

Anwendung und Nutzen molekularer Marker innerhalb der Gattung *Populus* für den Einsatz in der Züchtung

Hilke Schröder, Matthias Fladung

Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf

Zusammenfassung

Anhand von über 500 Individuen sind für 14 *Populus*-Arten SNP- und InDel (Insertionen/Deletionen) -Marker sowohl im Chloroplastengenom (cp) als auch im Kerngenom entwickelt worden. Unter Einsatz von 24 Abschnitten im cp-Genom wurden insgesamt über 200 variable Nukleotidstellen gefunden. Von diesen waren pro Art einer bis zu 30 SNPs/InDels artspezifisch, also jeweils nur in einer Art zu finden. Mit Hilfe dieser cp-Marker wird der mütterliche Teil einer Kreuzung und damit die Kreuzungsrichtung verifiziert. In fünf Bereichen des Kerngenoms wurden etwa 190 Nukleotid-Variationen gefunden, die pro Art in einem bis zu 17 artspezifischen SNPs/InDels resultierten. Im cp-Genom konnten so insgesamt für die untersuchten Arten über 100 und im Kerngenom 70 artspezifische Variationen entdeckt werden.

Die Kombination dieser Marker ermöglicht die eindeutige Identifizierung von 13 der 14 untersuchten Arten. Ebenso können anhand mehrerer Kernmarker Genealogien zurückverfolgt und Komplexhybride identifiziert werden.

Schlüsselworte: *Populus*, Einzel-Nukleotid-Austausch (SNP), Insertion/Deletion (InDel), Chloroplast, Kern-Genom

Abstract

Application and benefits of molecular markers for breeding purposes within the genus *Populus*

500 individuals of 14 poplar species have been used to develop SNP- and InDel (insertions/deletions) -markers within the chloroplast (cp) and the nuclear genome. Using 24 region of the chloroplast, more than 200 nucleotide variations were detected. Per species one to 30 SNPs/InDels have been identified to be species-specific, thus existing in only one species. The cp-makers are used to verify the maternal part of a crossbreeding and therefore the direction of the crossbreeding. For the nuclear genome, in five genes about 190 nucleotide variations could have been detected with one to 17 species-specific SNPs/InDels per species. In total, within the cp genome over 100 and in the nuclear genome 70 species-specific variations have been detected. The combination of these markers allows the clear identification of 13 of the 14 investigated species. Furthermore, with help of several nuclear markers tracking of genealogies and identification of complex hybrids is possible.

Keywords: *Populus*, single nucleotide polymorphism (SNP), Insertion/Deletion (InDel), chloroplast, nuclear genome

Einleitung

Die etwa 29 Arten der Gattung *Populus* werden systematisch in sechs Sektionen eingeteilt (*Populus*, *Tacamahaca*, *Ageiros*, *Abaso*, *Turanga* und *Leucoides*) (Eckenwalder 1996). Innerhalb und zwischen diesen Sektionen gibt es eine große Hybridisierungskapazität diverser Arten. Zum Teil sind diese Hybridisierungen natürlichen Ursprungs, sie werden aber auch gezielt gezüchtet, da insbesondere

viele zwischenartige Hybriden eine hohe Leistungsfähigkeit aufweisen (Licht und Isebrands 2005, vande Walle et al. 2007) und damit vielfach für Kurzumtriebsplantagen eingesetzt werden. Diese intersektionelle Kreuzungskompatibilität von *Populus*-Arten ist zwar für die Züchtung von großem Vorteil, für die Identifizierung von Arten innerhalb von Kreuzungen jedoch eine große Herausforderung. So existieren heute zahlreiche Kreuzungen und Rückkreuzungen, deren ursprüngliche Kreuzungspartner nicht mehr immer unbedingt anhand von Aufzeichnungen nachvollziehbar sind. Jedoch muss für die Anmeldung neuer Klone die Genealogie nachweisbar sein. In dem hier vorgestellten Arbeitspaket des FNR-finanzierten Projekts „FastWood“ lag daher der Schwerpunkt auf der Entwicklung von molekularen Markern zur Identifizierung von Arten und Hybriden sowie deren Kreuzungsrichtung, um die Genealogie von bekannten und neuen Pappelklonen belegen zu können.

Material und Methoden

Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden 14 Arten aus vier verschiedenen Sektionen mit unterschiedlicher Anzahl an Individuen je Art (zwischen einem und 270 Individuen) für die Untersuchungen verwendet. Aus der Sektion *Populus* waren dies die drei Arten *P. alba*, *P. tremula* und *P. tremuloides*, die Sektion Aigeiros ist mit den acht Arten *P. trichocarpa*, *P. maximowiczii*, *P. cathayana*, *P. koreana*, *P. simonii*, *P. szechuanica*, *P. ussuriensis* und *P. balsamifera* vertreten, außerdem wurden die zwei Schwarzpappeln (Sektion *Tacamahaca*) *P. nigra* und *P. deltoides* sowie *P. wilsonii* aus der Sektion Leucoides verwendet. Die Individuen stammen aus dem Arboretum des Thünen-Instituts für Forstgenetik in Großhansdorf, von Kollegen des Thünen-Instituts für Forstgenetik in Waldsiedersdorf, der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (NW-FVA) in Hann. Münden, des Bayerischen Amtes für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP) in Teisendorf, des Staatsbetriebs Sachsenforst (SBS) in Graupa sowie aus den Botanischen Gärten Marburg, Hamburg, Tübingen und Dresden.

DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation

Je 1 cm² eines Blattes wird in flüssigem Stickstoff in einer Retschmühle zu Pulver zermahlen. Die DNA wird nach einem leicht modifizierten ATMA-B-Protokoll (Dumolin et al. 1995) extrahiert. Für die PCR-Reaktion wird ein Standardprotokoll verwendet, das in Schroeder et al. (2012) und SCHROEDER & FLADUNG 2014 detailliert beschrieben ist. Die annealing Temperaturen in der PCR-Reaktion sind auf die jeweils verwendeten Primer angepasst und liegen zwischen 50°C und 65°C. Die Amplifikationsprodukte werden in einem mit Rotisafe (Carl Roth, Karlsruhe) angefärbten Agrosegel sichtbar gemacht.

Untersuchte Regionen

Insgesamt sind 23 barcoding Regionen und 17 neu generierte Primerkombinationen des Chloroplasten untersucht worden. Die Erstellung der Primer erfolgte anhand des *P. trichocarpa* Genoms (Tuskan et al. 2006). Detaillierte Informationen zu den Primern finden sich in Schroeder und Fladung (2010) und Schroeder et al. (2012). Aus dem Kerngenom wurden die Gene Gibberellinoxidase 20 (*GA20ox*), *LEAFY*, *TB1* und zwei Introns des *KNOX*-Gens verwendet.

Ergebnisse

SNP- und InDel-Marker

Als SNP (single nucleotide polymorphism) wird der Austausch einzelner Basen (Nukleotide) in der Sequenzabfolge bezeichnet, der in einer Population oder innerhalb einer Art manifestiert ist. Ein

InDel (Insertion/Deletion) ist ein Längenunterschied in der Sequenz verschiedener Populationen bzw. Arten. Als artspezifisch wird ein SNP oder InDel bezeichnet, wenn alle Individuen einer Art diesen Polymorphismus aufweisen und dieser bei keinem Individuum einer anderen Art zu finden ist. Chloroplasten (cp) werden bei Angiospermen rein mütterlich vererbt, so dass die cp-Marker für die Identifizierung der Mutter einer Kreuzung und damit der Kreuzungsrichtung verwendet werden, während die SNPs und InDels im Kern für die Identifizierung beider Kreuzungspartner und damit Hybriden eingesetzt werden.

Von den 40 erwähnten Bereichen des Chloroplasten-Genoms konnten bis zu 24 für die Analyse der 14 Arten herangezogen werden. Insgesamt wurden so gut 200 Nukleotidvariationen (SNPs oder InDels) gefunden, von denen über 100 artspezifisch waren (Tabelle 1). Im Kerngenom war die Anzahl der insgesamt gefundenen Nukleotidvariationen nicht wesentlich geringer (etwa 190), allerdings waren hier nur gut 70 der Variationen auch artspezifisch (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl an artspezifischen SNPs und InDels im Chloroplasten (cp) und im Kerngenom für die 14 untersuchten Pappelarten.

Art	Abk. (Abb. 1)	cp artspezifisch: SNPs / InDels	Kern artspezifisch: SNPs / InDels
<i>P. alba</i>	alb	4 / 3	12 / 5
<i>P. tremula</i>	tre	14 / 7	7 / 0
<i>P. tremuloides</i>	tro	31 / 11	0 / 0
<i>P. nigra</i>	nig	7 / 3	14 / 0
<i>P. deltoides</i>	del	9 / 4	15 / 0
<i>P. trichocarpa</i>	tri	7 / 1	9 / 0
<i>P. maximowiczii</i>	max	1 / 2	2 / 0
<i>P. cathayana</i>		0	0
<i>P. koreana</i>	kor	0	0
<i>P. simonii</i>	sim	1 / 1	4 / 1
<i>P. szechuanica</i>	sze	2 / 0	2 / 0
<i>P. ussuriensis</i>	ussu	0	0
<i>P. balsamifera</i>	bal	0	1 / 0
<i>P. wilsonii</i>	wil	4 / 3	1 / 0

Durch die Kombination mehrerer artspezifischer Marker ist die Identifizierung von 13 der Arten möglich. Für *P. cathayana* liegen zurzeit noch zu wenig Daten für eine eindeutige Aussage vor. In Abbildung 1 ist ein solches Multiplexing im Detail gezeigt: (A) Über einen Längenpolymorphismus (InDel) im *TB1*-Gen werden *P. alba* mit immer 460 Basenpaaren (bp) und *P. simonii* mit einer Länge von immer 474bp unterschieden. Weiterhin haben bei dieser Variation alle *P. tremula* und *P. tremuloides* immer eine Länge von 469bp. Es verbleiben 10 Arten, die alle ein InDel im *TB1*-Gen mit einer Länge von 458bp lang aufweisen. (B) *P. tremula* und *P. tremuloides* werden im nächsten Schritt durch einen SNP im *KNOX3*-Gen unterschieden. (C) Zwei SNPs im *TB1*-Gen ermöglichen darauffolgend die Identifizierung von *P. deltoides* und von *P. trichocarpa* und die gemeinsame Gruppierung von *P. nigra* und *P. wilsonii* sowie den restlichen fünf Arten. (D) Ein SNP im *LEAFY*-Gen trennt anschließend *P. nigra* und *P. wilsonii* voneinander. (E) Im *GA20ox*-Gen führt ein SNP zur Differenzierung von *P. szechuanica* und die Arten *P. koreana*, *P. ussuriensis* und *P. maximowiczii* haben ein gemeinsames InDel, was zur Identifizierung von *P. balsamifera* führt. (F) *P. koreana* wird über einen SNP im *KNOX*-Gen identifiziert und schließlich (G) kann noch *P. ussuriensis* von *P. maximowiczii* über einen SNP im *TB1*-Gen getrennt werden. So erbringt die Anwendung von sieben Markern die Differenzierung von insgesamt 13 Pappelarten.

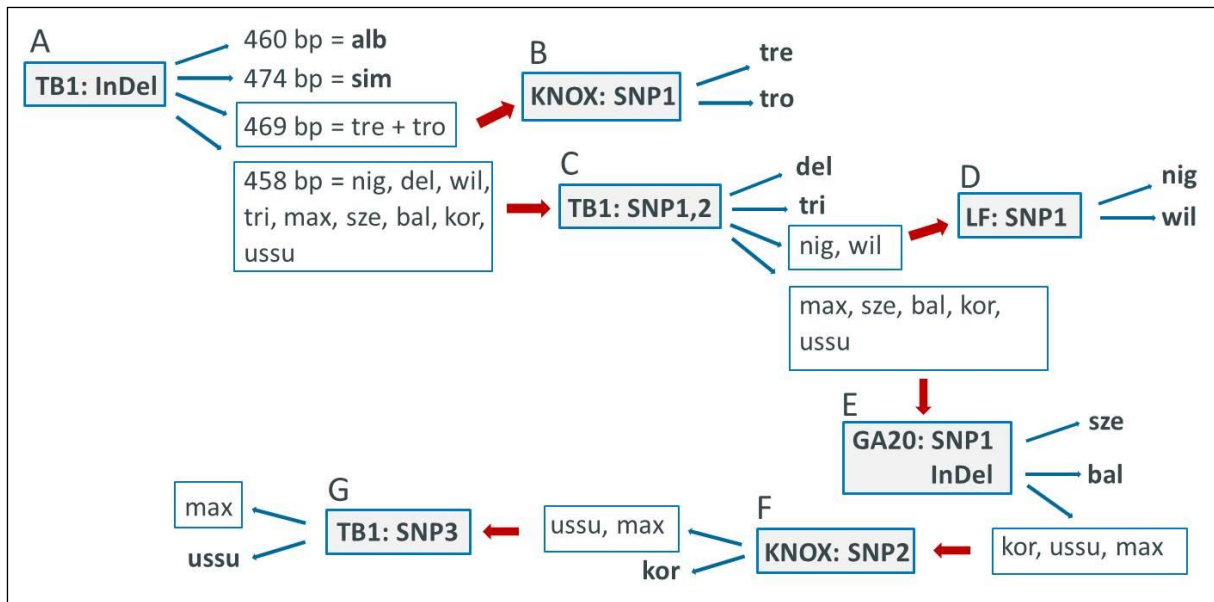


Abb. 1: Differenzierung von 13 Pappelarten über ein Ausschlussverfahren mit SNPs und InDels in vier verschiedenen Kerngen-Abschnitten. Nähere Erläuterung: siehe Text (Abk. s. Tabelle 1)

Anwendungsbeispiele

Bisher durchgeführte Untersuchungen mit einer Reihe von SNP-Markern zeigen, dass viele der untersuchten Klone aus Mehrfach-Hybridisierungen sowohl innerartlich als auch zwischen verschiedenen Arten und sogar zwischen Arten verschiedener Sektionen hervorgegangen sind. Für eine präzise Charakterisierung von Mehrfach-Hybridisierungen wird eine Kombination von cp- und Kern-Markern verwendet, um sowohl bezüglich beteiligter Arten als auch der Genealogie eine höhere Auflösung zu erzielen.

Im ersten Beispiel wird die Überprüfung der Genealogie einer Pappelprobe erörtert: Waren die Eltern einer als Balsampappel deklarierten Probe reine Arten oder Hybriden?

Anhand des in Abbildung 1 dargestellten Schemas wurde der Artstatus und anhand von spezifischen Chloroplasten-Markern die Kreuzungsrichtung festgestellt. Es handelte sich um einen Hybriden aus *P. maximowiczii* (Mutter) und *P. trichocarpa* (Vater). Anschließend wurde die Probe mit Hilfe von artspezifischen Kern-Markern für *P. maximowiczii* und *P. trichocarpa* auf Heterozygotie überprüft. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Rückverfolgung der Genealogie dieser Pappelprobe. Dargestellt sind sowohl die Chloroplasten-Marker, die zur Überprüfung der Kreuzungsrichtung dienten als auch zwei verwendete Kern-Marker. Sind die Eltern reine Arten, dann müssten sie bei beiden Markern homozygot gewesen sein. Der erste Kern-Marker ergab für die untersuchte Probe einen Hybriden aus den beiden Elternarten. Mit diesem Ergebnis könnte es sich bei der Probe um einen F1-Hybriden handeln, der aus homozygoten Eltern hervorgegangen sein kann. Es sind aber neben dieser Möglichkeit auch bereits Hybrid-Eltern denkbar (Abb. 2). Die Hinzunahme eines zweiten Kern-Markers ergab für die Probe keine Heterozygotie, so dass hiermit bereits belegt werden konnte, dass es sich nicht um einen F1-Hybriden handeln kann, sondern bereits Rückkreuzungen stattgefunden haben müssen. Der Vater muss nach diesem Ergebnis bereits ein Hybrid aus *P. maximowiczii* und *P. trichocarpa* gewesen sein, die Mutter könnte eine reine *P. maximowiczii* oder ebenfalls ein Hybrid gewesen sein (Abb. 2).

	Chloroplast	Kern 1
Probe 1	A	AT
Mögliche Eltern	♀: A x ♂: T	AA x TT / AT x AT / AT x TT / AA x AT
	Chloroplast	Kern 2
Probe 1	G	GG
Mögliche Eltern	♀: G x ♂: C	GC x GC / GG x GC / GC x CC / GG x CC

Abb. 2: Darstellung der Überprüfung der Eltern eines Hybriden aus *P. maximowiczii* und *P. trichocarpa*. Beim Kern-Marker 1 hätten eine reine *P. maximowiczii* AA und eine reine *P. trichocarpa* TT, bei Kern-Marker 2 wären es entsprechen für eine reine *P. maximowiczii* GG und eine reine *P. trichocarpa* CC. Über den Kern-Marker 2 ist damit geklärt, dass die Eltern nicht homozygot gewesen sein können (Durchgestrichene Kombinationen in Zeile „Mögliche Eltern“ bei Kern-Marker 2). Nähere Erläuterung: siehe Text.

Als zweites Beispiel dient die Überprüfung einer Pappelprobe, die als homozygote *P. simonii* deklariert war. Nach der Etablierung der Marker werden, soweit zeitlich möglich, alle eingehenden Pappelproben auf die Richtigkeit der Artangaben überprüft. Die *P. simonii* Probe wurde zunächst mit einem spezifischen Chloroplasten-Marker getestet. Dieser ergab nicht *P. simonii*. Ein Test mit weiteren artspezifischen cp-Markern ergab schließlich *P. trichocarpa* als Mutter. Ein artspezifischer Kern-Marker für *P. simonii* ergab ein positives Ergebnis. Weitere Kern-Marker wurden angewendet, um festzustellen, ob es sich um eine Komplexhybride handelt. Tatsächlich konnte auch *P. maximowiczii* nachgewiesen werden. Es handelte sich also um eine Komplexhybride aus (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) x *P. simonii*.

Schlussfolgerungen

Es gibt einige Studien, die sich mit der Entwicklung von SNP-Markern speziell für Pappeln beschäftigen (Fladung und Buschbom 2009, Meirmans et al. 2007, Gilchrist et al. 2006, Ingvarsson 2005), jedoch handelt es sich dabei meistens um Ansätze mit nur wenigen Pappelarten. Die Suche nach artspezifischen SNPs, die eine Differenzierung von 14 Arten innerhalb einer Gattung ermöglicht, ist eine Herausforderung und damit eher selten. Mit dem hier beschriebenen Ansatz ist es gelungen, die in kommerziell genutzten Kreuzungen häufig verwendeten Arten eindeutig zu identifizieren. Damit können Pappelklone, die für Kurzumtriebsplantagen verwendet werden sollen, auf korrekte Deklaration hinsichtlich Art und Kreuzungshistorie überprüft werden. Ebenso kann der Artstatus potentieller Kreuzungspartner für Neuzüchtungen verifiziert werden. Mit den entwickelten SNP-Markern können Arten und Kreuzungsrichtung sowohl von bekannten Klonen als auch von Hybriden oder Arten, die aus natürlichen Populationen stammen, identifiziert werden. Die Rückverfolgung der Genealogie ist ebenso möglich wie die Aufschlüsselung von Komplexhybriden.

Für einige der SNP-Marker konnten bereits kostengünstig und schnell umzusetzende PCR-RFLPs entwickelt werden, d. h. die Identifizierung der Arten erfolgt über eine Restriktion und die Auftrennung auf Gelen. Wenn die SNPs in Bereichen ohne Restriktionsenzyme liegen, wird auf Sequenzierungen zugegriffen. Die InDels können entweder ebenfalls auf Gelen identifiziert werden, wenn es sich um größere Längenunterschiede handelt, oder aber auf dem Sequenzierer analysiert werden, auf dem auch ein Unterschied von nur einer Base auflösbar ist.

Danksagung

Wir bedanken uns bei der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) für die finanzielle Unterstützung über das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Den Gärtnern danken wir für das Ernten von Probenmaterial, unserer technischen Assistentin Susanne Bein für die Laborarbeit und Mirko Liesebach und Georg von Wühlisch für Informationen über die Herkunft der Pappeln und das Einsammeln von Probenmaterial. Den Kollegen im Projekt FastWOOD sowie den Botanischen Gärten Hamburg, Marburg, Tübingen und Dresden danken wir für die Überlassung von Probenmaterial. Mirko Liesebach danken wir für die Koordinierung des Thünen-FastWOOD-Teilprojekts.

Literatur

- Dumolin S, Demesure B, Petit RJ, 1995: Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256.
- Eckenwalder JE, 1996: Systematics and evolution of *Populus*. In Stettler RF, HD Bradshaw Jr, PE Heilman and TM Hinckley (eds). *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation Part I*, Chapter 1. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, Canada: 7–32.
- Fladung M, Buschbom J, 2009: Identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in different *Populus* species. *Trees – Structure and Function* 23: 1199-1212.
- Gilchrist EJ, Haughn GW, Ying CC, Otto SP, Zhuang J, Cheung D, Hamberger B, Aboutorabi F, Kalynyak T, Johnson L, Bohlmann J, Ellis BE, Douglas CJ, Cronk QCB, 2006: Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. *Molecular Ecology* 15: 1367-1378.
- Ingvarsson PK, 2005: Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae). *Genetics* 169: 945-953.
- Licht LA, Isebrands JG, 2005: Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass & Bioenergy* 28: 203-218.
- Meirmans PG, Lamothe M, Périnet P, Isabel N, 2007: Species-specific single nucleotide polymorphism markers for detecting hybridization and introgression in poplar. *Canadian Journal of Botany* 85: 1082-1091.
- Schroeder H, Fladung M, 2010: SSR and SNP markers for the identification of clones, hybrids and species within the genus *Populus*. *Silvae Genetica* 59 (6): 257-263.
- Schroeder H, Fladung M, 2014: Differentiation of *Populus* species by chloroplast SNP markers for barcoding and breeding approaches. *iForest* 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 Biology* 14: 374-381.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, et al., 2006: The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-1604.
- Vande Walle I, van Camp N, van de Castele L, Verheyen K, Lemeur R, 2007: Short-rotation forestry of birch, maple, poplar and willow in Flanders (Belgium) II. Energy production and CO2 emission reduction potential. *Biomass & Bioenergy* 31: 276-283.

Korrespondierende Autorin:

Dr. Hilke Schröder
Thünen-Institut für Forstgenetik
Sieker Landstr. 2
22927 Großhansdorf
hilke.schroeder@ti.bund.de

FastWOOD II: Züchtung schnellwachsender Baumarten für die Produktion nachwachsender Rohstoffe im Kurzumtrieb – Erkenntnisse aus 6 Jahren FastWOOD

Mirko Liesebach (Hrsg.)

Thünen Report 26

Bibliografische Information:
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikationen in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet unter www.dnb.de abrufbar.

Bibliographic information:
The Deutsche Nationalbibliothek (German National Library) lists this publication in the German National Bibliography; detailed bibliographic data is available on the Internet at www.dnb.de

Bereits in dieser Reihe erschienene Bände finden Sie im Internet unter www.ti.bund.de

Volumes already published in this series are available on the Internet at www.ti.bund.de

Zitationsvorschlag – Suggested source citation:
Mirko Liesebach (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

Die Verantwortung für die Inhalte liegt bei den jeweiligen Verfassern bzw. Verfasserinnen.

The respective authors are responsible for the content of their publications.



THÜNEN

Thünen Report 26

Herausgeber/Redaktionsanschrift – *Editor/address*

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

thuenen-report@ti.bund.de
www.ti.bund.de

ISSN 2196-2324

ISBN 978-3-86576-131-6

DOI:10.3220/REP_26_2015

urn:nbn:de:gbv:253-201503-dn054837-5