

Verbundvorhaben „Fastwood“

Identifizierung kommerziell genutzter Pappelklone – der Nutzen molekularer Marker für die Züchtung

Hilke Schröder, Matthias Fladung (vTI)



Hintergrund

- Viele Arten der Gattung *Populus* sind kreuzungskompatibel (sowohl intra- als auch intersektionell)
- Jahrzehntelange züchterische Arbeit führte zu großer Anzahl von Hybriden zwischen verschiedenen Pappelarten
- Heute in KUPs verwendete Pappelklone sind das Ergebnis von zahlreichen Kreuzungen und Rückkreuzungen
- ➔ Zuordnung der heute verwendeten Klone zu Arten/Hybriden ist teilweise nicht mehr möglich
- ➔ Aber unbedingt notwendig für die Erzeugung neuer Hochleistungsklone

Ziel:

- Entwicklung molekularer Marker zur eindeutigen Identifizierung von Pappel-Arten, Hybriden und Klonen



Molekulare Marker I - Mikrosatelliten

- Mikrosatelliten = Wiederholung kurzer Sequenzabschnitte (Zumeist Kombinationen aus 2 bis 4 Basen)



- Hoch variabel – Kombination aus mehreren Mikrosatelliten ermöglicht Unterscheidung von Individuen (genetisches „Fingerprinting“)
- Gibt es sowohl in den haploiden Chloroplasten- und Mitochondrien-Genomen als auch im diploiden Kern-Genom
- Wir verwenden Kern-Mikrosatelliten (vererbt von beiden Elternteilen)

→ Verwendung: Klon-Identifizierung



Molekulare Marker II - SNPs

- SNPs = single nucleotide polymorphisms
Der Austausch einzelner Basen in der Sequenz
- Ist der Unterschied innerhalb einer Art manifestiert, dann ist es ein artspezifischer SNP
- Gibt es ebenfalls sowohl in den haploiden Organellen als auch im diploiden Genom
- Wir verwenden SNPs im Chloroplasten diese werden mütterlich vererbt (also Erkennung der Mütter einer Kreuzung)
- Und SNPs im Kerngenom zur Erkennung beider Kreuzungspartner

alba	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
nigra	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
trem.	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
tro	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
delt.	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
trich.	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT
	TTATACTCCTGATATGAAACCAAAGAT

→ Verwendung: Erkennung von Arten und Hybriden



Entwicklung von Markern I - Mikrosatelliten

- Für *P. trichocarpa* sind über 3000 Mikrosatelliten Marker bekannt
- Daraus haben wir 290 ausgewählt und die Übertragbarkeit auf andere Arten getestet (*P. deltoides*, *P. nigra*, *P. tremula*, *P. tremuloides*, *P. alba*, *P. maximowiczii*)
- Über 60 Mikrosatelliten sind anwendbar für diese Arten
- Nach diversen technischen Auswahlkriterien verblieben 12 Mikrosatelliten, die für o.a. Pappelarten sehr gut anwendbar sind
- Innerhalb des Fastwood-Projekts werden insgesamt 25 Mikrosatelliten eingesetzt
- Dieser Mikrosatelliten-Pool ist ausreichend zur Identifizierung vorhandener Klone



Entwicklung von Markern II – SNPs (cp)

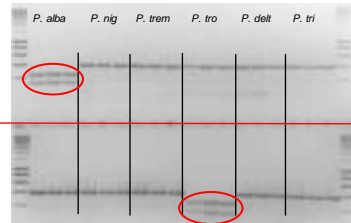
- Für das Chloroplastengenom (cp) stehen zahlreiche universelle Primer-Kombinationen (= Erkennungssequenzen) zur Verfügung („Barcode of Life“)
- Diese amplifizierbaren Bereiche liegen sowohl in kodierenden Genabschnitten als auch in nicht-kodierenden („intergenic spacer“) Regionen
- Zusätzlich wurden eigene Primer-Kombinationen entwickelt
- Und an den sieben Arten hinsichtlich Artspezifität getestet
- Je Art wurden 3 bis 12 Individuen sequenziert

Primer	N	erfolgreich	Sequenz	SNPs
Barcode	23	12	11	3
Neu	17	15	13	6



Entwicklung von Markern II – SNPs (cp)

- Ersatz für aufwändige Sequenzierung: Suche nach Restriktionsenzymen, mit deren Hilfe die DNA an den SNPs spezifisch geschnitten werden kann
- Ungeschnitten = 1 Fragment
- Geschnitten = 2 Fragmente
- 5 Arten über Restriktionsenzyme zu identifizieren
- 2 weitere über Sequenzierung



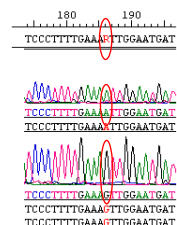
Restriktionsergebnis von *trnH-psbA* mit *Alw26I* (oben) und *Dral* (unten)

Entwicklung von Markern II – SNPs (Kern)

Anzahl art-spezifischer Kern-SNPs (PPO-Gen) je Art:

- | | | |
|----------------------|------------------------|----|
| • Sektion Tacamahaca | <i>P. trichocarpa</i> | 2 |
| | <i>P. maximowiczii</i> | 5 |
| • Sektion Populus | <i>P. tremuloides</i> | 6 |
| | <i>P. tremula</i> | 2 |
| | <i>P. alba</i> | 6 |
| • Sektion Aigeiros | <i>P. nigra</i> | 14 |
| | <i>P. deltoides</i> | 11 |

Mit 2 Primer-Kombinationen werden z.Zt. Restriktionsenzyme ausprobiert



Anwendung von Mikrosatelliten + SNPs

Verschiedene vorhandene Klone wurden getestet:

- MAX 1 bis 5 (Urbäume aus Hann. Münden):
 - Enthaltene Arten und Kreuzungsrichtung mit SNPs
 - Unterschied zwischen den Klonen mit Mikrosatelliten (MAX 1 und 4 sind identisch)
- Außerdem Brühl, Muhle-Larsen, Androscoggin, Hybride 275, Fritzi-Pauley...
- Derselbe Klon mit verschiedenen Namen:
 - Biehla 11 und Brauna 11 – identisch?
 - Mit SNPs für beide die Art *P. tremula* bestätigt
 - Mit Mikrosatelliten belegt, dass Biehla 11 und Brauna 11 identisch sind



Anwendung von SNPs

Komplex-Hybride:

- z.B. Monviso [*P. deltooides* x *trichocarpa*] x *nigra*
 - Chloroplasten-SNPs belegen, dass ursprünglich tatsächlich ein *P. deltooides* Mutterklon verwendet wurde
- Lassen sich Kern-SNPs für *P. trichocarpa* und *P. nigra* finden?
 - Ja, als heterozygote Marker



SNP-Marker – Erkennung von Hybriden

- Beispiel-Kreuzung: Mutter = *P. deltooides* (A) und Vater = *P. trichocarpa* (T):

	Chloroplast	Kern 1	Kern 2
Parental	♀: A x ♂: T	♀: AA x ♂: TT	♀: GG x ♂: CC
F1-Generation	A	AT	GC
	Kreuzung der F1 mit einander		
F2-Generation	A	AA, AT, TT	GG, GC, CC

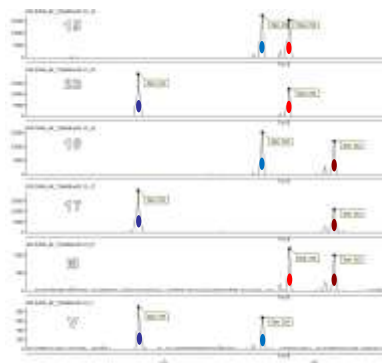
- Identifizierung über Chloroplasten SNPs als *P. deltooides* (Mutter)
- Identifizierung der F2 über Kern 1 als *P. deltooides* oder *P. trichocarpa* oder Hybrid
- ➔ Kombination aus beiden ergibt Möglichkeit F1-Generation zu bestimmen
- Eindeutige Identifizierung F2-Generation über mehrere Kern-Marker
- ➔ Kombination mehrerer Kernmarker ermöglicht Identifizierung weiterer Generationen



Anwendung von Mikrosatelliten

Nachkommenschaftsprüfung:

- Eltern: z.B. Brauna 11 (*P. tremula*) x Turesson 141 (*P. tremuloides*)
- Überprüfung, ob die Nachkommen tatsächlich aus dieser Kreuzung sind
- Vater = zwei (blaue) Allele
- Mutter = zwei (rote) Allele
- Nachkommen müssen je ein Allel von Vater und Mutter haben



Zusammenfassung

- 2 Arten von molekularen Markern (weiter) entwickelt und in Anwendung überführt:
 - Mikrosatelliten zur Identifizierung und Unterscheidung von Pappelklonen
 - SNPs zur Art- und Hybrid-Erkennung bei Pappeln
- Anwendungsbeispiele sind:
 - Identifizierung beteiligter Pappelarten innerhalb Klonen
 - Überprüfung von Klonen auf Konsistenz
 - unterschiedliche Namen, aber gleicher Klon
 - gleicher Name = identischer Genotyp?
 - Nachvollziehbarkeit der Genealogie von Hybriden
 - Nachkommenschaftsprüfungen



Danksagung

Kooperationspartner:

Alle Fastwood-Partner,
insbesondere NW-FVA,
SBS, ASP und UniMR

Finanzierung:

BMELV über FNR

Technische Assistenz:

Susanne Bein (Labor)
Matthias Wellern (Gärtnerei)
Dieter Boedeker (Gärtnerei)

Botanische Gärten:

Hamburg, Marburg, Tübingen, Dresden

Und alle Kollegen, die uns mit Pflanzenmaterial versorgt haben



**Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit !**

