

## Einleitung + Ziel

In der Gattung *Populus* gibt es zahlreiche Hybridisierungen sowohl zwischen Arten innerhalb einer Sektion als auch intersektionell. Diese Hybridisierungen finden auch in der Natur statt, werden aber insbesondere für die Züchtung von geeignetem Vermehrungsgut für die Anlage von Kurzumtriebsplantagen zur Biomasseproduktion genutzt. Jahrzehnte züchterischer Arbeit bewirkten, dass die heute verwendeten Pappel-Klone Resultate vielfacher Hybridisierungen sind und damit eine eindeutige Zuordnung der verwendeten Elternarten nicht mehr ohne weiteres möglich ist. Ein Bereich des Projekts „Fastwood“ beschäftigt sich daher mit der Entwicklung molekularer Marker zur Identifizierung von Arten und Hybriden der Gattung *Populus*.



Abb. 1: Pappel-Klonsammlung in Trenthorpe (Foto: Stefan Jencsik)

**Tabelle 1:** Übersicht über die Anzahl an getesteten Primerkombinationen in den sechs *Populus*-Arten sowie das Amplifikationsergebnis.

Art	Anzahl Primerkombinationen	Anzahl PCR-Produkt
<i>P. tri</i>	42	30
<i>P. delt</i>	42	30
<i>P. nig</i>	42	29
<i>P. tro</i>	42	29
<i>P. trem</i>	42	32
<i>P. alba</i>	42	31

## Ergebnis cp-DNA

Insgesamt wurden 42 Primerkombinationen aus 16 Chloroplastengenen in sechs *Populus*-Arten (*P. trichocarpa*, *P. deltoides*, *P. nigra*, *P. tremula*, *P. tremuloides*, *P. alba*) auf die Bildung eines PCR-Produkts getestet (Tab. 1). Zum Teil handelt es sich um (leicht modifizierte) Primer, die im barcoding verwendet werden.

Daraus konnten bisher vier SNP-Marker des cp-Genoms identifiziert werden, die eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme aufweisen, so dass über PCR-RFLPs zunächst die drei Arten der Sektion *Populus* (früher *Leuce*) unterschieden werden können. In Abb. 2 ist beispielhaft der SNP im Bereich *trnH-psbA* gezeigt und in Abb. 3 ist das Ergebnis nach Restriktion mit *Alw26I* bzw. *DraI* gezeigt.

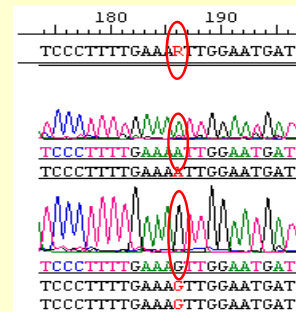


Abb. 2: SNP in der barcoding Sequenz *trnH-psbA*

## Ergebnis Kern-DNA

Von der Kern-DNA wurde das Gen ausgewählt, das für die Polyphenoloxidase (PPO) kodiert (Degen & Fladung 2008). Hierfür wurden zwölf Primerkombinationen getestet. Mit allen konnten für die sechs Arten erfolgreich PCR-Produkte amplifiziert werden. Letztendlich wurde ein knapp 400 bp großes Fragment ausgewählt, dass für alle sechs *Populus*-Arten artspezifische SNPs aufweist (Tab. 2).

**Tab. 2:** Beispiele für SNPs im PPO-Gen. Zahlen = Position auf dem PPO-Gen (bp).

Art	381	405	424	444	511	513
<i>P. tri</i>	C	A	A	C	G	A
<i>P. delt</i>	C	A	G	C	A	A
<i>P. nig</i>	C	A	G	T	G	A
<i>P. tro</i>	C	A	G	C	G	G
<i>P. tre</i>	T	A	G	C	G	A
<i>P. alba</i>	C	G	G	C	G	A

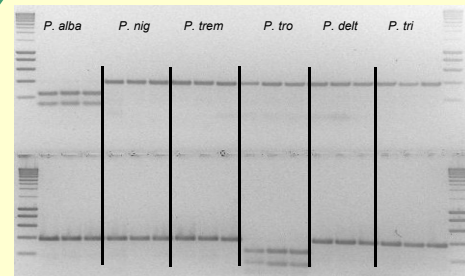


Abb. 3: Restriktionsergebnis von *trnH-psbA* mit *Alw26I* (oben) und *DraI* (unten)

## Schlussfolgerung

Die Chloroplasten-Marker werden zur Identifizierung der Mutter einer Kreuzung verwendet. Dagegen können mit Kern-Markern sowohl reine Arten als auch die Kreuzungspartner erkannt werden.



### Literatur

Degen, B., Fladung, M. (2008). Use of DNA-markers for tracing illegal logging. Proceedings of the international workshop "Fingerprinting methods for the identification of timber origins", October 8-9 2007, Bonn/Germany, Sonderheft 321: 6-14

### Danksagung

Das vorliegende Projekt wird von der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR) unterstützt. Wir danken unseren technischen Assistentinnen, Susanne Bein, Katrin Groppe und Alexandra Meier für die Laborarbeit.

# ART- UND HYBRID-IDENTIFIZIERUNG INNERHALB DER GATTUNG *POPULUS* MIT SNP-MARKERN (POSTER)

## IDENTIFICATION OF SPECIES AND HYBRIDS WITHIN THE GENUS *POPULUS* USING SNP-MARKERS

H. Schröder & M. Fladung

Johann Heinrich von Thünen-Institut, vTI-Institut für Forstgenetik, D-22927 Großhansdorf

### ABSTRACT

In the genus *Populus* numerous hybridizations occur both among the species within a distinct section as well as it is observed inter-sectional. For decades this potential of hybridization was utilized for breeding purposes. As a result poplar clones used today in short rotation plantations originate from numerous crossings and backcrossing. Thus, distinguishing the originally used parental species is almost impossible. In order to pursue breeding and generate new high performance clones the characterization of the parental species (and hybrids) is urgently required. One aspect of the FNR-financed project "FastWood" comprises the development of molecular markers and their implementation for practical use.

**Keywords:** Poplar, *Populus spec.*, hybridization, SNP markers, identification of species and hybrids, research project FastWOOD

### ZUSAMMENFASSUNG

In der Gattung *Populus* kommen zahlreiche Hybridisierungen sowohl zwischen Arten innerhalb einer Sektion als auch intersektionell vor. Diese Fähigkeit zur Hybridisierung wurde jahrzehntelang für züchterische Zwecke genutzt, was dazu geführt hat, dass die heute für Kurzumtriebsplantagen verwendeten Pappel-Klone das Ergebnis zahlreicher Kreuzungen und Rückkreuzungen sind. Die eindeutige Erkennung der ursprünglich verwendeten Elternarten ist somit fast ausgeschlossen. Für die Weiterführung der Züchtung und die Erzeugung neuer Hochleistungs-Klone ist jedoch eine Charakterisierung der Ausgangsarten (und Hybride) unbedingt erforderlich. Ein Teilaspekt des FNR-geförderten Projekts „FastWood“ hat daher die Aufgabe, molekulare Marker zu entwickeln und zur Anwendung zu bringen.

**Schlagwörter:** Pappel, *Populus spec.*, Hybridisierung, SNP-Marker, Art- und Hybrididentifizierung, FastWOOD-Projekt

# 1 EINLEITUNG

Die Gattung *Populus* besteht aus mindestens 29 Arten, allerdings sind sich die Taxonomen über die Anzahl nicht endgültig einig aufgrund von zahlreichen Hybriden, die zeitweilig als Arten beschrieben wurden (ECKENWALDER, 1996). Viele Pappelarten haben sowohl eine hohe wissenschaftliche als auch ökonomische Bedeutung. So ist das Genom von *Populus trichocarpa* eines der ersten gewesen, das vollständig sequenziert wurde (TUSKAN et al., 2006). Ihre ökonomische Bedeutung basiert auf der Nutzung vieler Arten und Hybride (bzw. Klone) in Kurzumtriebsplantagen zur Biomasse-Produktion (LICHT & ISEBRANDS, 2005; vande WALLE et al., 2007).

Systematisch werden die Arten der Gattung *Populus* in sechs Sektionen eingeteilt (*Populus*, *Tacamahaca*, *Ageiros*, *Abaso*, *Turanga* and *Leucoides*) (ECKENWALDER, 1996). Viele der Arten sind kreuzungskompatibel, sowohl innerhalb von Sektionen als auch intersektionell. Diese Hybridisierungen finden in der

Natur statt. Sie werden aber insbesondere für die Züchtung von geeignetem Vermehrungsgut für die Anlage von Kurzumtriebsplantagen genutzt, da vor allem einige Hybride ein sehr schnelles Wachstum und hohe Resistenz-Level aufweisen. Jahrzehnte züchterischer Arbeit bewirkten, dass die heute verwendeten Pappel-Klone Resultate vielfacher Hybridisierungen sind und damit eine eindeutige Zuordnung der verwendeten Elternarten nicht mehr ohne Weiteres möglich ist. Und auch für die Züchtung neuer Klone ist es unbedingt notwendig, die verwendeten Arten oder Hybride genotypisch eindeutig charakterisieren zu können, um die korrekte Beschreibung neuer Klone zu gewährleisten. Ein Bereich des Projekts „FastWood“ beschäftigt sich daher mit der Entwicklung und Anwendung molekularer Marker zur Identifizierung von Arten und Hybriden der Gattung *Populus* (weiterer Beitrag zum „FastWOOD“-Projekt, siehe vorne bei Janssen et al.).

## 2 ÜBERSICHT SNPs

Für die Identifizierung von Arten und Hybriden bieten sich sowohl Mikrosatelliten-Marker (SSR, short sequence repeat) als auch SNPs (single nucleotide polymorphisms) an. In diesem Beitrag beschränken wir uns auf die Beschreibung der SNP-Marker.

Ein SNP ist die Sequenz-Variation einer einzelnen Base, die definitionsgemäß in mindestens 1 % einer Population vorkommen muss, um als polymorph bezeichnet zu werden. SNPs entstehen durch Mutationen oder durch Lesefehler bei der DNA-Replikation und stellen die häufigste Variation in Genomen dar (JONES et al., 2009). Für Bäume z.B. ist eine Frequenz von einem SNP alle 60 bis 540 bp beschrieben (ZHANG & ZHANG, 2005). Sie können sowohl in nicht-kodierenden Regionen als auch in kodierenden DNA-Abschnitten vorkommen. Das Vorkommen in kodierenden Bereichen ist nicht zwangsläufig mit einer Veränderung des Phänotyps verbunden. Entscheidend ist die Position des SNPs in den Aminosäure-kodierenden Sequenzen – nur

Veränderungen an der ersten oder zweiten Position eines Triplets können zu Veränderungen der Aminosäure und damit des Proteins führen.

Die Suche nach SNPs hat sich in den letzten Jahren durch die Entwicklung von Hoch-Durchsatz-Sequenziergeräten vereinfacht. Dadurch sind auch die Einsatzmöglichkeiten von SNPs angestiegen. Und obwohl SNPs eine deutlich geringere Diversität als SSR-Marker haben, bieten sie aufgrund ihrer Häufigkeit und uniformen Verteilung im Genom ein wertvolles Werkzeug für Genkartierungs- und Populationsstudien (XING et al., 2005). So wurden SNPs während der letzten zehn Jahre z.B. für die Konstruktion von Genom-Karten (CHO et al., 1999) und in Bereichen der Populationsgenetik (GARCIA-GIL et al., 2003) eingesetzt.

## 3 SNPs IN PAPPEL

Es gibt nur einige wenige Berichte in der Literatur, die eine SNP-Detektion in Forstgehölzen und insbesondere in der Gattung *Populus* beschreiben (INGVARSSON, 2005; GILCHRIST et al., 2006; FLADUNG & BUSCHBOM, 2009; DEGEN & FLADUNG, 2008). Analysen von SNP-Polymorphismen in zwei verschiedenen *Populus*-Arten ergaben eine Nukleotid-Variation zwischen 7,7 SNPs pro 1.000 bp für *P. trichocarpa* (GILCHRIST et al., 2006) und 16,6 SNPs pro 1.000 bp für *P. tremula* (INGVARSSON, 2005). Diese Frequenzen sind ebenfalls für andere Waldbaum-Arten (*Pinus*, *Eucalyptus*, *Chamaecyparis*) pro 1.000 bp beschrieben worden (ZHANG & ZHANG, 2005). Für *P. trichocarpa* haben GILCHRIST et al. (2006) insgesamt 63 neue SNPs in 8.191 bp von neun Genen gefunden.

Nach DEGEN & FLADUNG (2008) existieren im Gen der Polyphenoloxidase (CONSTABEL et al., 2000) in

einem 1.689 bp großen Abschnitt 66 SNPs, die eine Differenzierung von Arten erlauben. Andere Gene, wie leafy, GA20-Oxidase oder CAD-like können ebenfalls für genetische Differenzierung von Arten oder Hybriden herangezogen werden (FLADUNG & BUSCHBOM, 2009). Interessant ist beim Vergleich der Sequenzen aus dem gleichen Gen (z.B. Polyphenoloxidase, Leafy, GA20-Oxidase) der verschiedenen *Populus*-Arten, dass Nukleotid-Variationen auftreten, die an den gleichen Positionen auftreten („Gattung-spezifische“ SNPs; FLADUNG & BUSCHBOM, 2009). Nukleotid-Variationen, die zwischen den verschiedenen *Populus*-Arten vorkommen („Spezies-spezifische“ SNPs), sind zufällig verteilt.

---

## 4 IDENTIFIZIERUNG VON PAPPELARTEN

Für die Identifizierung von SNPs in der Gattung *Populus* haben wir sowohl Primer, die bereits für die molekulare Differenzierung von Arten („Barcoding“) eingesetzt werden (z.B. HOLLINGSWORTH et al., 2009; CHASE et al., 2005) verwendet und an verschiedenen *Populus*-Arten ausprobiert, als auch aus dem *Populus trichocarpa*-Chloroplastengenom eigene Primer entwickelt.

Insgesamt haben wir 42 Primer-Kombinationen aus 16 Chloroplastengenomen getestet. Für die Etablierung haben wir die Arten *Populus trichocarpa*, *P. tremula*, *P. tremuloides*, *P. alba*, *P. deltoides* und *P. nigra* verwendet. Mit einigen Markern wurde inzwischen zusätzlich *P. maximowiczii* überprüft.

Bisher konnten wir daraus drei SNPs identifizieren, mit denen über PCR-RFLPs eine positive Identifizierung von drei Arten der Sektion *Populus* (*P. tremula*, *P. tremuloides*, *P. alba*) möglich ist (Abbildung 1 und Abbildung 2).

Für die vier weiteren Arten haben wir SNPs gefunden, die anhand von Sequenzierungen eine Artbestimmung zulassen. Zur Ergänzung sind bisher 12 Primerkombinationen aus dem Kern-Gen (Polyphenoloxidase – PPO) verwendet worden, mit denen ebenfalls über Sequenzierung die Zuordnung aller sieben untersuchten Arten realisiert werden kann.

Abbildung 1 / Figure 1

SNP in der barcoding-Sequenz trnH-psbA, der die Unterscheidung von *Populus alba* und *P. tremuloides* ermöglicht

SNP in the barcoding sequence trnH-psbA allowing the discrimination of *Populus alba* and *P. tremuloides*

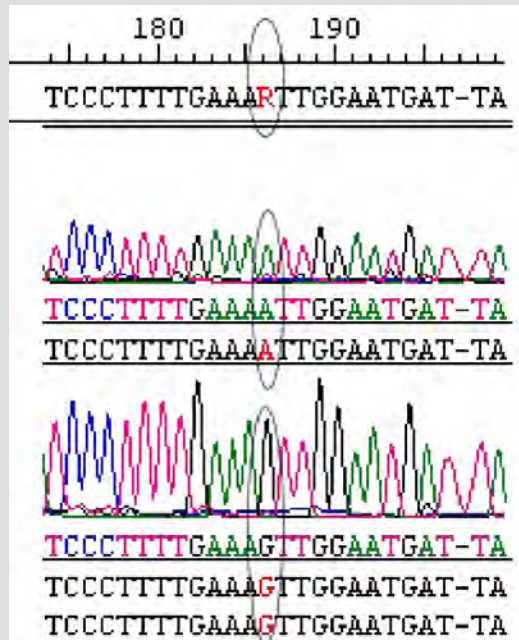
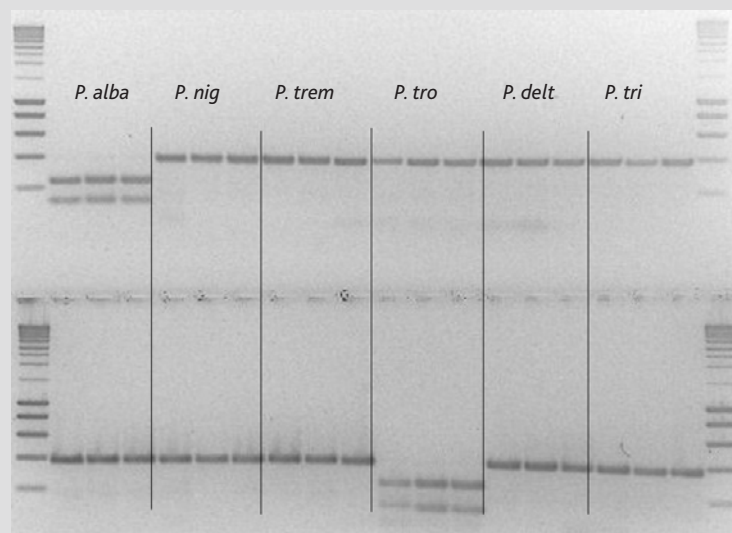


Abbildung 2 / Figure 2

Beispiel des Restriktionsergebnisses von trnH-psbA mit Alw26I (oben) (*P. alba* wird geschnitten) und DraI (unten) (*P. tremuloides* wird geschnitten); nig = *P. nigra*, trem = *P. tremula*, tro = *P. tremuloides*, delt = *P. deltoides* und tri = *P. trichocarpa*

Example of the restriction result of trnH-psbA with Alw26I (top): (*P. alba* is cut) and DraI (bottom) (*P. tremuloides* is cut); nig = *P. nigra*, trem = *P. tremula*, tro = *P. tremuloides*, delt = *P. deltoides* und tri = *P. trichocarpa*



## 5 IDENTIFIZIERUNG

Ein weiterer Schritt ist die Erkennung von Hybriden der Gattung *Populus*. Mit Hilfe der SNPs im Chloroplastengenom können die Mütter von Kreuzungen erkannt werden. SNPs im Kerngenom ermöglichen die Erkennung beider Kreuzungspartner. Im einfachsten Fall eines F1-Hybriden aus reinen Arten genügt es, einen Kern-SNP-Marker zu verwenden, um beide Kreuzungspartner zu identifizieren. Ein zusätzlicher SNP-Marker des Chloroplastengenoms ermöglicht dann noch die Zuordnung der Kreuzungsrichtung (Abbildung 3A). Ist bereits ein Elternteil ein Hybrid, so ist nur aus der Kombination eines cp-Markers und eines Kern-Markers die Art bzw. Hybridisierung zu determinieren, wie im Beispiel in Abbildung 3B dargelegt, wenn die

F1-Hybride am Kern-Marker homozygot ist. Die Kombination aus einem cp- und einem Kern-Marker ist in zwei von drei Fällen auch noch für die Erkennung von F2-Hybridisierungen ausreichend: AT und TT am Kern-Marker in Abbildung 3C. Für die Erkennung der dritten F2-Kombination (AA) wird mindestens ein zweiter Kern-Marker benötigt, an dem die zu identifizierende F2-Variante nicht homozygot ist (Abb. 3D)

Die Anzahl an benötigten Markern für die Identifizierung des Hybridisierungs-Status (bzw. der Generation) auch über die F2-Generation hinaus werden wir experimentell ermitteln und mit Hilfe von „Sättigungskurven“ validieren.

Abbildung 3 / Figure 3

Identifizierung von Hybriden / Generationen mit Hilfe von SNPs im Chloroplastengenom kombiniert mit SNPs im Kern-Genom. **A:** beide Eltern sind homozygot; **B:** ein Elternteil ist heterozygot, **C:** die F1-Hybride werden untereinander gekreuzt, **D:** Hinzunahme eines zweiten Kern-SNPs ermöglicht die Identifizierung der F2-Hybride. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Identification of hybrids / generations by applying SNPs of the chloroplast genome combined with SNPs in the nuclear genome. **A:** both parents are homozygous; **B:** one parent is heterozygous; **C:** the F1 hybrids are crossed among each other; **D:** adding another nuclear SNP allows the identification of F2 hybrids. For more details, cf. text.

<b>A</b>	Chloroplast	Kern 1
Parental	♀ : A x ♂ : T	♀ : AA x ♂ : TT
F1-Generation	A	AT

<b>B</b>	Chloroplast	Kern 1
Parental	♀ : A x ♂ : T	♀ : AT x ♂ : TT
F1-Generation	A	AT, TT

<b>C</b>	Chloroplast	Kern 1
Parental	♀ : A x ♂ : T	♀ : AT x ♂ : AT
F2-Generation	A	AA, AT, TT

<b>D</b>	Chloroplast	Kern 1	Kern 2
F1-Generation	♀ : A x ♂ : T	♀ : AT x ♂ : AT	♀ : GC x ♂ : GC
F2-Generation	A	AA, AT, TT	GC, GG, CC

## 6 LITERATUR / REFERENCES

- CHASE, M.W., SALAMIN, N., WILKINSON, M., DUNWELL, J.M., KESANAKURTHI, R.P., HAIDAR, N. & SAVOLAINEN, V. (2005): Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Phil Trans R Soc* 360: 1889-1895.
- CHO, R.J., MINDRINOS, M.; RICHARDS, D.R.; SAPOLSKY, R.J. et al. (1999): Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 23: 203-207.
- CONSTABEL, C.P., YIP, L., PATTON, J.J. & CHRISTOPHER, M.E. (2000): Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* 124: 285-295.
- DEGEN, B. & FLADUNG, M. (2008): Use of DNA-markers for tracing illegal logging. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research* 321: 6-14.
- ECKENWALDER, J. E. (1996): Systematics and evolution of *Populus*. In: STETTLER, R. F., H. D. BRADSHAW JR; P. E. HEILMAN & T. M. 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* 23: 1199-1212.
- GARCIA-GIL, M.R.; MIKKONEN, M. & SAVOLAINEN, O., 2003: Nucleotide diversity at two phytochrome loci along a latitudinal cline in *Pinus sylvestris*. *Mol Ecol* 12: 1195-1206.
- GILCHRIST, E.J., HAUGHN, G.W., YING, C.C., OTTO, S.P., ZHUANG, J., CHEUNG, D., HAMBERGER, B., ABOUTORABI, F., KALYNYAK, T., JOHNSON, L., BOHLMANN, J., ELLIS, B.E., DOUGLAS, C.JJ & CRONK, Q.C.B. (2006): Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. *Mol Ecol* 15: 1367-1378.
- HOLLINGSWORTH, M.L., CLARK, A.A., FORREST, .L.L., RICHARDSON, J., PENNINGTON, R.T., LONG, D.G., COWAN, R., CHASE, M.W., GAUDEUL, M. & HOLLINGSWORTH, P.M. (2009): Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol Ecol Resources* 9: 439-457.
- INGARVSSON, P.K. (2005): Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae). *Genetics* 169: 945-953.
- JONES, N., OUGHAM, H., THOMAS, H. & PASAKINSKIENE, I. (2009): Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist* 183: 935-966.
- LICHT, A. & ISEBRANDS, J.G. (2005): Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass & Bioenergy* 28: 203-218.
- TUSKAN, G.A., 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 CASTEELE, 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.
- XING, C., SCHUMACHER, F.R., XING, G., LU, Q., WANG, T. & ELSTON, R.C. (2005): Comparison of microsatellites, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and composite markers derived from SNPs in linkage analysis. *BMC Genetics* 6 (suppl. 1): p.29.
- ZANG, D.Q. & ZHANG, Z.Y. (2005): Single nucleotide polymorphisms (SNPs) discovery and linkage disequilibrium (LD) in forest tress. *For Stud China* 7: 1-14.