S. daphnoides* genotype DA57. It is the seedling number 1 in the nursery trial Waldsiefersdorf. Note that 79036 x DA57_1_Z was selected in the nursery trial Zepernick and is another seedling with a different genotype.

In this paper the following terminology will be used for differentiating clones and ramets: The original seedling is the genet. The propagation by cuttings (i.e. cloning) results in ramets. The ramet together with the genet forms the clone. Thus, the name 79036 x DA57_1_W can denote both the original seedling and the clone. Usually the name will be

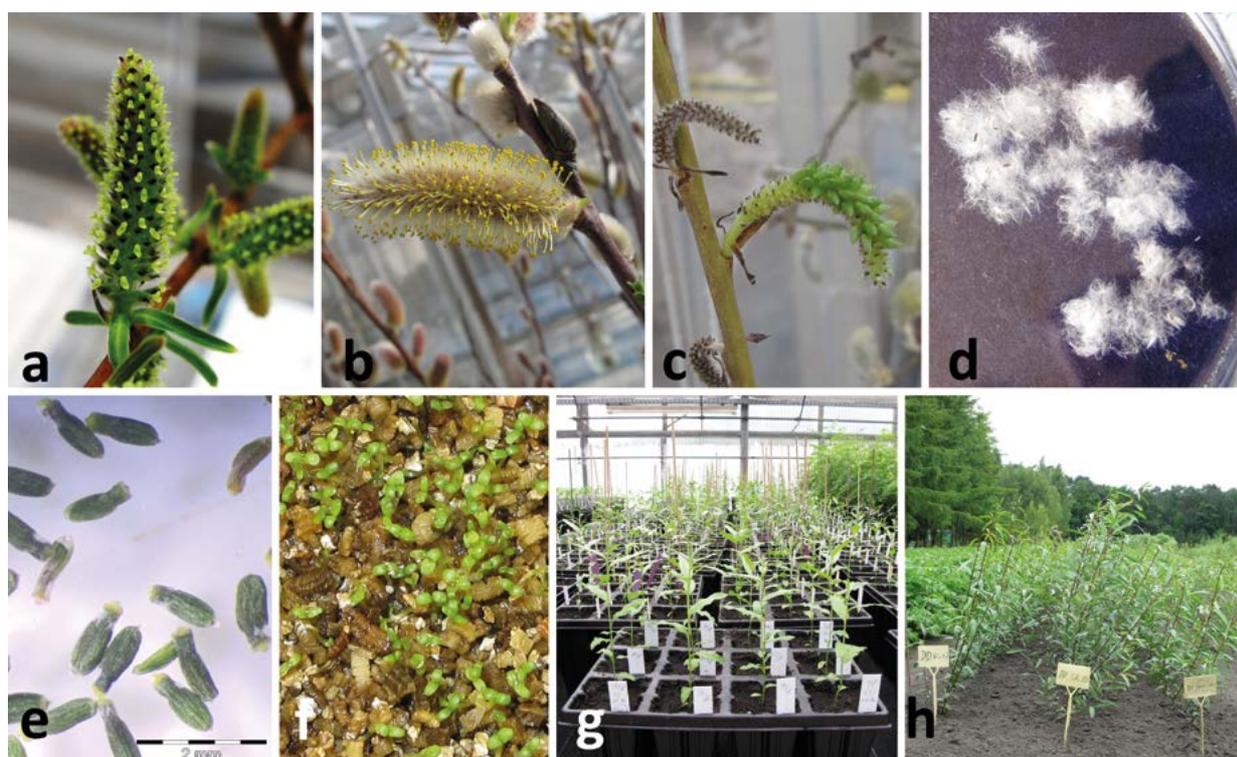


Figure 2

Stages of the crossing process: a) catkin of female *S. humboldtiana* genotype SH2; b) catkin of male *S. daphnoides* genotype DA65; c) developing capsules of the intraspecific crossing PU59 x PU108 on branches in crossing chambers; d) "wool" with seeds; e) seeds of crossing *S. viminalis* x *S. daphnoides* Tordis x DA135; f) seedlings after germination; g) seedlings in quick-pots in the greenhouse; h) plants in July of the second year after germination, they are not yet propagated by cuttings.

used as clone name. Where a distinction between clone and the original seedling is necessary it will be explicitly stated.

2.4 Cultivation and propagation of clones

The selection and propagation process is exemplified for the crossing season 2011 (Table 1).

In the year of crossing seedlings were cultivated in pots. When a crossing yielded numerous seedlings, excess seedlings were planted into nursery trials in the fall of the crossing year. Routinely, seedlings were planted in spring of the second year into nursery trials (Figure 2h). Fast growing seedlings were selected for propagation by micro cuttings. Micro cuttings were prepared from one year old seedlings by cutting the shoot in 7 to 10 sections with at least two buds in March. They were grown in 0.5 l pots with seedlings substrate with perlite (Klasmann-Deilmann, Geeste Germany) under plastic cover at 2 to 20 °C. Acclimatization started in May by removing part of the foil and installing shading. Beginning from May, the ramets were planted into nursery trials together with the rootstock of the original seedling.

A second method for propagation was the use of conventional cuttings (25 cm length, diameter 1 to 2 cm). When cuttings were prepared in the spring of the third year after crossing (either from original seedlings or from ramets) they were rooted in the greenhouse in early spring and planted

from pots into the field in May. Cuttings from clones in the fourth year or older (mostly ramets) were also directly planted into field trials in May. In the first year, irrigation was provided.

2.5 Nursery trials and field trials

Nursery trials have been established next to the stock collections in Berlin-Dahlem (Humboldt-Universität zu Berlin), Zepernick (Humboldt-Universität zu Berlin) and Waldsiedersdorf (Thünen Institute). They served to survey the growth rate, number of shoots and rust colonization in the second and third year of cultivation after crossing. All seedlings of a crossing progeny (usually 7 to 9) or all ramets of one clone were planted into a consecutive row. Nursery trials were surveyed from the years 2012 to 2015.

Field trial Wriezen2 has been established in spring 2013 with rooted cuttings. It is situated in the lowlands of the river Oder (Oderbruch: 52.741591° N, 14.121651° E), where the groundwater level is high. The clones are planted in a randomized block design with three blocks. Each block consisted of 36 plots with 15 plants per plot. 34 clones from crossings 2011 and two standard clones of the section Vimen (Tordis and Zieverich 3N) were planted. Tordis is a hybrid of *S. schwerinii* and *S. viminalis*. Zieverich is originally a *S. viminalis* clone. In the *Salix* clone collection of Hann. Münden it is

Table 1
 Time course of cultivation at the example of the crossing progeny of 2011

Consecutive timing	Time	Event
1 st year	Spring 2011	crossing and sowing, cultivation in pots
	Summer 2011	cultivation in pots
2 nd year	Spring 2012	selection of 145 seedlings by shoot length, diameter and rust resistance; preparation of 7-10 micro cuttings for each seedling
	May 2012	planting of ramets together with the original rootstocks into nursery trials
	Fall 2012	selection by shoot lengths, shoot number, rust resistance: 67 genotypes remain in nursery
3 rd year	February 2013	propagation by cuttings and rooting in the greenhouse
	May 2013	planting of rooted ramets of 34 genotypes in the field trial Wriezen2
	Winter 2013/14	first cut
4 th year	Winter 2014/15	Second cut with measurements of fresh weight and phenol glycoside content

female and diploid by flow cytometry (Fehrenz, 2015). The clone in the clone collection Waldsiefersdorf is triploid and female. Therefore the used standard is called Zieverich 3N to make clear that it is distinct from Zieverich. According to morphological traits Zieverich 3N is at least relative of *S. viminalis*.

Field trial Wei15 has been established in spring 2015 with rooted cuttings in 30 km distance to Wriezen2 near the town Müncheberg (52.522007° N, 14.135644° E). In comparison to the field trial Wriezen2 the soil conditions are dry with a low ground water level. The randomized block design consisted of 4 blocks with 50 plots and 21 plants in each block. Altogether 48 clones have been tested: 20 clones already planted in Wriezen2 and 28 clones from the crossing years 2012 to 2014. Standard clones are Tordis and Zieverich 3N.

The following three sections describe the different measurements. Rust infection and biomass/growth measurements served as criteria to select clones for planting in the field trials. Rust infection, biomass/growth, and phenolic glycosides served to evaluate the selected clones in the field trials.

2.6 Scoring rust infection

Rust infection was surveyed by a rating scheme with 7 grades (Figure 3). Scores are the estimated average leaf surface covered by rust pustules on all leaves of the plant. Score 1 means that no rust pustules are observed on the plant, while 7 means that more than 50% of the leaf surface of the whole plant is covered with rust pustules. Surveys in the nursery trials were conducted in the first two weeks of September. Within the progeny of a crossing the rust score was determined for each individual seedling. Seedling with a score higher than three were excluded from further cultivation except for the case that they showed exceptional growth rates (putative cases of tolerance). In the case of clones generated by micro cuttings the values for the ramets were averaged. The threshold for further cultivation was also three.

Screening for rust resistance in the field trial Wriezen2 took place on 16th September 2014. The rating scheme has

been adjusted in a way that the score was averaged visually for all 15 plants of a plot resulting in one rust score per plot. Preliminary test had shown that the variation between the ramets of one plot is very low, allowing to apply a summarizing score. Comparison of rust infection between genotypes was based on the average score of three blocks.

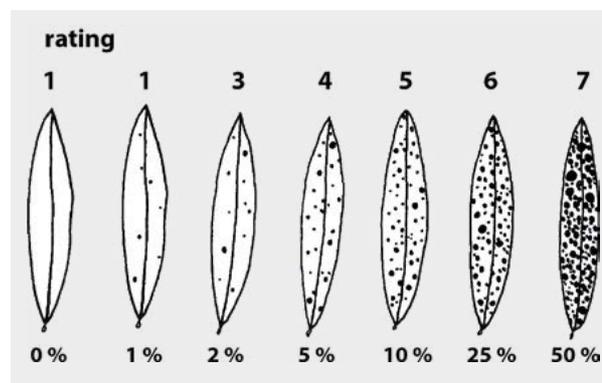


Figure 3
 Rating for surveys of rust infestation in nursery trials and field trials, adapted from McCracken and Dawson (1992)

2.7 Measurements for growth and biomass

In the nursery trials following parameters have been measured: height of the highest shoot, diameter of the strongest shoot and the number of shoots. It was based on 6 to 9 ramets from the propagation by micro cuttings. Seedlings or clones were selected after two years for further testing in field trials. In the field trial Wriezen2 biomass was measured as fresh weight directly from the cut shoots in winter 2014/2015 after cutting in winter 2013/2014. That is stools grew two growing periods and the shoots one growing period.

An indirect approach was applied to estimate biomass in the field trial Wei15. The diameters at breast height (1.3 m) of all shoots per plant were measured and the basal area was calculated in autumn 2017 after three growing periods

without cutting. The biomass function for dry weight has been determined in a previous field trial in Müncheberg (Wei9) with following parameters:

$$\text{Oven dry weight [g]} = 118.22 \times \text{basal area} + 112.13.$$

2.8 Measurements of phenolic glycosides

Sampling: Sampling took place in winter to early spring 2014. Bark was removed in stripes from shoots of three plants of each genotype at a height of 30 to 60 cm above ground. The bark was shock frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until further processing.

Extraction: Phenolic glycosides were extracted as described in Förster et al. (2008). Briefly, samples were lyophilized and homogenized in a ball mill. Fifty mg of each sample were mixed with 750 µl 80% methanol and 100 µl internal standard resorcin (50 mM), incubated in an ultrasonic bath on ice, and centrifuged to collect the supernatant. The pellet was re-extracted with 80% methanol two more times. The extract was concentrated in a vacuum concentrator and refilled to 1 ml with ultrapure water. It was filtrated (SpinX filters, 0.22 µm) and stored at -20°C until HPLC analysis.

HPLC analysis: The HPLC system consisted of a DIONEX P680 pump, an ASI-100 auto sampler, a TCC-100 thermostated column department, and an UltiMate 3000 Photodiode Array Detector. Reversed phase chromatography was carried out on an Acclaim PolarAdvantage C16 column (3 µm, 120 Å, 2.1 x 150 mm, Thermo-Fisher) protected by a pre-column (5 µm, 120 Å, 2 x 10 mm, Thermo-Fisher). Eluents used for HPLC analysis were (A) 2% tetrahydrofuran, 0.5% phosphoric acid in ultrapure water and (B) 100% methanol. The applied gradient program (flow rate 0.35 ml/min) was: 0% B (min 0-5), 0-15% B (min 5-10), 15-25% B (min 10-20), 25-35% B (min 20-30), 35-50% B (min 30-40), 100% B (min 40-42), 100-0% B (min 42-44), 0% (min 44-49). Injection volume was 10 µl and peak detection was carried out at 270 nm. Qualitative analysis of phenolic glycosides was based on their retention times, specific UV-spectra (Shao, 1991), and mass spectrometry. Peak evaluation of chromatograms was performed with the program Chromeleon 6.8.

Quantification: Quantification of phenolic glycosides was based on the peak area relative to the internal

standard. The content of phenolic glycosides is given in mg/g dry weight as sum of all phenolic glycosides including salicylates (salicin and salicortin) and separately only for salicylates.

2.9 Statistics

Fresh weight per plant (15 for Wriezen2, 21 for Wei15) was averaged for each plot. These plot means were used as input for testing for ANOVA. Significance of difference of clone means with the mean of Tordis (standard clone) was tested by Dunnett's test. The GLM procedure of SAS 9.3 was used. The statistics for oven dry ton (10⁶ g) at Wei15 started from dry mass per plot by using the sum of all basal areas as input for the biomass function. With the plot size of 21 m² the value was converted into t ha⁻¹.

Correlation of biomass and salicylate content was calculated as Spearman's rank correlation coefficient and tested on significance by using SPSS 23.

3 Results

3.1 Success of crossings

Altogether 578 crossings with 64 mother and 48 father genotypes have been performed. They resulted in 203 progenies with altogether 622 seedlings (Table 2). In the years 2011, 2012, and 2013 around 50% of crossings resulted in seeds. The low number of successful crossings in 2012 has two causes. First, the catkins have been damaged by biotic (larvae of different insects) and abiotic (frost) stresses. Second, in 2012 mostly interspecific crossings have been performed that resulted in lower number of successful fertilizations as compared to intraspecific crossings. The original aim was to clone 10 seedlings per progeny by cuttings or micro cuttings. This was only possible in 2011 for a larger number of crossings whereas in the following years only two to three seedlings per progeny could be cloned. This was especially true for interspecific crossings that often resulted in only one clone. The female clone of the foreign species *S. humboldtiana*, SH2, proved to be a good mother clone. Several interspecific crossings with *S. viminalis*, *S. purpurea* and *S. daphnoides* yielded viable seedlings.

Table 2

Success of crossing over four crossing seasons

Consecutive timing	2011	2012	2013	2014
Mother genotypes	24	35	35	32
Father genotypes	16	27	30	29
Crossings	79	185	199	115
Crossings yielding seeds	40 (50%)	36 (19%)	99 (50%)	73 (63%)
Progenies	36 (46%)	35 (19%)	74 (37%)	58 (50%)
Seedlings (= new clones) in nursery trial	268	82	161	111
Average number of clones per progeny	7.4	2.3	2.2	1.9

Percentages in brackets refer to the number of performed crossings.

Table 3
 Clones selected for field trials

crossings	Selection for Wriezen2 (2013)	Selection for Wei15 (2015)
<i>S. daphnoides</i> x <i>daphnoides</i> (in brackets DA135 as father)	21 (21)	11 (8)
<i>S. humboldtiana</i> x <i>viminalis</i>	0	1
<i>S. humboldtiana</i> x <i>purpurea</i>	0	1
<i>S. humboldtiana</i> x <i>daphnoides</i>		1
<i>S. purpurea</i> x <i>viminalis</i>	2	4
<i>S. viminalis</i> x <i>daphnoides</i>	8	7
<i>S. viminalis</i> x <i>viminalis</i>	3	3
Sum	34	28

3.2 Selected clones for planting in field trials

Cloned for the field trials were selected according to the growth, number of shoots and rust infestation in the nursery trials. After at least two years of observation in the nursery trials altogether 62 clones from originally 622 clones were selected for plantings in field trials Wriezen2 and Wei15 (Table 3 and clone names in Figure 4 to 6). The number of selected clones for Wriezen2 was 34 and comprised clones from the crossing year 2011. Another 28 clones from the crossing years 2012 to 2013 were selected for field trial Wei15. They were planted together with 20 clones that showed good growth in Wriezen2, so that the total number of clones for Wei15 is 48.

Among 32 intraspecific clones of *S. daphnoides*, 29 of them were offspring of genotype DA135 as father (Table 3). This is especially noteworthy considering the relative weak growth of DA135 in the stock collections as compared to other fathers (data not shown). A larger number of intraspecific clones of *S. viminalis* could also be selected. Crossings of *S. purpurea* x

purpurea resulted in seeds (Figure 2c) and clones in the nursery trials but none could be selected for field trials. Among the interspecific crossings the largest number of clones could be selected for the crossings *S. viminalis* x *daphnoides*. When used as crossing partner with other species *S. purpurea* was involved in six selectable crossings. Although crossing with *S. humboldtiana* is principally possible, the resulting seedlings were relatively weak. Nevertheless, three seedlings with a father of *S. viminalis*, *S. purpurea*, and *S. daphnoides* respectively, could be selected for the field trial Wei15.

3.3 Biomass and rust at the moist field trial Wriezen2

Biomass: Under moist soil conditions the highest biomass is recorded for an intraspecific crossing *S. viminalis* x *viminalis* (Bowles x Jorr_ER5_W) with 2.6 kg per plant and a high standard deviation of 1,1 kg. However no clone has a significant higher

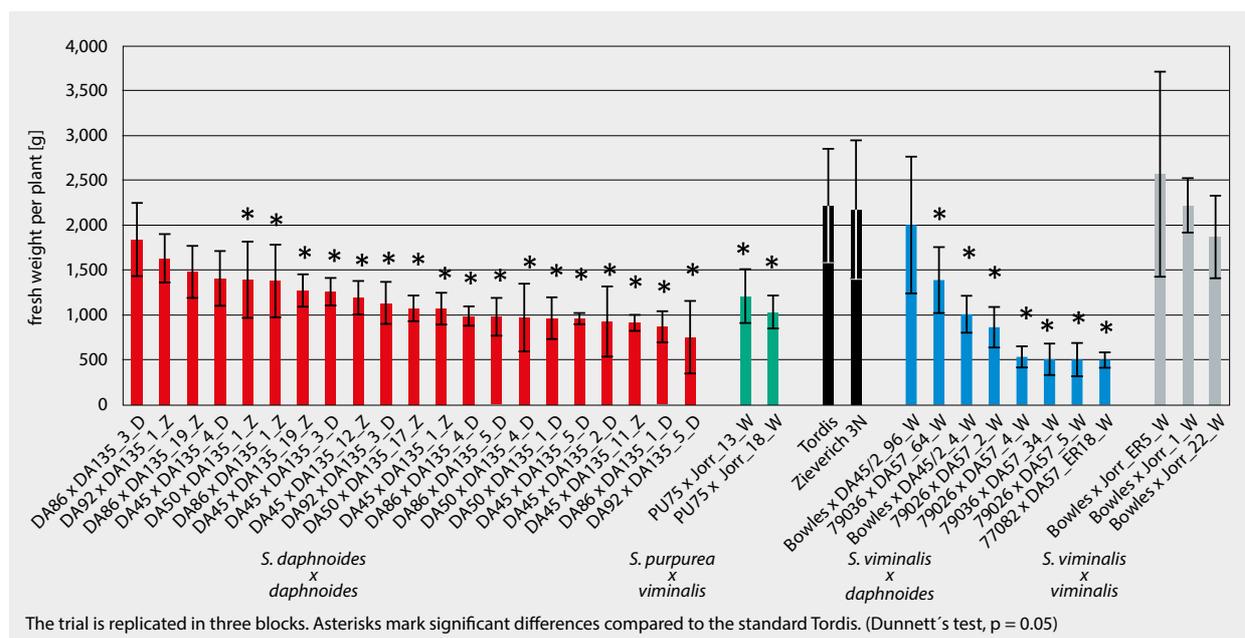


Figure 4
 Moist site Wriezen2, 2014. Fresh weight of the second cut (two vegetation periods after planting).

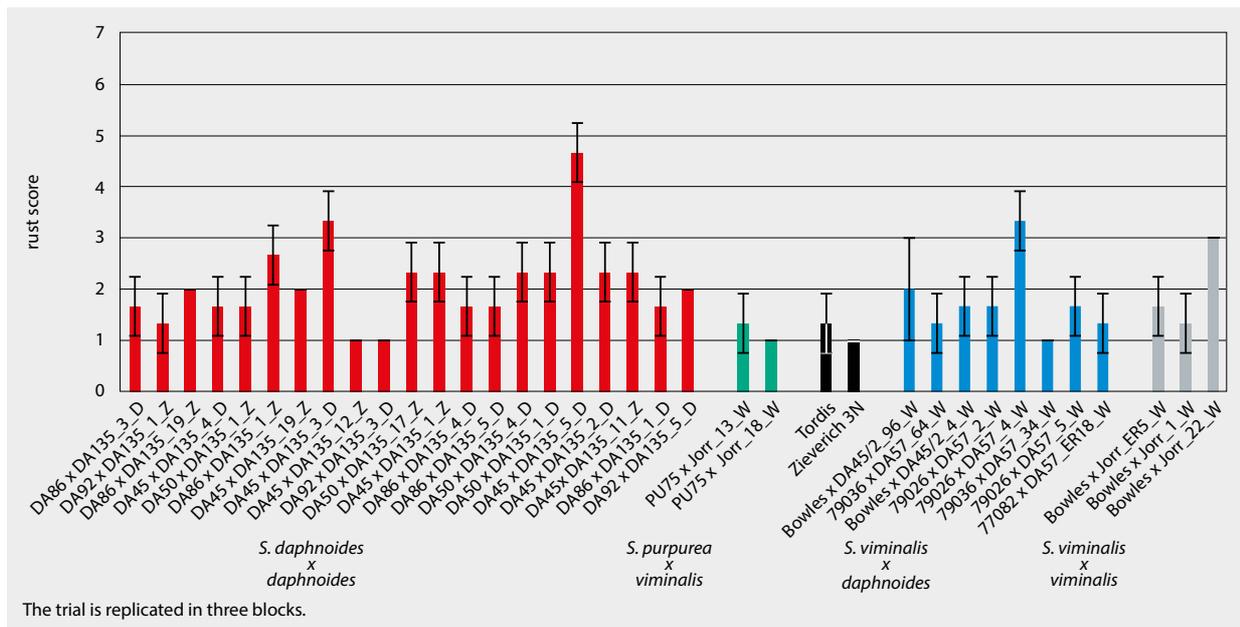


Figure 5
 Moist site Wriezen2, rust survey on 16th September 2014 (two vegetation periods after planting).

biomass than the standard clone Tordis (Figure 4). A significant lower biomass is determined for 26 clones. However, there are 8 clones that have no significant lower biomass than the standard. Among them are the second standard Zieverich 3N, four intraspecific crossings *S. daphnoides* x *daphnoides* with DA135 as father, three intraspecific crossings *S. viminalis* x *viminalis*, and one interspecific crossing *S. viminalis* x *daphnoides*.

Rust infestation: Rust score above 5 was not observed and the score 5 was only observed once in one plot of the clone

DA45 x DA135_5_D. Five clones had a score of 1 (i.e. no rust at all) over all three plots while the majority of clones showed a score around 2. Overall rust infestation was low (Figure 5).

3.4 Biomass at the dry field trial Wei15

Under the dry soil conditions of Wei15 nineteen *S. daphnoides* clones had higher dry weight than the standard *S. viminalis* Tordis. For three of them, DA92 x DA135_1_Z, DA45 x

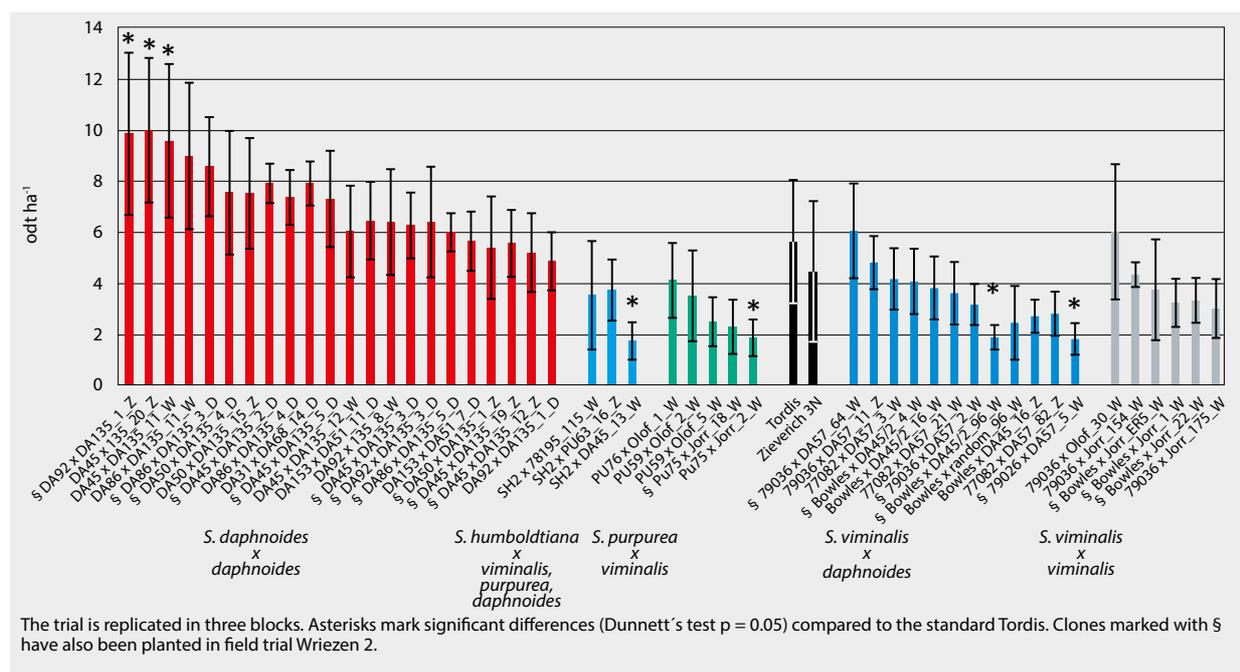


Figure 6
 Dry site Wei15. Estimated odot ha-1 three vegetation periods after planting (calculated from stem diameter).

Table 4
 Contents of phenolic glycosides in the field trial Wriezen2

Crossing family/parent	Salicylate in mg g ⁻¹		Further phenolic glycosides in mg g ⁻¹				Total phenolic glycosides in mg g ⁻¹
	Salicin	Salicortin	Syrenin	Triandrin	Naringenin-5-glucoside II	Naringenin-7-glucoside	
<i>S. daphnoides</i> x <i>daphnoides</i>							
DA45 x DA135 (n=8)	1.74 ±0.59	31.95 ±3.52	4.36 ±1.15	0	12.55 ±4.79	14.13 ±3.53	79.10 ±9.78
DA50 x DA135 (n=4)	2.02 ±1.09	31.16 ±5.93	4.66 ±0.88	0	11.43 ±2.97	13.46 ±1.56	77.40 ±11.34
DA86 x DA135 (n=6)	1.48 ±0.69	33.10 ±2.37	5.37 ±1.60	0	9.11 ±2.88	15.92 ±3.14	78.59 ±9.23
DA92 x DA135 (n=3)	1.39 ±0.20	32.55 ±5.98	4.90 ±2.18	0	12.59 ±2.11	12.63 ±7.72	77.62 ±17.84
<i>S. purpurea</i> x <i>viminalis</i>							
Pu75 x Jorr (n=2)	0.35 ±0.13	9.13 ±2.07	1.35 ±0.57	55.37 ±2.50	2.70 ±1.61	0.12 ±0.04	72.74 ±7.16
<i>S. viminalis</i> x <i>daphnoides</i>							
Bowles x DA45/2 (n=2)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
77082 x DA57 (n=1)	0.38	10.69	2.26	86.4	2.14	0.88	105.27
79026 x DA57 (n=3)	0.88 ±0.13	15.81 ±5.96	2.91 ±0.20	43.19 ±11.96	2.67 ±0.38	2.19 ±2.21	71.40 ±17.01
79036 x DA57 (n=2)	0.42 ±0.12	15.88 ±1.84	2.76 ±1.19	58.44 ±2.21	3.04 ±1.45	2.10 ±0.52	86.66 ±1.94
<i>S. viminalis</i> x <i>viminalis</i>							
Bowles x Jorr (n=3)	0	0	0.73	101.09 ±9.20	0	0	111.20 ±4.93
parents (for all: n=1)							
DA45 ¹	1.99	46.88	2.38	0	14.68	13.63	95.23
DA45/2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DA50 ¹	1.93	35.31	1.68	0	13.26	12.11	79.54
DA86 ¹	2.43	44.87	2.59	0	10.42	21.98	101.72
DA92 ¹	2.16	44.65	2.15	0	9.93	24.55	100.74
DA135 ³	1.49	21.42	8.02	0	9.37	9.51	60.02
PU75 ²	0.98	25.62	2.71	0	8.53	1.31	51.71
Bowles ¹	0	0	1.45	101.52	0	0	108.76
Jorr ¹	0	0	0.68	109.18	0	0	114.25
77082 ²	0	0	2.7	133.73	0	0	170.97
79026 ¹	0	0	0.54	90.08	0	0	95.04
79036 ²	0	0	2.6	140.1	0	0	147.99

The measurements are from block 3 and are given in mg g⁻¹ dry weight. For each crossing family the average and the standard deviations are given. Measurements for the parents are from the field trial Wriezen1 (¹) or the stock collections in Dahlem (²) and Zepernick (³). Apart from the listed phenol glycosides following phenolic compounds have been measured (included in the column "total phenol glycosides"): different catechins, vimalin, ampelopsin, eriodictyol-7-glucoside, naringenin-5-glucoside I, salidroside, purpurein, unknown phenolic glycoside (data adapted from Köhler 2016).

DA135_20_Z, DA45 x DA135_11_W, the difference was significant (Figure 6). Only three interspecific crosses had a significantly lower dry weight than the standard *S. viminalis* Tordis. The three intraspecific *S. viminalis* clones that showed no significant difference to Tordis in Wriezen2 had also no significant differences at the field trial Wei15. The estimated dry masses for the three best clones are 9.84 odt (oven dry ton) ha⁻¹ (DA92 x DA135_1_Z), 9.98 odt ha⁻¹ (DA45 x DA135_20_Z) and 9.56 odt ha⁻¹ (DA45 x DA135_11_W, Figure 7).

Preliminary rust screenings in 2016 and 2017 showed no rust infestation at Wei15. Therefore, that it was not scored.

3.5 Measurement of phenolic glycosides at Wriezen2

The phenol glycosides have been measured once for each clone and are summarized according to their crossing

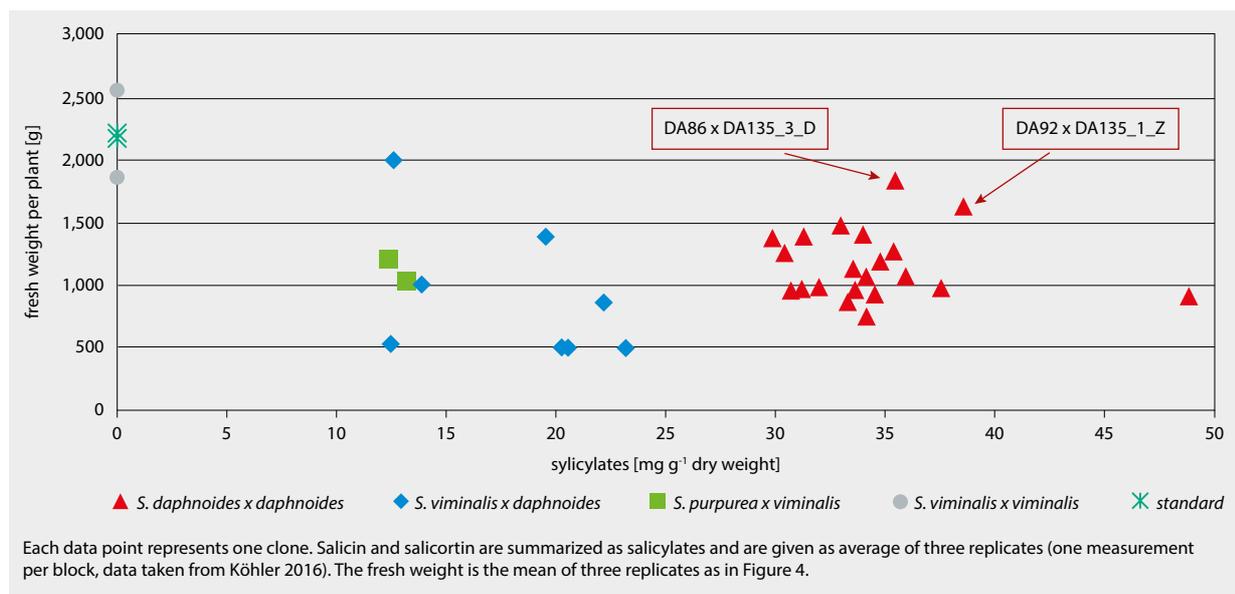


Figure 7
Joint plot of fresh weight and salicylate content at the field trial Wriezen2

families. Data are taken and adapted from Köhler (2016). Different substance classes are separately listed in Table 4.

Qualitative differences for intraspecific crossings and parents: The main phenolic glycoside in *S. daphnoides* and *S. purpurea* (PU75) is the salicylate salicortin. Both species contain low amounts of salicin. Other common phenolic glycosides in these two species are syringin, (+/-)-naringenin-5-glucoside (naringenin-5-glucoside I and II) and naringenin-7-glucoside. Both species do not contain triandrin. In contrast, triandrin is the main phenolic glycoside in *S. viminalis*. The only substance detected in all of these three species is syringin.

Qualitative differences of interspecific crossings and parents: The phenolic glycoside spectrum of the offspring of interspecific crossings is a combination of the parents. The crossings *S. viminalis* x *S. daphnoides* and *S. purpurea* x *viminalis* contain both salicylates and triandrin and all minor phenolic glycosides listed in Table 4. There are several substances that are measured in minor amounts (for instance catechins) that are not listed in Table 4. For them is also true that they can be crossed into the offspring, that is they are present in the hybrid when they were present in one of parent species (data not shown).

Quantitative differences: The highest contents of total phenol glycosides are found in the barks of *S. viminalis* parents and *S. viminalis* crossings (both intraspecific and interspecific) but the phenolic glycosides are dominated by one substance, triandrin. When considering the salicylates the highest content is recorded for the parent *S. daphnoides* DA45 with 1.99 mg g⁻¹ dry weight (dw) salicin and 46.88 mg g⁻¹ dw salicortin. Intraspecific *S. daphnoides* crossings have an average salicortin content of 31.96 to 33.1 mg g⁻¹ dw. Interspecific crossings of *S. daphnoides* x *S. viminalis* have a lower salicortin content with the lowest content in the interspecific crossing *S. purpurea* x *S. viminalis* (9.13 mg g⁻¹ dw).

Intraspecific crossings are intermediary between their parents in the amount of specific substances. For instance, progeny of the crossing DA45 x DA135 has a salicortin mean of 31.95 mg g⁻¹ dw, which is intermediary between the parents DA45 (46.88 mg g⁻¹ dw) and DA135 (21.42 mg g⁻¹ dw).

3.6 Joint assessment of salicylates and biomass at Wriezen2

There is no significant correlation between salicylate content and biomass (Spearman correlation 0.183, Figure 7). However, the plot of Figure 7 is useful for distinguishing clones for dual use as salicylate source and biomass producer. Promising clones are DA86 x DA135_3_D and DA92 x DA135_1_Z because they have both high biomass and high salicylate content. There are also some clones of *S. daphnoides* x *viminalis* with a biomass comparable to the best *S. daphnoides* crossings, but their salicylate content is much lower. The two *S. purpurea* x *viminalis* crosses show a similar combination of salicylate content and biomass. The best biomass producers in Wriezen2 are *Salix viminalis* clones, but they do not contain salicylates.

4 Discussion

The aim of this breeding program was to combine the high biomass yield of *S. viminalis* genotypes with the high content of salicylates in other *Salix* species.

Salicylate content: We could confirm previous reports that *S. viminalis* contains no or only traces of salicin and other salicylates (Minakhmetov et al., 2002; Poblocka-Olech et al., 2007). *S. daphnoides* and *S. purpurea* contain salicin and salicortin, with salicortin being the main salicylate. The measured salicortin concentrations in *S. daphnoides* (30 to 45 mg

g^{-1} dw) and in *S. purpurea* (25 mg g^{-1} dw) are less than previously reported for these species (87 mg g^{-1} dw and 72 mg g^{-1} dw respectively (Julkunen-Tiitto, 1989)). The measured concentrations are still sufficient for use as phytopharmaceutical since the required salicin concentration in the willow bark as drug is at least 1.5% (ESCOF, 2003). Salicin and salicortin are similar in their physiological effect because they are both hydrolyzed to saligenin (Julkunen-Tiitto and Meier, 1992), which is metabolized in the human body to salicylic acid, the physiological active substance (Meier, 2001). Thus, also the bark of the *S. viminalis* x *daphnoides* crossing families 79026 x DA57 and 79026 x DA57 with an average of 15 mg g^{-1} dw (= 1.5%) salicortin is suitable as phytopharmaceutical.

The salicortin content in the two tested *S. purpurea* x *viminalis* clones is on average below 1.5%. This is a result of intermediate inheritance because a clone with 2.5% salicylates (PU75) is crossed with a clone without salicylate (Jorr). When both parents would have salicylate contents above the threshold value of 1.5% also the progeny had a salicylate content above 1.5%. In the same way it could be argued that *S. daphnoides* x *daphnoides* crosses could be further improved. All tested intraspecific *S. daphnoides* crosses had DA135 as father, because those crosses have been selected in the nursery trials for their growth and rust resistance. However, DA135 had the lowest content of salicylates among the used parents. Pollination with a salicylate rich father could lead to a further improvement of the salicylate content in intraspecific crossings.

With the interspecific crossings we could show that it is possible to cross the ability to produce salicylates into salicylate free *Salix* species. Despite the lack of salicylates, *S. viminalis* clones could be interesting as producers of phenolic substances because they contain more than 10% phenolic glycosides (parent 77082: 17%), dominantly as triandrin. In comparison, Thieme (1965) reports 6.7% triandrin for *Salix viminalis* bark. *Salix* phenolic glycosides other than salicylate can become an item of substantial interest for the "chemocetical" industry that uses plant substances for a bio based economy (Brereton et al., 2017). Therefore, future scaled up trials for phenolic glycoside yield should also include *S. viminalis* clones. Moreover, recent studies showed not only salicylates to be effective as bioactive substances in willow bark, other compounds such as flavonoids and procyanidins are also known for their bioactivity potential (Agnolet et al., 2012; Fiebich and Chrubasik, 2004; Ishikado et al., 2013; Nahrstedt et al., 2007).

Drought tolerance: At the site with a high ground water level (Wriezen2) a new *S. viminalis* x *viminalis* clone (Bowles x Jorr_ER5_W) had the highest biomass. None of the other two species (neither an interspecific nor an intraspecific crossing) had a significantly higher biomass than the standard *S. schwerinii* x *viminalis* Tordis. The high biomass of the crossing Bowles x Jorr_ER5_W demonstrates that *S. viminalis* and relatives have the potential to be further improved by intraspecific crossings.

At the site with the dry soil conditions the picture is different. Because of differences in the setup of the field trials we cannot compare the biomass yields of both sites directly.

They have been planted in different years, the genotypes overlap only partially, and the cutting regime differed (second rotation, second year for Wriezen2; first rotation, third year for Wei15). Furthermore, the biomass at Wei15 has not been measured, but calculated as oven dry ton, not as fresh weight, for better comparison with published literature. Nevertheless, we can compare the relation of the different species and crossing families to each other and to the standard *S. schwerinii* x *viminalis* Tordis. The significantly best biomass producers are three intraspecific clones of *S. daphnoides* and further 16 *S. daphnoides* x *daphnoides* clones show a higher biomass (though not significantly) than the standard. At the first glance, this seems to indicate that *S. daphnoides* performs superior to *S. viminalis* and related species at the dry site. This could be due to the expected drought tolerance of *S. daphnoides*. Almost all *S. daphnoides* crossings have at least one crossing partner originating from the Baltic Sea coast. There, *S. daphnoides*, normally a small tree grows, more bushy and on sand dunes (Chmelar and Meusel, 1979) indicating an adaption to sites with dry soils.

The interpretation of draught tolerance is problematic since the plants at site Wriezen2 were cut after the first growing season, while they were grown for three seasons without cutting at Wei15. *S. viminalis* is a shrub willow and sprouting from stool with many shoots and even needs cutting to develop full biomass capacity (Karp et al., 2011). *S. daphnoides* from the Alps is small tree (Chmelar and Meusel, 1979) regenerating from stools with a smaller number of shoots and is not promoted as strongly by cutting as *S. viminalis*. This also applies to most of the tested crosses of *S. daphnoides*, although they have been selected in the nursery trials for a high number of basal shoots. Therefore it is possible that *S. viminalis* did not show its optimal growth at the dry site due to the uncut condition and not due to drought stress. The three years growth on the hand may have been favorable for *S. daphnoides*. Further field trials are necessary to finally conclude whether *S. daphnoides* is superior at dry sites in comparison to *S. viminalis* and relatives.

Biomass production: The estimated dry weight of the three best *S. daphnoides* x *daphnoides* clones is with 9 odt (oven dry ton) ha^{-1} below the values reported for *S. viminalis*/*S. dasyclados* with 10 to 20 odt ha^{-1} and exceptionally 30 odt ha^{-1} in experimental plots (Mola-Yudego and Aronsson, 2008). This difference is even higher considering that literature values are annual yield estimates, whereas Wei15 was measured three years after planting. On the other hand, the yield of the first rotation will be increased after cutting (Tahvanainen and Rytönen, 1999). Thus, a higher yield could be expected over a longer operation time of Wei15. If this is also true for *S. daphnoides*, which is normally sprouting from stools with less shoots than *S. viminalis* has to be shown in future field trials.

It should also be considered that in poplar experimental field plots yields are overestimated 4 to 7 times as compared to plantations (Hansen, 1991). In commercial willow plantations of Southern and Central Sweden average yield was 4.47 odt ha^{-1} with an average rotation length of 4.1 years (Mola-Yudego and Aronsson, 2008). The biomass value of

S. daphnoides at Wei15 should also be seen under the aspect that the best clone *S. daphnoides* × *daphnoides* DA92 × DA135_1_Z is also a clone that is valuable as source for salicylates (Figure 7).

While the interspecific crosses of *S. viminalis* × *daphnoides* show both weak clones and clones that are not significantly different to *S. viminalis*, crossings with *S. purpurea* as mother are not under the promising clones. This is surprising since *S. purpurea* is routinely used as starting material both for biomass and salicylate improvements (Serapiglia et al., 2013; Smart et al., 2005; Sulima et al., 2017) and also in interspecific crosses (Fabio et al., 2017). Since *S. purpurea* produces its biomass from many thin shoots as compared to *S. daphnoides* with few but strong shoots it is possible that *S. purpurea* crossings need repeated cuts before they develop higher biomass yields from the stools.

The three hybrids of *S. humboldtiana* show that crossings of *S. humboldtiana* with several native *Salix* species are possible. The hybrids could be easily propagated by cuttings so that they could be planted into the field trial. The relatively low yield at Wei15 could have been the same reason as for *S. purpurea*. The question of the number of shoots from stools can only be solved in further field trials with repeated cuts.

Melampsora resistance: *Melampsora* infestation was low at Wriezen2. At the field trial Wei15 rust infestation was so low that it was not measured separately. The reason could be that the choice of the parent genotype was already guided by rust resistance (e.g. DA135 is rust resistant) and that the offspring with a high rust susceptibility have been eradicated in the nursery trials. If this is true, then the selection at an early stage of the breeding process is an easy approach to reduce rust susceptibility.

Another reason for the low rust incidence could be the absence of the alternate host from the field trial Wriezen2. In a previous study in the stock collections and nursery trials of Zepernick, Berlin-Dahlem and Waldsiefersdorf it could be shown that the *Salix* species *S. viminalis*, *S. daphnoides* and *S. purpurea* are mainly infested by two formae speciales of the rust species *Melampsora larici-epitea* Kleb. (Bubner et al., 2014). The alternate host of this *Melampsora* species is *Larix decidua* Mill (Gäumann, 1959; Klenke and Scholler, 2015). This tree species is not present in the vicinity of Wriezen2 which is surrounded by meadows and agricultural fields. For future scaled up field trials their location should be chosen for the presence of the potential alternate host. This approach should ensure that the rust surveys give a realistic view of the rust resistance.

Processing of multipurpose willows: When growing a dual or multipurpose plant it should be possible to use the same feedstock for different purpose e.g. as bioenergy and for chemoceuticals (Joyce and Stewart, 2012; Lyko et al., 2009). In the case of salicylate containing willows the bark will be peeled off and the remaining wood can be processed to wood chips. Although commercial willow bark peeling machines for basketry are available, machines for the industrial use in short rotation coppice have still to be developed. Another problem is that the rotation time in willow

plantation is four years (Mola-Yudego and Aronsson, 2008) but bark for phenolic glycosides extraction is usually harvested from one or two year old shoots (Sulima et al., 2017; Sulima et al., 2006). In a future field trial it should be tested whether four year old bark contains as much salicin as two year old shoots.

One approach to circumvent the peeling problem is the use of alternate rotation times. One rotation could comprise four years to produce biomass and a second rotation is one year to provide shoot for extraction of phenol glycosides. The phenols could be extracted directly from the shoot, although the industrial application of such an approach has still to be developed. In future project the phenolic glycoside yield from shoots and from bark should be compared. This includes measuring the percentage of bark dry weight and the total dry weight separately.

5 Conclusion

We could show that we are able to cross *S. viminalis* with *S. daphnoides* and *S. purpurea* to yield both salicylates and improved biomass. Crossings with *S. daphnoides* produced better results than crosses with *S. purpurea*. Besides interspecific crossing the crossing of two *S. daphnoides* genotypes is an equivalent approach to combine high salicylate content and high biomass. This approach should be further pursued. A next step is the planting of scaled up field trials to verify the results for agricultural application. They should also include sites with wet and dry soil conditions to further investigate the possible superiority of *S. daphnoides* over *S. viminalis* on dry sites. The necessary cuttings could be provided through the field trial Wei15.

Acknowledgements:

We thank for technical assistance: Heidrun Mattauch, Marlies Karas, Petra Knauer, Petra Müller, and Andrea Glöde. Dietmar Barkusky from the ZALF Müncheberg prepared the field for the field trial Wei15. The project was supported by the German Agency for Renewable Resources (Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe, FNR; grants 22015011 and 22015311).

References

- Agnolet S, Wiese S, Verpoorte R, Staerk D (2012) Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technology platform : combined use of metabolomics, high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-resolution radical scavenging assay. J Chromatogr 1262:130-137
- Ayllott MJ, Casella E, Tubby I, Street NR, Smith P, Taylor G (2008) Yield and spatial supply of bioenergy poplar and willow short-rotation coppice in the UK. New Phytol 178:358-370
- Begley D, McCracken AR, Dawson WM, Watson S (2009) Interaction in short rotation coppice willow, *Salix viminalis* genotype mixtures. Biomass Bioener 33:163-173

- Berlin S, Fogelqvist J, Lascoux M, Lagercrantz U, Ronnberg-Wastljung AC (2011) Polymorphism and divergence in two willow species, *Salix viminalis* L. and *Salix schwerinii* E. Wolf. G3 (Bethesda) 1:387-400
- Boeckler GA, Gershenzon J, Unsicker SB (2011) Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* 72:1497-1509
- Brereton NJB, Berthod N, Lafleur B, Pedneault K, Pitre FE, Labrecque M (2017) Extractable phenolic yield variation in five cultivars of mature short rotation coppice willow from four plantations in Quebec. *Indust Crops Products* 97:525-535
- Bubner B, Wunder S, Zaspel I, Zander M, Gloger J, Fehrenz S, Ulrichs C (2014) *Melampsora* rust species on biomass willows in central and northeastern Germany. *Fungal Biol* 118:910-923
- Chmelar J, Meusel W (1979) Die Weiden Europas. Wittenberg : Ziemsen, 143 p
- Djomo SN, El Kasmioui O, Ceulemans R (2011) Energy and greenhouse gas balance of bioenergy production from poplar and willow : a review. *GCB Bioenergy* 3:181-197
- ESCOP (2003) *Salicis cortex* (willow bark). In: ESCOP Monographs, Exeter : ESCOP, pp 445-451
- Fabio ES, Kemanian AR, Montes F, Miller RO, Smart LB (2017) A mixed model approach for evaluating yield improvements in interspecific hybrids of shrub willow, a dedicated bioenergy crop. *Indust Crops Products* 96:57-70
- Fehrenz S (2015) Personal communication with Steffen Fehrenz, Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden, Germany, 14.10.2018
- Fiebich BL, Chrubasik S (2004) Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine* 11:135-138
- Förster N, Ulrichs C, Zander M, Kätzel R, Mewis I (2008) Influence of the season on the salicylate and phenolic glycoside contents in the bark of *Salix daphnoides*, *Salix pentandra*, and *Salix purpurea*. *J Appl Bot Food Quality* 82:99-102
- Gäumann E (1959) Die Rostpilze Mitteleuropas. Bern : Buechler, 1407 p, Beitr Kryptogamenflora Schweiz 12
- Gebhardt K (2012) Neuzüchtung, Erprobung und mögliche Verwendung bisher nicht registrierter Weidensorten. *Beitr NW-FVA* 8:55-70
- Hänsel S, Petzold S, Matschullat (2007) Precipitation trend analysis for Central Eastern Germany. In: Strelcová K (ed) International scientific conference bioclimatology and natural hazards : proceedings ; [17-20 September, Zvolen - Polana nad Detvou, Slovakia]. Zvolen : Slovenská Bioklimatologická Spoločnosť, pp 29-38
- Hansen EA (1991) Poplar woody biomass yields : a look to the future. *Biomass Bioener* 1:1-7
- Ishikado A, Sono Y, Matsumoto M, Robida-Stubbs S, Okuno A, Goto M, King GL, Blackwell TK, Makin T (2013) Willow bark extract increases anti-oxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biol Med* 65:1506-1515
- Joyce BL, Stewart CN (2012) Designing the perfect plant feedstock for biofuel production : using the whole buffalo to diversify fuels and products. *Biotechnol Adv* 30:1011-1022
- Julkunen-Tiitto R (1989) Phenolic constituents of *Salix* : a chemotaxonomic survey of further Finnish species. *Phytochemistry* 28:2115-2125
- Julkunen-Tiitto R, Meier B (1992) The enzymatic decomposition of salicin and its derivatives derivatives obtained from salicaceae species. *J Nat Prod* 55:1204-1212
- Karp A, Hanley SJ, Trybush SO, Macalpine W, Pei M, Shield I (2011) Genetic improvement of willow for bioenergy and biofuels. *J Integr Plant Biol* 53:151-165
- Klenke F, Scholler M (2015) Pflanzenparasitische Kleinpilze : Bestimmungsbuch für Brand-, Rost-, Mehltau-, Flagellatenpilze und Wucherlingswandtke in Deutschland, Österreich, der Schweiz und Südtirol. Berlin, Heidelberg : Springer, 1172 p
- Köhler A (2016) Untersuchungen zur Phenolglykosidkonzentration ausgewählter intra- und interspezifischer Kreuzungen salicinreicher Biomasseweiden. Uelvesteubull. Der Andere Verlag, 114 p, Berl ökophysiolog. phytomed. Schr 38
- Larsson S (1998) Genetic improvement of willow for short-rotation coppice. *Biomass Bioener* 15:23-26
- Lindegaard KN, Adams PWR, Holley M, Lamley A, Henriksson A, Larsson S, von Engelbrechten HG, Lopez GE, Pisarek M (2016) Short rotation plantations policy history in Europe : lessons from the past and recommendations for the future. *Food Ener Security* 5:125-152
- Lindegaard KN, Barker JHA (1996) Breeding willows for biomass. *Asp Appl Biol* 49:155-162
- Lindroth A, Bath A (1999) Assessment of regional willow coppice yield in Sweden on basis of water availability. *For Ecol Manage* 121:57-65
- Lyko H, Deerberg G, Weidner E (2009) Coupled production in biorefineries : combined use of biomass as a source of energy, fuels and materials. *J Biotechnol* 142:78-86
- Makeschin F (1999) Short rotation forestry in Central and Northern Europe : introduction and conclusions. *For Ecol Manage* 121:1-7
- McCracken AR, Dawson M (1992) Clonal response in *Salix* to *Melampsora* rusts in short rotation coppice plantations. *Eur J For Pathol* 22:19-28
- McCracken AR, Dawson WM (1998) Short rotation coppice willow in Northern Ireland since 1973 : development of the use of mixtures in the control of foliar rust (*Melampsora* spp.). *Eur J For Pathol* 28:241-250
- McCracken AR, Walsh L, Moore PJ, Lynch M, Cowan P, Dawson M, Watson S (2011) Yield of willow (*Salix* spp.) grown in short rotation coppice mixtures in a long-term trial. *Ann Appl Biol* 159:229-243
- Meier B (2001) Die Weidenrinde als Schmerz- und Rheumamittel [online]. To be found at <https://www.researchgate.net/publication/242772020_Die_Weidenrinde_als_Schmerz-_und_Rheumamittel> [quoted 15.08.2018]
- Minakhmetov RA, Onuchak LA, Kurkin VA, Zapesochynaya GG, Medvedeva SA (2011) Determination of triandrin and salicin in *Salix viminalis* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Anal Chem* 57:338-341
- Mola-Yudego B, Aronsson P (2008) Yield models for commercial willow biomass plantations in Sweden. *Biomass Bioener* 32:829-837
- Mola-Yudego B, Gonzalez-Olabarria JR (2010) Mapping the expansion and distribution of willow plantations for bioenergy in Sweden : lessons to be learned about the spread of energy crops. *Biomass Bioener* 34:442-448
- Nahrstedt A, Schmidt M, Jäggi R, Metz J, Khayyal MT (2007) Willow bark extract : the contribution of polyphenols to the overall effect. *Wien Med Wochenschr* 157:348-351
- Pei MH, Lindegaard K, Ruiz C, Bayon C (2008) Rust resistance of some varieties and recently bred genotypes of biomass willows. *Biomass Bioener* 32:453-459
- Pei MH, Ruiz C, Bayon C, Hunter T (2004) Rust resistance in *Salix* to *Melampsora larici-epitea*. *Plant Pathol* 53:770-779
- Poblocka-Olech L, van Niderkassel AM, Heyden YV, Krauze-Baranowska M, Glod D, Baczek T (2007) Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. *J Sep Sci* 30:2958-2966
- Pohjonen V (1991) Selection of species and clones for biomass willow forestry in Finland. *Acta For Fenn* 221:258
- Seabra J, Chim RB, Salgueiro P, Braga MEM, de Sousa HC (2018) Influence of solvent additives on the aqueous extraction of tannin from pine bark : potential extracts for leather tanning. *J Chem Tech Biotechnol* 93:1169-1182
- Serapiglia MJ, Cameron KD, Stipanovic AJ, Abrahamson LP, Volk TA, Smart LB (2013) Yield and woody biomass traits of novel shrub willow hybrids at two contrasting sites. *Bioenergy Res* 6:533-546
- Shao Y (1991) *Phytochemischer Atlas der Schweizer Weiden*. Zürich : ETH, 198 p
- Skvortsov AK (1999) Willows of Russia and adjacent countries : taxonomical and geographical revision. Joensuu : Univ Joensuu, 307 p, Fac Mathem Nat Sci Rep Ser 39
- Smart LB, Volk TA, Lin J, Kopp RF, Phillips IS, Cameron KD, White EH, Abrahamson LP (2005) Genetic improvement of shrub willow (*Salix* spp.) crops for bioenergy and environmental applications in the United States. *Unasylva* 56:51-55
- Sulima P, Krauze-Baranowska M, Przyborowski JA (2017) Variations in the chemical composition and content of salicylic glycosides in the bark of *Salix purpurea* from natural locations and their significance for breeding. *Fitoterapia* 118:118-125
- Sulima P, Przyborowski JA, Wiwart M (2006) Willow bark : herbal raw material harvested from plants cultivated on arable lands. *Herba Pol* 52:18-25
- Tahvanainen L, Rytönen VM (1999) Biomass production of *Salix viminalis* in southern Finland and the effect of soil properties and climate conditions on its production and survival. *Biomass Bioener* 16:103-117

Thieme H (1965) Die Phenolglykoside der Salicaceen : 5. Mitteilung: Untersuchungen über die Glykosidspektren und den Glykosidgehalt der mittel-deutschen Weidenarten. *Pharmazie* 20:570-574

Zander M, Ulrichs C, Mewis I, Gloger J, Förster N, Kätzel R, Löffler S, Becker F (2010) Ex-situ-Erhaltung salicinreicher Weiden und Anlage eines Modellbestandes für eine nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt innerhalb der Gattung *Salix* [online]. To be found at <https://service.ble.de/ptdb/index2.php?detail_id=88813&site_key=141&stichw=weiden&zeilenzahl_zaeher=37#newContent> [quoted 29.08.2018]

Evaluierung von Genotyp-Umwelt Interaktionen bei Pappel und Weide auf landwirtschaftlichen Standorten in kurzen Umtriebszeiten – Ergebnisse aus dem ProLoc Verbundvorhaben

Christoph Stiehm* und Martin Hofmann*

Zusammenfassung

Im Zuge des ProLoc Verbundvorhabens wurden auf einer breiten Amplitude standörtlicher Bedingungen nach einheitlichem Design Feldversuche mit drei Pappel- und zwei Weidenklonen in Kurzumtriebsplantagenbewirtschaftung angelegt, um den Einfluss ertragsbestimmender Standortbedingungen zu quantifizieren. Basierend auf 23 dieser Versuche wurde der Einfluss der Genotyp-Umwelt Interaktion auf die Gesamtwuchsleistung der Biomasse untersucht. Anhand einer Varianzkomponentenanalyse kann der größte Anteil der Gesamtstreuung durch den Faktor Standort erklärt werden, der Anteil, der durch Genotyp-Umwelt Interaktion erklärten Varianz, liegt deutlich niedriger und der Anteil des Faktor Genotyp ist verschwindend gering. Dem Ansatz der zweiphasigen Versuchsserienauswertung folgend, wurden die Einzelversuche varianzanalytisch ausgewertet, um die Standorte mit signifikanten Unterschieden in der Ertragsleistung der Klone zu identifizieren. 13 von 23 Standorten weisen signifikante Differenzierungen in der Rangfolge der Klone auf. Von diesen 13 Standorten liegen jedoch nur fünf in ihrer mittleren Ertragsleistung über dem Gesamtdurchschnitt von $42,38 t_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1}$. Die klon- und standortweisen Mittelwerte der Ertragsleistung wurden einer Biplot Analyse unterzogen, um zu überprüfen, ob sich Standorteinheiten bilden lassen, die ähnlich differenzierend auf den Prüfglied-satz wirken. Durch die Biplot Analyse konnte die Datenstruktur gut approximiert werden. Es bestätigten sich die Ergebnisse der Varianzkomponentenanalyse. Auf den Standorten mit ähnlicher Rangfolge der Prüfgliedmittel konnten keine deutlichen Tendenzen zu Standorteigenschaften, die diese Rangfolge verursachen könnten, identifiziert werden. Abgrenzungen zwischen den Gattungen der Prüfglieder sind nur tendenziell erkennbar.

Schlüsselwörter: *Populus, Salix, Kurzumtriebsplantage, Standortleistung, Genotyp-Umwelt Interaktion, Biplot Analyse*

Abstract

Assessing Genotype-Environment Interaction for Poplars and Willows on agricultural sites in short rotation coppice – Results from the Joint Research Project ProLoc

In the course of the ProLoc joint research project field experiments with three poplar and two willow clones in short rotation coppice management were established in a uniform design on a broad amplitude of site conditions, in order to quantify the influence of yield determining site factors. Based on 23 of these experiments, the influence of the genotype-environment interaction on the total biomass growth performance was investigated. Using a variance component analysis, the largest proportion of the total variance could be explained by the site factor, the variance explained by genotype-environment interaction is significantly lower and the proportion of the factor genotype is negligible. Following a two-phase trial series analysis approach, the individual experiments were evaluated by one-way ANOVA in order to identify the sites with significant differences in the yield performance of the clones. 13 out of 23 sites showed significant differentiation in the ranking of the clones. Out of these 13 sites, only five of them had an average yield above the overall average of $42.38 t_{\text{atro}} \text{ ha}^{-1}$. The clonal and site-wise means of yield performance were subjected to a biplot analysis in order to check whether site units can be formed that have a comparable differentiating effect on the clones. The biplot analysis displayed a good approximation of the data structure; the results of the variance component analysis were confirmed. At locations with similar ranking of clone means, no significant trends could be identified for site characteristics that could cause this ranking. Differences between the genera of the clones occurred rather as tendencies.

Keywords: *Populus, Salix, Short Rotation Coppice, Site productivity, Genotype-Environment Interaction, Biplot Analysis*

* Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung C – Waldgenressourcen, Professor-Oelkers-Straße 6, 34346 Hann. Münden

1 Einleitung

Aufgrund ihres starken Jugendwachstums sind Pappeln und Weiden besonders interessant für die Produktion von Energiehackschnitzeln in kurzen Umtriebszeiten (Hofmann, 1999; Bärwolff et al., 2012). Dabei werden bestimmte Arten und Hybridformen über Steckhölzer vermehrt und auf landwirtschaftlichen Standorten in drei- bis vierjährigen Ernteintervallen bewirtschaftet. Bei sachgerechtem Management garantieren vitale Stockausschläge eine lange Standzeit der Plantagen (Janßen et al., 2010).

In der Bundesrepublik Deutschland sind solche Kurzumtriebsplantagen bislang noch weitgehend auf den Versuchsmaßstab beschränkt. Es bedarf aber nur leicht veränderter Rahmenbedingungen, um das Konzept auch wirtschaftlich attraktiv werden zu lassen.

Unter den Erfolgsvoraussetzungen stehen Ertragsleistung und Ertragssicherheit an vorderster Stelle. Deshalb setzt eine kalkulierbare Kurzumtriebswirtschaft Wissen über die Standortanforderungen von Hochleistungspappeln und -weiden voraus und erfordert eingehende Kenntnisse über Klon-Standort Wechselwirkungen bei Pappel und Weide.

Bislang kann das standortsbezogene Ertragspotential von bestimmten Sorten und damit die sichere standortabhängige Beurteilung der Wirtschaftlichkeit noch nicht mit hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden. Abweichend zu den Ertragsprognosen für landwirtschaftliche Fruchtfolgen, die sich auf eine belastbare Datenbasis gründen, fehlt eine solche für den Feldholzanbau. Vorliegende Versuchsergebnisse können nur standortbezogen interpretiert werden. Für weiterführende Aussagen ist das mit den bisherigen Versuchen abgedeckte Standortspektrum leider nicht ausreichend. Ertragspotenzialstudien mit unterschiedlichen Klonen, Bestandesdichten, Umtriebszeiten und Anpflanzjahren von verschiedenen Standorten sind in diesem Zusammenhang allenfalls als Anhaltspunkte einzustufen.

Das Verbundvorhaben ProLoc „Erfassung von Klon/Standort Wechselwirkungen bei Pappel und Weide auf landwirtschaftlichen Standorten in kurzen Umtriebszeiten“ schließt diese Lücke. Erstmals wurden unter Einbezug möglichst aller repräsentativen Regionen Deutschlands, die auf Grund ihrer Standortsausstattung für einen Anbau in Frage kommen, Feldversuche nach einheitlichem Versuchsdesign angelegt und mit einheitlicher Datenerhebung zentral

ausgewertet (Amthauer Gallardo, 2014; Janßen et al., 2017). Versuchsanlage und Kulturführung entsprachen dem anerkannten Standard.

Entsprechend der inhaltlichen Ausrichtung des Versuches wurden zwei aussichtsreiche Weidensorten („Inger“ und „Tordis“) und drei bekannte Pappelklone („Max 1“, „Hybride 275“ und „AF2“), also insgesamt fünf Prüfglieder, auf insgesamt 55 Standorten im gesamten Bundesgebiet auf ihre Klon/Standort Wechselwirkung hin untersucht und die ertragsbestimmenden Standortparameter identifiziert. Die Arbeiten gliederten sich in mehrere Arbeitspakete, die neben der Quantifizierung der Umwelteinflüsse im dreijährigen Rotationsmodus (Arbeitspaket 1, 38 Flächen), zusätzlich diese Effekte bei Bewirtschaftung in längeren Umtriebszeiten von zehn Jahren (Arbeitspaket 2a, 14 Flächen) und wechselnden Pflanzabständen (Arbeitspaket 2b, drei Flächen) untersuchen sollten. Ein Teilprojekt der Universität Kassel befasste sich mit der C- und N-Dynamik in den Böden unter Kurzumtriebsplantagen (Wachendorf und Möller 2016). Nicht zuletzt die enge Zusammenarbeit mit 28 Institutionen aus Forschung, Wissenschaft und Praxis über mehr als sechs Jahre hinweg macht das Verbundvorhaben ProLoc beispielhaft für die Kurzumtriebsforschung in Deutschland.

Neben der Identifizierung der leistungsbestimmenden Standortparameter sollte in ProLoc untersucht werden, ob Klon-Standort Wechselwirkungen vorliegen und ob diese wiederholbar sind, also ob für verschiedene Klone unterschiedliche Anbauoptima hinsichtlich der Umweltbedingungen existieren. Die Untersuchung dieser Fragestellung ist das Ziel dieses Beitrags und soll im Folgenden anhand der Versuchsflächen mit dreijährigen Ernteintervallen näher beleuchtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Prüfglieder

Als Prüfglieder wurden zu Beginn des Verbundvorhabens drei Pappel- und zwei Weidenhybride festgelegt (Tabelle 1). Durch diese Auswahl sollten Klone geprüft werden, die zum Teil bereits im Praxisanbau etabliert sind und es sollten durch unterschiedliche Kreuzungseltern bzw. interspezifische Kreuzungskombinationen verschiedene Züchtungsstrategien repräsentiert werden.

Tabelle 1

Übersicht über die in ProLoc verwendeten Klone und deren jeweilige Kreuzungskombination (Sektionen der Kreuzungskombinationen nach Dickmann und Kuzovkina (2014))

Prüfglied	Klon-Name	Kreuzung Artnamen	Sektionen Kreuzung	Kürzel
1	'Max 1'	<i>P. nigra</i> Linnaeus × <i>P. maximowiczii</i> Henry	<i>Aigeiros</i> × <i>Tacamahaca</i>	MAX
2	'Hybride 275' (syn. 'NE 42')	<i>P. maximowiczii</i> Henry × <i>P. trichocarpa</i> Torrey & Gray	<i>Tacamahaca</i> × <i>Tacamahaca</i>	HYB
3	'AF2'	<i>P. deltooides</i> Marshall × <i>P. nigra</i> Linnaeus	<i>Aigeiros</i> × <i>Aigeiros</i>	AF2
4	'Inger'	<i>S. triandra</i> Linnaeus × <i>S. viminalis</i> Linnaeus	<i>Amygdalinae</i> Koch × <i>Vimen</i> Dumortier	ING
5	'Tordis'	(<i>S. viminalis</i> Linnaeus × <i>S. schwerinii</i> E. Wolf) × <i>S. viminalis</i> Linnaeus	(<i>Vimen</i> Dumortier × <i>Vimen</i> Dumortier) × <i>Vimen</i> Dumortier	TOR

Bei den Pappelklonen handelt es sich ausschließlich um intra- und intersektionelle Kreuzungen von Schwarz- und Balsampappeln. Besonders die Hybride von Balsampappeln haben sich für die Biomassegewinnung im Feldholzanbau bewährt (Hofmann, 2005; Bärwolff et al., 2012; Janßen et al., 2012; Grotehusmann et al., 2017). „Max 1“ und „Hybride 275“ zählen nach der Erhebung zur Versorgungssituation von forstlichem Vermehrungsgut im Bundesgebiet (BLE – Bundesanst Landwirtschaf Ernährung, 2018) zu den meist nachgefragtesten Pappelklonen, die nach FoVG zugelassen sind. Beide Klone erzeugten in Feldversuchen überdurchschnittliche Erträge und werden zum Anbau empfohlen (Rau et al., 1988; Hofmann, 1999; Boelcke, 2006; Bärwolff et al., 2012). Für „AF2“ liegt keine Zulassung nach FoVG vor. Dieser Klon aus italienischer Züchtung hat sich beim Anbau in Norditalien und bei Versuchsanbauten im europäischen Ausland im Vergleich mit anderen Klonen bewährt (Filat et al., 2010; Lazdina et al., 2014; Sixto et al., 2014).

Für Versuchsanbauten in Großbritannien belegen Lindgaard et al. (2011) eine Leistung von „Tordis“, die über dem Gesamtmittel aller Klone in allen Versuchen liegt. Inger schneidet dagegen unter dem Durchschnitt ab. Caslin et al. (2012) bewerten den Ertrag beider Klone insgesamt als durchschnittlich, an einzelnen Standorten jedoch auch als überdurchschnittlich. Für beide Klone wird auf vergleichsweise guten Ertrag oder zumindest erwartet guten Ertrag auf trockenen Standorten hingewiesen (Caslin et al., 2012). Bärwolff et al. (2012) heben die überdurchschnittliche Wachstumsleistung von „Inger“ und „Tordis“ hervor und beziehen beide Klone in eine Anbauempfehlung mit ein.

2.2 Versuchsflächen

Abbildung 1 enthält eine Übersicht über die geografische Lage der 23 für die folgende Analyse verwendeten ProLoc Flächen des Arbeitspaketes 1 (AP1). Ursprünglich wurden im Frühjahr 2008 zu Beginn des Verbundvorhabens 38 Flächen angelegt, von denen jedoch nicht alle bis zum Ende der zweiten Rotation aktiv betreut wurden. In der ersten Projektphase wurden neun Standorte aufgrund wiederholt starker Ausfälle oder sehr geringer Wüchsigkeit bereits von der Analyse ausgeschlossen (Amthauer Gallardo, 2014). Gründe dafür waren im Einzelnen und als Kombination von Ursachen eine fehlende Beikrautregulierung, sehr geringe Niederschläge auf sandigen (Ackerzahl < 30) oder flachgründigen Standorten, starker Wildverbiss aufgrund fehlender Einzäunung und stark saure Bodenreaktion. Diese Standorte wurden in der zweiten Projektphase nicht fortgeführt oder waren bereits aufgegeben. Es kamen drei Standorte hinzu, auf denen aus administrativen Gründen die Betreuung nicht fortgesetzt werden konnte. Für zwölf Versuche lagen daher nicht die Ernteergebnisse aus beiden Umtriebszeiten vor. Auf den verbleibenden 26 Standorten konnten die Daten vollständig erhoben werden. In den folgenden Analysen wurden jedoch wie bei Amthauer Gallardo (2014) die Standorte 2 Lilitental, 7 Kaisheim und 27 Bärenrode aufgrund des hohen Beikrautdrucks und der Ausfälle durch Schermausfraß nicht berücksichtigt, da die Ertragsresultate als nicht repräsentativ für die Standorteigenschaften angesehen werden.

Der Versuchszeitraum der ausgewählten Flächen erstreckt sich über zwei Umtriebszeiten, also sechs Jahre. Beginnend in 2008 erfolgte zum Ende der ersten Umtriebszeit die Beerntung des dreijährigen Aufwuchses auf dreijähriger Wurzel im Winter 2010/2011. Die zweite Ernte des dreijährigen Aufwuchses auf sechsjähriger Wurzel wurde im Winter 2013/2014 durchgeführt.

Ziel der Standortauswahl war es, eine möglichst breite Verteilung über das Bundesgebiet zu erreichen, um die für den KUP-Anbau möglichen Boden- und Klimabedingungen zu repräsentieren. Die Verteilung der hier dargestellten Standorte erstreckt sich auf insgesamt neun Bundesländer und 14 verschiedene Bodengroßlandschaften (FISBo BGR 2014). Letztere reichen von den nördlichsten Versuchsflächen auf den Grundmoränenplatten und lehmigen Endmoränen im Jungmoränengebiet Norddeutschlands bis hin zu den Schwäbisch Bayerischen Jungmoränengebieten der südlichsten Fläche. Die westlichste Fläche befindet sich im Rheinland im Bördenvorland mit geringmächtiger Lössbedeckung. Die östlichste Versuchsfläche liegt in den sächsischen Lösslandschaften des Berglandes.

Tabelle 2 beinhaltet die den Versuchsflächen zugehörigen Standortinformationen im Bezug auf Boden und Klima. Die Höhenstufen der Versuche reichen von planar (Kummerow (12): 3 m Höhe ü. NN) bis hin zu montan (Aulendorf (3): 545 m Höhe ü. NN). Insgesamt sind acht verschiedene Bodentypen vorhanden. Parabraunerden stellen den größten Anteil mit sieben Standorten, gefolgt von Braunerden mit fünf Standorten. Gleye, Pseudogleye und Schwarzerden (Tschernosem) sind jeweils durch zwei Versuchsflächen vertreten. Eine Sonderrolle nimmt der Moorstandort Aulendorf (3) ein. Bei vier Versuchen handelt es sich um Bergbaufolgestandorte, die als Lockersyrosem und Regosol angesprochen wurden. Letzterem ist der Standort Grünewalde (13) zugehörig, der sich bereits seit einem längeren Zeitraum als die anderen Bergbaufolgen in der Rekultivierung befindet (Amthauer Gallardo 2014).

Die Bodenarten gliedern sich in beiden Tiefen nach der Einteilung der 5. Auflage der bodenkundlichen Kartieranleitung (KA5) in die Bodenarten-Hauptgruppen überwiegend in Sande und Schluffe (Ad-Hoc-Arbeitsgruppe Boden der Staatlichen Geologischen Dienste und der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe et al. 2005). Bei der Einstufung der nutzbaren Feldkapazität (nFK) ebenfalls nach KA5 reichen die Werte von gering, z. B. in Forchheim (4) und Energiewald Welzow (8), bis hoch bei Königshovener Höhe (24) (Ad-Hoc-Arbeitsgruppe Boden der Staatlichen Geologischen Dienste und der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe et al. 2005). Die Einstufung des Standorts Königshovener Höhe ist aufgrund der Störung als Bergbaufolge jedoch vorsichtig zu betrachten. Als bodenchemischer Parameter ist der pH-Wert angegeben, der wiederum nach KA5 Einstufung von Iden (30) mit einem Wert von 3,9 als sehr stark sauer bis hin zu sehr schwach alkalisch in Bernburg (28) und Königshovener Höhe (24) mit ca. 7,5 reicht.

Hinsichtlich der Klimadaten wurde über alle Standorte in sechs Versuchsjahren ein mittlerer Niederschlag in der Hauptvegetationszeit von Mai bis September von 359 mm

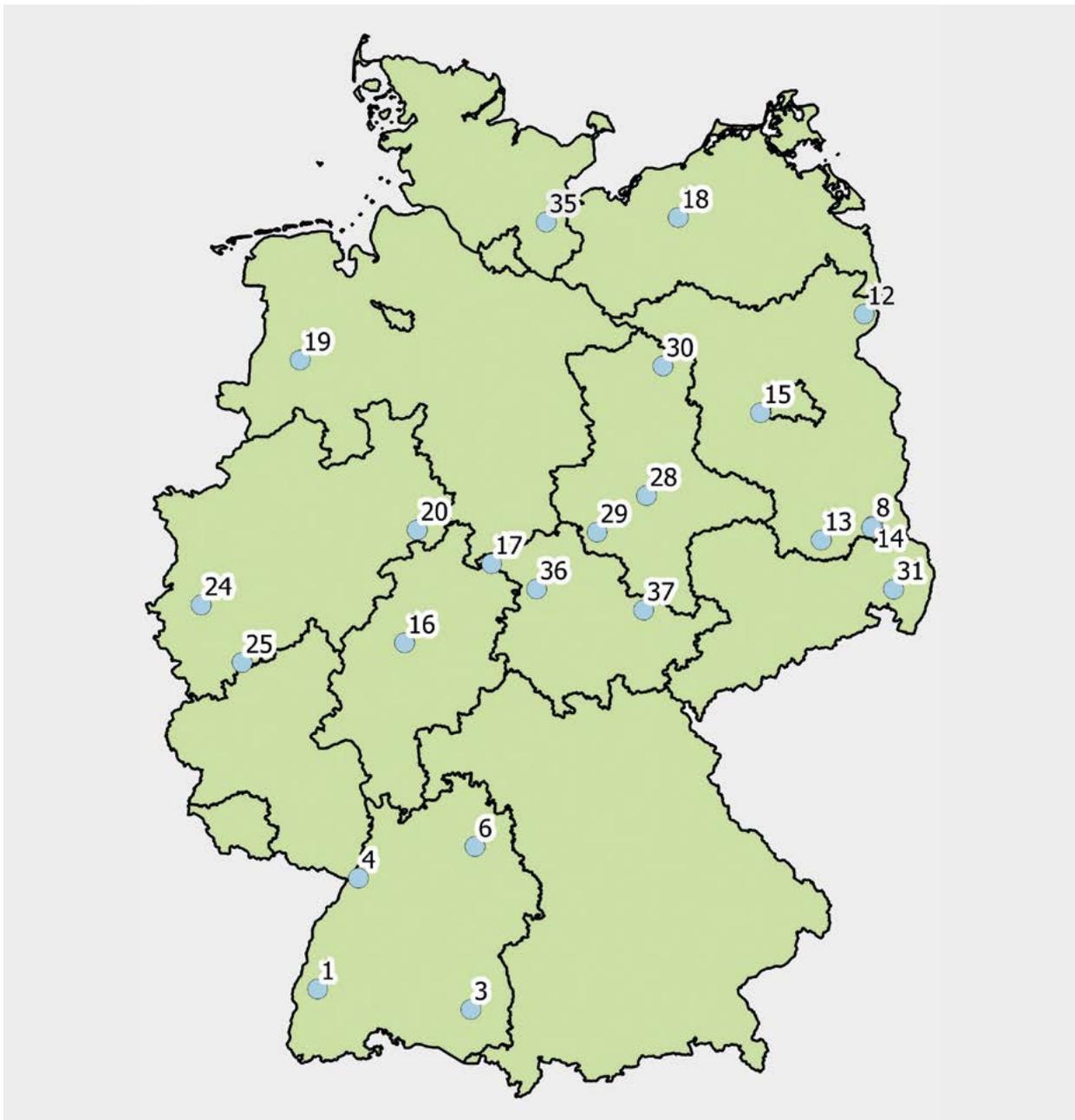


Abbildung 1

Geografische Lage der hier verwendeten 23 von ursprünglich 38 im Arbeitspaket 1 angelegten Versuchsflächen

gemessen. Das untere Ende der Verteilung wird dabei von Iden (30) mit 304 mm markiert, das obere Ende von Aulendorf (3) mit 511 mm. Die durchschnittliche Gesamt-Tagesmitteltemperatur für die Vegetationsperiode lag bei 16°C. Forchheim (4) stellt den wärmsten Standort mit 17,6°C dar was der Stufe mäßig warm entspricht (Arbeitskreis Standortkartierung in der Arbeitsgemeinschaft Forsteinrichtung, 2016). Die geringste mittlere Tagestemperatur wurde in Hayn (29) mit 14,9°C ermittelt, was der Wärmestufe mäßig kühl zugeordnet werden kann (Arbeitskreis Standortkartierung in der Arbeitsgemeinschaft Forsteinrichtung, 2016).

Die Methodik zur Erhebung der Standortparameter ist unter 2.4 näher erläutert.

2.3 Versuchsdesign und Aufnahmemethodik

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde je Arbeitspaket ein einheitliches Versuchsdesign für alle Flächen festgelegt. Im Folgenden wird das Design der Versuchsserie im AP1 erläutert, um die Bildung der Ertragswerte nachvollziehen zu können. Eine ausführlichere Beschreibung der Aufnahmemethodik aller Arbeitspakete findet sich in Janßen et al. (2017).

Die Einzelversuche wurden hinsichtlich der Allokation der Prüfglieder als vollrandomisiert (CRD, Completely Randomised Design) angelegt. Einige Versuche erfüllen auch die Voraussetzungen einer randomisierten vollständigen Blockanlage (RCBD, Randomised Complete Block Design). Die

Tabelle 2

Übersicht zu Betreuung und Standorteigenschaften hinsichtlich Boden und Klima der betrachteten ProLoc Versuchsflächen (VFL)

VFL	Betreuende Institution	Standortname	Länder-kürzel	Höhe ü. NN [m]	Bodentyp	Bodenart		nFK [mm]		pH		Nieder-schlag		Tempe-ratur	
						0-30 cm	30-60 cm	0-30 cm	30-60 cm	0-60 cm	BZ	VP [mm]	VP [°C]		
1	FVA Baden-Württemberg	Emmendingen	BW	250	Tschernosem	Ut4	Ut4	56	50	6,55	77	459	17,1		
3	LTZ Augustenberg	Aulendorf	BW	545	Niedermoor	Mo	Mo	-	-	6,80	46	511	15,5		
4	LTZ Augustenberg	Forchheim	BW	117	Braunerde	Sl2	St2	34	21	4,90	26	369	17,6		
6	LTZ Augustenberg	Kupferzell	BW	350	Pseudogley	Lt3	Tu2	41	27	7,30	50	375	16,2		
8	BTU Cottbus	Energiewald Welzow	BB	100	Lockersyrosem	Lts	Ls4	28	30	5,65	14	373	16,5		
12	HNE Eberswalde (FH)	Kummerow	BB	3	Braunerde	St2	St2	43	33	4,90	14	321	16,2		
13	FIB Finsterwalde	Grünwalde	BB	103	Regosol	St2	St2	51	38	5,05	38	370	16,3		
14	FIB Finsterwalde	Welzow Süd	BB	130	Lockersyrosem	Sl4	Ss	32	25	7,00	13	374	16,5		
15	ATB Potsdam	Potsdam Bornim	BB	35	Parabraunerde	Su2	Su2	54	39	7,05	36	325	16,8		
16	JLU Gießen	Lehmkaute	HE	230	Parabraunerde	Lu	Lu	43	38	5,70	80	333	15,5		
17	Universität Kassel	Unterrieden	HE	161	Braunerde	Sl3	Sl3	41	38	5,95	39	334	15,4		
18	LFA Mecklenburg-Vorpommern	Gülzow	MV	8	Braunerde	Ss	Ss	33	27	6,35	36	315	15,7		
19	3N Kompetenzzentrum Niedersachsen	Werlte	NI	30	Parabraunerde	Su2	Su2	57	44	5,50	33	356	15,7		
20	Maschinenring Höxter-Warburg	Borlinghausen	NW	297	Pseudogley	Lt3	Tu2	37	29	5,65	34	340	15,4		
24	RWE / RFWU Bonn	Königshovener Höhe	NW	49	Lockersyrosem	Uu	Uu	66	65	7,55	66	317	16,0		
25	RFWU Bonn	Campus Klein-Altendorf	NW	184	Parabraunerde	Lu	Lu	41	37	6,85	72	327	16,0		
28	LLFG Sachsen-Anhalt	Bernburg	ST	72	Tschernosem	Ut4	Ut4	57	54	7,50	100	329	16,6		
29	LLFG Sachsen-Anhalt	Hayn	ST	416	Parabraunerde	Lu	Lu	49	40	6,00	50	349	14,9		
30	LLFG Sachsen-Anhalt	Iden	ST	26	Gley	Ss	Ss	33	27	3,90	19	304	16,2		
31	LFULG Sachsen	Pommritz	SN	256	Braunerde	Sl2	Sl3	43	29	5,90	34	441	16,4		
35	TI – Fachinstitut für Forstgenetik Großhansdorf	Threnthorst	SH	41	Gley	Ls2	Lt2	46	25	6,45	55	343	15,5		
36	Baumschulen Oberdorla GmbH	Lohberg	TH	240	Parabraunerde	Ut4	Ut4	53	44	7,00	50	332	15,5		
37	Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft	Dornburg	TH	244	Parabraunerde	Tu4	Ut4	38	45	6,85	62	357	16,0		

Die Daten wurden in der ersten Projektphase erhoben (Amthauer Gallardo 2014). Bodenart und nutzbare Feldkapazität (nFK) sind auf die Tiefenstufen 0 bis 30 cm sowie 30 bis 60 cm bezogen angegeben. Die nFK wurde basierend auf den Tabellen 4 und 5 von Wessolek et al. (2009) neu berechnet. Der pH Wert ist als Mittelwert aus den Einzelwerten beider Tiefenstufen angegeben. Die Bodenzahlen (BZ) stammen aus der Reichsbodenschätzung bzw. wurden von Amthauer Gallardo (2014) geschätzt. Die Niederschlagssumme und die Tagestemperatur wurden als Mittelwerte über die forstliche Vegetationsperiode (VP, Monate Mai bis September) angegeben. Die Daten hierfür stammen vom Deutschen Wetterdienst.

Berücksichtigung der Blöcke als Zufallseffekt im gemischten Modell brachte jedoch in Modellvergleichen keinen signifikanten Vorteil gegenüber einer einfachen Varianzanalyse (hier nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden alle Versuche als vollrandomisiert analysiert. Die fünf Prüfglieder wurden in vierfacher Wiederholung, also 20 Versuchspartellen, ausgebracht. Jede Versuchspartelle setzt sich aus 5 Reihen je 20 Pflanzen zusammen. Der Pflanzverband wurde in der gesamten Versuchsserie auf einen Reihenabstand von 1,8 m und einen Abstand in den Reihen von 0,5 m festgesetzt. Die Partellen wurden im Versuch so ausgerichtet, dass sich

idealerweise eine für KUP typische zusammenhängende Reihenstruktur ergibt. Außen um die Versuche sollte ein 5 m breiter Rand frei gehalten werden, um mögliche Randeinflüsse von benachbarten Kulturen zu vermeiden. Die Flächen wurden zusätzlich gegen Störeinflüsse wie Wildverbiss eingezäunt. Innerhalb der einzelnen Versuchspartellen wurde ein Partellenkern ausgewiesen, der sich aus den inneren 48 Pflanzen zusammensetzt. Die äußersten zwei Reihen und die beiden ersten und letzten Pflanzplätze der mittleren drei Reihen wurden als Partellenrand belassen. Messungen und Bonituren wurden nur im Partellenkern durchgeführt. Im

Winter wurden jährlich Ausfall, Höhe und Brusthöhen-Durchmesser (kurz: BHD, Durchmesser in 1,3 m Höhe) gemessen und im Sommer der Rostbefall sowie andere pflanzenpathologisch relevante Befallserscheinungen. Nicht alle 48 Pflanzen der Kernparzelle wurden hinsichtlich der beschriebenen Parameter untersucht. Ein Aufnahmeaster wurde festgelegt, dass für den BHD eine Messung von 24 Pflanzen und für die Höhen eine Messung von 8 Pflanzen in der ersten Projektphase vorsah. Der Umfang der BHD Messungen wurde in der zweiten Projektphase von 24 auf 16 Pflanzen reduziert. Die zur BHD Messung herangezogenen Pflanzen wurden ebenfalls nach drei Jahren zur Wiegung für die Biomasseschätzung verwendet. Da die Massen aus den Wiegungen als Frischmassewerte ermittelt wurden, folgte eine Feststellung der Trockensubstanzgehalte. Dazu wurden vom Erntegut je Parzelle vier Mischproben angefertigt, die in Trockenschränken zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden. Dieses Vorgehen kam den Vorgaben der DIN Norm zur Bestimmung des Wassergehaltes bei festen Biobrennstoffen nach (DIN, 2010). Über die mittleren Trockensubstanzgehalte je Klon wurden die Frischmassewerte in Trockenmassewerten je Einzelbaum umgerechnet. Über die Summenbildung und Hochrechnung von der Stichprobenfläche wurde die Gesamtbiomasse als Hektarangabe errechnet. Dieses Vorgehen folgt dem bei Röhle (2009) beschriebenen Probebaumverfahren. Da die Berechnung je Ernte erfolgte, ergab sich ein Ertragswert je Parzelle je Rotation. Diese beiden Werte wurden parzellenweise aufsummiert, um die Gesamtwuchsleistung (GWL) nach sechs Jahren zu erhalten. Die Angabe der GWL ist im Folgenden als [t_{atro} ha⁻¹] zu interpretieren.

2.4 Standortkartierung

Die zur Einschätzung des Ertragspotenzials erforderlichen Standortdaten wurden in der ersten Projektphase erhoben bzw. angefordert und für die Modellierung in der zweiten Projektphase weiterverwendet. Die Standortinformationen gliedern sich in Boden- und Klimadaten.

Die Methodik zum bodenkundlichen Teil der Standortkartierung ist bei Amthauer Gallardo (2014) beschrieben. Neben Standortansprachen in Profilgruben wurden auf jeder Fläche an den Profilen und aus Bohrungen Proben für bodenphysikalische und bodenchemische Analysen genommen (Amthauer Gallardo, 2014). Die Profilsprachen erfolgten nach den Standards der KA5 (Ad-Hoc-Arbeitsgruppe Boden der Staatlichen Geologischen Dienste und der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe et al. 2005), die Labormethoden zu Bodenchemie und -physik sind im Detail bei Amthauer Gallardo (2014) beschrieben. Die in Tabelle 2 angeführten nFK Werte wurden für beide Tiefenstufen aus den im Labor ermittelten Bodenphysik Daten neu berechnet nach den Tabellen 4 und 5 von Wessolek et al. (2009).

Die Niederschlags- und Temperaturdaten wurden für den Versuchszeitraum vom Deutschen Wetterdienst bezogen. Die in Tabelle 2 enthaltenen Klimadaten basieren auf den mittleren Tagestemperaturen und Tagessummen der Niederschläge für den Versuchszeitraum an den Versuchen nächstgelegenen Messstationen, die auf die

tatsächlichen Versuchsflächenorte interpoliert wurden. Zur Interpolation der Klimadaten wurden die Methoden des WaSiM Modells verwendet (vgl. Schulla, 2017). Die Standorte, an denen in 2008 nach Pflanzung bewässert wurde, erhielten einen Zuschlag zum Niederschlag 2008 entsprechend der Bewässerungsmenge (Amthauer Gallardo, 2014; Janßen et al., 2017).

2.5 Versuchsauswertung und verwendete Software

Die statistischen Analysen für diesen Beitrag wurden unter Verwendung der Programmiersprache R (R Core Team, 2018) durchgeführt.

Zur Auswertung der vorliegenden parzellenweisen Ertragsdaten stehen die zwei Ansätze der einphasigen und zweiphasigen Serienauswertung zur Verfügung. Aus statistischer Sicht ist der einphasige Ansatz vorzuziehen (Smith et al., 2001; Piepho et al., 2012). In der praktischen Auswertung von Feldversuchen der Pflanzenzüchtung (sowohl landwirtschaftlich als auch forstlich) wird jedoch häufig der zweiphasige Ansatz verwendet (Piepho et al., 2012; Yan, 2014; Grotehusmann et al., 2017). Dieser sieht in der ersten Phase vor, dass zunächst eine varianzanalytische Auswertung auf Einzelversuchsebene erfolgt. Mit den adjustierten Mittelwerten der Klone je Versuch erfolgt dann in der zweiten Phase, meist mit entsprechender Gewichtung der Mittel, die serienübergreifende Varianzanalyse. Die Auswertung der Ertragsdaten je Einzelstandort wurde als Einfach-Varianzanalyse vorgenommen, der folgendes Modell zugrunde liegt:

$$y_{ir} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ir} \quad (1)$$

y_{ir} entspricht hier dem beobachteten Wert der GWL in Wiederholung r für Klon i . μ ist die mittlere GWL des Einzelversuchs, α_i ist der Effekt des Klons i und ε_{ir} ist der Restfehler für Klon i in Wiederholung r . Der F-Test wurde als Omnibus-Test verwendet, um auf einen signifikanten Einfluss des Faktors Prüfglied/Klon zu testen. Wenn die Nullhypothese, dass alle Klone denselben mittleren Ertrag aufweisen, abgelehnt wurde, wurden anschließend paarweise Vergleiche durchgeführt, um zu ermitteln, welche Gruppen sich signifikant unterscheiden. Die paarweisen Vergleiche wurden mit dem R-Paket „multcomp“ (Bretz et al., 2011) durchgeführt. Dabei wurden Tukey Kontraste angewandt, um alle Prüfglieder untereinander zu vergleichen. Die Adjustierung der p-Werte zur Kontrolle des versuchs- und nicht vergleichsbezogenen Fehlers wurde mit der im Paket implementierten Prozedur nach Benjamini und Hochberg (1995) vorgenommen.

Die Modellvoraussetzungen wie Normalverteilung und Homoskedastizität wurden für die einzelnen Modelle anhand der Residuen überprüft. Dazu erfolgte zum einen eine graphische Analyse mit QQ-Plots und der Darstellung der Residuen über den Schätzwerten. Zusätzlich wurde die Normalverteilungsannahme mit dem Test nach Shapiro und Wilk (1965) in der R Implementierung nach Royston (1982) überprüft. Zum Überprüfen der Varianzhomogenität wurde der Test von Bartlett (1937) angewandt. Letzterer wurde

entsprechend der Empfehlung von Milliken und Johnson (2009) gewählt, da bei den betroffenen Einzelversuchen nach eingehender Überprüfung die Normalverteilungsannahme als erfüllt angesehen wurde. Für vier Versuche wurde keine Varianzhomogenität des Ertrags zwischen den Klonen angenommen (Tabelle 4). Milliken und Johnson (2009) folgend wurde daher der Omnibus-Test von Welch (1951) verwendet. Die paarweisen Vergleiche wurden in diesen Fällen unter Verwendung des in dem R-Paket „multcomp“ implementierten „sandwich“ Schätzers nach Zeileis (2006) angepasst. An zwei Versuchen wurde die Normalverteilungsannahme als nicht erfüllt angesehen. In diesen Fällen wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis Rangsummen Test (Hollander et al., 2014) als Omnibus Test durchgeführt. In beiden Fällen konnte die Nullhypothese nicht abgelehnt werden, weshalb keine Post-hoc-Tests durchgeführt wurden.

Zusätzlich wurde an allen Einzelstandorten die Heritabilität im weiteren Sinne („Broad Sense Heritability“) als Verhältnis der genotypischen zur phänotypischen Varianz berechnet (Lynch und Walsh, 1998):

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_\varepsilon^2} \quad (2)$$

σ_g^2 entspricht der genetisch bedingten Varianz, σ_ε^2 der Residualstreuung. Die Berechnung auf Einzelversuchsebene erfolgte mit dem R-Paket „heritability“ (Kruijer und White, 2016).

Um die Anteile der durch Umwelt, Genotyp und deren Interaktion verursachten Varianz an der Gesamtstreuung zu quantifizieren, wurde eine Varianzkomponentenanalyse durchgeführt. Diese wurde serienübergreifend basierend auf den Parzellendaten nach folgendem mehrfaktoriellen Modell berechnet (verändert nach Yan, 2014):

$$y_{ijr} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijr} \quad (3)$$

y_{ijr} entspricht hier dem beobachteten Wert der GWL in Wiederholung r für Klon i an Standort j . μ ist die mittlere GWL der Versuchsserie, α_i ist der Effekt des Klons i , β_j ist der Effekt am Standort j , $(\alpha\beta)_{ij}$ beschreibt die Wechselwirkung des Effekts des Klons i mit dem Effekt des Standorts j und ε_{ijr} ist der Restfehler für Klon i in Wiederholung r . Die phänotypische Varianz setzt sich basierend auf diesem Modell aus folgenden Varianzkomponenten zusammen (verändert nach Yan, 2014):

$$\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_i^2 + \sigma_{gi}^2 + \sigma_\varepsilon^2 \quad (4)$$

Dabei ist σ_p^2 die phänotypische Varianz, σ_g^2 ist die genotypische Varianz, σ_i^2 die durch den Standort bedingte Varianz und σ_{gi}^2 die Varianz durch Genotyp-Umwelt Interaktionen. σ_ε^2 bezeichnet die Residualstreuung. Die Varianzkomponentenanalyse wurde per Restricted Maximum Likelihood (REML) Schätzung mit der Funktion „remlVCA“ des R-Pakets „VCA“ (Schuetzenmeister und Dufey, 2017) durchgeführt.

Wie bereits eingangs erwähnt wurden einige Standorte von vornherein vollständig von dieser Auswertung ausgeschlossen aufgrund von Schwierigkeiten in der Versuchsanlage, die kein repräsentatives Versuchsergebnis für die

Standortbedingungen erwarten ließen. Auf weiteren Standorten mussten einzelne Prüfglieder aus der Analyse ausgeschlossen werden aufgrund von Mängeln des Pflanzmaterials und darauf folgende Ausfälle. Die Nachbesserungen an diesen Standorten fielen so umfangreich aus, dass dies einer Neuanlage aller vier Parzellen eines Prüfglieds gleich kam. Der Aufwuchs des jeweiligen Prüfglieds war aus diesem Grund zum Zeitpunkt der ersten Ernte überwiegend erst zweijährig. Die hier beschriebenen Analysen wurden zunächst für den vollständigen Datensatz durchgeführt, als aber ersichtlich wurde, dass die beschriebenen Parzellen auch in der Gesamtwuchsleistung teils sehr deutlich unter dem jeweiligen Umweltmittel lagen, wurde die betroffenen Klone in den entsprechenden Versuchen wie bei Amthauer Gallardo (2014) von der Analyse ausgeschlossen. Dies führte in der serienübergreifenden Betrachtung zu unbalancierten, nicht orthogonalen Daten, da nicht mehr alle Prüfglieder an allen Standorten vertreten waren. In Tabelle 2 markieren die Leerstellen die unberücksichtigten Klon-Standort Kombinationen. Die Varianzanalyse und Post-hoc-Tests wurden dann für den am Standort verbleibenden Prüfgliedsatz durchgeführt. In der Biplot Analyse wurden, wie von Yan (2014) empfohlen, die fehlenden Werte durch die Umweltmittel der Einzelversuche ersetzt.

Das Signifikanzniveau für alle durchgeführten Tests wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

2.6 Biplot Analyse

Biplots sind ein Werkzeug, das in der statistischen Analyse eingesetzt werden kann, um durch Dimensionsreduktion Muster in Kreuztabellen bzw. Matrizen zu visualisieren (Yan und Kang, 2003). Die Biplot Analyse wurde von (Gabriel, 1971) eingeführt und kann dazu dienen, basierend auf einer Singulärwertzerlegung eine graphische Approximation der Datenstruktur einer Kreuztabelle zu ermöglichen (Yan, 2014). Dazu wird die Kreuztabelle in ihre Hauptkomponenten zerlegt und die Werte der Hauptkomponenten gegeneinander graphisch dargestellt (Yan, 2014). Die Darstellung der Hauptkomponenten in Biplots kann dadurch zahlreiche Eigenschaften aufweisen, die auf die Verhältnisse der Werte der Ursprungsmatrix untereinander zutreffen (Yan, 2014). Eine ausführliche Dokumentation der theoretischen Grundlagen und der verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten von Biplots findet sich in Yan und Kang (2003) sowie Yan (2014). Eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften ist in Malik und Piepho (2018) enthalten.

Die Analyse von z.B. Ertragsdaten in Kreuztabellen, die zeilenweise den Genotypen und spaltenweise den Standorttypen zugeordnet sind, mithilfe von Biplots findet in der landwirtschaftlichen Züchtung zunehmend breite Anwendung (Yan, 2014). Für den Bereich der Forstpflanzenzüchtung ist die Zahl der Veröffentlichungen wesentlich niedriger (z.B. Correia et al., 2010; Sixto et al., 2011; Gezan et al., 2017).

Zwei Arten von Biplots sind für die Analyse von Fragestellungen der Pflanzenzüchtung hilfreich: GGE und EGE Biplots. E steht in dieser Notation für Environment, also Umwelt, G (Genotype) für Genotyp und GE für die Wechselwirkung

aus Genotyp und Umwelt. Im Folgenden werden die Begriffe Genotyp und Klon sowie Standort, Versuch und Umwelt synonym verwendet, da dies für die Untersuchungen in ProLoc zutrifft. Unter dem Faktor Standort/Versuch/Umwelt werden die gesamten Umwelteinflüsse am jeweiligen Standort subsumiert.

Die GGE und EGE Form des Biplots unterscheiden sich wesentlich durch verschiedene Zentrierungen einer Genotyp-Umwelt Kreuztabelle, die in diesem Fall Ertragsdaten enthält.

Für die GGE Form des Biplots werden von den Ertragswerten der Genotyp-Umwelt Tabelle die Standortmittel (in diesem Fall Spaltenmittel) von den jeweiligen Ertragswerten abgezogen (Yan, 2014). Dadurch sind in den einzelnen Zellen der Matrix nur noch der Einfluss von Genotyp und Genotyp-Umwelt Interaktion enthalten. Der hierauf basierende Biplot eignet sich dazu, die Genotyp-Umwelt Interaktion zu quantifizieren und festzustellen, inwieweit sich hinsichtlich der Klone Gruppen von Standorten bilden, die ähnliche Rangfolgen unter den Prüfgliedwerten erzeugen.

Die Ausgangsdaten für den EGE-Biplot werden durch Subtraktion der Genotyp-Gesamtmittel der GWL von den Genotyp-Mitteln der Einzelversuche berechnet. Daraus ergeben sich in den Zellen der Kreuztabelle Werte, die die Effekte der Umwelt, der Genotyp-Umwelt Interaktion und den Restfehler enthalten. Der hierauf basierende Biplot eignet sich dazu, die Standorte auszuwählen, die für alle oder einige Genotypen die höchsten Erträge in der Versuchsserie lieferten (Yan, 2014). Der Biplot kann nicht zur Auswahl der besten Genotypen verwendet werden (Yan, 2014).

Dem Hinweis von Yan (2014) folgend, werden in die Biplot Analyse nur Standorte einbezogen, die in der einzelversuchsweisen Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Prüfgliedern hinsichtlich des Ertrags ergaben.

Die „Information Ratio“ (IR) nach Yan und Tinker (2006) dient dazu, den Informationsgehalt von Hauptkomponenten zu beurteilen. Dazu wird der Anteil der erklärten Varianz im Verhältnis zur durchschnittlich zu erwartenden erklärten Varianz der vorhandenen Dimensionen der Matrix gesetzt. Für die ProLoc Ertragsmatrix ist die maximale Anzahl der Dimensionen fünf, da fünf Prüfglieder verwendet wurden und die Anzahl der Standorte größer ist. Wenn die fünf Dimensionen der Matrix linear unabhängig voneinander sind, sollte jede Dimension 20 % der Gesamtstreuung erklären (Yan, 2014). Die erklärte Varianz einer Hauptkomponente der jeweiligen Analyse wird in Verhältnis zu diesen 20 % gesetzt. Ist der erhaltene Wert des IR > 1, ist die zugehörige Hauptkomponente informativ und gibt entsprechend Strukturen der zugrunde liegenden Matrix wieder (Yan, 2014). Ist der Wert kleiner 1 ist durch andere Hauptkomponenten bereits ausreichend Streuung erklärt worden (Yan, 2014). Hauptkomponenten mit einer IR < 1 müssen aufgrund des geringen Informationsgehalts nicht tiefergehend untersucht werden. Idealerweise sollten die ersten beiden Hauptkomponenten in der Biplot Analyse einen IR > 1 haben (Yan, 2014), was für den ProLoc Datensatz bei fünf Prüfgliedern eine erklärte Varianz von über 20 % je Hauptkomponente bedeutet.

Für die Erstellung der Biplots wurde das R-Paket „gge“ (Wright und Laffont, 2018) verwendet. Aufgrund heterogener Varianzen der Klon-Mittelwerte zwischen den Standorten wurden die Werte vor der Biplot Analyse wurzeltransformiert (vgl. Malik und Piepho, 2018). Zusätzlich wurden die Einzelwerte jeweils mit der Standardabweichung der Prüfgliedmittel je Standort (GGE) und je Klon (EGE) skaliert.

3 Ergebnisse

3.1 Varianzkomponentenanalyse

Tabelle 3 enthält die Varianzkomponentenanalyse der Gesamtwuchsleistung. Die genotypische Varianz, also die durch den Faktor Klon verursachte Streuung, fällt absolut und relativ sehr niedrig aus. Mit einem Anteil von 0,02 % an der Gesamtstreuung ist dies der niedrigste Wert. Im sehr starken Gegensatz dazu übt die Umwelt (VFL als Standort) mit einem Anteil von 81,24 % an der Gesamtstreuung den größten Einfluss aus. Die Interaktion aus Genotyp und Umwelt (Klon * VFL) ist mit 7,73 % ebenfalls von größerer Bedeutung als der alleinige Einfluss des Faktors Klon. Die Reststreuung ist mit 11,02 % auf einem etwas höheren Niveau.

Das Verhältnis von Streuung (als Standardabweichung) zum Gesamtmittel, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten, bestätigt die Beobachtungen der Varianzkomponenten. Die Genauigkeit der Schätzung der Varianzkomponenten, die durch ihre Varianz (Var(VK)) beurteilt werden kann, ist absolut mit 1,5701 wiederum für den Standort am höchsten und für die anderen Faktoren vergleichsweise klein. Im Bezug auf die Größe der Schätzwerte ist das Verhältnis jedoch für den Faktor Klon ähnlich groß wie für den Standort.

Die durch den Faktor Umwelt bedingte Streuung und die durch die Klon-Standort Wechselwirkung bedingte Streuung

Tabelle 3

Varianzkomponentenanalyse der quadratwurzeltransformierten GWL der betrachteten ProLoc Standorte

Ursache	FG	VK	Anteil [%]	Vkoeff [%]	Var(VK)
Gesamt	31,465	4,977	100,00	36,45	1,5748
Klon	0,004	0,001	0,02	0,48	0,0003
VFL	20,827	4,044	81,24	32,86	1,5701
Klon * VFL	43,758	0,385	7,73	10,13	0,0068
Fehler	326,004	0,548	11,02	12,10	0,0018

Die Spalte Ursache gibt die Faktoren der Streuungsursachen an. Dem beschriebenen Modell folgend handelt es sich um den Genotyp (Klon), den Standort (VFL), die Wechselwirkung aus Klon und Standort (Klon * VFL) und den Restfehler (Fehler). Die Spalte FG bezeichnet die jeweiligen Freiheitsgrade und VK die zugehörigen Varianzkomponenten. Die Spalte Anteil gibt den Anteil der durch den Faktor bedingten Varianz an der Gesamtstreuung an. Zusätzlich sind die Variationskoeffizienten (Vkoef) und die Streuung der Schätzung der Varianzkomponenten (Var(VK)) angegeben. Die Werte sind auf die jeweils angegebenen Nachkommastellen gerundet.

sollen im Folgenden näher untersucht werden. Besonders für die Interaktion ist zu klären, ob es sich um zufällige Wechselwirkungen handelt oder ob eine Standortplastizität der GWL der Prüfglieder vorliegt.

3.2 Einzelflächenweise Auswertung

Tabelle 4 enthält die Ergebnisse der einzelflächenweisen Versuchsauswertung des Ertrags und einige Maßzahlen zur Beurteilung der Einzelversuche. Zusätzlich sind die Ergebnisse von paarweisen Vergleichen auf Versuchsebene nach Klon und auf Serienebene nach Standort dargestellt. Das Gesamtmittel der GWL betrug über alle Standorte und Klone hinweg $\mu = 42,38 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$.

Der höchste Ertrag als Gesamtwuchsleistung wurde am Campus Klein-Altendorf (25) mit $69,14 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$ erreicht, gefolgt von Unterrieden (17) mit $67,86$ und Werlte (19) mit $66,13 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$. Die drei ertragschwächsten Standorte liegen

mit den benachbarten Bergbaufolgeflächen in Welzow (8 und 14) mit $3,69$ bzw. $4,45 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$ sowie Iden (30) mit $9 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$ vor. Alle drei Pappelklone erzielten in Klein-Altendorf (25) die höchsten Erträge (Max 1' $70,99 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$; Hybride 275' $76,64 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$; AF2' $85,08 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$). Die höchste Gesamtwuchsleistung für Inger wurde in Werlte (19) mit $76,66 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$ erzielt. In Aulendorf (3) konnte die höchste Biomasseleistung für Tordis' mit $86,61 \text{ t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$ ermittelt werden. Der Variationskoeffizient wurde basierend auf den Einzelparzellenwerten berechnet. Insgesamt sind die Werte als groß zu beurteilen, was jedoch auch darin begründet liegen dürfte, dass der Versuchsfehler in der Varianz enthalten ist und die Versuche als vollständig randomisiert ausgewertet wurden. Der Anstieg des Variationskoeffizienten mit abnehmender Ertragsleistung ist in den niedrigeren Versuchsmittelwerten begründet. Im Vergleich mit Vorgaben zur Einzelversuchspräzision aus der landwirtschaftlichen Pflanzenzüchtung erscheinen diese Werte sehr hoch (vgl. Thomas, 2006; Yan, 2014) und liegen

Tabelle 4

Ergebnisse der einzelflächenweisen Auswertung der GWL auf den betrachteten ProLoc Flächen

VFL	n	GWL [$\text{t}_{atro} \text{ ha}^{-1}$]						VKoef [%]	h^2	Teststatistik	p-Wert	Paarweise Vergleiche					
		VFL Mittel	MAX	HYB	AF2	ING	TOR					VFL	MAX	HYB	AF2	ING	TOR
25	20	69,14	70,99	76,64	85,08	53,68	59,31	20	0,69	9,89	0,0004	k	bc	cd	d	a	ab
17	20	67,86	68,21	71,86	61,82	68,82	68,59	11	0,00	1,42	0,3195 ¹	k	-	-	-	-	-
19	16	66,13	55,27	-	56,50	76,66	76,09	23	0,39	3,51	0,0493	jk	-	-	-	-	-
37	16	61,22	68,58	-	59,71	56,14	60,44	25	0,00	2,71	0,4380 ²	jk	-	-	-	-	-
3	20	60,41	62,38	45,46	47,57	60,05	86,61	30	0,65	18,13	0,0010 ¹	jk	b	a	a	ab	c
29	20	60,33	66,75	67,55	54,45	53,25	59,63	29	0,00	0,52	0,7215	jk	-	-	-	-	-
28	20	59,94	66,10	56,90	66,77	55,33	54,62	14	0,30	2,74	0,0680	jk	-	-	-	-	-
1	19	59,53	63,85	72,75	39,69	59,47	61,88	20	0,69	9,30	0,0007	jk	bc	c	a	b	bc
16	16	57,81	49,15	-	51,87	60,22	70,00	24	0,26	5,18	0,1588 ²	jk	-	-	-	-	-
31	20	56,80	57,12	65,66	35,10	60,64	65,49	23	0,79	16,49	0,0000	jk	b	b	a	b	b
15	20	55,75	48,04	47,80	59,28	60,58	63,06	23	0,09	1,39	0,2835	h jk	-	-	-	-	-
36	16	51,51	45,86	-	53,02	48,14	59,02	22	0,01	1,02	0,4180	ij	-	-	-	-	-
24	20	41,55	39,68	25,99	39,79	51,61	50,67	31	0,49	4,77	0,0111	g i	ab	a	ab	b	b
6	12	40,13	47,40	-	38,56	34,44	-	20	0,46	4,39	0,0467	fg hi	-	-	-	-	-
20	20	37,38	35,28	38,24	27,13	42,96	43,30	25	0,30	2,73	0,0687	e g	-	-	-	-	-
35	20	33,02	37,43	18,49	25,34	43,95	39,87	32	0,85	23,83	0,0000	d g	b	a	a	b	b
13	20	28,40	35,78	33,81	21,57	19,99	30,82	34	0,35	3,20	0,0435	def	-	-	-	-	-
4	20	27,62	39,88	42,95	26,13	18,76	10,38	49	0,87	27,47	0,0000	de	c	c	b	ab	a
18	20	22,92	31,24	18,98	18,64	24,85	20,90	38	0,15	1,72	0,1976	d	-	-	-	-	-
12	20	12,70	14,89	16,16	7,08	12,26	13,14	44	0,17	1,81	0,1792	c	-	-	-	-	-
30	20	9,00	7,86	5,69	18,18	9,13	4,12	83	0,34	3,06	0,0497	bc	-	-	-	-	-
14	20	4,45	5,50	5,90	7,07	2,17	1,61	88	0,16	6,26	0,0174 ¹	ab	b	ab	ab	a	a
8	20	3,69	4,62	6,02	5,20	1,68	0,93	83	0,35	6,35	0,0227 ¹	a	bc	bc	c	ab	a
Klon Mittel		44,43	39,83	39,37	42,38	45,48											

Die Daten sind absteigend nach dem Versuchsflächenmittel (VFL Mittel) sortiert. VFL gibt die ID des Versuches an, n die Anzahl an betrachteten Parzellen je Versuch. VFL Mittel enthält die mittlere GWL über die vier Klone je Versuch. Die mittleren Erträge je Klon sind in den Spalten mit den entsprechenden Abkürzungen enthalten. Die letzte Zeile beinhaltet die mittlere GWL je Klon über alle Standorte. Der Variationskoeffizient (VKoef) wurde für den Gesamtversuch über alle Parzellen berechnet, ebenso wie die Heritabilität. Der Wert der Teststatistik F und der zugehörige p-Wert entstammen der versuchsweisen Einfach-Varianzanalyse mit dem Faktor Klon als unabhängige und GWL als abhängige Variable. In mit ¹ gekennzeichneten Zeilen war die Voraussetzung der Homoskedastizität nicht erfüllt, in mit ² gekennzeichneten Zeilen war die Normalverteilungsannahme nicht erfüllt. Hier wurden entsprechende Anpassungen bei den Tests vorgenommen. Die Werte der Teststatistiken beziehen sich auf den jeweils verwendeten Test (s. o.). Den paarweisen Vergleichen liegen unterschiedliche Modelle und Daten zugrunde: Für die Spalte VFL wurden die quadratwurzeltransformierten Klon-Mittelwerte der GWL je Versuchsfläche verwendet und versuchsübergreifend paarweise Vergleiche alle Standorte untereinander durchgeführt. Die Buchstaben stellen homologe Gruppen der Standorte hinsichtlich GWL dar. Die Spalten mit den Klon-Kürzeln enthalten die Ergebnisse der paarweisen Vergleiche aller Klone untereinander je Standort. Datengrundlage sind die Parzellenwerte je Einzelversuch. Die Buchstaben stellen homologe Gruppen der Klone je Standort hinsichtlich GWL dar. Die Spalte VFL kann daher als Ganzes interpretiert werden, die Spalten mit den Klon-Kürzeln müssen zeilenweise im Bezug auf den Standort interpretiert werden.

durchweg über 10%. Thomas (2006) verweist auf mögliche höhere Variationskoeffizienten im forstgenetischen Versuchswesen, letzteres gilt jedoch vor allem, wenn Einzelpflanzen sowohl die Versuchs- als auch Beobachtungseinheit darstellen. Hier wurden jedoch Parzellenwerte verrechnet.

Die größte Heritabilität wurde an den Standorten Forchheim (4) mit 0,87 und Trenthorst (35) mit 0,85 festgestellt. Der niedrigste bis nicht vorhandene Anteil der genotypischen Varianz an der phänotypischen Varianz liegt in Unterrieden (17), Hayn (29) und Dornburg (37) mit einer Heritabilität von jeweils 0 vor. Damit gehen erwartungsgemäß hohe p-Werte aus der einzelversuchsweisen Varianzanalyse einher. Bei einer niedrigen relativen genotypischen Variabilität liegen die p-Werte meist über dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, weshalb die Nullhypothese, dass zwischen den Mittelwerten der Klone in der Grundgesamtheit signifikante Unterschiede bestehen, hier nicht abgelehnt werden kann. An 13 von 23 Standorten wurde dagegen ein p-Wert kleiner 0,05 ermittelt und anschließend der Post-Hoc Test durchgeführt. An vier Standorten (6 Kupferzell, 13 Grünwalde, 19 Werlte und 30 Iden) sind die Unterschiede nur sehr schwach signifikant (0,0435 bis 0,0497), in den paarweisen Vergleichen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgliedern ermittelt werden.

Bei Betrachtung der homologen Gruppen ist zu bemerken, dass es keinen Standort gibt, an dem die paarweisen Vergleiche getrennte homologe Gruppen hinsichtlich der Gattungszugehörigkeit der Prüfglieder ergeben haben. An allen Standorten ist mindestens ein Weidenprüfglied immer einer Gruppe zugehörig, zu der auch Pappelprüfglieder zählen. Der Fall, dass ein Klon in der Ertragsleistung von allen anderen signifikant verschieden und dabei überlegen ist, tritt nur am Moorstandort Aulendorf (3) für ‚Tordis‘ auf. Auf allen anderen Standorten, sind die Weiden nicht signifikant verschieden und gehören immer einer Gruppe an. In Betrachtung der Gruppenzugehörigkeit der Pappeln untereinander stechen Aulendorf (3) und Trenthorst (35) wiederum hervor, da hier ‚Max 1‘ keiner der Gruppen der beiden anderen Pappelklone angehört. In beiden Fällen gibt es jedoch Überschneidungen mit den Weidenprüfgliedern. Auf allen anderen Versuchsflächen sind immer mindestens zwei Pappelklone einer Gruppe zugehörig. Der Klon ‚AF2‘ ist in Emmendingen (1) und Pommritz (31) signifikant verschieden von allen anderen Prüfgliedern und unterlegen. In Forchheim trifft dies auf das Verhältnis von ‚AF2‘ zu den beiden anderen Pappelklonen zu. An den beiden ertragsschwächsten Standorten in Welzow (8 und 14) wurden zwar signifikante Unterschiede zwischen den Prüfgliedern festgestellt, allerdings ist die Überlegenheit der Pappeln hier kritisch zu beurteilen, da diese Überlegenheit auf einem insgesamt niedrigen Ertragsniveau von geringer praktischer Bedeutung ist.

Für die paarweisen Vergleiche der GWL zwischen den Versuchen ist vom Standort Klein-Altendorf (25) bis Gülzow (18) ein „gleitender Übergang“ zu beobachten. Dies bedeutet, dass die ertragsschwächeren Standorte in diesem Bereich immer zu einer Gruppe gehören, in der Standorte sind, die wiederum der nächst höher gelegenen Gruppe mit ertragsstärkeren Standorten angehören. Dadurch ergibt sich ein

Kollektiv bzw. Übergang von der Gruppe mit den wüchsigsten Standorten des Buchstaben k bis hin zur Gruppe mit dem Buchstaben d. Hier besteht jedoch ein „Bruch“ zwischen den Standorten, da zwischen den im Ertragsniveau aufeinander folgenden Standorten Gülzow (18, Gruppe d) und Kummerow (12, Gruppe c) signifikante Unterschiede in der durchschnittlichen Gesamtwuchsleistung bestehen.

Die Standorte mit dem größten Biomassepotenzial gehören der homologen Gruppe k an, die insgesamt elf Flächen umfasst. Erwähnenswert ist noch der Übergang von Potsdam Bornim (16) zu Oberdorla (36), weil ab hier kein Anschluss mehr an die vollständige Spitzengruppe mit dem Buchstaben k besteht.

3.3 EGE Biplot

Abbildung 2 enthält den EGE Biplot zur Untersuchung des Anbauoptimums der Klone. Wie zur Methodik der Biplot Analyse beschrieben, wurden hierzu die Gesamt-Klon-Mittelwerte von den Ertragswerten in Tabelle 4 abgezogen. Die Zellenwerte wurden vor der Analyse wurzeltransformiert. Hier dargestellt sind nur Standorte, an denen nach dem Omnibus-Test signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt wurden.

91% der Gesamt-Quadratsummenabweichung werden durch die erste Hauptkomponente erklärt, durch die zweite nur 5%. Die Information Ratio liegt bei der ersten Hauptkomponente mit 4,55 deutlich über 1 im Gegensatz zu der IR der zweiten Hauptkomponente mit 0,24. Bei der Interpretation des Biplot sollte daher beachtet werden, dass durch Unterschiede der ersten Hauptkomponente (also entlang der Abszisse) deutlich mehr Varianz erklärt wird als durch Unterschiede entlang der Ordinate. Aufgrund des Anteils der durch beide Hauptkomponenten erklärten Varianz an der Gesamtvarianz von in Summe 96% gibt dieser Biplot die Datenstruktur der zugrunde liegenden EGE Matrix gut wieder.

Im Biplot werden insgesamt sieben Sektoren aufgespannt durch die Versuche Klein-Altendorf (25), Werlte (19), Königshovener Höhe (24), Trenthorst (35), Iden (30), Energiewald Welzow (8) und Forchheim (4). Diese Standorte markieren auch die Eckpunkte des umhüllenden Polygons. Die Sektoren ergeben sich durch das Zeichnen einer Linie aus dem Ursprung, die orthogonal zu der verbindenden Linie zwischen zwei Eckpunkten verläuft. In nur zwei dieser so entstehenden Sektoren fallen die Koordinaten aller Klone, die sich nach Gattungen aufteilen. ‚Inger‘ und ‚Tordis‘ fallen in den Sektor des Versuchs in Werlte (19), zu dem der Standort Aulendorf (3) nahe platziert ist. Die Pappel-Prüfglieder fallen alle in den Sektor der durch die Koordinate des Standorts Klein-Altendorf als Eckpunkt gebildet wird. Die mittleren EGE Werte als Verhältnis zum Gesamtmittel des Versuchs nehmen von rechts nach links ab und sind rechts vom Ursprung positiv und links davon negativ. Die Standorte Campus Klein-Altendorf (25) und Werlte (19) liegen daher an der Spitze in ihrer durchschnittlichen Überlegenheit zum Mittel, die beiden Standorte in Welzow (8 und 14) dagegen liegen deutlich unterm Mittel. Die erste Hauptkomponente dürfte daher hier den Standorteinfluss wiedergeben. Die zweite

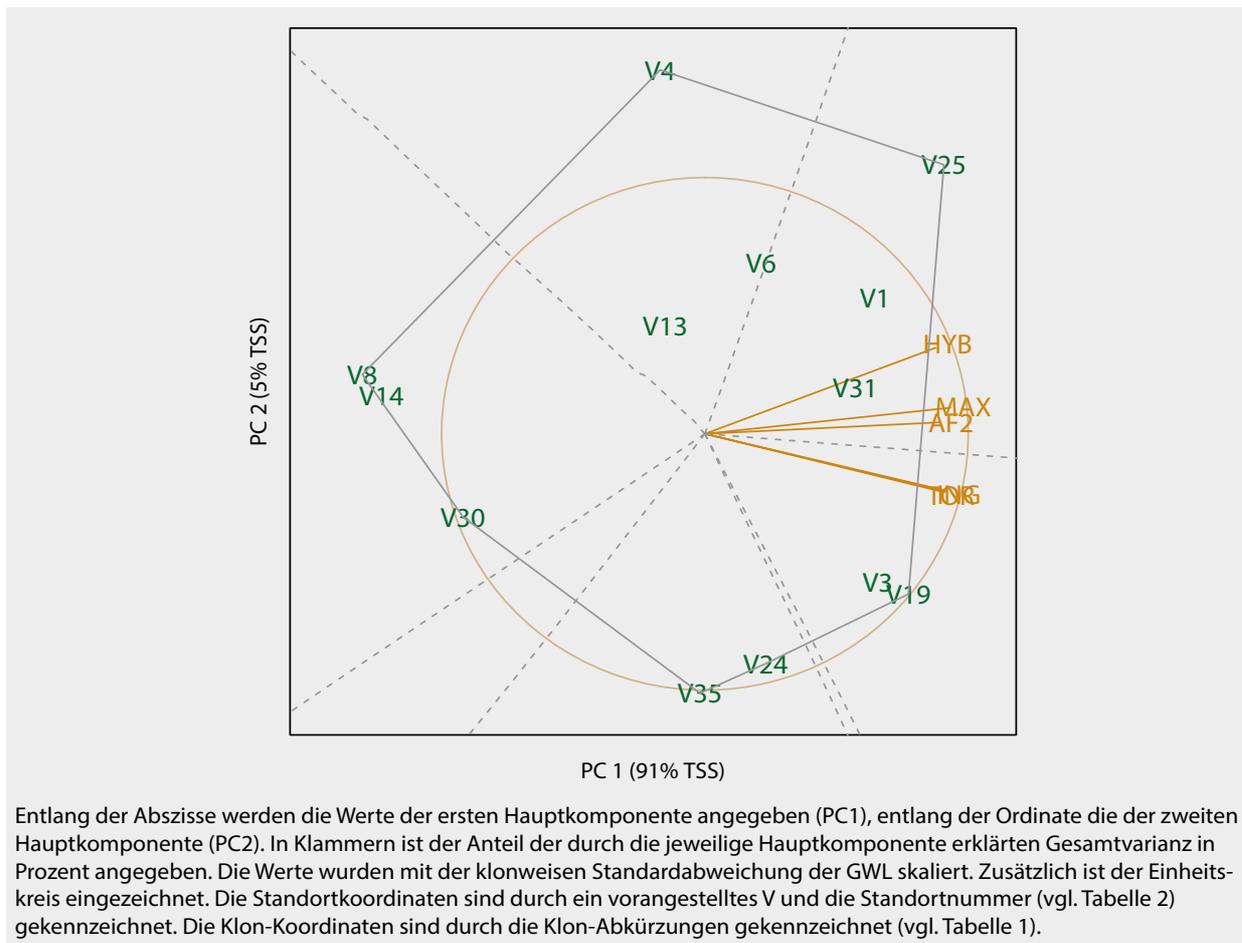


Abbildung 2

EGE Form des Biplot basierend auf der Hauptkomponentenanalyse der um den Genotyp-Effekt bereinigten wurzeltransformierten Ertragsdaten.

Hauptkomponente gibt die Rangverschiebungen aufgrund der Genotyp-Umwelt Interaktion wieder. Am Standort 25 sind z.B. alle Klon-Ertragswerte dem Gesamt-Klon-Mitteln überlegen, die Überlegenheit fällt jedoch für die Pappeln höher aus als für die Weiden. Der Unterschied ist für den Klon „AF2“ am deutlichsten. In Aulendorf (3) und Werlte (19) ist dies im Bezug auf die Gattung genau umgekehrt. Die Rangfolgen der Standorte Emmendingen (1) und Pommritz (31) liegen zwischen denen von Klein-Altendorf und Werlte bzw. Aulendorf. Die Standorte lieferten im Mittel überdurchschnittliche Erträge. Bis auf „AF2“ liegen alle Prüfglied-Werte deutlich über den Gesamt-Klon-Mitteln, mit höheren Werten besonders für „Hybride 275“. Da die Weiden aber auch vergleichsweise gut abschneiden und „AF2“ hier deutlich zurückfällt, sind die Koordinaten der Standorte 1 und 31 zwischen denen der Standorte 25 und 19 platziert.

Standorte, in deren Sektor kein Klon-Vektor fällt, weisen auch kein Optimum in der Ertragsüberlegenheit zum Klon-Mittel für diese Prüfglieder auf. Hinzu kommt, dass Standorte links des Ursprungs in ihrer Gesamtleistung unterdurchschnittlich sind. Auch wenn hier signifikante Unterschiede vorliegen, spielen sich diese auf einem niedrigen Niveau ab.

Insgesamt betrachtet sind die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Versuche entschieden größer ausgeprägt als die Unterschiede durch Genotyp-Umwelt Interaktion zwischen und innerhalb der Versuche. Dies wird gut durch die Anteile der erklärten Streuung der beiden Hauptkomponenten repräsentiert. Der Einfluss der Genotyp-Umwelt Interaktion soll im GGE Biplot näher evaluiert werden.

3.4 GGE Biplot

In Abbildung 3 ist der GGE Biplot mit der Darstellungsvariante des „which-won-where-pattern“ enthalten. Die erste Hauptkomponente erklärt 58% der Gesamtvarianz, die zweite Hauptkomponente 31%. Die IR Werte der Hauptkomponenten betragen 2,88 für die erste bzw. 1,57 für die zweite. Basierend auf diesen beiden Werten und mit in Summe erklärten 89% der Gesamtvarianz sind diese beiden Hauptkomponenten daher geeignet, die Struktur der zugrunde liegenden GGE Matrix wiederzugeben.

Die Überlegenheit von „AF2“ zum Versuchsmittel ist am Standort Iden (30) am größten, gefolgt von 14 Welzow-Süd und 25 Campus Klein-Altendorf. Dies wird im Biplot entsprechend wieder gegeben, da die Vektoren der genannten

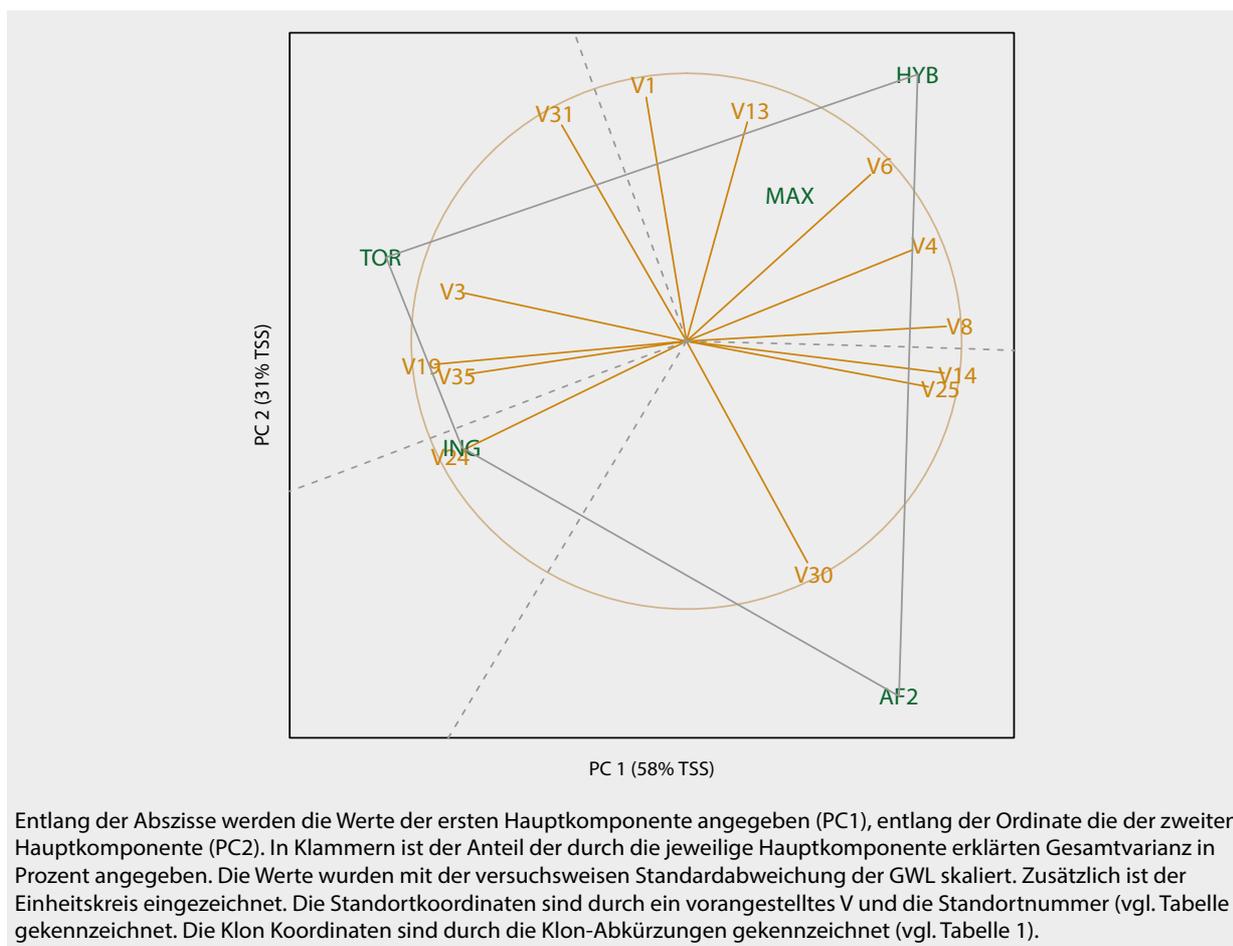


Abbildung 3

GGE Form des Biplot basierend auf der Hauptkomponentenanalyse der um den Umwelt-Effekt bereinigten wurzeltransformierten Ertragsdaten.

Standorte in den Sektor von ‚AF2‘ fallen. Während in Iden die beiden anderen Pappel-Prüfglieder unterdurchschnittlich abschneiden, liegen die Ertragswerte für ‚Max 1‘ und ‚Hybride 275‘ an den Standorten 14 und 25 über dem Durchschnitt. Dies erklärt die größere Nähe zur Sektorengrenze. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass basierend auf den paarweisen Vergleichen ‚AF2‘ immer einer Gruppe mit einem anderen Pappel-Prüfglied angehörte.

Die Prüfglieder ‚Max 1‘ und ‚Hybride 275‘ teilen sich einen Sektor, in den insgesamt fünf Standorte fallen, an denen diese Klone dem Versuchsmittel deutlicher überlegen sind als die anderen Klone. Von Interesse sind hier auch die Winkel der Standortvektoren untereinander. Je spitzer der Winkel desto größer ist die positive Korrelation der Rangfolgen der Prüfglieder hinsichtlich der Genotyp-Umwelt Interaktion. Bei zunehmend stumpfen Winkeln zwischen den Vektoren wird die Korrelation negativ und größer. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Standorte Emmendingen (1) und Iden (30), da in Emmendingen ‚AF2‘ am deutlichsten unterdurchschnittlich abschneidet und in Iden dagegen deutlich überdurchschnittlich.

Durch die Weidenprüfglieder werden zwei Sektoren gebildet. In dem Sektor für ‚Tordis‘ liegen vier Flächen und im Sektor für ‚Inger‘ nur eine Fläche, nämlich Königshovener

Höhe (24). Hier ist zu beachten, dass der Großteil der Standorte ähnliche Rangfolgen hinsichtlich der Prüfglieder aufweist und dass drei Standorte nahe der Sektorgrenze liegen, also die Differenzierung der Weidenprüfglieder hier geringer ausfällt. Ausgenommen davon sind der Standort Aulendorf (3), an dem nur ‚Tordis‘ überdurchschnittlich abgeschnitten hat, und Pommritz (31), wo ‚Tordis‘ und ‚Hybride 275‘ ähnlich gute Biomasseleistungen aufweisen. Letzteres erklärt die Nähe zum ‚Hybride 275‘ Sektor.

Bei der Betrachtung der Aufteilung der Standortvektoren sind zwei Kollektive erkennbar. Auf der linken Seite die Standorte, an denen die Weiden besser abschneiden, und auf der rechten Seite die Standorte, auf denen die Pappeln positive Interaktionen aufweisen. Pommritz (31) stellt einen Übergang dar, innerhalb der Pappeln und Weiden gibt es Übergänge, die jedoch für die Pappeln zwischen den Prüfgliedern ‚Max 1‘ mit ‚Hybride 275‘ und ‚AF2‘ größer ausfallen. Hier sollte nochmals betont werden, dass in der GGE Darstellung der Standort-Effekt fehlt. Wenn nur die Standorte betrachtet werden sollen, an denen signifikante Unterschiede zwischen den Prüfgliedern vorlagen und die über dem ProLoc Gesamtittel liegen, reduziert sich dies auf die Standorte 1, 3, 19, 25, und 31.

4 Diskussion

Das Hauptziel im ProLoc Verbundvorhaben war die Standortleistungsschätzung und die Ermittlung der ertragsbestimmenden standörtlichen Eigenschaften. Vor diesem Hintergrund sind die in der Varianzkomponentenanalyse ermittelten Anteile der Streuungsursachen, die für den Faktor Standort am größten ausfielen, als positiv für das Projektziel zu beurteilen. Die Boden- und Klimabedingungen, die innerhalb dieses Faktors mit der Biomasseleistung korrelieren, wurden im Projekt (Amthauer Gallardo, 2014; Janßen et al., 2017) und anderen Untersuchungen (Murach et al., 2008; Ali, 2009; Aust, 2012; Petzold, 2013) für Standortbedingungen in Deutschland bereits herausgestellt. Überwiegend sind hier Parameter wie Bodenart, Bodengüte (ausgedrückt durch die Boden- und Ackerzahl), Wasserspeicherkapazität und klimatische Variablen wie Temperatur und Niederschlag in unterschiedlicher zeitlicher Auflösung als ertragsbestimmend identifiziert worden. Für die Ertragsentwicklung nach Rückschnitt ergibt sich bei Janßen et al. (2017) und Horn et al. (2013) eine enge Korrelation mit dem Ertrag vor der Ernte. Zum Nährstoffbedarf und der Entwicklung der Nährstoffgehalte unter KUP sei auf Boelcke und Kahle (2008) und Kahle et al. (2007) hingewiesen.

Entscheidend für die Modellierung des Ertrags ist neben der Quantifizierung des Umwelteffekts in den genannten Eigenschaften, jedoch auch, ob eine Standortplastizität also signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Umwelt vorliegt und ob diese wiederum einen reproduzierbaren Zusammenhang mit Standorteigenschaften aufweist. Das Ziel dieser Arbeit war es, diese möglichen Rangverschiebungen der Klone näher zu untersuchen und mögliche klonspezifische Anbauoptima zu identifizieren.

Zur Beurteilung der Genotyp-Umwelt Interaktion wurden dazu überwiegend Methoden und Werkzeuge aus dem Bereich der Pflanzenzüchtung angewandt. Es sollte dabei bedacht werden, dass es sich bei ProLoc vom Versuchsziel um kein Züchtungsprogramm handelt. Für eine Versuchsserie, die der Selektion von überlegenen Genotypen dienen soll, wäre die erwähnte durch den Faktor Genotyp verursachte niedrige Varianz fatal. Zudem wurde eine deutlich niedrigere Prüfgliedzahl, als dies z. B. bei den Versuchsserien des FastWOOD Züchtungsprojekts üblich war (Grotehusmann et al., 2017; Fey et al., 2018), ausgebracht. Die Anwendbarkeit der genutzten Methoden erübrigt sich jedoch dadurch nicht, da der Prüfgliedsatz in ProLoc bewusst so ausgewählt wurde, dass sich aufgrund der unterschiedlichen Gattungen und Kreuzungskombinationen eine Differenzierung erwarten ließ. Diese fiel im Vergleich der Faktoren sehr niedrig aus und lag auch für die Interaktionen auf einem niedrigen Niveau. Für die Betrachtung und Analyse der Interaktionen ist der Biplot Ansatz basierend auf der zweiphasigen Versuchsauswertung gut geeignet. Die EGE und GGE Form des Biplots für die Gesamtwuchsleistung erlauben eine Identifizierung der Standorte, die ein überdurchschnittliches Wachstum ermöglichen bzw. die sich hinsichtlich der Rangfolge der Klone ähneln. Ausbaupotenziale der Analyse ergeben sich durch die mögliche Verwendung des einphasigen Analyseansatzes oder durch

zusätzliche Verwendung geeigneter Gewichtungen, für die in Abhängigkeit vom Datensatz unterschiedliche Parameter getestet werden sollten (Möhring und Piepho, 2009).

Als Grenzwert für einen wirtschaftlichen Anbau wird von Petzold et al. (2010) ein durchschnittlicher Gesamtzuwachs von 8 bis 10 $t_{atro} \text{ ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ genannt. Dieser Grenzwert sollte vor dem Hintergrund aktueller Hackschnitzelpreise neu evaluiert werden und kann hier als nur absolut unterer Grenzwert gelten. Bei dem Versuchszeitraum in ProLoc von sechs Jahren entspricht diese Grenze einer Gesamtwuchsleistung von 48 bis 60 $t_{atro} \text{ ha}^{-1}$. Der Mittelwert aller Klone und Versuche liegt bei 42,38 $t_{atro} \text{ ha}^{-1}$. Die Versuche, die in ihrem Ertragsniveau über dem Mittel liegen, liegen alle im beschriebenen Grenzbereich oder darüber. Die Überlegung, in der Analyse der Genotyp-Umwelt Interaktion den Fokus auf die überdurchschnittlich guten Standorte zu legen, bestätigt sich dadurch. Standorte, die darunter liegen, sind zwar für die Standortleistungsschätzung von Bedeutung, die Verschiebungen in den Rangfolgen der Klone sind jedoch von geringer praktischer Relevanz aufgrund des insgesamt niedrigen Ertragsniveaus.

Wie durch die Einzelversuchsauswertung und die GGE Biplot Analyse bestätigt, finden sich im Bereich überdurchschnittlicher Erträge insgesamt fünf von zwölf Standorten, an denen statistisch signifikante Unterschiede des Faktors Klon hinsichtlich GWL festgestellt werden. Von diesen fünf Versuchen zeigen wiederum vier Tendenzen, die Prüfglieder nach Gattung zu differenzieren. Innerhalb der Gattungen sind die Unterschiede jeweilig gering. Die Standorte Aulendorf (3) und Werlte (19) weisen im Vergleich zu den Standorten Klein-Altendorf und Emmendingen vor allem Unterschiede hinsichtlich der Bodenzahl (Aulendorf: 46, Werlte: 33, Emmendingen: 77, Klein-Altendorf: 72) auf. Zusätzlich sind die Durchschnittstemperaturen der Vegetationsperiode in Emmendingen (16,0°C) und Klein-Altendorf (17,1°C) höher als in Werlte (15,7°C) und Aulendorf (15,5°C), auch wenn diese Unterschiede gering ausfallen. Die Tendenz zur höheren Temperatur bei den anderen Standorten der Pappelgruppe im GGE Biplot zeigt sich auch bei den unterdurchschnittlichen Standorten. So liegen die Mitteltemperaturen an diesen Standorten im Bereich von 16,0°C bis 17,6°C, die der Standorte in den Weidensektoren dagegen bei 15,5°C bis 16,0°C. Dem ist jedoch entgegen zu stellen, dass an mehreren Standorten, die relativ und absolut niedrige Mitteltemperaturen aufweisen, kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Prüfgliedmitteln bestand. Allen voran ist hier Hayn (29) im Harz mit 14,9°C zu nennen. Hier besteht sogar die Tendenz, dass die Pappeln über dem Versuchsmittel abschneiden. Vor diesem Hintergrund könnten Untersuchungen zur Wärmeverteilung in der Vegetationsperiode und eine Analyse des Austrieb- und Abschlussverhaltens der Klone zur Klärung beitragen. Ähnliche Tendenzen wie für die Temperatur sind für die Bodenzahl zu beobachten, da Standorte existieren, an denen zwar relativ geringe Bodenzahlen vergeben wurden, die jedoch ebenfalls nicht differenzierend hinsichtlich der Prüfgliedmittel zwischen den Gattungen wirken, z. B. Unterrieden (17) wo von den Pappeln einzig ‚AF2‘ unterdurchschnittlich abschneidet, ‚Hybride 275‘ etwas

überdurchschnittlich und die Erträge der restlichen Prüfglieder alle nah am Standortmittel liegen. Hinzu kommt, dass an den Standorten mit überdurchschnittlichen Erträgen und statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Klonen meist doch gattungsübergreifende homologe Gruppen vorliegen. Für die überdurchschnittlichen Standorte lassen sich weitere Versuchsorte finden, die in den dargestellten Standortbedingungen weitgehend vergleichbare Werte, jedoch tendenziell andere Rangfolgen aufweisen. Miteinander zu vergleichen wären z.B. die Standorte Werlte (19) mit Potsdam Bornim (15), sowie Klein-Altendorf (25) mit Lehmkauze (16) und Emmendingen (1). Bei letzterem ist zu berücksichtigen, dass das schlechte Abschneiden von ‚AF2‘ wahrscheinlich durch Pathogenbefall bedingt ist, der die anderen Prüfglieder nicht betroffen hat. Dies bestätigen Beobachtungen aus dem FastWOOD Verbundvorhaben zum Blattrostbefall mit *Melampsora larici-populina*, welche für ‚AF2‘ und den Klon ‚Robusta‘ (ebenfalls *P. deltoides* × *P. nigra*) stets überdurchschnittlich hoch waren (Fey et al., 2018). Hinsichtlich der Ertragsdynamik ist auch auf die Zunahme der Ausfälle bei ‚AF2‘ nach der zweiten Ernte hinzuweisen (vgl. Janßen et al., 2017). Letzteres schlägt sich auch in den Erträgen nieder, die für ‚AF2‘ in der ersten Rotation noch vergleichsweise hoch waren, dann aber nachlassen, während ‚Hybride 275‘ höhere Zuwächse aufweist und teils die Rückstände durch Nachpflanzung aufholt. Vor diesem Hintergrund bleiben die Ergebnisse späterer Umtriebszeiten abzuwarten, die für einige fortgeführte ProLoc Flächen noch erhoben werden oder für die ProLoc Klone als Kontroll-Prüfglieder auf FastWOOD-Flächen (Grotehusmann et al., 2017; Fey et al., 2018) ermittelt werden können. Die Analyse der Genotyp-Umwelt Interaktion sollte daher noch getrennt für die Umtriebszeiten und die Ertragsdynamik durch Rückschnitt erfolgen.

Die hier dargestellten Ergebnisse müssen vor dem Hintergrund der gewählten Umtriebszeit, der damit verbundenen Pflanzzahl und den gewählten Klonen interpretiert werden und lassen Erweiterungen auf andere Bewirtschaftungsvarianten in Kurzumtriebsplantagen nur bedingt zu. Die Analysen sollten daher auf die Versuche der weiteren Arbeitspakete in ProLoc erweitert werden. Die Betrachtungen könnten damit um die Aspekte der verlängerten Umtriebszeit und daran angepassten Pflanzabständen ergänzt werden (vgl. Janßen et al., 2017).

Um generalisierte Aussagen über die Standortplastizität von interspezifischen Hybriden bestimmter Kreuzungskombinationen zu treffen, reicht der verwendete Datensatz nicht aus, da je Kombination nur ein Genotyp getestet wurde. Um solche Beurteilungen zu ermöglichen, sollten die vorgestellten Analysen um den Datensatz des FastWOOD Züchtungsprogramms für Schwarz- und Balsampappeln und Weiden erweitert werden. Hier liegen für verschiedene Kreuzungskombinationen Ertragswerte mehrerer sowohl intersektionaler als auch interspezifischer Hybride vor (Grotehusmann et al., 2017; Fey et al., 2018). Zusätzlich wurden sowohl die Pappel- als auch Weiden-Prüfglieder aus ProLoc getestet, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse vereinfacht. Der Einbezug von Stabilitätsmaßen ähnlich wie bei Sixto et al. (2014) könnte die Aussagen zusätzlich fundieren.

Basierend auf dem sehr geringen Einfluss des Faktors Genotyp und dem geringen Einfluss der Genotyp-Umwelt Interaktion, die keine deutlichen Muster in Abhängigkeit der Standortbedingungen zeigt, kann basierend auf den dargestellten Analysen der Gesamtwuchsleistung keine Empfehlung zu jeweilig verschiedenen Anbauoptima der verwendeten Klone ausgesprochen werden. Dieses Ergebnis wird aktuell in das Modell zur Standortleistungsschätzung implementiert.

Danksagung

Die Autoren sind dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft zu besonderem Dank für die finanzielle Unterstützung verpflichtet. Dem Projektträger Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) möchten wir für die professionelle Projektabwicklung danken.

Den Kooperationspartnern im Arbeitspaket 1 des ProLoc Verbundvorhaben gilt ebenfalls unser großer Dank für die partnerschaftliche Zusammenarbeit über sieben Jahre Projektlaufzeit und besonders für die Betreuung der Flächen vor Ort: Manuel Karopka (FVA Baden Württemberg); Klaus Mastel, Frieder Seidl (LTZ Augustenberg); Bettina Stoll, Frank Burger (LWF Bayern); Dirk Freese, Ansgar Quinkenstein (BTU Cottbus); Dieter Murach, Rainer Schleppehorst, Holger Hartmann (HNEE Eberswalde); Dirk Knoche (FIB Finsterwalde); Peter Kaulfuß, Ralf Pecenka (ATB Potsdam Bornim); Lothar Behle Schalk (Universität Giessen); Michael Wachendorf, Reinhold Stülpnagel (Universität Kassel); Ludger Tapken (LK Niedersachsen); Marie-Luise Rottmann-Meyer (3N Niedersachsen); Barbara Boelcke, Andreas Gurgel (LFA Mecklenburg Vorpommern); Norbert Hofnagel (Biomassehof Borlinghausen); Ralf Pude, Volker Wenghöfer, Georg Völkerling (Universität Bonn); Henning Kurth (LLFG Sachsen Anhalt); Kerstin Jaekel, Sabine Mau, Pierre Seibold (IfULG Sachsen); Georg von Wühlisch, Stefan Jencsik (Thuenen Institut); Hardy Dembny (Baumschule Oberdorla); Andrea Biertümpfel, Armin Vetter (TLL). Christine Wachendorf und Josefine Möller vom Teilprojekt Bodenkunde danken wir ebenso für die Zusammenarbeit. Allen weiteren Kooperationspartnern im Arbeitspaket 2, allen ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Projekt und den zahlreichen Hilfskräften sei an dieser Stelle ebenfalls sehr gedankt.

Literaturverzeichnis

- Ad-Hoc-Arbeitsgruppe Boden der Staatlichen Geologischen Dienste und der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Sponagel H (ed) (2005) Bodenkundliche Kartieranleitung : mit 103 Tabellen und 31 Listen. Stuttgart : Schweizerbart, 438 p
- Ali W (2009) Modelling of biomass production potential of poplar in short rotation plantations on agricultural lands of Saxony, Germany. Dresden : Techn Univ, 130 p
- Amthauer Gallardo D (2014) Standortbasierte Ertragsmodellierung von Pappel- und Weidenklonen in Kurzumtriebsplantagen. Dresden : Techn Univ, 201 p
- BLE - Bundesanstalt Landwirtsch Ernährung (2018) Erhebung zur Versorgungssituation von forstlichem Vermehrungsgut im Bundesgebiet (Erfassungszeitraum 01.07.2016 - 30.06.2017) [online].

- Zu finden in <https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/Landwirtschaft/Saat-und-Planzgut/Erhebung2016_2017.pdf?__blob=publicationFile&v=4> [zitiert am 25.10.2018]
- Arbeitskreis Standortkartierung in der Arbeitsgemeinschaft Forsteinrichtung (2016) Forstliche Standortaufnahme: Begriffe, Definitionen, Einteilungen, Kennzeichnungen, Erläuterungen. Eching bei München: IHW-Verl, 400 p
- Aust C (2012) Abschätzung der nationalen und regionalen Biomassepotentiale von Kurzumtriebsplantagen auf landwirtschaftlichen Flächen in Deutschland. Freiburg i Br: Univ, 145 p
- Bartlett MS (1937) Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc R Soc Math Phys Eng Sci* 160:268–282, doi: 10.1098/rspa.1937.0109
- Bärwolff M, Hansen H, Hofmann M, Setzer F (2012) Energieholz aus der Landwirtschaft. Gülzow-Prüzen: FNR, 54 p
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57:289–300
- Boelcke B (2006) Schnellwachsende Baumarten auf landwirtschaftlichen Flächen: Leitfaden zur Erzeugung von Energieholz. Schwerin: Minist Ernähr Landwirtsch Forst Fisch Mecklenburg-Vorpommern, 40 p
- Boelcke B, Kahle P (2008) Energieholzproduktion mit Weiden und Pappeln: Ertragsbildung und Grundnährstoffbedarf. *Pflanzenbauwiss* 12:78–85
- Bretz F, Hothorn T, Westfall PH (2011) Multiple comparisons using R. Boca Raton: CRC Press, 187 p
- Caslin B, Finnan J, McCracken A (2012) Willow varietal identification guide [online]. Zu finden in <https://www.google.com/url?sa=t&src=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKewiYu4GhwKHeAhWBKFAKHUNCeYQfJAAegQICRAC&url=https%3A%2F%2Fwww.teagasc.ie%2Fmedia%2Fweb%2Fpublications%2F2012%2FWillow_Identifier_Guide_2012.pdf&usq=AOvVaw1bwXREDIzoJwV8R8jDGP9B> [zitiert am 25.10.2018]
- Correia I, Alia R, Yan W, David T, Aguiar A, Almeida MH (2010) Genotype × environment interactions in *Pinus pinaster* at age 10 in a multi-environment trial in Portugal: a maximum likelihood approach. *Ann For Sci* 67:612–612, doi: 10.1051/forest/2010025
- Dickmann DJ, Kuzovkina J (2014) Poplars and willows of the world, with emphasis on silviculturally important species. In: Isebrands JG, Richardson J (eds) *Poplars and willows: trees for society and the environment*. Wallingford: CAB, pp 8–91
- DIN – Deutsches Institut für Normung e.V. (2010) DIN EN 14774-1 – Feste Biobrennstoffe – Bestimmung des Wassergehaltes – Ofentrocknung – Teil 1: Gesamtgehalt an Wasser – Referenzverfahren. Berlin: Beuth
- Fey C, Stiehm C, Hofmann M, Moos M, Grotehusmann H, Steiner W, Janßen A (2018) Züchtung und Evaluierung von Schwarz- und Balsampappelklonen hinsichtlich Ertrag und Blattrosttoleranz in vier FastWOOD Versuchsserien [online]. Zu finden in <<https://doi.org/10.3220/LBF1534945636000>> [zitiert am 26.10.2018]
- Filat M, Chira D, Nică MS, Dogaru M (2010) First year development of poplar clones in biomass short rotation coppiced experimental cultures. *Ann For Res* 53(2):151-160
- FISBo BGR (2014) Web Map Service (WMS) zur Karte der Bodengroßlandschaften von Deutschland [online]. Zu finden in <<https://services.bgr.de/wms/boden/bgI5000/?service=WMS&version=1.3.0&request=getCapabilities>> [zitiert am 26.10.2018]
- Gabriel KR (1971) The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* 58:453–467
- Gezan SA, de Carvalho MP, Sherrill J (2017) Statistical methods to explore genotype-by-environment interaction for loblolly pine clonal trials. *Tree Genet Genomes* 13(1), doi: 10.1007/s11295-016-1081-0
- Grotehusmann H, Stiehm C, Janßen A, Hartmann KU, List J, Karopka M, Moos M, Schilbach M, Schirmer R (2017) Pappelsortenprüfungen im Projekt FastWOOD: Ergebnisse nach 2. Rotation. *Forstarchiv* 88(2):47–54, doi: 10.4432/0300-4112-88-47
- Hofmann M (1999) Bereitstellung von genetisch hochwertigem Vermehrungsgut für Kurzumtriebsbestände. In: Hofmann M (1999) Modellvorhaben "Schnellwachsende Baumarten": zusammenfassender Abschlussbericht. Münster: Landwirtschaftsverl, pp 151–239, Schr Nachwachs Rohstoffe 13
- Hofmann M (2005) Pappeln als nachwachsender Rohstoff auf Ackerstandorten: Kulturverfahren, Ökologie und Wachstum unter dem Aspekt der Sortenwahl. Hann Münden: Forschungsinst schnellwachs Baumarten, 143 p, Schr Forschungsinst schnellwachs Baumarten 8
- Hollander M, Wolfe DA, Chicken E (2014) *Nonparametric statistical methods*. Hoboken: Wiley, 819 p
- Horn H, Skibbe K, Röhle H (2013) Wuchsleistung von KUP aus Pappel in Folge-rotationen. *AFZ Wald* 68(7):53–55
- Janßen A, Fehrenz S, Fey-Wagner C, Hüller W (2012) Züchtung von Schwarz- und Balsampappeln für den Kurzumtrieb. In: Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (ed) *Züchtung und Ertragsleistung schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb: Erkenntnisse aus drei Jahren FastWOOD*, ProLoc und Weidenzüchtung. Göttingen: Univ Verl, pp 33–54, Beitr Nordwestdtch Forstl Versuchsanst 8
- Janßen A, Fey-Wagner C, Hofmann M (2010) Verbundvorhaben FASTWOOD: Züchtung schnellwachsender Baumarten; Teil Pappeln [online]. Zu finden in <<https://docplayer.org/52963434-Verbundvorhaben-fastwood-zuechtung-schnellwachsender-baumarten-teil-pappeln.html>> [zitiert am 30.10.2018]
- Janßen A, Stiehm C, Hofmann M, Schmidt C (2017) Erfassung von Klon-Standort-Wechselwirkungen bei Pappel und Weide auf landwirtschaftlichen Standorten in kurzen Umtriebszeiten – ProLoc (Ertrags – Programm – Locus) – Projektphase II: Schlussbericht zum Vorhaben. Hann Münden: Nordwestdtch Forstl Versuchsanst, 97 p
- Kahle P, Hildebrand E, Baum C, Boelcke B (2007) Long-term effects of short rotation forestry with willows and poplar on soil properties. *Arch Agron Soil Sci* 53:673–682, doi: 10.1080/03650340701648484
- Kruijer W, White I (2016) Heritability: marker-based estimation of heritability using individual plant or plot data: 1.2 [online]. Zu finden in <<https://CRAN.R-project.org/package=heritability/index/html>> [zitiert am 30.10.2018]
- Lazdina D, Bardulis A, Bardule A, Lazdins A, Zeps M, Jansons A (2014) The first three-year development of ALASIA poplar clones AF2, AF6, AF7, AF8 in biomass short rotation coppice experimental cultures in Latvia. *Agron Res* 12(2):543–552
- Lindegaard KN, Carter MM, McCracken A, Shield IF, MacAlpine W, Hinton Jones M, Valentine J, Larsson S (2011) Comparative trials of elite Swedish and UK biomass willow varieties 2001–2010. In: Booth E (ed) *Biomass and energy crops IV*. Wellesbourne: AAB, pp 57–66
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland: Sinauer, 980 p
- Malik WA, Piepho H-P (2018) Biplots: do not stretch them! *Crop Sci* 58(3):1061-1069, doi: 10.2135/cropsci2017.12.0747
- Milliken GA, Johnson DE (2009) *Analysis of messy data*. Boca Raton: CRC Pr, 690 p
- Möhring J, Piepho H-P (2009) Comparison of weighting in two-stage analysis of plant breeding trials. *Crop Sci* 49:1977–1988, doi: 10.2135/cropsci2009.02.0083
- Murach D, Murn Y, Hartmann H (2008) Ertragsermittlung und Potenziale von Agrarholz. *Forst Holz* 63:18-23
- Petzold R (2013) Standortökologische Aspekte und Anbaupotenziale von Kurzumtriebsplantagen in Sachsen. Dresden: Techn Univ, 120 p
- Petzold R, Feger K-H, Röhle H (2010) Standortliche Voraussetzungen für Kurzumtriebsplantagen. In: Bemann A, Knust C (eds) *AGROWOOD: Kurzumtriebsplantagen in Deutschland und europäische Perspektiven*. Berlin: Weißensee-Verl, pp 44–53
- Piepho H-P, Möhring J, Schulz-Streeck T, Ogutu JO (2012) A stage-wise approach for the analysis of multi-environment trials: stage-wise analysis of trials. *Biom J* 54:844–860, doi: 10.1002/bimj.201100219
- R Core Team (2018) R: a language and environment for statistical computing 3.4.4 [Software] [online]. Zu finden in <<https://cran.r-project.org/>> [zitiert am 02.11.2018]
- Rau HM, Schulzke R, Albrecht J (1988) Steigerung und Sicherung der Holzproduktion durch Auswahl, Prüfung und züchterische Verbesserung geeigneten Ausgangsmaterials bei schnellwachsenden Baumarten. *Schr Forschungsinst schnellwachs Baumarten* 5:114-148
- Röhle H (2009) Arbeitskreis Biomasse: Verfahrensempfehlungen zur Methodik der Biomasseermittlung in Kurzumtriebsbeständen. In: Nagel J (ed) *Jahrestagung 25.-27. Mai 2009, Ascona (Schweiz): Beiträge zur Jahrestagung*. Göttingen: Dt Verband forstl Versuchsanst, pp 220–226

- Royston JP (1982) Algorithm AS 181 : the W test for normality. *Appl Stat* 31:176, doi: 10.2307/2347986
- Schuetzenmeister A, Dufey F (2017) VCA : Variance component analysis 1.3.3 [Software] [online]. Zu finden in <<https://CRAN.R-project.org/package=VCA>> [zitiert am 02.11.2018]
- Schulla J (2017) Model description WaSiM (Water balance Simulation Model) [online]. Zu finden in <http://www.wasim.ch/downloads/doku/wasim/wasim_2017_en.pdf> [zitiert am 01.11.2018]
- Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52:591, doi: 10.2307/2333709
- Sixto H, Gil P, Ciria P, Camps F, Sanchez M, Canellas I, Voltas J (2014) Performance of hybrid poplar clones in short rotation coppice in Mediterranean environments : analysis of genotypic stability. *GCB Bioenergy* 6:661–671, doi: 10.1111/gcbb.12079
- Sixto H, Salvia J, Barrio M, Ciria MP, Canella I (2011) Genetic variation and genotype-environment interactions in short rotation *Populus* plantations in southern Europe. *New Forests* 42(2):163–177, doi: 10.1007/s11056-010-9244-6
- Smith A, Cullis B, Thompson R (2001) Analyzing variety by environment data using multiplicative mixed models and adjustments for spatial field trend. *Biometrics* 57:1138–1147, doi: 10.2307/3068246
- Thomas E (2006) *Feldversuchswesen : 196 Tabellen*. Stuttgart : Ulmer, 387 p
- Wachendorf C, Möller J (2016) *Schlussbericht zum Vorhaben C- und N-Dynamik in Böden etablierter Kurzumtriebsplantagen – Verbundprojekt : Erfassung von Klon-Standort-Wechselwirkungen bei Pappel und Weide auf landwirtschaftlichen Standorten in kurzen Umtriebszeiten (ProLoc)*. Kassel: Universität Kassel, 97 p
- Welch BL (1951) On the comparison of several mean values : an alternative approach. *Biometrika* 38:330–336
- Wessolek G, Kaupenjohann M, Renger M, Facklam M (2009) *Bodenphysikalische Kennwerte und Berechnungsverfahren für die Praxis*. Berlin : Techn Univ, 80 p, *Bodenökologie und Bodengenese* 40
- Wright K, Laffont J-L (2018) gge: genotype plus genotype-by-environment biplots 1.4 [Software] [online]. Zu finden in <<https://CRAN.R-project.org/package=gge>> [zitiert am 02.11.2018]
- Yan W (2014) *Crop variety trials : data management and analysis*. Hoboken : Wiley, 360 p
- Yan W, Kang MS (2003) *GGE biplot analysis : a graphical tool for breeders, geneticists, and agronomists*. Boca Raton : CRC Pr, 271 p
- Yan W, Tinker NA (2006) Biplot analysis of multi-environment trial data : principles and applications. *Can J Plant Sci* 86:623–645, doi: 10.4141/P05-169
- Zeileis A (2006) Object-oriented computation of sandwich estimators. *J Stat Softw* 16:1–16

Untersuchung der Holzdichte von Aspen und Hybridaspen mittels Pilodyn

Christian Heimpold*, Kathrin Heimpold*, Volker Schneck*, Rainer Tölle** und Mirko Liesebach***

Zusammenfassung

Bei der energetischen und stofflichen Nutzung von Holz aus Kurzumtriebsbeständen spielt die Rohdichte der angebauten Bäume eine wesentliche Rolle. Untersuchungen zur Rohdichte von Aspen aus Kurzumtriebsbeständen fehlen bislang jedoch weitestgehend.

Das Pilodynverfahren nutzt die Eindringtiefe eines 2,5 mm starken Stahlstiftes, der mittels einer definierten Energie von 6 J in den Baum getrieben wird, zur indirekten Bestimmung der Rohdichte. Zwischen Eindringtiefe und Rohdichte besteht eine enge negative Korrelation. Die seit den 1970er Jahren angewendete Methode gilt als zerstörungsfrei.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden an 17 Aspen-nachkommenschaften Rohdichteuntersuchungen durchgeführt. Die Untersuchungen auf drei Standorten in Brandenburg, Sachsen und Schleswig-Holstein im Alter 9 zeigten z.T. signifikante Unterschiede zwischen den Prüfgliedern. Hybridaspen haben i.d.R. eine geringere Rohdichte als reine Europäische Aspen. Im Mittel beträgt die Eindringtiefe bei den Europäischen Aspen 23 mm, bei den Hybridaspen 24 mm und bei den Amerikanischen Aspen 25 mm. Ebenso ist erkennbar, dass gleiche Nachkommenschaften auf besseren Standorten mit einem einhergehenden besseren Wachstum geringere Rohdichten aufweisen.

Die Tatsache, dass zwischen den einzelnen Nachkommenschaften signifikante Unterschiede in der Rohdichte nachgewiesen werden konnten, kann für die zukünftige züchterische Bearbeitung der Aspe genutzt werden, indem gezielt Nachkommenschaften mit gutem Wuchs und hoher Dichte erzeugt werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um den Pilodynwerten reale Rohdichten zuordnen zu können.

Schlüsselwörter: Kurzumtrieb, *Populus*, Zitter-Pappel, Holzdichte, Pilodynwert

Abstract

Investigation of wood density of aspen and hybrid aspen with Pilodyn

Wood produced in short rotation coppices is used for energetic and material purposes. In both cases, wood density is an essential parameter as a proxy for energy content and heat value. Despite this importance, studies on the density of wood produced in short rotation coppices are still missing.

The Pilodyn-method indirectly determines wood density by using the penetration depth of a 2.5 mm steel pin, which is driven into the tree by a defined energy of 6 J. The close negative correlation between the two parameters allows using penetration depth as a proxy for density. The method is considered non-destructive and can therefore be used on living trees.

We tested wood density in 17 different aspen progenies (age 9 years) grown in short rotation coppices at three locations in Brandenburg, Saxony and Schleswig-Holstein using the Pilodyn-method.

In general, density is lower in hybrid aspen compared to European aspen. On average the penetration depth of the Pilodyn measures 23 mm in European aspen, 24 mm in hybrid aspen, and 25 mm in American aspen. Plants of identical progeny show higher growth rates and lower densities under more favorable site conditions. The ability to detect significant differences in wood density between progenies can be used in future breeding activities by selecting progenies with good growth and high density. However, further investigations are necessary to calculate real wood densities from the Pilodyn values.

Keywords: Short-rotation coppice, *Populus*, trembling aspen, wood density, Pilodyn value

* Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, Eberswalder Chaussee 3A, 15377 Waldsiedersdorf

** Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Unter den Linden 6, 10099 Berlin

*** Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, Sieker Landstraße 2, 22927 Großhansdorf

1 Einleitung

Die Europäische Aspe (*Populus tremula* L.) und Hybridaspes ($P. \times wettsteinii = P. tremula \times P. tremuloides / P. tremuloides \times P. tremula$) gehören zu den Pappeln der Sektion *Populus* und wachsen in Deutschland auf 81.063 ha der Waldfläche, dies entspricht einem Anteil 0,7 % an der Gesamtwaldfläche (Thünen-Institut, 2012). Die Aspe ist in Deutschland eine Nebenbaumart (Ebert, 1999) und deshalb derzeit von geringer wirtschaftlicher Bedeutung (Wühlisch, 2016). Aspenholz ist jedoch vielseitig verwendbar und eignet sich für die Papier- und Zellstoffindustrie zur Erzeugung hochwertiger Papiere, für die Furnierproduktion, aber auch für die Herstellung von Faserplatten und Holzwole-Leichtbauplatten (Schneck, 1985; Ebert, 1999). In der jüngeren Vergangenheit wird zunehmend die Eignung der Aspen und hier insbesondere die der wüchsigeren Hybridaspes zur Erzeugung von Dendrobiomasse zur energetischen Nutzung auf landwirtschaftlichen Grenzertragsstandorten auf sogenannten Kurzumtriebsplantagen (KUP) geprüft (Liesebach et al., 1999; Liesebach et al., 2000; Liesebach et al., 2012; Schneck und Liesebach, 2015).

Untersuchungen zu holzphysikalischen Eigenschaften wie der Rohdichte sind teuer und zeitaufwändig (Cown, 1978; Wu et al., 2010). Die Rohdichte ist ein entscheidendes Kriterium bei der Beurteilung der Eignung einer Baumart für stoffliche und energetische Verwendungszwecke (Cown, 1978). Sie ist vom Wassergehalt abhängig und wird in Gramm je Kubikzentimeter [g/cm^3] gemessen (DIN 52182). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Rohdichte immer für absolut trockenes (darrtrockenes) Holz mit einer Holzfeuchte von 0 % (r_0) angegeben. In der Literatur finden sich bereits Angaben zur Rohdichte bei Aspen (Tabelle 1). Dabei bewegen sich die Angaben in Abhängigkeit von dem Untersuchungsmaterial und der Methodik zwischen $0,35 \text{ g}/\text{cm}^3$ und $0,60 \text{ g}/\text{cm}^3$, wobei der überwiegende Teil der Werte zwischen $0,37 \text{ g}/\text{cm}^3$ und $0,46 \text{ g}/\text{cm}^3$ liegt.

Scholz (1972) stellt fest, dass ein standörtlich bedingtes besseres Wachstum auch eine geringere Rohdichte zur Folge

hat. Er konnte ebenfalls nachweisen, dass zwischen einzelnen Nachkommenschaften statistisch gesicherte Unterschiede in der Rohdichte bestanden. Dies bedeutet, dass die Rohdichte genetisch festgelegt ist und somit züchterisch beeinflusst werden kann.

Die Bestimmung der Holzdicke ist ein zeit- und kostenintensiver Vorgang. Laboranalysen gehen zudem mit der Zerstörung des Probebaumes einher, der für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung steht. Das seit den 1970er Jahren angewendete sogenannte Pilodynverfahren wurde von der Schweizer Firma Proceq entwickelt und diente ursprünglich der Untersuchung von Leitungsmasten auf die unsichtbare Moderfäule (englisch: „soft rot“). Es ist heute eine etablierte Methode zur zerstörungsfreien Bestimmung der Holzdicke an stehenden Bäumen (Zhang et al., 2017; Nunes et al., 2017; dos Santos et al., 2016; Hai et al., 2015; Chen et al., 2015; Le Dinh et al., 2012; Mishima et al., 2011; Wu et al., 2010; Zhu et al., 2009; Wang et al., 2008; Ishiguri et al., 2008).

Die Rohdichte eines Baumes ist jedoch nicht nur vom Wassergehalt und genetischen Ursachen abhängig. Sie wird nach Wu et al. (2010) auch von der Himmelsrichtung beeinflusst. Ebenso spielt die Jahreszeit (Lewark, 1984) und die Höhe am Baum (Raymond und MacDonald, 1998) eine Rolle. Kube und Raymond (2002) nennen für das Pilodynverfahren Kosten pro Baum von 1,50 \$, für laboranalytische Rohdichtebestimmungen veranschlagen sie 10,50 \$ pro Baum. Bei gleichem Kostenrahmen kann der Stichprobenumfang bei Anwendung des Pilodynverfahrens um den Faktor 7 gesteigert werden, was für die statistische Auswertung eine größere Datengrundlage ermöglicht.

Da die Rohdichte den Trockenmassegehalt und den Heizwert je Volumeneinheit beeinflusst, spielt sie sowohl bei der stofflichen, als auch bei der energetischen Nutzung von Aspenholz eine entscheidende Rolle. Bei der Werkseingangsvermessung von Industrieholz, die auf der Trockenmassebestimmung beruht, ist sie direkt abrechnungsrelevant (Steiner und Dunkel, 2017). Die bisherigen Untersuchungsmerkmale Überlebensrate, Durchmesser, Höhe, Form und Vitalität

Tabelle 1

Übersicht zu Rohdichteangaben bei Aspe in der Literatur (absolut trocken mit einer Holzfeuchte von 0 % (r_0))

Art	Rohdichte	Quelle	Bemerkung
Europäische Aspe	$0,43 \text{ g}/\text{cm}^3 - 0,45 \text{ g}/\text{cm}^3$	Haasemann (1964)	
Europäische Aspe	$0,37 \text{ g}/\text{cm}^3 - 0,52 \text{ g}/\text{cm}^3$ $0,41 \text{ g}/\text{cm}^3$	Bosshard (1982)	
Europäische Aspe	$0,368 \text{ g}/\text{cm}^3 - 0,438 \text{ g}/\text{cm}^3$	Scholz (1972)	
Europäische Aspe	$0,395 \text{ g}/\text{cm}^3 - 0,420 \text{ g}/\text{cm}^3$	Schneck (1985)	Ermittlung an Bohrkernen
Hybridaspe	$0,46 \text{ g}/\text{cm}^3$	Sachsse und Melchior (1984)	Hybridaspennachkommenschaft ('Holsatia')
Amerikanische Aspe	$0,42 \text{ g}/\text{cm}^3$	Gonzales (1990)	
Europäische Aspe	$0,36 \text{ g}/\text{cm}^3 - 0,56 \text{ g}/\text{cm}^3$ $0,45 \text{ g}/\text{cm}^3$	Großer und Teetz (1998)	
Europäische Aspe	$0,40 \text{ g}/\text{cm}^3 - 0,60 \text{ g}/\text{cm}^3$ $0,49 \text{ g}/\text{cm}^3$	Großer (2006)	
Hybridaspe	$0,35 \text{ g}/\text{cm}^3$	Bütow (2009)	5-jährigen Aspen von einer KUP-Versuchsfläche, Ermittlung an Stammscheiben
Europäische Aspe	$0,38 \text{ g}/\text{cm}^3$	Bütow (2009)	5-jährigen Aspen von einer KUP-Versuchsfläche, Ermittlung an Stammscheiben

sollen durch Serien-Dichteuntersuchungen mittels Pilodyn ergänzt werden, da diese Informationen für Aspennachkommenschaften auf KUP-Flächen bislang weitestgehend fehlen. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Klärung dieses Sachverhaltes anhand 9-jähriger Aspen.

2 Material und Methoden

Auf drei im Jahr 2010 im Rahmen des Verbundprojektes FastWOOD (Borschel et al., 2012; Liesebach, 2015) vom Thünen-Institut für Forstgenetik mit einjährigen Sämlingen angelegten Aspen-Nachkommenschaftsprüfungen in Altlandsberg (Brandenburg), Thammenhain (Sachsen) und Trenthorst (Schleswig-Holstein) wurden zwischen dem 29.03.2017 und dem 13.04.2017 Dichteuntersuchungen durchgeführt. Dabei wurde das als zerstörungsfrei geltende Pilodynverfahren (Cown, 1978; Görlacher, 1987; Proceq, 2003) angewendet. Es nutzt die Eindringtiefe eines 2,5 mm starken Stahlstiftes, der mittels einer definierten Energie von 6 J in den Stamm getrieben wird, zur indirekten Bestimmung der Rohdichte. Mittlere Eindringtiefe und Rohdichte stehen dabei in einem engen negativen Zusammenhang.

Als Untersuchungsmaterial dienten Aspen der im Frühjahr 2010 angelegten Versuchsserie. Der Versuch ist als vollständige Blockanlage mit 4 (Thammenhain) bzw. 5 (Altlandsberg, Trenthorst) Wiederholungen angelegt. Der Pflanzverband beträgt 2,00 x 0,75 m. Jede Parzelle besteht aus 40 Einzelbäumen (4 Reihen á 10 Bäume). Die Lage der Flächen ist Tabelle 2 zu entnehmen. Eine detaillierte standörtliche und klimatische Beschreibung der Versuchsstandorte findet sich in Heimpold (2017).

Die Flächen AS 10/1 (Altlandsberg) und Bio 11 (Trenthorst) wurden im Winter 2015/2016, also im Jahr vor der Pilodynmessung, durchforstet. Dabei wurde die Stammzahl um etwa 50% reduziert. Die Fläche AS 10/2 (Thammenhain) ist undurchforstet. Die Pilodynmessung in 1,3 m Höhe erfolgte an allen Bäumen mit einem Brusthöhendurchmesser > 50 mm. Jeder Baum wurde zweifach mit dem Pilodyngerät beprobt, die erste Messung erfolgte aus südlicher (im Reihenverlauf), die zweite Messung aus östlicher Richtung (quer zur Reihe). Die Werte wurden bei der späteren statistischen Auswertung gemittelt. Die Pilodyn-Messungen wurden bei allen Bäumen mit Rinde durchgeführt, da die untersuchten Bäume auf den

drei Versuchsflächen im ähnlichen BHD-Bereich lagen und noch keine Borke ausgebildet war. Zusätzlich erfolgte die Ermittlung des Brusthöhendurchmessers jedes Probebaumes durch Einfachklappung (Liesebach et al., 2017).

Die vorliegende Arbeit wertet die Daten der 17 auf allen drei Versuchsflächen gemeinsam vorkommenden Prüfgliedern aus. Insgesamt flossen die Daten von 1.843 Bäumen in die Auswertung ein. Der Stichprobenumfang je Prüfglied und Versuchsfläche ist Tabelle 3 zu entnehmen. Die Tabelle gibt gleichzeitig die Zuordnung der einzelnen Prüfglieder zu den Artgruppen farblich wieder. Die Einzelbaumabsaat Pinneberg dient als Kontrolle.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse über alle Versuchsorte nach folgendem Modell:

$$y_{ijk} = \mu + b_k [b_j] + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ji}$$

Dabei sind y_{ijk} der Prüfmerkmalswert der Nachkommenschaft i im Block k in Versuch j , μ das Gesamtmittel, a_i der fixe Effekt der Nachkommenschaft auf Stufe i , b_j der fixe Effekt des Versuchs auf Stufe j , $b_k [b_j]$ der fixe Effekt des Blockfaktors auf Stufe k im Versuch j , $(ab)_{ij}$ die Wechselwirkung zwischen der i -ten Nachkommenschaft und dem j -ten Versuch und e_{ji} der Zufallseffekt. Die Berechnung erfolgte mit der Prozedur MIXED des Programmpaketes SAS 9.3 unter Verwendung der ADJUST=SIMULATE Option der LSMEANS Anweisung.

Die grafischen Darstellungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2010 angefertigt.

Mit der Korrelationsanalyse (Produkt-Moment-Korrelation) wurde berechnet, ob zwischen den Merkmalen BHD und Pilodyn-Wert ein Zusammenhang besteht.

3 Ergebnisse

Aufgrund der standörtlichen Unterschiede zeigen die Aspen-Nachkommenschaften auf den einzelnen Versuchsflächen unterschiedliche Durchmesserleistungen. Ebenso zeigen sich auf den gleichen Flächen unterschiedliche Leistungsniveaus in Abhängigkeit von den Nachkommenschaften der Elternkombination. Die Auswertung über alle Versuche (Tabelle 4) erfolgt getrennt nach Europäischen Aspen, Hybridaspens und Amerikanischen Aspen und die Versuchsflächen. Die drei Gruppen sind in Abbildung 1 verschiedenfarbig hervorgehoben.

Tabelle 2

Beschreibung der im Frühjahr 2010 angelegten Versuchsflächen des Verbundprojektes FastWOOD

Versuchsfläche	Bundesland	Bodentyp	Ackerzahl	Geogr. Länge	Geogr. Breite	Höhe über NN [m]	Anzahl Prüfglieder	Anzahl Wiederholungen (aufgenommen) [n]	Aufnahmedatum
Altlandsberg (AS 10/1)	Brandenburg	Braunerde	28	13°69'O	52°54'N	57	32	5 (4)	11.-13.04.2017
Thammenhain (AS 10/2)	Sachsen	Pseudogley-Braunerde	48	12°84'O	51°43'N	149	27	4 (2)	29.-30.03.2017
Trenthorst (Bio 11)	Schleswig-Holstein	Pseudogley	58	10°51'O	53°78'N	45	28	5 (3)	05.-06.04.2017

Tabelle 3

Übersicht über die 17 auf allen drei Flächen gemeinsam angepflanzten Prüfglieder (PG) und die je Prüfglied und Versuchsfläche (AS 10/1 = Altlandsberg, AS 10/2 = Thammenhain, Bio11 = Trenthorst) erhobenen Stichprobenumfänge

Artgruppe	PG	Elternkombination	AS 10/1 [n]	AS 10/2 [n]	Bio 11 [n]	Σ [n]
ta	1	W 1 × W 52	9	17	37	63
	16	Uhyst 27 × L 311	10	25	45	80
	21	L 47 × L 317	18	8	41	67
	28	Pinneberg	6	15	11	32
ta x ts	2	Brauna 11 × Turesson 141	42	48	51	141
	3	Brauna 11 × T 46-60	56	53	54	163
	4	GrDubrau 5 × Turesson 141	32	39	44	115
	5	GrDubrau 5 × Drinkwater Rd.	47	44	45	136
	6	GrDubrau 5 × T 46-60	45	48	50	143
	7	W 1 × Turesson 141	44	48	62	154
	8	W 1 × T 46-60	39	53	58	150
	13	W 1 × Ihl 1	42	42	45	129
	20	L 4 × T 44-60	31	20	51	102
22	L 47 × Turesson 141	15	11	45	71	
ts x ta	9	T 5-61 × W 52	43	45	53	141
ts	10	T 5-61 × Turesson 141	6	42	57	105
	12	T 5-61 × T 46-60	15	52	47	114

Farblich hervorgehoben sind die drei Artgruppen (grün = Europäische Aspe, blau = Hybridaspes, rot = Amerikanische Aspe; ta = *Populus tremula*, ts = *P. tremuloides*)

Tabelle 4

Minimaler, mittlerer und maximaler BHD der Nachkommenschaften in den drei Artgruppen und auf den drei Versuchsflächen

Art	BHD Min ... Mittel ... Max [mm]			
	Altlandsberg	Thammenhain	Trenthorst	Mittel
Europäische Aspe	57...59...61	61...64...67	55...59...63	55...61...67
Hybridaspes	62...73...82	69...76...79	61...76...85	61...75...85
Amerikanische Aspe	58...60...62	63...63...63	56...63...69	56...62...69
Mittel	57...68...82	61...71...79	55...71...85	55...70...85

Tabelle 5

Minimale, mittlere und maximale Eindringtiefe bei den Nachkommenschaften in den drei Artgruppen und auf den drei Versuchsflächen

Art	Eindringtiefe Min ... Mittel ... Max [mm]			
	Altlandsberg	Thammenhain	Trenthorst	Mittel
Europäische Aspe	20...21...22	22...24...25	23...25...26	20...23...26
Hybridaspes	20...22...25	23...26...29	23...25...31	20...25...31
Amerikanische Aspe	19...21...23	25...26...27	25...26...26	19...24...27
Mittel	19...22...25	22...25...29	23...25...31	19...24...31

Abbildung 1 stellt die mittleren BHD-Werte der gemeinsamen Prüfglieder absteigend sortiert dar. Prüfglied 6 (GrDubrau 5 × T 46-60) weist über alle drei Flächen betrachtet mit 82 mm den höchsten BHD auf, gefolgt von PG 7 (W 1 × Turesson 141) und PG 9 (T 5-61 × W 52) mit jeweils 78 mm. Den letzten Rang belegt PG 28 (Kontrolle), eine freie Abblüte einer

Europäischen Aspe mit 59 mm. Der mittlere BHD über alle Prüfglieder beträgt 70 mm. Die vorderen 10 der 17 Ränge werden von Hybridaspes belegt (blaue Säulen). Auf Rang 11 folgt eine Amerikanische Aspe (PG 10: T 5-61 × Turesson 141). Die Europäischen Aspen belegen die Plätze 13 bis 15 und 17.

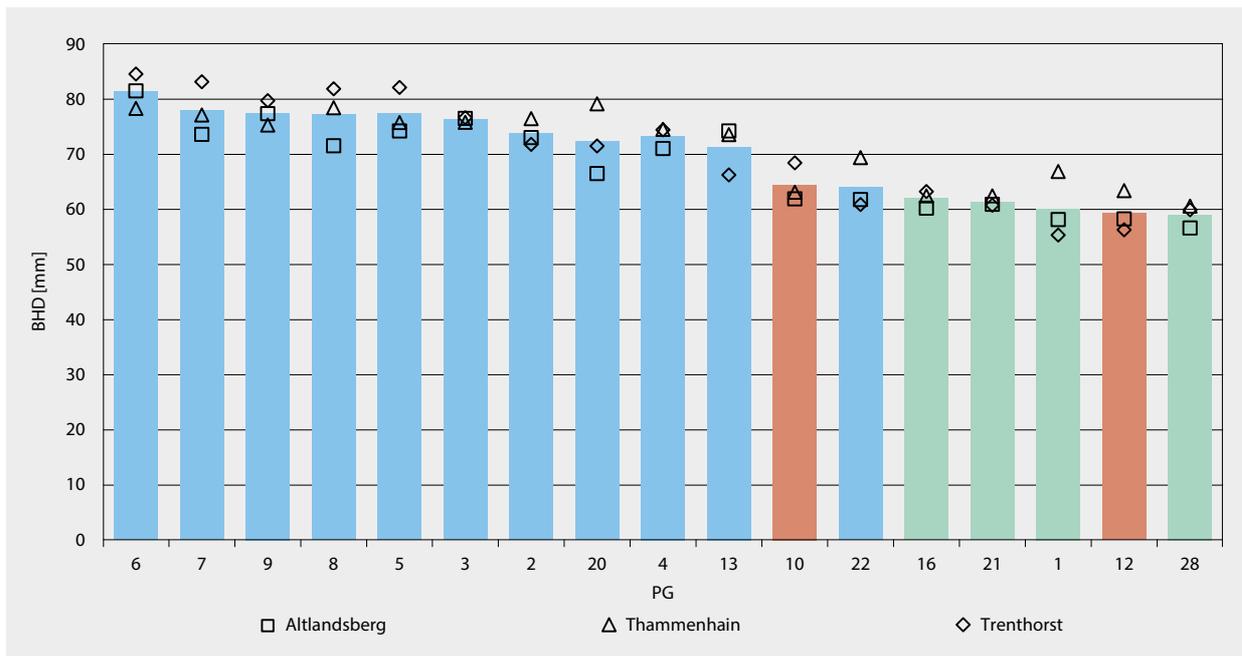


Abbildung 1

Überblick über die 17 gemeinsamen Prüfglieder (PG) mit Darstellung des Durchschnittswertes (Säule) absteigend nach BHD sortiert und der Mittel auf den 3 Versuchsflächen (grün = Europäische Aspe, blau = Hybridaspes, rot = Amerikanische Aspe)

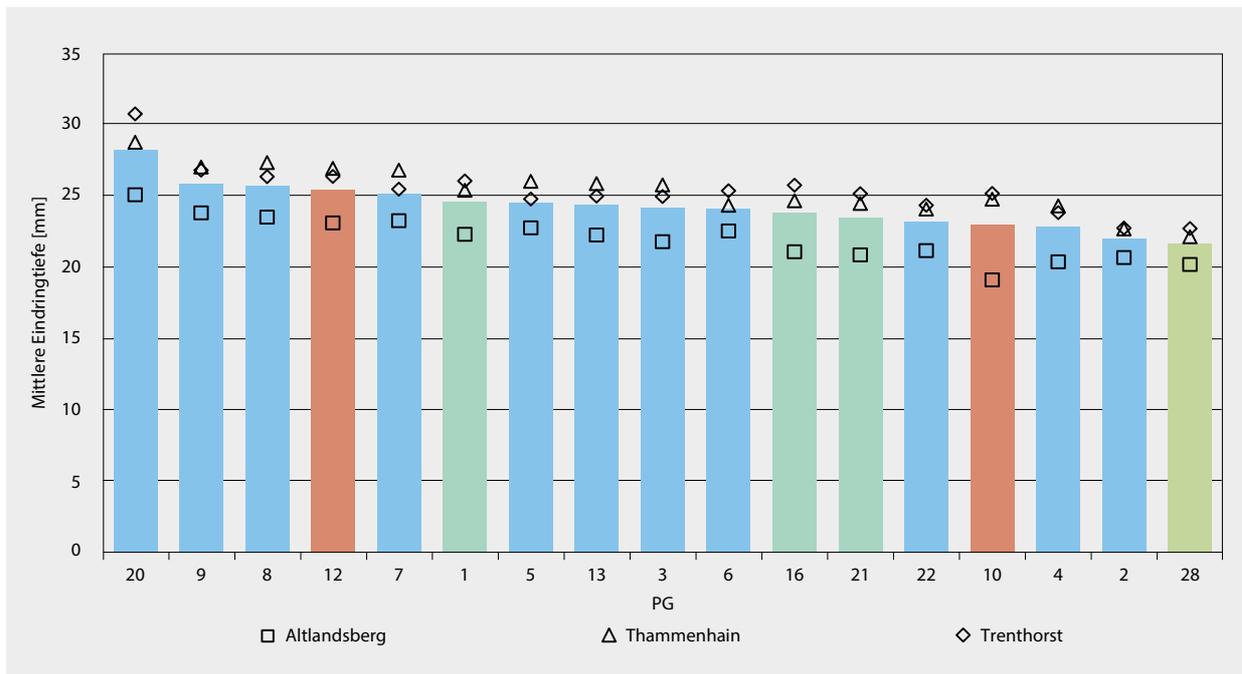


Abbildung 2

Mittelwerte der mittleren Eindringtiefe über die Versuchsserie (Säule) und für die Einzelversuche (Symbole) der 17 gemeinsamen Prüfglieder absteigend sortiert (grün = Europäische Aspe, blau = Hybridaspes, rot = Amerikanische Aspe)

Die mittlere Eindringtiefe bewegt sich bei den Europäischen Aspen zwischen 22 mm (PG 28: Kontrolle Pinneberg) und 25 mm (PG 1: (W 1 × W 52)). Im Mittel beträgt die Eindringtiefe bei den Europäischen Aspen 23 mm. Bei den Hybridaspes besitzt das PG 20 (L 4 × T 44-60) mit 28 mm die höchste mittlere Eindringtiefe, das PG 2 (Brauna 11 × Turesson 141) mit

22 mm die geringste Eindringtiefe. Im Mittel beträgt die Eindringtiefe bei den Hybridaspes 25 mm. Bei den Amerikanischen Aspen schwankt die mittlere Eindringtiefe zwischen 25 mm (PG 12: T 5-61 × T 46-60) und 23 mm (PG 10: T 5-61 × Turesson 141). Die mittlere Eindringtiefe der Amerikanischen Aspen liegt bei 24 mm (Tabelle 5, Abbildung 2).

Tabelle 6

Paarweise Mittelwertdifferenzen der mittleren Eindringtiefe der gemeinsamen Prüfglieder der drei Versuchsflächen, signifikante Unterschiede ($\alpha \leq 0,05$) gelb hervorgehoben

		PG																
		1	16	21	28	2	3	4	5	6	7	8	13	20	22	9	10	12
PG	1		1,4	1,0	3,1	2,7	0,8	2,9	0,1	1,2	-0,4	-0,6	1,1	-3,0	1,3	-0,9	2,2	0,4
	16			-0,4	1,7	1,3	-0,6	1,5	-1,3	-0,2	-1,8	-2,0	-0,3	-4,4	-0,1	-2,3	0,8	-1,0
	21				2,0	1,7	-0,2	1,9	-0,9	0,2	-1,4	-1,6	0,1	-4,1	0,2	-1,9	1,2	-0,6
	28					-0,3	-2,2	-0,2	-2,9	-1,8	-3,5	-3,7	-2,0	-6,1	-1,8	-3,9	-0,8	-2,7
	2						-1,9	0,2	-2,6	-1,5	-3,1	-3,4	-1,6	-5,8	-1,5	-3,6	-0,5	-2,4
	3							2,1	-0,7	0,4	-1,3	-1,5	0,2	-3,9	0,4	-1,7	1,4	-0,5
	4								-2,8	-1,7	-3,3	-3,5	-1,8	-5,9	-1,6	-3,8	-0,7	-2,5
	5									1,1	-0,6	-0,8	0,9	-3,2	1,1	-1,0	2,1	0,2
	6										-1,6	-1,8	-0,1	-4,2	0,0	-2,1	1,0	-0,8
	7											-0,2	1,5	-2,6	1,7	-0,5	2,7	0,8
	8												1,7	-2,4	1,9	-0,3	2,9	1,0
	13													-4,1	0,2	-2,0	1,2	-0,7
20														4,3	2,2	5,3	3,4	
22															-2,1	1,0	-0,9	
9																3,1	1,3	
10																	-1,9	
12																		

Die drei Prüfglieder mit der höchsten mittleren Eindringtiefe sind allesamt Hybridaspes. Die höchste mittlere Eindringtiefe hat das PG 20 (L 4 x T 44-60) mit 28 mm, gefolgt von PG 9 (T 5-61 x W 52) und PG 8 (W 1 x T 46-60) mit jeweils 26 mm. Auch die statistische Auswertung bestätigt die Ergebnisse, mit Ausnahme von PG 9 (T 5-61 x W 52) ist die mittlere

Eindringtiefe von PG 20 (L 4 x T 44-60) im Vergleich zu allen anderen Prüfgliedern signifikant größer (Tabelle 6). Die geringste mittlere Eindringtiefe hat PG 28 (Kontrolle) mit 22 mm.

Über alle drei Flächen und die drei Arten gibt es einen schwachen Zusammenhang zwischen BHD und Pilodyn-

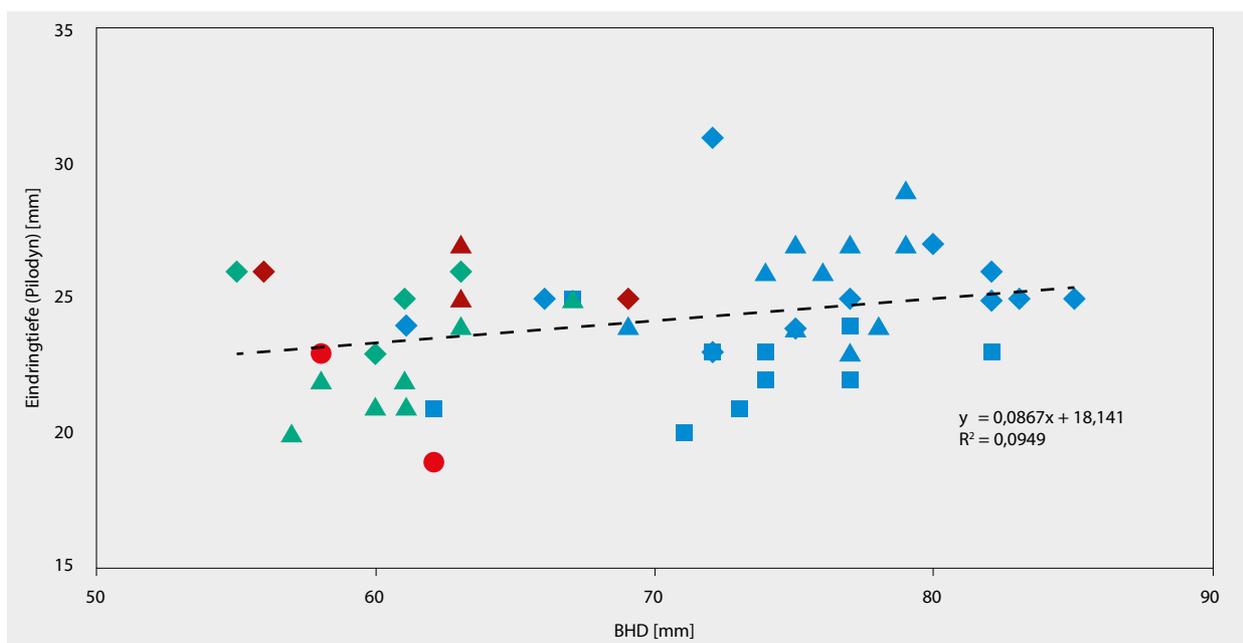


Abbildung 3

Zusammenhang zwischen BHD und Pilodyn-Wert (Flächen: Raute = Trenthorst, Quadrat = Altlandsberg, Dreieck = Thammenhain; Art: grün = Europäische Aspe, blau = Hybridaspe; rot = Amerikanische Aspe)

Tabelle 7

Zusammenhang zwischen dem BHD und der Pilodyn-Eindringtiefe (Pearson's Korrelationskoeffizient, ns = nicht signifikant $\alpha \leq 0,05$) für Flächen und Artgruppen

		Pearson's Korrelationskoeffizient
Fläche	Trenthorst	0,0859 ns
	Altlandsberg	0,4269 ns
	Thammenhain	0,4201 ns
Artgruppe	Europäische Aspe	0,3277 ns
	Hybridaspes	0,2844 ns
	Amerikanische Aspe	0,0489 ns

Wert (Abbildung 3). Auch bei getrennter Betrachtung der Flächen bzw. Arten (Tabelle 7) zeigt sich ein nur schwacher und nicht signifikanter Zusammenhang zwischen dem Durchmesser und der Eindringtiefe.

Auch innerhalb der Prüfglieder einer Versuchsfläche ergab die Untersuchung der Beziehung zwischen den Merkmalen BHD und mittlere Eindringtiefe nur in drei Fällen einen statistisch gesicherten Zusammenhang. In allen anderen Fällen war die Eindringtiefe nicht durchmesserabhängig.

4 Diskussion

In der untersuchten Versuchsserie bestätigen sich die Aussagen von Joachim (1991), Wettstein-Westerheim (1933), Melchior (1985), Wühlisch (2006) sowie Schneck und Liesebach (2015), dass die Hybridaspes oft wüchsiger sind als reine Aspen. So belegen bei der Bildung einer absteigend nach BHD sortierten Rangordnung die ersten 10 Ränge der 17 ausgewerteten Prüfglieder ausschließlich Hybridaspes. Joachim (1991) begründet das bessere Wachstum der Hybridaspes unter anderem mit einer um bis zu 6 Wochen verlängerten Wachstumsperiode durch einen früheren Austrieb und einen späteren Laubfall im Vergleich zu reinen Europäischen Aspen sowie dem Heterosiseffekt.

Die mittlere Eindringtiefe und die Rohdichte stehen in einem umgekehrt proportionalen Zusammenhang. Proceq (2003) nennt für das Pilodynverfahren einen an Kiefern-

klonen ermittelten Korrelationskoeffizienten von $r = -0,96$. Cown (1978) gibt für das Pilodynverfahren für seine Untersuchungen an *Pinus radiata* D. Don. einen Korrelationskoeffizienten von $r = -0,86$ an. Im Rahmen einer Pilotstudie von Heimpold (2018, unveröffentlicht) auf der Fläche AS 10/2 (Thammenhain) konnte ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,93$ ermittelt werden.

Das Pilodynverfahren als etablierte Methode zur Bestimmung der Holzdicke am lebenden Stamm hat zahlreiche Vor- und Nachteile. Hansen (2002) beschreibt in seiner Veröffentlichung die Vor- und Nachteile des Pilodynverfahrens (Tabelle 8).

Laut Mohrdiek (1979) und Bonnemann (1979) liegen die Rohdichten der Hybridaspes im Mittel höher als die der reinen Aspen. Dieser Sachverhalt ließ sich mit unseren Untersuchungsergebnissen nicht bestätigen. Im Mittel betrug die Eindringtiefe bei den Europäischen Aspen 23 mm, bei den Hybridaspes 24 mm und bei den Amerikanischen Aspen 25 mm. Die Differenzen lassen sich statistisch nicht sichern.

Die auf den Flächen Altlandsberg und Trenthorst durchgeführte Durchforstung hatte einen positiven Einfluss auf den Durchmesserzuwachs des verbleibenden Bestandes. Inwiefern sich dieser Mehrzuwachs auf eine verringerte Rohdichte ausgewirkt hat, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht quantifiziert werden.

Hansen (2002) führt an, dass die Richtung der ersten Messung zufällig erfolgen soll, um systematische Einflüsse des Zugholzes, beispielsweise aufgrund der Hauptwindrichtung, zu verhindern. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgängig aus südlicher und östlicher Richtung durchgeführten Messungen könnten somit zu einer Verzerrung geführt haben.

Die Verletzung des Stammes durch die Prüfnadel des Pilodyn 6J Forest ist dabei so gering, dass das Verfahren als zerstörungsfrei gilt (Görlacher, 1987; Proceq, 2003). Dies ist besonders von Vorteil, da es sich um Untersuchungen auf Versuchsflächen handelt, die ihren Versuchszweck noch nicht erfüllt haben und weiter beobachtet werden sollen.

Das Pilodynverfahren stellt ein geeignetes Verfahren zur kostengünstigen Beurteilung der Rohdichte von Aspen und Hybridaspes dar. Auch ohne Umrechnung in die Rohdichte [g/cm^3] ermöglicht es die Bildung von Rangfolgen unter den einzelnen Prüfgliedern. Das Pilodynverfahren stellt eine

Tabelle 8

Vor- und Nachteile des Pilodynverfahrens (verändert nach Hansen, 2002)

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> gute Korrelation (oft 0,8-0,9) zwischen Rohdichte und Eindringtiefe bei Betrachtung von Familien 	<ul style="list-style-type: none"> misst nur die äußeren Jahrringe (bis max. 40° mm)
<ul style="list-style-type: none"> zerstörungsfreies Verfahren 	<ul style="list-style-type: none"> nicht bei Frost anwendbar
<ul style="list-style-type: none"> zeit- und kostensparend 	<ul style="list-style-type: none"> Korrelation auf Einzelbaumebene geringer → sicheres Werkzeug zur Auswahl von Familien, weniger von Einzelbäumen mit bestimmten Dichteigenschaften
<ul style="list-style-type: none"> keine Temperatur- und tageszeitlichen Unterschiede in der Messung 	<ul style="list-style-type: none"> Unterschiede in der Eindringtiefe im Jahresverlauf bei dickborkigen Bäumen Entfernung der Rinde erforderlich

Möglichkeit dar, verwendungsrelevante holzphysikalische Parameter am stehenden Stamm zu bestimmen und als zusätzliche Informationsquelle bei der Selektion von Plusbäumen für zukünftige Züchtungsschritte zu nutzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Pilodynwert als eng mit der Rohdichte korrelierendes Maß verwendet. Eine direkte Aussage zur Rohdichte kann aber nicht getroffen werden. Weiterführende Untersuchungen sind deshalb erforderlich.

Danksagung

Die Projekte „FastWOOD“, „FastWOOD 2“ und „FastWOOD 3“ wurden bzw. werden durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft über die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e.V. gefördert (FKZ: 22011107, 22002611 und 22000514), dafür sei an dieser Stelle gedankt. Ebenso sei den Herren Stefan Jenczik und Paul Reim, beide Thünen-Institut für Forstgenetik, gedankt, die bei den Datenaufnahmen mitgewirkt haben.

Literatur

- Bonnemann A (1979) Die Eigenschaften des Pappelholzes : 6: Physikalische Eigenschaften: Rohdichte. Holz-Zentralblatt 105:1728-1731
- Borschel M, Fey-Wagner C, Janßen A (2012) Züchtung und Ertragsleistung schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb : Erkenntnisse aus drei Jahren FastWOOD, ProLoc und Weidenzüchtung. Göttingen : Univ-Verl, 346 p, Beitr NW-FVA 8
- Bosshard HH (1982) Mikroskopie und Makroskopie des Holzes. Basel : Birkhäuser, 224 p
- Bütow U (2009) Wachstum und Entwicklung unterschiedlicher Aspennachkommenschaften für die Nutzung als nachwachsender Rohstoff. Hohenheim : Univ, 46 p
- Chen Z-Q, Karlsson B, Lundqvist S-O, García Gil MR, Olsson L, Wu H X (2015) Estimating solid wood properties using Pilodyn and acoustic velocity on standing trees of Norway Spruce. *Ann For Sci* 72(4):499-508
- Cown DJ (1978) Comparison of the Pilodyn and torsionmeter methods for the rapid assessment of wood density in living trees. *J For Sci* 8(3):384-391
- dos Santos GA, Nunes ACP, de Resende MDV, Silva LD, Higa A, de Assis TF (2016) An index combining volume and Pilodyn penetration to study stability and adaptability of *Eucalyptus* multi-species hybrids in Rio Grande do Sul, Brazil. *Australian For* 79(4):248-255
- Ebert H-P (1999) Die Behandlung von nicht häufig vorkommenden Baumarten (Nebenbaumarten). Rottenburg : FHR, 177 p, Schr Fachhochschule Rottenburg 10
- Gonzales JS (1990) Wood density of Canadian tree species. Edmonton, Alberta : Northern Forestry Centre, 130 p, Inform Rep 315
- Görlacher R (1987) Zerstörungsfreie Prüfung von Holz : ein "in situ"-Verfahren zur Bestimmung der Rohdichte. Holz Roh- Werkst 45:273-278
- Großer D, Teetz W (1998) Einheimische Nutzhölzer : Pappel ; Blatt 14. Bonn : CMA, 6 p
- Großer D (2006) Das Holz der Pappeln – Eigenschaften und Verwendung [online]. Zu finden in <<https://www.lwf.bayern.de/forsttechnik-holz/holzverwendung/038606/index.php>> [zitiert am 03.09.2018]
- Haasemann W (1964) Untersuchungen zur genetisch bedingten Variation verschiedener Holzeigenschaften an Aspe (*Populus tremula* L.). Zellst Pap (4):108-111
- Hai PH, Duong LA, Toan NQ, Ha TTT (2015) Genetic variation in growth, stem straightness, pilodyn and dynamic modulus of elasticity in second-generation progeny tests of *Acacia mangium* at three sites in Vietnam. *New Forests* 46(4):577-591
- Hansen CP (2002) Application of the Pilodyn in forest tree improvement. Humblebaek : Danida Forest Seed Centre, 11 p, Techn Note / Danida Forest Seed Centre 55
- Heimpold K (2017) Untersuchungen zur zerstörungsfreien Bestimmung der Rohdichte von Pappeln der Sektion *Populus* auf landwirtschaftlich genutzten Flächen (Kurzumtriebsbestände) in den Bundesländern Brandenburg, Sachsen und Schleswig-Holstein. Berlin : Humboldt-Univ, 49 p
- Ishiguri F, Matsui R, Iizuka K, Yokota S, Yoshizawa N (2008) Prediction of the mechanical properties of lumber by stress-wave velocity and Pilodyn penetration of 36-year-old Japanese larch trees. Holz Roh- Werkst 66(4):275-280
- Joachim H-F (1991) Hybridaspens : schnellwüchsige, leistungsfähige und vielseitig einsetzbare Baumarten. Eberswalde-Finow : Inst Forstwiss, 46 p, IFE-Ber Forsch Entwickl 22
- Kube PD, Raymond CA (2002) Selection strategies for genetic improvement of basic density in *Eucalyptus nitens* [online]. Zu finden in <https://www.researchgate.net/publication/237512362_Selection_strategies_for_genetic_improvement_of_basic_density_in_Eucalyptus_nitens> [zitiert am 03.09.2018]
- Le Dinh K, Harwood CE, Duc Kien N, Baltunis BS, Hai ND, Thanh HH (2012) Growth and wood basic density of *Acacia* hybrid clones at three locations in Vietnam. *New Forests* 43(1):13-29
- Lewark S (1984) Korrekturfaktoren für Messwerte eines Pilodyn-Holzprüfgerätes aus verschiedenen Monaten. Holz Roh- Werkst 42(11):431
- Liesebach M, Wühlisch G von, Muhs H-J (1999) Von Aspenhybriden für die Biomasseerzeugung in Kurzumtriebsplantagen. In: Hofmann M (ed) Modellvorhaben „Schnellwachsende Baumarten“ : zusammenfassender Abschlussbericht. Münster : Landwirtschaftsverl, pp 240-313, Schr Nachw Rohst 13
- Liesebach M, Wühlisch G von, Muhs H-J (2000) Überlegenheit von Aspen-Arthybriden bei der Biomasseproduktion im Kurzumtrieb. Holzzucht 54(1):11-18
- Liesebach M, Schneck V, Wolf H (2012) Züchtung von Aspen für den Kurzumtrieb. In: Züchtung und Ertragsleistung schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb : Erkenntnisse aus drei Jahren FastWOOD, ProLoc und Weidenzüchtung. Göttingen : Univ-Verl, pp 71-90, Beitr NW-FVA 8
- Liesebach M (ed) (2015) FastWOOD II: Züchtung schnellwachsender Baumarten für die Produktion nachwachsender Rohstoffe im Kurzumtrieb – Erkenntnisse aus 6 Jahren FastWOOD. Braunschweig : Johann Heinrich von Thünen-Institut, 210 p, Thünen Rep 26, DOI: 10.3220/REP_26_2015
- Liesebach M, Ahrenhövel W, Janßen A, Karopka M, Rau HM, Rose B, Schirmer R, Schneck D, Schneck V, Steiner W, Schüler S, Wolf H (2017) Planung, Anlage und Betreuung von Versuchsflächen der Forstpflanzenzüchtung : Handbuch für die Versuchsanstellung. Braunschweig : Johann Heinrich von Thünen-Institut, 80 p, Thünen Rep 49, DOI:10.3220/REP1496222427000
- Melchior GH (1985) Die Züchtung von Aspe und Hybridaspens und ihre Perspektiven für die Praxis. *Allg Forst Jagdzeitg* 156:112-122
- Mishima K, Iki T, Hiraoka Y, Miyamoto N, Watanabe A (2011) The evaluation of wood properties of standing trees in sugi (*Cryptomeria japonica*) plus tree clones selected in Kanto breeding region. *J Jpn Wood Res Soc* 57(5):256-264
- Mohrdiek O (1979) Zur Holzdichte und Faserlänge bei *Populus-Leuce*-Arten. Holzzucht 33:23-26
- Nunes ACP, de Resende MDV, dos Santos GA, Alves RS (2017) Evaluation of different selection indices combining Pilodyn penetration and growth performance in *Eucalyptus* clones. *Crop Breed Appl Biotechnol* 17(3):206-213
- Proceq (2003) Holzprüfgerät PILODYN 6J für die Prüfung von Leitungsmasten [online]. Zu finden in <http://www.hoskinscientifique.com/uploadpdf/Instrumentation/Proceq/hoskin_Pilodyn_d_e4120c22b6e547.pdf> [zitiert am 05.09.2018]
- Raymond CA, MacDonald AC (1998) Where to shoot your pilodyn : within tree variation in basic density in plantation *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* in Tasmania. *New Forests* 15:205-221
- Sachsse H, Melchior GH (1984) Über das Holz der Hybridaspensfamilie „19/51“ ('*Holsatia*') von zwei Versuchsorten. *Holzforschung* 38:297-308

- Schneck H (1985) Neuzüchtungen zur Ertragssteigerung des Aspenanbaus auf mittleren Standorten im Pleistozän der DDR. *Beitr Forstwirtschaft* 19(2):74-77
- Schneck V, Liesebach M (2015) Potenziale von Aspe im Kurzumtrieb. *Thünen Rep* 26:15-27
- Scholz E (1972) Vorschlag für die Anerkennung einer Hochzuchtsorte der Aspe. Forschungs- und Entwicklungsarbeit am Institut für Forstwissenschaften Eberswalde (unveröffentlicht)
- Steiner W, Dunkel K (2017) Holzvermessungsanweisung (HVA) : Grundsatzanweisung zur Vermessung von Rohholz für alle Holzverkäufe durch den Landesbetrieb Landesforsten Rheinland-Pfalz [online] Zu finden in <https://www.wald-rlp.de/index.php?eID=tx_securedownloads&u=0&g=0&t=1877716779&hash=a9842e2eb0de8f2c2bb27dd745bcacdae-074ab1c&file=fileadmin/website/downloads/vermarktung/rva.pdf> [zitiert am 03.09.2018]
- Thünen-Institut (2012) Dritte Bundeswaldinventur : Ergebnisdatenbank ; Auftragskürzel: 77Z1JL_L657of_2012_bi_LB [online]. Zu finden in <<https://bwi.info>>, Archivierungsdatum: 2014-7-22 8:24:31.947, Überschrift: Waldfläche (gemäß Standflächenanteil) [ha] nach Land und Laubbaumart, Filter: Jahr=2012 [zitiert am: 05.09.2018]
- Wang J-H, Zhang S-G, Zhang J-G, Sun X-M, Zhu J-L, Liang B-S, Qi W-Y (2008) Research on applying the pilodyn in wood property breeding of *Larix kaempferi*. *Linye Kexue Yanjiu* 21(6):808-812
- Wettstein-Westerheim W von (1933) Die Methode der gelenkten Kreuzung und die Beschreibung von F1-Hybriden bei Pappel. *Z Pflanzenzücht* 18:597-626
- Wu S, Xu J-M, Li G-Y, Vuokko R, Lu Z-H, Li B-Q, Wang W (2010) Use of the pilodyn for assessing wood properties in standing trees of *Eucalyptus* clones. *J Forestry Res* 21:68-72
- Wühlisch G von (2006) Ergebnisse der Züchtung von Pappeln und Aspen in Großhansdorf : Perspektiven für die Energie- und Rohstoffherzeugung. *Vortr Pflanzenzüchtung* 70:157-170
- Wühlisch G von (2016) Pappeln und Weiden in Deutschland : Bericht der Nationalen Pappelkommission 2012-2015. Braunschweig : Johann Heinrich von Thünen-Institut, 15, XVIII p, Thünen Working Paper 62, DOI:10.3220/WP1471853422000
- Zhang S, Luan Q, Jiang J (2017) Genetic variation analysis for growth and wood properties of slash pine based on the non-destructive testing technologies. *Linye Kexue/Scientia Silvae Sinicae* 53(6):30-36
- Zhu J-L, Wang J-H, Zhang S-G, Zhang J-G, Sun X-M, Liang B-S, Zhao K (2009) Using the pilodyn to assess wood traits of standing trees *Larix kaempferi*. *Linye Kexue Yanjiu* 22(1):75-79

Variable genotypes at the cpDNA marker locus *trnDT* in spontaneous rejuvenation of the species complex around the European black poplar (*Populus nigra* L.) and its relatives collected in Germany

Matthias Meyer*, Melanie Zacharias* **, Kristin Morgenstern*, Doris Krabel* and Heike Liesebach***

Abstract

Young poplars of the *Aigeiros-Tacamahca*-complex in spontaneous rejuvenation in Germany that grew along shores, mainly in gravel mines, were sampled and cultivated *ex situ*. The leaf phenotype was assessed. The cpDNA marker locus *trnDT* was investigated which is suitable for the genetic assignment of the chloroplast DNA to a poplar species. The results of Heinze (1998), who investigated the locus *trnDT* in poplars, were chosen as a reference to account for potential methodological differences between the present fragment length analysis results and that obtained with classic gel electrophoresis.

The assignment of each individual to a leaf phenotype category allowed a basic differentiation of *P.-nigra*- or *P.-deltoides*-like and other leaf shapes. At the cpDNA marker locus *trnDT*, fragment lengths referring to the two variants described by Heinze (1998) or referring to at least one more variant were found. The third genotype is of intermediate length between the two that were described by Heinze (1998) and, very likely, the related fragments (approx. 1,065 base pairs = bp long) are specific for balsam poplar species. Quantitatively, the *P.-nigra*-related genotype was the most important in the present collection. It is shown that phenotypically *Aigeiros*-like rejuvenation does predominantly, but not in all individuals, carried the related *trnDT* marker fragments specific for *P. nigra*.

The seed cloud of the *Aigeiros-Tacamahaca*-complex resulting in the present rejuvenation sample trees was predominantly based on diaspores of *P. nigra* or of intra-specific *Aigeiros*-hybrids. However, the section *Tacamahaca* has contributed to the seed cloud. The results suggest that there must be significant gene flow from alien or hybrid poplars in Germany. Further genetic investigations with microsatellite markers are carried out in the present poplar collective for more detailed quantification of the taxonomic composition.

Keywords: Genetic introgression, spontaneous hybridization, short rotation coppice, invasive species

Zusammenfassung

Unterschiedliche Genotypen am cpDNA Genort *trnDT* in spontan aufgelaufener Verjüngung des Artkomplexes um die Europäische Schwarz-Pappel und deren Verwandte in Deutschland

Pappeln (Artkomplex um *P. nigra*) aus spontan aufgelaufener Verjüngung in Deutschland wurden beprobt und *ex situ* kultiviert. Der Blattform-Phänotyp wurde erfasst. Der cpDNA-Marker-Genort *trnDT* wurde analysiert, der für die genetische Zuordnung der cpDNA zu einer Pappelart geeignet ist. Die Analyse-Ergebnisse von Heinze (1998) am Genort *trnDT* in Pappeln wurden als Referenz genutzt, um bei der Interpretation der Fragmentlängen-Ergebnisse mögliche methodisch bedingte Fragmentlängenunterschiede zur klassischen Gel-elektrophorese zu beachten.

Es erfolgte mit Hilfe des Blattform-Phänotyps eine grobe Unterscheidung von *P.-nigra*- bzw. *P.-deltoides*-artigen Pappeln sowie Arten mit anderen Blattformen. Am cpDNA Genort *trnDT* wurden Fragmentlängen verzeichnet, die 2 von Heinze (1998) beschriebenen Varianten oder einem 3. Genotyp zuzuordnen waren. Dieser 3. Genotyp weist eine zu den 2 anderen intermediäre Fragmentlänge auf. Vermutlich sind diese ca. 1.065 bp langen Fragmente den Balsam-Pappeln zuzuordnen. Das *P.-nigra*-spezifische Fragment kam am häufigsten vor. Die phänotypisch *Aigeiros*-artige Verjüngung trug vorwiegend ein *P.-nigra*-spezifisches Markerfragment am Genort *trnDT*.

Die Samenwolke, die die Verjüngung hervorbrachte, basierte vorwiegend auf Diasporen der Art *P. nigra* oder intra-spezifischen Hybriden. Daneben hat die Sekt. *Tacamahaca* zur Samenwolke beigetragen. Die Ergebnisse legen einen von nicht-heimischen Pappeln oder Hybriden ausgehenden Genfluss in Deutschland nahe.

Schlüsselwörter: Genetische Introgression, spontane Hybridisierung, Kurzumtriebsplantage, invasive Art

* Dresden University of Technology, Institute of Forest Botany and Forest Zoology, Molecular tree physiology group, Piener Strasse 7, 01737 Tharandt

** Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, Institute of Botany and Landscape Ecology, Soldmannstraße 15, 17489 Greifswald

*** Johann Heinrich von Thünen Institute, Thünen Institute of Forest Genetics, Sieker Landstrasse 2, 22927 Grosshansdorf

1 Introduction

Poplar species (*Populus* spp.) comprise some of the fastest growing tree species of the northern hemisphere, some of which are able to form hybrid swarms among native stands and with cultivated (hybrid) forest stands, shelter belts, alleys or ornamentals. Even species of two different taxonomic poplar sections, the black and the balsam poplars (*Populus* spp. sections *Aigeiros* Duby and *Tacamahaca* Spach), are able to hybridize interspecifically under certain natural conditions. Due to the hybrid vigor, the inter-specific F1 hybrid offspring frequently shows extraordinary fast growth and partially also superior yield. For at least 100 years, the inter- and intra-sectional compatibility was utilized for hybridization breeding followed by clonal propagation of elite clones (Henry, 1914; Houtzagers, 1937; Schreiner and Stout, 1934). There are hundreds of selected clones for both ornamental use and forest or, respectively, agricultural wood production. But only some of them have become very widespread and are now rather overrepresented genotypes in the diaspore clouds.

The European black poplar *Populus nigra* L. is the only species of the *Aigeiros* section native to Europe, Near East and North Africa (Isebrands and Richardson, 2013). In Germany, it is threatened due to the loss of its natural alluvial habitats, especially of sand or gravel banks that allow for the successful germination and seedling survival (Schmitt et al., 1996) and due to genetic introgression of foreign gene material. However, *P. nigra* has intensively been used in many European states that possess big rivers on their territories (van Dam and Bordács, 2002), for hybridization-breeding and for landscaping (e.g. selected forms like the Lombardy poplar, *P. nigra* cv. '*italica*'). In addition, *P. nigra* is a flagship wild species of the riparian ecosystems in floodplains and along shores of European rivers, like the Danube, the Rhine or the Elbe in Germany (Franke et al., 1997; Schmidt and Huber, 2010; Tröber and Wolf, 2015). Especially in floodplain landscapes, hybrid poplar clones have been cultivated (e.g. Böcker and Koltzenburg, 1996) for producing lightweight wood for several historical or rather modern uses, mainly for veneer production, fruit and cheese packaging, pulp and paper, wood composites, matches or carved shoes, matrices and vats. Some European regions, e.g. at the Upper and at the Lower Rhine, partially gather their specific landscape character from monumental poplar rows. During the last 40 years, short rotation tree cropping with poplars has become a major research focus, either for developing wood-based bio-energy supply chains or for establishing bio-based value chains in European bio-economy.

In particular the riparian regions where both the native black poplars and the hybrid clone plantations grow neighbored, the ability of *P. nigra* to spontaneously hybridize bears the risk for genetic introgression into the native *P. nigra* genepool. In the worst case, this genepool can become totally altered by the gene flow from non-native or hybrid individuals. Therefore, the legal framework for the use of non-native or hybrid poplar trees in forests, short rotation coppices

(SRC), landscaping or shelterbelts, fosters the protection of the native black poplar genepool.

The potential and the actual extent of genetic introgression into the European genepool of *P. nigra* are still debated (Csencsics and Holderegger, 2016; van Dam and Bordács, 2002). In Germany, recent investigations revealed that there are still considerable numbers of old growth black poplar trees in some regions but rather scarce rejuvenation (e.g. Tautenhahn et al., 2007).

In the FastWOOD project, several partners had the objective to select individuals from native stands and rejuvenation. For the present work, it was initially intended to collect and cultivate wild growing hybrid or potentially native juvenile individuals for future crossbreeding. Later, genetic investigations were carried out in the collection to assess how important the alien diaspores have been for the origination of the sampled wild rejuvenation. Based on a microsatellite approach (Liesebach et al., 2010a; Liesebach et al., 2010b; Rathmacher et al., 2009; Wypukol et al., 2008), collected individuals had to be identified which had originated from unintentionally released propagation material of yet existing cultivars that had to be excluded from the new collection.

For the present work, the DNA (cpDNA) marker *trnDT* was used. It allows the distinction between cpDNA of the two black poplar species *P. nigra* and *P. deltoides* (Heinze, 1998). Within in the present poplar collection, the leaf phenotype was recorded. For the present collection, it was the objective to assess how frequent individuals that exhibit a *P.-nigra*-like leaf phenotype do not carry the *P.-nigra*-specific *trnDT* marker fragment.

2 Material and Methods

2.1 Sampling rejuvenation, ex situ cultivation and leaf phenotype

In Germany, sites which are suitable for poplar seed germination and subsequent rejuvenation establishment are scarce (Schmitt et al., 1996; Tautenhahn et al., 2007), and they often belong to conservation areas in near-natural floodplains. As the initial objective of the present work was scion sampling for *ex situ* cultivation, which can result in severe impact on smaller sampled poplar seedlings, we had to avoid conservation areas. Therefore, poplar rejuvenation, apparently belonging to the sections *Aigeiros* or *Tacamahaca*, was sampled only on anthropogenic wetland biotopes like in actively working gravel mines. Using publicly available google satellite images, open mineral soil areas that comprise shore lines with water bodies were identified in five German federal states (14 sampling sites, Figure 1, Table 1). After contacting the land owners, sampling was carried out in the late winter or early spring seasons between 2008 and 2015. Mainly, rejuvenation which had survived the seedling stage was found along the shores of artificial lakes or, only partially, in river bank reinforcements. A visual assessment of the site and of the individuals growing in succession stands of poplars and willows was carried out to avoid sampling of root suckers growing of unintentionally transplanted roots. No rubble

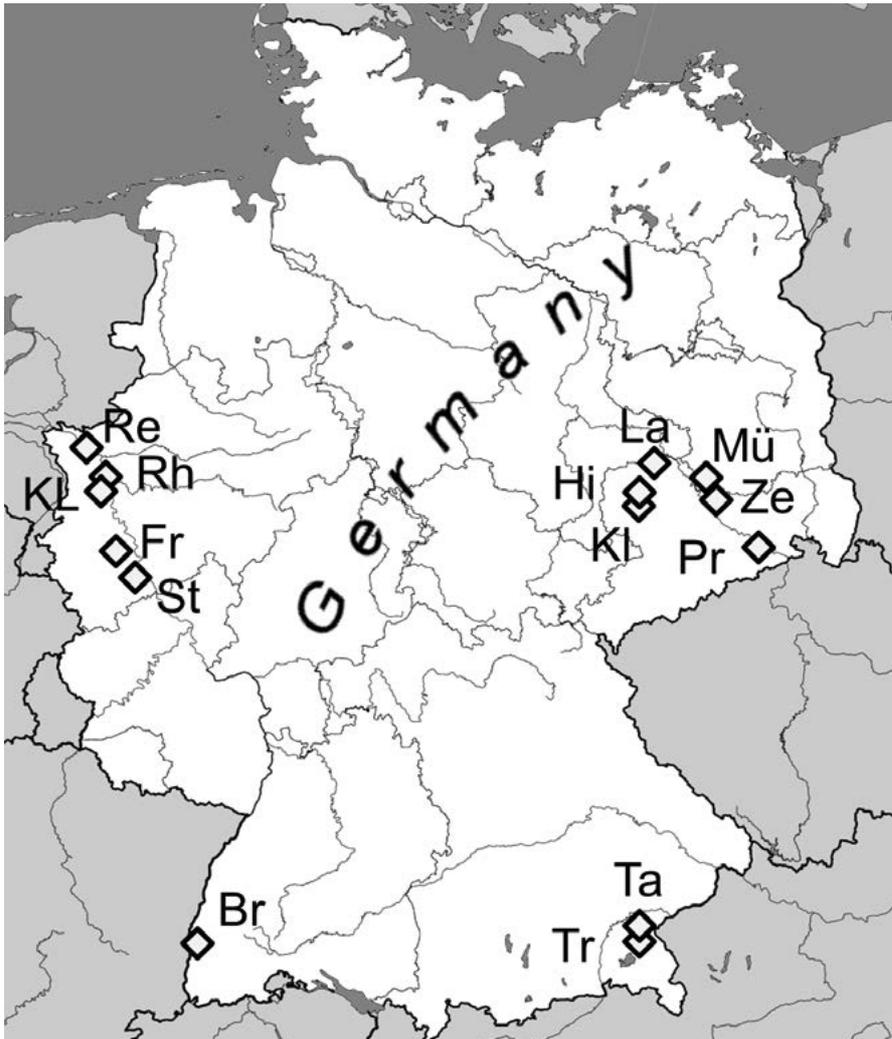


Figure 1

Sampling sites, given with abbreviations as explained in Table 1. Map file originally published by NordNordWest, download from <<https://commons.wikimedia.org>> (under the license described at <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>>), image was modified.

fields or other ruderal sites bearing the risk for anthropogenic root deposition were sampled. If possible, some young trees were torn out to check whether the root system originated from displaced roots or branches. Such rejuvenation was not sampled. Only individuals that (most likely) originated from seed disposal and germination were collected. The height of sampled individuals was between approximately 0.5 m and several meters corresponding with the late seedling or with the sapling stage, respectively. The spatial distribution and number of young poplars was very variable within and among the collection sites. Also, the collection sites varied substantially in their area. Therefore, no equal sample size per site and no equal sampling systematics were applied. In case of more abundant rejuvenation, only dominant individuals were sampled that were spatially distributed over the rejuvenation stand.

One top shoot per individual was cut off for cultivation *ex situ* in the experimental garden at the Department of Forest Sciences of the TU Dresden in Tharandt, Germany. Cuttings of

approximately 20 cm length were planted in QuickPot nursery trays (0.65 l pot volume, HerkuPlast Kubern GmbH). All individuals were grown in a substrate mixture consisting of 2 parts by volume of sand and one part of the planting substrate ED73 (Einheitserde Werkverband e.V., distributed by Hermann Meyer KG). Older plants of the collection were cut back once or twice after several years. During cultivation, 28 genotypes died back, and only 143 of the formerly collected 171 genotypes were sampled for the present genetic and leaf analyses (Table 1).

In the summer 2016, leaves were visually assessed and the shape of mature leaves of the genotypes was assigned to leaf phenotype categories described in the taxonomic identification key of Roloff et al. (2014) (Table 2). Three to four fully developed, healthy and non-chlorotic leaves were sampled per genotype from positions between 50 to 75% of plant height, approximately. At that time, the shoots of the potted plants in the genotype collection were in their 2nd or 3rd year of growth and approximately 0.5 to 1 m high. The

Table 1

Sampling sites, given with the federal state in Germany (BW Baden-Württemberg, BY Bavaria, BRB Brandenburg, NRW North-Rhine Westphalia, SN Saxony), and with the closest river plain or stream plain that the site is closely situated to

Municipality	Sampling site		Total no.			No. of genotypes per cpDNA class		
	Federal state	Closest river or stream	collected	dying	cpDNA sampled	< 900 bp	1,000- 1,100 bp	> 1,100 bp
Breisach (Br)	BW	(Upper) Rhine	5	3	2	2	-	-
Tacherting (Ta)	BY	Alz	13	2	11	11	-	-
Trostberg (Tr)	BY	Alz	19	3	16	5	10	1
Mühlberg (Mü)	BRB	Elbe	4	1	3	3	-	-
Frechen (Fr)	NRW	Erfurt	6	1	5	-	3	2
Straßfeld (St)	NRW	Erfurt	9	-	9	1	8	-
Kamp Lintfort (KL)	NRW	(Lower) Rhine	10	-	10	5	4	1
Rees (Re)	NRW	(Lower) Rhine	12	1	11	7	1	3
Rheinberg (Rh)	NRW	(Lower) Rhine	43	9	34	19	13	2
Pratzschwitz (Pr)	SN	Elbe, Wesenitz	9	1	8	1	4	3
Zeithain (Ze)	SN	Elbe	14	1	13	11	2	-
Laußig (La)	SN	Mulde	9	1	8	6	-	2
Kleinpösna (KI)	SN	Parthe	9	1	8	5	-	3
Hirschfeld (Hi)	SN	Parthe	5	-	5	4	1	-
Total			171	28	143	80	46	17

Total numbers; i.e. the number of collected genotypes; the number of genotypes that died in cultivation; the number of successfully ex situ sampled genotypes for the present analysis; as well as the number of genotypes assigned to cpDNA-genotype classes carrying the trnD marker fragment with the estimated length of approximately 865 bp (here < 900 bp, referring to *P. nigra*), or approximately 1,065 bp (1,000-1,100 bp, likely referring to the section *Tacamahaca*) or approximately 1,135 bp (> 1,100 bp, referring to *P. deltooides*), Heinze (1998), see Figure 2.

plants were all equally suppressed in growth due to the small pot volume.

2.2 DNA extraction, analysis of the cpDNA locus trnD

The sampled leaves of each collected genotype were used for DNA extraction. In addition, to provide reference cpDNA samples with known taxonomic identity, eight trees were sampled in the Saxon State Arboretum (Tharandt Forest Botanic Garden of the TU Dresden, Tharandt, Germany), or material was received from the Northwest German Forest Research Institute (NW-FVA, Hannoversch Münden, Germany). Among the 8 reference genotypes were 4 *P. nigra* (2 from the arboretum, 1 from the NW-FVA (NW9-487D, cv. 'Rheinaue') and 1 natural monument from Dresden, Germany), 2 *P. trichocarpa* (cv. 'Brühl 8'; and one from the arboretum), 1 *P. maximowiczii* and 1 *P. deltooides* (both from the arboretum). All samples were frozen until further laboratory processing. For one extraction sample, 100 mg of healthy leaf material was weighed and milled for 3 min at $f = 30$ Hz with a vibration mill, type MM200 (Retsch GmbH, Haan, Germany). The DNeasy Plant Mini Kit was used and the related handbook protocol of the manufacturer (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) was followed. Extraction success was tested on agarose gels (1.5% gel, (150 ml TBE solution + 2.25 g agarose); $V_{\text{sample}} = 3.0 \mu\text{l}$ (2.0 μl of template DNA solution + 1.0 μl of 6X DNA Loading Dye, ThermoScientific); run for 60 min at 120 V in a midi electrophoresis unit; staining with

ethidium bromide). The PCR was carried out using the fprimer *trnD* (ACC AAT TGA ACT ACAATC CC) and the rprimer *trnT* (CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG) as described in Heinze (1998), based on the work of Demesure et al. (1995). The fragment length estimates given by Heinze (1998) are approximately 850 bp (*P. nigra*) and approximately 1,050 bp (*P. deltooides*). For the present work, slightly different fragment length values were expected, because a capillary unit was used for fragment length estimation (described below) instead of classical gel electrophoresis which was used by Heinze (1998). This cpDNA marker locus was chosen because it detects fragment length polymorphisms between *P. nigra* and *P. deltooides* with the PCR step only, without applying a subsequent restriction enzyme digestion. The same simple and very effective method was successfully applied by Ziegenhagen et al. (2008) and by Bialozyt et al. (2012). Another length polymorphism between *P. nigra* and *P. deltooides* (*psbA-matK*) amounts to 6 bp only (Schroeder et al., 2017). Several SNPs to distinguish *P. nigra* and *P. deltooides* are located within fragments of identical length (Schroeder et al., 2012) and need more laboratory efforts.

The PCR was carried out with a C1000TM cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) in 25 μl reaction volume (0.5 μl of template DNA solution (20 ng/ μl) and 0.5 μl of each primer solution were taken up in a master mix consisting of 10.0 μl H₂O, 12.5 μl TopTaq Master Mix and 1.0 μl MgCL₂ solution, both Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The initial denaturation was carried out for 3.0 min at 94 °C,

followed by 35 cycles of 30 sec denaturation at 94 °C, 30 sec annealing at 57 °C, 60 sec of elongation at 72 °C, and followed by a final elongation of 600 sec at 72 °C (final cooling step at 10 °C). The success of the PCR was tested on agarose gels (same gel and run conditions as described above for extraction products, but 5 µl of PCR products were loaded).

The final fragment length estimation was carried out with the parallel capillary electrophoresis instrument 'FragmentAnalyzer™' and the related software package PROSize 2.0 (Advanced Analytical Technologies GmbH, Heidelberg, Germany). The dsDNA Reagent Kit, 35 bp – 5,000 bp, DNF915 was used (Advanced Analytical Technologies GmbH), and the separation run time was 80 min. To assess the accuracy of this technique, little information is available. One possible true length of 961 bp for the *trnD-trnT* PCR fragment is given for *P. trichocarpa* (clone Nisqually1, Tuskan et al. 2006, GenBank Accession EF489041.1). The respective fragment length for a *P. nigra* sample amounts to 819 bp (GenBank Accession KX377117.1). For *P. deltoides*, comparable chloroplast sequence data are not yet available. The mean deviation of the fragment length estimations with the FragmentAnalyzer™ is approximately 5 % to 10 % (referring to approximately ± 50 to ± 100 bp ranging uncertainty for length estimates of 1,000 bp long fragments) in the laboratory where the present investigation was carried out (Figure 3).

2.3 Data processing and statistics

Data graphs were generated and statistical tests were performed with SPSS Statistics for Windows version 25.0.0 (IBM, Armonk, NY, USA). It was tested whether there are significantly different fragment length (FL) estimates (FragmentAnalyzer™) for the *trnDT* amplicon across the subgroups which

exhibited different leaf phenotypes. Two subgroups of the factor variable 'leaf phenotype' comprised only two individuals (oval, elliptic). These subgroups, in total 4 of 143 individuals, were excluded. Hence, five subgroups were considered for testing quadrangular, triangular, triangular-oval (all *Aigeiros*-like), ovate or ovate-lanceolate (both *Tacamahaca*-like). The subgroups had unequal sample size ($n = 11$ to 69, Table 2, last column), and the assumptions of normality of FL data within, and of homogeneity of FL variances among subgroups were clearly violated. Therefore, the FL difference was tested pairwise across the leaf phenotype subgroups with non-parametric MannWhitney Utests ($\alpha = 0.05$).

3 Results

The genetic investigation of the collected 143 poplar individuals at the cpDNA locus *trnDT* revealed three maxima in the distribution of fragment length (FL) values which were estimated for the amplicons by means of capillary electrophoresis (FragmentAnalyzer™). The histogram (Figure 2) suggested the existence of three different FL classes at the locus *trnDT*. This is at least one FL class more than described in the work of Heinze (1998). The first FL class comprised all genotypes with fragment length values shorter than 900 bp, the second class all samples with values between 1,000 and 1,100 bp, and the third class all with values longer than 1,100 bp. The mean FL values per class were 865 bp (standard error ± 1.1), 1,065 bp (± 2.4), and 1,135 bp (± 3.0) (given as \bar{x} in Figure 2).

The reference genotypes which were sampled in the Saxon State Arboretum had the analysis results shown in Figure 3. The *trnDT* amplicons of the four *P. nigra* reference

Table 2

Leaf phenotypes found in the *ex situ* cultivated poplar (*Populus* spp.) collection, separately counted in cpDNA-genotype classes carrying the *trnDT* marker fragment with the estimated lengths of < 900 bp (assigned to *P. nigra*), 1,000-1,100 bp (likely referring to the section *Tacamahaca*) or > 1,100 bp (assigned to *P. deltoides*)

	Leaf phenotype	Number of individuals per cpDNA-genotype class			Total
		< 900 bp	1,000-1,100 bp	> 1,100 bp	
<i>Aigeiros</i> -like	quadrangular ^a 	10	–	1	11
	triangular ^a 	11	1	2	14
	triangular-oval ^a 	57	2	10	69
<i>Tacamahaca</i> -like	oval 	–	1	1	2
	ovate ^b 	1	30	2	33
	ovate-lanceolate ^b 	1	10	1	12
	elliptic 	–	2	–	2
	Total	80	46	17	143

^{a,b} Subgroups a and b leaf phenotypes have significantly different fragment length estimates at the cpDNA marker locus *trnDT* (*p*-values in Table 3, subgroups oval and elliptic were not included in testing due to minor sub-sample size).

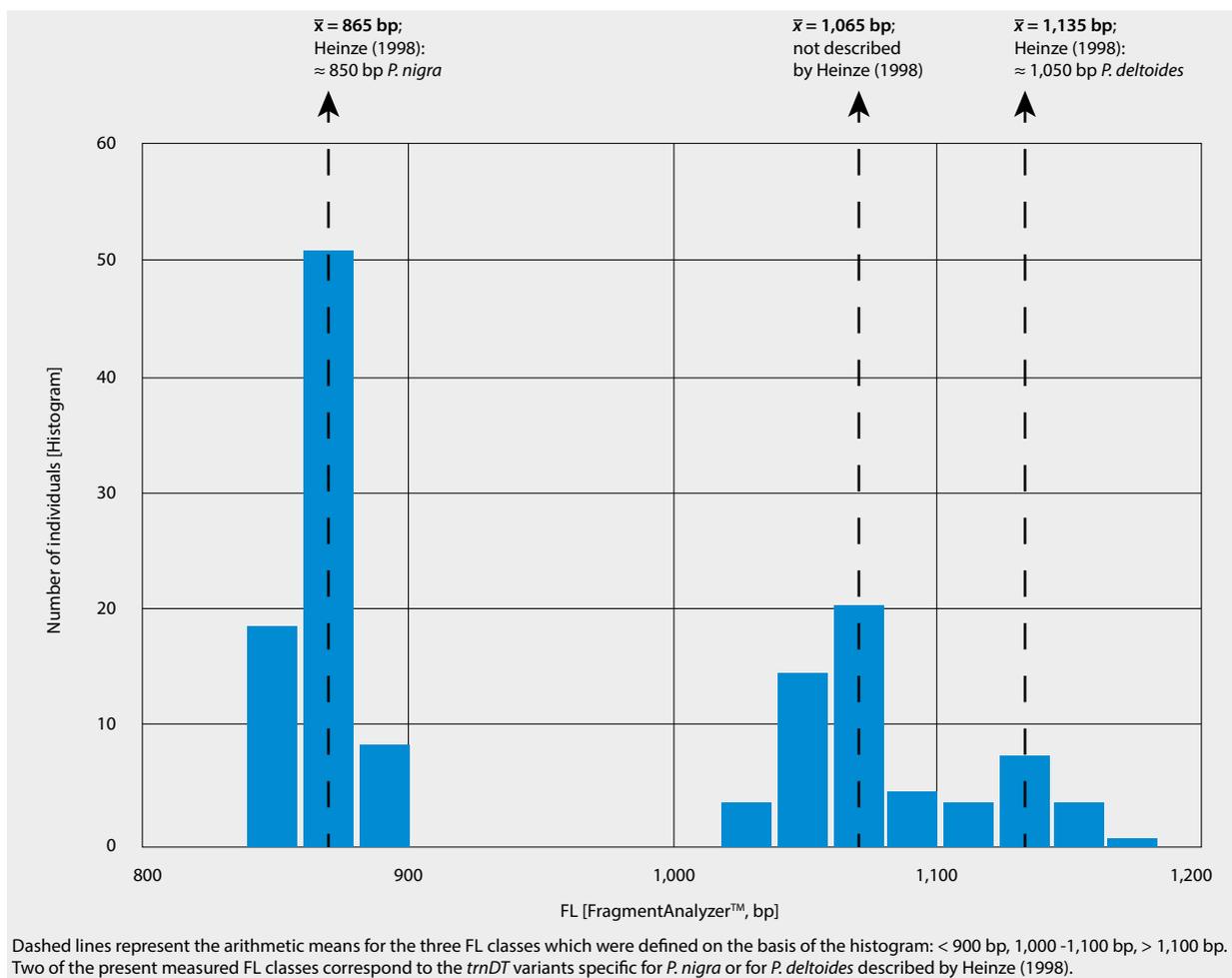


Figure 2

Histogram showing the number of genotypes per class of the fragment length (FL) in base pairs [bp] which was obtained with the FragmentAnalyzer™ (Advanced Analytical).

genotypes were estimated to be 873 or 882 bp long, that of the *P. deltoides* reference genotype was 1,155 bp long, and those of the three balsam poplars were 1,093 (*P. maximowiczii*), 1,074 or 1,098 bp long (*P. trichocarpa*), respectively. Both estimates given by Heinze (1998), that for the *trnDT* fragment specific for *P. nigra* and that specific for *P. deltoides*, were shorter than the respective mean fragment length values for the FL classes in the present work (850 bp vs. 865 bp for *P. nigra* and 1,050 bp vs. 1,135 bp for *P. deltoides*).

Seven leaf phenotypes (following the classification system of Roloff et al., 2014), were observed in the present poplar collection: quadrangular, triangular, triangular-oval, oval, ovate, ovate-lanceolate and elliptic leaf shapes (Table 2). 69 of the 143 investigated individuals carried triangular-ovate leaves. Together with the triangular ($n = 14$) and the quadrangular ($n = 11$) phenotypes, these three long-petiole phenotypes are often taxonomically assigned to the black poplar species *P. nigra* and *P. deltoides* (section *Aigeiros*). As it turned out, the majority of these *Aigeiros*-like leaf phenotypes were associated with the *trnDT* fragment length of approximately 865 bp ($n = 78$) or, to a smaller extent, with the FL of 1,135 bp ($n = 13$). Only three of the phenotypically *Aigeiros*-like

individuals were genotypes with the FL of approximately 1,065 bp. However, their FL estimates and their class assignment may be false due to the measurement uncertainty described in the Material and Methods chapter. One of the three individuals had a FL estimate very close to the 1,100 bp class boundary, and its *trnDT* variant possibly belongs rather to *P. deltoides*.

The mean fragment length of 1,065 bp was, in turn, mainly associated with leaf phenotypes that are often taxonomically assigned to balsam poplar species (oval, ovate or elliptic leaves with rather short petioles). The majority of the individuals showing balsam-poplar-like (*Tacamahaca*-like) leaves exhibited the ovate leaf phenotype. 30 of 33 individuals with an ovate leaf phenotype as well as 10 of 12 individuals with ovate-lanceolate leaves belonged to the genotypes with the approximately 1,065 bp long fragment.

The Mann-Whitney U-tests, which were performed pairwise across the leaf phenotype subgroups to test for significant FL differences, were not significant between the three *Aigeiros*-like leaf phenotypes and not between the two major *Tacamahaca*-like leaf phenotypes (p-values in Table 3). Instead, the FL difference was significant for all

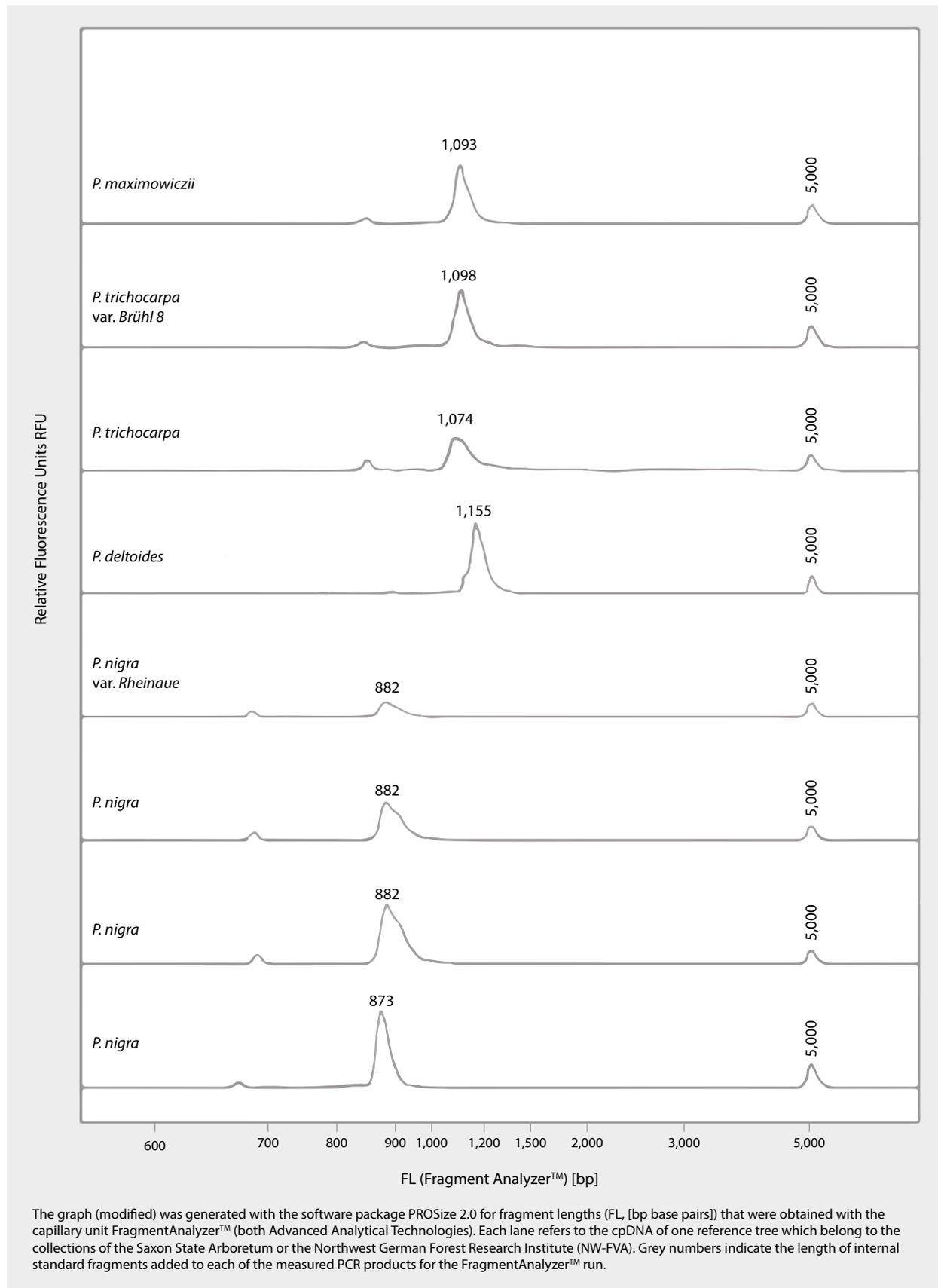


Figure 3
Peak view of poplar (*Populus* spp.) PCR amplicons, cpDNA locus *trnDT*

tested pairs of one *Aigeiros*-like and one *Tacamahaca*-like leaf phenotype.

In total, 80 genotypes carrying the approximately 865 bp long fragment (cpDNA assigned to *P. nigra*), 46 having a fragment length of approximately 1,065 bp (i.e. cpDNA assigned to a balsam poplar species) and 17 genotypes with the approximately 1,135 bp long fragment (cpDNA assigned to *P. deltoides*) were found. At all 14 sampling sites, either the *trnDT* genotype class carrying the approximately 865 bp long fragments or that class having a fragment length of approximately 1,065 bp dominated over the respective other two classes (Table 1). At no sampling site, the genotype class with the approximately 1,135 bp long fragments (cpDNA assigned to *P. deltoides*) was dominating. Only two sampling sites (Breisach (n = 2) and Tacherting (n = 11)) did not reveal other than the 865 bp genotypes.

Table 3

Significances (*p*-values) resulting from pairwise Mann-Whitney U Tests for testing differences of fragment length estimates (FragmentAnalyzer™) across subgroups of poplars showing different leaf phenotypes ($\alpha = 0.05$) (Table 2)

p-values pairwise Mann-Whitney U-tests	quadrangular	triangular	triangular-oval	ovate	ovate-lanceolate
Quadrangular		0.467	0.413	< 0.001	0.001
Triangular	-		0.995	< 0.001	0.003
Triangular-oval	-	-		< 0.001	0.001
Ovate	-	-	-		0.331
Ovate-lanceolate	-	-	-	-	

4 Discussion

The present investigation focused on the genetic composition of spontaneously occurring natural rejuvenation of black or balsam poplars or their intra- and inter-specific hybrids (*Populus* spp., sections *Aigeiros* and *Tacamahaca*) on anthropogenic wet sites in Germany. The cpDNA and the leaf morphological investigations have, separately from each other, revealed that there are rather large proportions of foreign gene material that have contributed to the establishment of the sampled rejuvenation. However, the present collection of genotypes does not congruently reflect the proportion of foreign gene material *in situ* at the collection sites. Furthermore, several collected genotypes were lost during the *ex situ* cultivation. Hence, no exact quantification of the genetic admixture or of the different species' contribution at the collection sites can be done on the basis of the present results.

The investigation of the cpDNA locus *trnDT* was subject to a method-based uncertainty in fragment length (FL) measurements. As the present method (FragmentAnalyzer™) had an

accuracy of $\pm 5\%$ to $\pm 2\%$, the obtained FL values are only estimates of the respective true FL which corresponds to genotype class. As a consequence, the present capillary gel-electrophoresis method and also the classic gel electrophoresis method used by Heinze (1998) are not able to allow totally safe distinction between two fragments of almost equal true lengths. Nonetheless, the three maxima in the present stochastic distribution of the FL measurements revealed, that there are at least three different classes in the poplar collection at the locus *trnDT* (see histogram, Figure 2).

The FL estimates for the four *P. nigra* reference trees (873 or 882 bp) allowed the assignment of the first class of fragment lengths (< 900 bp, mean approximately FL of 865 bp) to the 850 bp variant which was described to be specific for *P. nigra* (Heinze 1998). Due to the large length difference, the FL class of the approximately 865 bp long fragments was well separated from the two other FL classes (1,000-1,100 bp; > 1,100 bp).

The marker fragment of the *P. deltoides* reference tree had an estimated length of 1,155 bp. Therefore, the FL class with approximately 1,135 bp long fragments was assigned to the 1,050 bp variant which was described to be specific for *P. deltoides* by Heinze (1998). The third FL class with the intermediate FL of approximately 1,065 bp (1,000-1,100 bp) refers to at least one additional genotype which was not described by Heinze (1998). The existence of at least one other class is supported by the present FL estimates for the reference trees which belong to the two balsam poplar (section *Tacamahaca*) species *P. maximowiczii* (1,093 bp) and *P. trichocarpa* (1,074 or 1,098 bp). Given the methodological measurement uncertainty in addition to the within-species variability, it is not possible to distinguish among the two balsam poplar species. In addition, the approximate length of the balsam poplar variants is relatively close to the fragment length of the *P. deltoides* genotypes. Presumably, the ranges of FL estimations of the balsam poplar and *P. deltoides* classes have overlapped. Hence, the present boundary between the present two FL classes at 1,100 bp is inevitable somewhat arbitrary and needs more efforts for determining correct FLs by sequencing of reference samples. The number of reference trees with assured taxonomic assignment needs to be increased beyond the low number of reference trees in the present work. In addition, chloroplast SNP markers (Schroeder et al. 2017; Schroeder and Fladung, 2015) can be added to achieve higher precision in the taxonomic assignment of the female line in collected wild samples of *Populus* spp.

It must be noted that the present results do only allow the identification of the species origin of the chloroplasts which are only inherited by the female poplar parent to the generatively produced offspring (White et al., 2007). Nothing can be said about the specific genetic identity of the investigated individuals. E.g., a female parent that inherits a *trnDT* fragment of approximately 865 bp length is not necessarily a pure *P. nigra* tree. For example, it can be a hybrid of the second generation with *P. deltoides*, or with other species.

The present results for the locus *trnDT* suggest that not only species or intra-specific hybrids of the section *Aigeiros* (e.g. all *P. × canadensis* clones) but also the section *Tacamahaca* can

currently have considerable impact on the diaspora cloud in parts of Germany. This is also supported by literature. Balsam poplar clones like *P. trichocarpa* cvs. 'Muhle Larsen' or 'Fritzi Pauley'; *P. maximowiczii* × *P. trichocarpa* cv. 'Androskoggin' and other were cultivated mainly during the second half of the 20th century (Grosscurth, 1983; Hoffmann et al., 1977; Jestaedt, 1978; Joachim, 1957; van den Broeck et al., 2005; Weisgerber, 1983). Now, balsam poplars or their hybrids can be found as mature or old, flowering stands in German forests, shelterbelts and urban groves.

Interestingly, 78 of the 94 individuals which exhibited *Aigeiros*-like leaf phenotypes carried the *P. nigra*-specific *trnDT* genotype (approximately 865 bp, Table 2). Only 13 carried the *P. deltoides* variant. The remaining 3 individuals had *trnDT* fragment lengths that were assigned to the cpDNA of balsam poplars. However, this assignment can be false due to the fragment length measurement uncertainties described above.

The intra-specific hybrids of the two *Aigeiros* species *P. nigra* and *P. deltoides*, *P. × canadensis* (syn. *P. × euramericana*), were intensively used throughout Europe and the hybrids are found in spontaneous rejuvenation (van Dam and Bordács, 2002). For this intra-specific *Aigeiros* hybridization, *P. deltoides* was chosen as the seed parent (♀) and *P. nigra* as the pollinator (♂) (Ziegenhagen et al., 2008). Likely, the present observation of the quantitatively superior cpDNA marker genotype of *P. nigra* (Table 2) is due to the unilateral pollination incompatibility of *P. nigra* against *P. deltoides*' pollen or due to a more general preference of all black poplar species for the pollen of their own species (Rajora, 1989). However, it was reported that the second generation hybrids or back-cross-hybrids between *P. nigra* and *P. deltoides* seem to reduce the incompatibility, and a stable genetic introgression into the *P. nigra* genepool has to be expected in naturally reproducing sub-populations (Pospíšková and Šálková, 2006; Ziegenhagen et al., 2008). The same effect should be expected for the hybridization with balsam poplar species.

The genetic diversity of the European black poplar in Germany is potentially also threatened by the anthropogenic overrepresentation of a few *P. nigra* clone cultivars (e.g. Lombardy poplar, *Populus nigra* cv. *italica*). But the investigation of the cpDNA marker locus *trnDT* cannot provide information about the contribution of over-represented genotypes to the rejuvenation sample. Therefore, the present poplar collection will be subject to further investigations with microsatellite markers that allow a more detailed assessment of the genetic identity and of the extent of introgression.

To conclude, the genetic composition of German wild poplar rejuvenation is subject to ongoing genetic introgression. It initiated rather long ago by the anthropogenic use of introduced poplar species (of the sections *Aigeiros* and *Tacamahaca*) and of their artificial hybrids.

For future conservation strategies and for practical implications, it has to be considered that many of the existing mature hybrid poplar stands cannot simply be felled everywhere in Germany or Europe and that they will continue providing diaspores. Therefore, conservational cloning of valuable autochthonous *P. nigra* and planting them in the vicinity

of other autochthonous individuals can be a strategy to increase the contribution of autochthonous gene material to the diaspora clouds of *P. nigra* and its relatives in the near future.

Acknowledgement

We thank the staff members the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) and its Agency for Renewable Resources (FNR e.V.) for funding of FastWOOD III (FKz. 22002911). Furthermore, we thank the Bio-Based Industries Consortium (BIC), the Bio-Based Industries Joint Undertaking (BBI-JU) and the European Union for funding of the project Dendromass4Europe, which MM and KM are currently working for (GA-No. 745874).

References

- Bialozyt R, Rathmacher G, Niggemann M, Ziegenhagen B (2012) Wie groß ist das Potenzial von *Populus nigra* mit *Populus × canadensis* Hybrid-schwärme zu bilden? : Wo sich Mendel und molekulare Marker begegnen. Göttingen : NW-FVA, pp 295-313, Beitr NW-FVA 8
- Böcker R, Koltzenburg M (1996) Pappeln an Fließgewässern. Karlsruhe : LfU, 140 p, Handb Wasser 2
- Csencsics D, Holderegger R (2016) Origin of natural regeneration of black poplar (*Populus nigra* L.) and co-occurrence with hybrid poplar offspring. Flora (Jena) 222:20-26
- Demesure B, Sodji N, Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in Plants. Mol Ecol 4:129-131
- Franke A, Jaeschke H-G, Seyd C (1997) Erfassung letzter Schwarzpappel-Vorkommen (*Populus nigra* L.) im baden-württembergischen Teil der Oberrheinischen Tiefebene. Holzzucht 51:5-14
- Grosscurth W (1983) Ertragstabellen für Schwarz- und Balsampappel. Stuttgart : DRW-Verl, 45 p
- Heinze B (1998) Molekulargenetische Unterscheidung und Identifizierung von Schwarzpappeln und Hybridpappelklonen. Wien : Forstl Bundesversuchsanst Wien, 44 p, FBVA-Ber 105
- Henry A (1914) The artificial production of vigorous trees. J Dept Agric Techn Instruction Ireland 15:34-52
- Hoffmann E, Jestaedt M, Weisgerber H (1977) Die zum Handel zugelassenen Balsampappelklone : Beschreibung, Wuchseigenschaften, Resistenzverhalten und Anbauempfehlungen. Hann Münden : Forschungsinst Fördervereins schnellwachs Baumarten, 7 p, Merkbl Forschungsinst Fördervereins schnellwachs Baumarten 8
- Houtzagers G (1937) Het geslacht *Populus* in verband met zijn beteekenissen voor de houtteelt. Wageningen : Veenman, 266 p
- Isebrands JG, Richardson J (eds) (2013) Poplars and willows : trees for society and the environment. Wallingford : CABI Publ, 634 p
- Jestaedt M (1978) Sortenprüfung von Balsampappeln auf Waldstandorten. Holzzucht 32:22-27
- Joachim H-F (1957) Beobachtungen und Untersuchungen an Balsampappeln. In: Ewald E, Richter A, Heger (eds) Beiträge zur Pappelforschung : II. Berlin : Akad-Verl, pp 35-71, Wiss Abh Dtsche Akad Landwirtschaftswiss 27
- Liesebach H, Schneck V, Ewald D (2010a) Klonidentifizierung in der Gattung *Populus* L. mit nuklearen Mikrosatellitenmarkern. Mitt Forschungsanst Waldökologie Forstwirtschaft 69/11:115-122
- Liesebach H, Schneck V, Ewald E (2010b) Clonal fingerprinting in the genus *Populus* L. by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids. Tree Genet Genomes 6(2):259-269
- Pospíšková M, Šálková I (2006) Population structure and parentage analysis of black poplar along the Morava River. Can J Forest Res 36:1067-1076

- Rajora OP (1989) Pollen competition among *Populus deltoides* Marsh., *P. nigra* L. and *P. maximowiczii* Henry in fertilizing *P. deltoides* ovules and siring its seed crop. *Sex Plant Reprod* 2:90-96
- 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* 23:573-583
- Roloff A, Bärtels A, Schulz B (2014) Flora der Gehölze : Bestimmung, Eigenschaften, Verwendung. Stuttgart : Ulmer, 911 p
- Schmidt O, Huber G (eds) (2010) Die bayerischen Schwarzpappelvorkommen. Freising : Bayer Landesanst Wald Forstwirtschaft, 68 p, LWF Wissen 64
- Schmitt HP, Schulze L, Vornam B (1996) Maßnahmen zur Erhaltung der Schwarzpappel in Nordrhein-Westfalen. *LÖBF-Jahresber* 1996:161-169
- Schreiner EJ, Stout AB (1934) Descriptions of ten new hybrid poplars. *Bull Torrey Bot Club* 61:449-460
- Schroeder H, Fladung M (2015) Differentiation of *Populus* species by chloroplast SNP markers for barcoding and breeding approaches. *iForest Biogeosci Forest* 8:544-546
- Schroeder H, Hoeltken AM, Fladung M (2012) Differentiation of *Populus* species using chloroplast single nucleotide polymorphism (SNP) markers : essential for comprehensible and reliable poplar breeding. *Plant Biol* 14(2):374-381
- Schroeder H, Kersten B, Fladung M (2017) Development of multiplexed marker sets to identify the most relevant poplar species for breeding. *Forests* 8 (12):492
- Tautenhahn M, Witt B, Kätzel R, Löffler S, Becker F (2007) Erhaltung der Schwarz-Pappel 600 (*Populus nigra*) im Rahmen der Anlage von Weichholzwäldern im Nationalpark Unteres Odertal (AZ: 21784) [online]. Zu finden in <<https://www.dbu.de/ab/DBU-Abschlussbericht-AZ-21784.pdf>> [zitiert am 10.12.2018]
- Tröber U, Wolf H (2015) Conservation of black poplar (*Populus nigra* L.) in Saxony : identification, characterization and propagation on a genetic basis. *Forstarchiv* 86:166-173
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596-1604
- van Dam B, Bordács S (eds) (2002) Genetic diversity in river populations of European Black poplar : implications for riparian ecosystem management : proceedings of an international symposium held in Szekszárd, Hungary from 16-20 May 2001. Budapest : Nyomda, 231 p
- van den Broeck A, Villar M, van Bockstaele E, van Slycken J (2005) Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives : evidence and consequences for native poplar populations. *Ann Forest Sci* 62:601-613
- Weisgerber H (1983) Wuchsverhalten und Anbaumöglichkeiten einiger neu zum Handel zugelassener Balsampappeln und Aspen. *Holzzucht* 37:2-10
- White TL, Adams WT, Neale DB (2007) *Forest genetics*. Wallingford : CABI, 682 p
- Wypukol H, Liepelt S, Ziegenhagen B, Gebhardt K (2008) Genetische Methoden zur Abstammungsanalyse und Prüfung von Sortenechtheit und reinheit. In: Gebhardt K (ed) *Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden : Tagungsband des Symposiums „Herkunftskontrolle“ vom 7-8. 2. 2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587*. Hann Münden : Nordwestdtische Forstl Versuchsanst, pp 67-84
- 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* 9:373-379



Inhalt Content

- Kristina Ulrich und Dietrich Ewald
Methoden zur Erzeugung triploider Aspen und Pappeln
1 Methods for generation of triploid aspen and poplar
- Doris Krabel, Maximilian Groschke, Sandra Korn, Matthias Meyer, Rosi Müller, Alexander Solger, Lina Winkler und Marie Weigand
Topfversuche mit drei Pappelstandardsorten – Möglichkeiten und Herausforderungen
11 Pot experiments with three Poplar standard varieties – opportunities and challenges
- Hilke Schroeder und Matthias Fladung
Poplar clones differ in their resistance against insects feeding
19 Pappelklone unterscheiden sich in ihrer Toleranz gegenüber Insektenfraß
- Hilke Schroeder, Birgit Kersten und Matthias Fladung
Identifizierung von 19 verschiedenen Pappelarten mit Hilfe von Chloroplasten- und Kernmarker-Sets
27 Identification of 19 different poplar species by chloroplast and nuclear marker sets
- Christina Fey, Christoph Stiehm, Martin Hofmann, Matthias Moos, Helmut Grotehusmann, Wilfried Steiner und Alwin Janßen
Züchtung und Evaluierung von Schwarz- und Balsampappelklonen hinsichtlich Ertrag und Blattrosttoleranz in vier FastWOOD Versuchsserien
35 Breeding and Evaluation of Black and Balsam Poplar Clones regarding Yield and Tolerance to Leaf Rust in four FastWOOD Trial Series
- Ben Bubner, Angela Köhler, Irmtraut Zaspel, Matthias Zander, Nadja Förster, Jan-Christoph Gloger, Christian Ulrichs, and Volker Schneck
Breeding of multipurpose willows on the basis of *Salix daphnoides* Vill., *Salix purpurea* L. and *Salix viminalis* L.
53 Züchtung von Weiden zur Mehrfachnutzung auf der Basis von *Salix daphnoides* Vill., *Salix purpurea* L. und *Salix viminalis* L.
- Christoph Stiehm und Martin Hofmann
Evaluierung von Genotyp-Umwelt Interaktionen bei Pappel und Weide auf landwirtschaftlichen Standorten in kurzen Umtriebszeiten – Ergebnisse aus dem ProLoc Verbundvorhaben
67 Assessing Genotype-Environment Interaction for Poplars and Willows on agricultural sites in short rotation coppice – Results from the Joint Research Project ProLoc
- Christian Heimpold, Kathrin Heimpold, Volker Schneck, Rainer Tölle und Mirko Liesebach
Untersuchung der Holzdichte von Aspen und Hybridaspen mittels Pilodyn
83 Investigation of wood density of aspen and hybrid aspen with Pilodyn
- Matthias Meyer, Melanie Zacharias, Kristin Morgenstern, Doris Krabel, and Heike Liesebach
Variable genotypes at the cpDNA marker locus *trnDT* in spontaneous rejuvenation of the species complex around the European black poplar (*Populus nigra* L.) and its relatives collected in Germany
93 Unterschiedliche Genotypen am cpDNA Genort *trnDT* in spontan aufgelaufener Verjüngung des Artkomplexes um die Europäische Schwarz-Pappel und deren Verwandte in Deutschland

Landbauforschung
*Applied Agricultural
and Forestry Research*

Herausgeber · Editor
Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

Vol. 68

No. 1/2 · 12.2018

Preis · Price 8 €

ISSN 0458-6859