

Entwicklung und Anwendung molekularer und informatorischer Werkzeuge für das genetische Monitoring bei Wildrüben.

Development and application of molecular and bioinformatic tools for the genetic monitoring of wild beets.

Enders, M., Frese, L., Nachtigall, M.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Kontakt: matthias.enders@jki.bund.de

Zusammenfassung

Wildlebende Verwandte der Kulturpflanzen (WVK) sind wirtschaftlich wichtige pflanzen-genetische Ressourcen (PGR) für die Pflanzenzüchtung. Ein Konzept, solche PGR im natürlichen Habitat (*in situ*) zu erhalten, ist das genetische Schutzareal. Durch diese Technik ist es möglich, innerartliche Vielfalt zu erhalten und die Entstehung neuer Diversität zu ermöglichen. Das Konzept des genetischen Schutzareals wird an der Gattung *Beta* im Rahmen des vom Julius Kühn-Institut koordinierten EU-Projekts AEGRO angewendet, erprobt und weiterentwickelt. *B. patula* (Ait.) (BP) und *B. vulgaris* (L.) *maritima* (Arcang.) (BVM) werden dabei als Modellarten genutzt. Beide Spezies sind wichtige PGR für die Zuckerrübenzüchtung. BP ist eine seltene und gefährdete Art mit einem sehr begrenzten Verbreitungsgebiet. Im Gegensatz dazu ist BVM weitverbreitet und kommt u. a. an den Küsten Westeuropas vor. In Folge des globalen Klimawandels wird eine nach Norden gerichtete Migrationsbewegung dieser Unterart erwartet. Basierend auf den durch vorliegende Arbeit geschaffenen Grundlagen soll zu einem späteren Zeitpunkt die Auswirkung dieser Migrationsbewegung auf die genetische Diversität ermittelt werden.

Insgesamt wurden 557 Einzelpflanzen von 14 Sammelorten mit jeweils 25 SSR-Markern (Simple Sequence Repeat Marker) untersucht. Zusätzlich wurde eine Datenbank zur Unterstützung des genetischen Monitorings modelliert und implementiert, um die erhobenen Labor- und Felddaten in strukturierter und gut dokumentierter Form für die Auswertung von Zeitserien langfristig in hoher Qualität verfügbar zu halten. Erstmals wird die geographische Verteilung der genetischen Diversität von BP beschrieben und eine Empfehlung für die Ausweisung eines genetischen Schutzareals für BP gegeben. Auch das Wissen um die geographische Verteilung genetischer Diversität bei BVM wurde weiter vertieft.

Stichworte: Wildrüben, SSR-Marker, wildlebende Verwandte der Kulturpflanzen (WVK), genetisches Schutzareal

Abstract

Crop Wild Relatives (CWR) are an economically important plant genetic resource (PGR) for plant breeding. One strategy to conserve PGR in the natural habitat (*in situ*) is the genetic reserve technique. This approach protects the existing intraspecific diversity and allows, in contrast to the *ex situ* approaches, the emergence of new diversity. The genetic reserve conservation technique will be tested in practice with the genus *Beta* within the framework of the EU project AEGRO. *B. patula* (Ait.) (BP) and *B. vulgaris* (L.) *maritima* (Arcang.) (BVM) are used as models. Both species are important resources for sugarbeet breeding. BP is a rare and endangered species with a very limited habitat. In contrast, BVM is widespread along the shores of Western Europe. This subspecies is expected to migrate in a northward direction as a consequence of the global climate change. The impact of this migration on the genetic diversity will be examined in future analyses and will establish a basis for future research.

A total of 557 plants from 14 sampling plots were analysed using 25 SSR markers (Simple Sequence Repeat markers). Additionally, a database was modeled and implemented to support the genetic monitoring by storing and post-processing all laboratory and field data in a well documented and structured way. This makes the data available for the analysis of time series. For the first time the geographic pattern of genetic diversity in the wild beet BP was described and decision criteria for the establishment of a genetic reserve for BP were postulated. The knowledge of geographic patterns of genetic diversity in the wild beet BVM was consolidated as a baseline for further investigations on the potential influence of climate changes and the corresponding geographic range shift on genetic diversity.

Keywords: Wild beet, SSR markers, Crop Wild Relatives (CWR), genetic reserve conservation technique

Einleitung

Die zum Genpool (Harlan und de Wet, 1971) einer Kulturart zugehörigen Wildarten werden als wild lebende Verwandte der Kulturpflanzen (WVK) bezeichnet. Sie sind eine wirtschaftlich bedeutende pflanzengenetische Ressource (PGR) für die Pflanzenzüchtung (Maxted *et al.*, 2008). Genetische Schutzareale (genetic reserve conservation technique, Maxted *et al.*, 1997) gelten als ein Verfahren zur Erhaltung von PGR in situ, also am natürlichen Standort. Dieser Ansatz sichert vorhandene innerartliche Diversität und ermöglicht – im Gegensatz zu Ex-situ-Verfahren – die Entstehung neuartiger genetischer Variabilität. Bei der Entwicklung eines solchen Verfahrens sind die bislang nicht sicher vorhersehbaren Auswirkungen des Klimawandels, die damit verbundenen Veränderungen der Lebensräume sowie die daraus resultierenden Prozesse wie genetische Erosion und Migration zu berücksichtigen.

Das Konzept des "Genetischen Schutzareals" wird im Rahmen des vom JKI koordinierten EU-Projekts AEGRO u. a. an der Gattung *Beta* praxisnah getestet. *B. patula* (Ait.) (BP) und *B. vulgaris* (L.) ssp. *maritima* (Arcang.) (BVM) dienen dabei als Modellarten. Beide Arten sind wichtige genetische Ressourcen der Zuckerrübenzüchtung. Darüber hinaus unterscheiden sie sich durch sehr unterschiedliche Verbreitungsmuster. BP weist ein kleines Verbreitungsareal auf und erscheint damit experimentell geeignet, den Arbeitsablauf zur Etablierung eines genetischen Schutzareals zu erproben. Hingegen ist BVM unter anderem entlang der Atlantikküste Westeuropas weit verbreitet. Zusätzlich scheint sich diese Unterart seit ca. 150 Jahren entlang der Ostseeküste auszubreiten (Driefen, 2003). Seit 2004 ist sie auch auf einer russischen Insel südlich von Finnland anzutreffen (Glazkova, 2006). Die Unterart *maritima* ist deshalb geeignet, die Folgen einer Verschiebung von Arealgrenzen und damit verbundener Migrationsprozesse auf die innerartliche Diversität zu untersuchen.

Die Ziele vorliegender Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Für die Art BP und die Unterart BVM war eine genetische Diversitätsanalyse durchzuführen. Für BP sollte für die Ausweisung eines genetischen Schutzareals notwendige Datengrundlage geschaffen werden. Für die Unterart BVM sollen die gewonnenen Erkenntnisse in späteren Untersuchungen genutzt werden, um das Konzept des genetischen Schutzareals weiter zu verbessern. Weiterhin sollte eine Datenbank entwickelt werden, die speziell auf die Anforderungen eines genetischen Monitorings angepasst ist.

Material und Methoden

Für die Art BP wurde an sieben Sammelorten Blattmaterial von insgesamt 242 Pflanzen vom portugiesischen Projektpartner (M. Pinheiro de Carvalho, Universität Funchal, Madeira) gesammelt, getrocknet und zum Julius Kühn-Institut gesendet. Alle Sammelorte liegen auf zwei Schären nahe Madeira (Portugal) und wurden mithilfe von GPS-Geräten georeferenziert. Zusätzlich wurden 20 sympatrisch vorkommende BVM Pflanzen als Vergleichsgruppe

gesammelt. Für BVM wurde an ebenfalls sieben Sammelorten an der dänischen Ostseeküste und auf der Insel Fehmarn Blattmaterial von insgesamt 315 Pflanzen durch L. Frese (JKI) und G. Poulsen (Nordische Genbank) gesammelt und ebenfalls getrocknet und nach Deutschland versendet. Auch diese Sammelorte wurden georeferenziert; für fünf dieser sieben Sammelorte sind zusätzlich Einzelpflanzenkoordinaten vorhanden.

Am Julius Kühn-Institut wurde aus dem Blattmaterial die genomische DNA durch eine nach Dorokhov (1997) modifizierte Minipräparation extrahiert. Um die genetische Struktur aufzuklären, wurden 25 SSR-Marker (Cureton et al., 2002; McGrath et al., 2007; Laurent et al., 2007, Richards et al., 2004, KWS Saat AG, zu Forschungszwecken) eingesetzt. Die Amplikons wurden elektrophoretisch getrennt und über einen dual Laser DNA Fragmentanalyser (LiCor 4300) detektiert. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit weiteren Labor- und Felddaten in einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Monitoring-Datenbank abgespeichert und durch den Einsatz zusätzlich programmierter Module vorverarbeitet. Das Resultat dieser Vorverarbeitung sind einzelne Dateien, die als direkte Eingabe für unterschiedliche Programme zur statistischen Analyse und Verrechnung dienen.

Zum Einsatz kamen die Programme „Darwin“ (Perrier und Jacquemoud-Collet, 2006) und „Phylip“ (Felsenstein, 1989) zur Visualisierung der Daten, die Statistik-Software „SAS“ (Anonym, 2002) zur Berechnung wichtiger Kenngrößen wie z. B. der beobachteten bzw. erwarteten Heterozygotie (H_o , H_e), dem PIC-Wert sowie zum Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Zur weiteren Aufklärung der genetischen und geographischen Struktur wurden die Programme „FStat“ (Guodet, 2001), „Geneland“ (Guillot *et al.*, 2005) sowie „GDA“ (Lewis und Zaykin, 2001) eingesetzt.

Ergebnisse

Bei der geographischen Struktur der genetischen Diversität von BP zeigt sich deutlich die Abgrenzung der mit ID3 bzw. ID4 bezeichneten BVM-Pflanzen, die sympatrisch mit den BP-Pflanzen der Sammelorte BP3 bzw. BP4 vorkommen (Abbildung 1).

Auch die Pflanzen des Sammelortes BPIC grenzen sich deutlich ab. Dieser Sammelort ist der einzige Sammelort auf der sehr isoliert liegenden Schäre „Ilhèu Chão“. Alle anderen Sammelorte (BP1 bis BP6) liegen gemeinsam auf der Schäre „Ilhèu do Desembarcadouro“. Die Pflanzen dieser Sammelorte können nur grob in Cluster eingeteilt werden, die den jeweiligen Sammelorten zugeordnet werden können. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch eine Populationsstrukturaufklärung unterstützt. Durch diese werden Populationen gebildet, die entweder nur Pflanzen eines Sammelortes oder Pflanzen von mehreren, aber benachbarten, Sammelorten enthalten (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde das Wissen über die geographische Struktur genetischer Diversität bei BVM im Baltischen Raum weiter vertieft. So konnte u. a. festgestellt werden, dass die im Kalundborg-Fjord lokalisierte Population von BVM genetisch klar von den anderen untersuchten Populationen abgetrennt ist. Dies ist besonders hervorzuheben, da in diesem Vorkommen Resistenzgene gegen das „beet necrotic yellow vein virus“ (BNYVV) gefunden wurden (Frese 2002). Die festgestellten Strukturen sind jedoch allein über die geographische Lage der Sammelorte zueinander nicht ausreichend erklärbar.

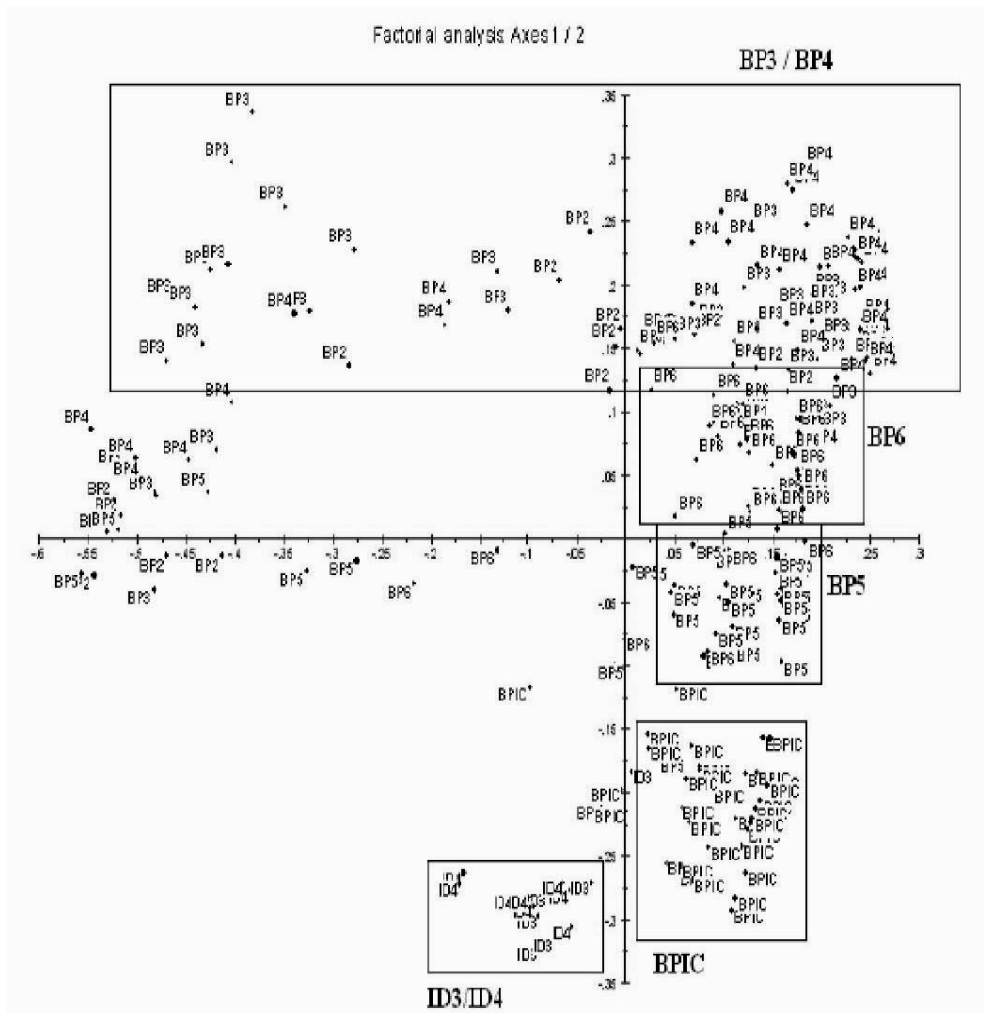


Abb. 1 Faktorenanalyse von *Beta patula* (Ait.). Durch die Achsen 1 und 2 erklärte Varianz: 42,48 %

Zur Entwicklung der Monitoring-Datenbank wurde das Datenbankmanagementsystem MS Access (Microsoft® Office Access 2007 SP2 MSO) genutzt. Das Datenbankschema ist in Abbildung 2 dargestellt. Zusätzlich wurden verschiedene Visual Basic for Application (VBA) Module für die Verarbeitung und Aufbereitung der Daten implementiert und in das Framework der Datenbank integriert. Auf Anfrage kann eine aktuelle Version der Datenbank vom Autor zur Verfügung gestellt werden.

Literatur

- Anonym (2002): SAS software, Version 9.1 of the SAS System for Windows XP. Copyright © 2002-2003 SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. Product or service names are registered trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Dorokhov, D.B., E. Klocke (1997): A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ. J. Genet.* **33**, 358–365.
- Driessen, S. (2003): *Beta vulgaris* subsp. *maritima* an Deutschlands Ostseeküste – Kartierung, genetische und physiologische Charakterisierung und ihre Rolle als Kreuzungspartner für transgene Zuckerrüben, Dissertation, RWTH Aachen.
- Felsenstein, J. (1989): PHYLIP - Phylogeny Inference Package. *Cladistics* **5**, 164–166.
- Cureton, A.N., J.M. Burns, B.V. Ford-Lloyd, H. J. Newbury (2002): Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow between sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) populations. *Mol. Ecol. Notes*, **2** (4), 402–403.
- Frese, L. (2002): Combining Static and Dynamic Management of PGR: A Vase Study of *Beta* Genetic Resources, In: Engels J.M.M., V. R. Rao, A. H. D. Brown, M. T. Jackson (Eds.) *Manag. Plant Genet. Divers.* 133–147.
- Glazkova et al. (2006): A new species to the flora of Russia. *Botanicheskii zhurnal*, **91**, 34–45.
- Goudet, J. (2001): FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3), Available from <http://www.unil.ch/izjedisplayerea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Guillot, G., F. Mortier, A. Estoup (2005): Geneland: a computer package for Landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 712–715.
- Harlan, J.R., J.M.J. De Wet (1971): Towards a rational Classification of Cultivated Plants. *Taxon* **20**, 509–517.
- Laurent, V., P. Devaux, T. Thiel, F. Viard, S. Mielordt et al. (2007): Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries an GenBank ESTs to map the sugar beet genome. *Theor. Appl. Genet.* **115** (6), 793–805.
- Letschert, J.P.W. (1993): *Beta* section *Beta*, biogeographical patterns of variation and taxonomy. Wageningen Agricultural University Papers, 1–153.
- Lewis, P.O., D. Zaykin (2001): Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data, Version 1.0 (d16c), Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html> (Website Stand: 21.10.2010).
- Maxted, N., J.G. Hawkes, B.V. Ford-Lloyd, J.T. Williams (1997): A practical model for *in situ* genetic conservation. In: Maxted, N., B.V. Ford-Lloyd, J.G. Hawkes (Eds.), *Plant Genetic Conservation – The in situ approach*, Chapman & Hall, London.
- Maxted, N., S.P. Kell, B.V. Ford-Lloyd (2008a): Crop Wild Relative Conservation and Use: an Overview, In: Maxted, N., B. V. Ford-Lloyd, S. P. Kell, J. M. Iriondo, M. E. Dulloo, J. Turok (Eds.), *Crop Wild Relative Conservation and Use*.
- McGrath, J.M., D. Trebbi, A. Fenwick, L. Pannella, B. Schulz, V. Laurent, S. Barnes, C. Murray (2007): An Open Source First-Generation Molecular Genetic Map from a Sugarbeet x Table Beet Cross an its extension to Physical Mapping. *Crop Sci.* **47**, Supplement 1, 27–44.
- Perrier, X., J.P. Jacquemoud-Collet (2006): DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin> (Website, Stand 21.10.2010).
- Richards, C.M., M. Brownson, S. E. Mitchell, S. Kresovich, L. Panella (2004): Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). *Mol. Ecol. Notes* **4** (2), 243–245.
- Tjebbes, K. (1933): The wild beets of the North Sea region. *Botanical Notiser*, 305–315.