

## Molekulare Verwandtschaftsanalyse von *Gaultheria*-Arten

Molecular distance analysis for *Gaultheria* species

Lehmann, C.<sup>1</sup>, Nehrlich, S.<sup>1,2</sup>, Budahn, H.<sup>1</sup>, Plaschil, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen,  
Institut für Züchtungsforschung an gartenbauliche Kulturen und Obst,  
Erwin-Baur-Straße 27, 06484 Quedlinburg

<sup>2</sup>IPK-Genbank, Außenstelle Nord, Inselstraße 9, 23999 Insel Poel

Kontakt: Claudia.Lehmann@jki.bund.de

### Zusammenfassung

Das in Nordamerika beheimatete amerikanische Wintergrün (*Gaultheria procumbens* L.) wird auf Grund der auffälligen roten Scheinbeeren, der immergrünen Blätter und der guten Winterhärte als Herbstpflanzung in Deutschland immer beliebter. Seine Anfälligkeit gegenüber dem Pilz *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) erschwert jedoch zunehmend den Anbau. Nach der Resistenzevaluierung von *Gaultheria*-Arten soll durch Artkreuzung Resistenz oder Toleranz gegenüber *C. gloeosporioides* auf *Gaultheria procumbens* übertragen werden. Die Chance auf eine erfolgreiche Artkreuzung sinkt mit steigender genetischer Distanz drastisch. Deshalb sollen mit einer molekularen Distanzanalyse relativ eng verwandte *Gaultheria*-Wildarten ermittelt werden.

Stichwörter: *Gaultheria procumbens* L., *Colletotrichum gloeosporioides*, Distanzanalyse

### Abstract

*Gaultheria procumbens* L. originating from northern America is more and more popular on the German market because of its red berry-like fruits, its evergreen leaves and its good winter hardiness. Its great susceptibility for *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) made it more complicated in the last years to cultivate it in Germany. After an evaluation of resistance, the aim is to cross a wild species with *Gaultheria procumbens* to get a resistant cultivar. The chance for successful crosses between different species decreases with increased genetic distance. Therefore molecular distance analysis was made to identify wild species with relatively close relation to *Gaultheria procumbens*.

Keywords: *Gaultheria procumbens* L., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), distance analysis

### Einleitung und Zielsetzung

In Deutschland wachsen Bekanntheitsgrad und Beliebtheit von *Gaultheria procumbens*. Ein ernstes Problem ist jedoch die hohe Anfälligkeit gegen den Pilz *Colletotrichum gloeosporioides*. Dieser verursacht das Absterben von Trieben, Verbräunungen sowie schwarze Läsionen am Stängelgrund. Der Pilz kann alle Altersstadien der Pflanze befallen. Besonders in Jungpflanzenbetrieben ist der Pilz deshalb ein großes Problem. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zeigt nur mäßigen Erfolg. Außerdem werden immer mehr Pflanzenschutzmittel vom Markt genommen. Deshalb besteht aus ökologischer und ökonomischer Sicht ein großer Bedarf für die Entwicklung *Colletotrichum*-resistenter *Gaultheria*-Arten. In der Sammlung von Wildarten und Kulturformen der Gattung *Gaultheria*, die im JKI gegenwärtig untersucht wird, fallen z.T. erhebliche morphologische Unterschiede auf. Das Material wird momentan auf seine Resistenzeigenschaften gegenüber dem Pathogen getestet.

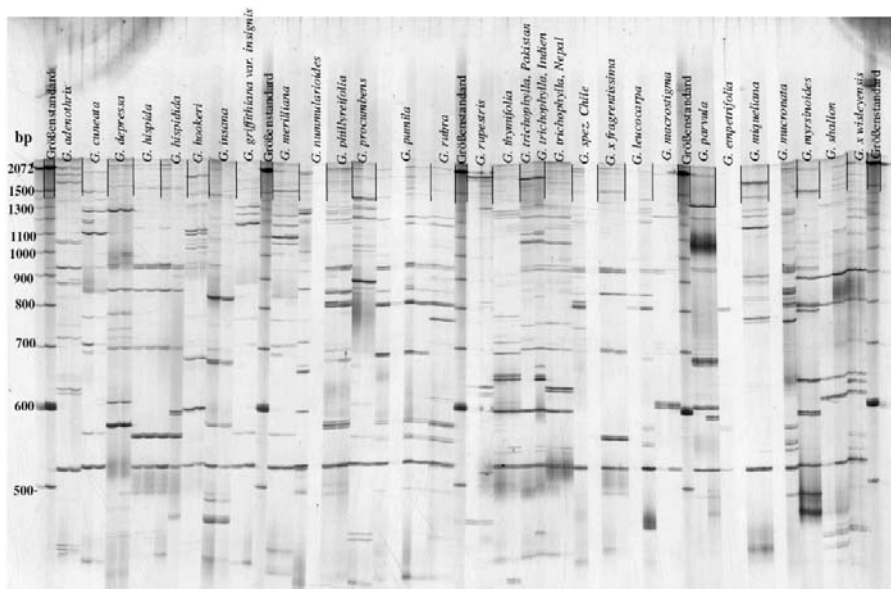
Bei weit voneinander entfernten Arten einer Gattung sind mit größerer Wahrscheinlichkeit ernsthafte Kreuzungsbarrieren zu erwarten. Deshalb sollte parallel zur Resistenzbonitur schon eine vergleichende Distanzanalyse mit molekularen Markern durchgeführt werden um geeignete Kreuzungspartner für *Gaultheria procumbens* zu identifizieren.

## Material und Methoden

Von 28 verschiedenen *Gaultheria*-Arten wurde jeweils an 2 Pflanzen frisches, vom Pathogen nicht befallenes Blattmaterial entnommen. Für die DNA-Isolation kam eine leicht modifizierte CTAB-Methode nach Rogers und Bendich (1985) zum Einsatz. Die isolierte DNA wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel visuell beurteilt, spektrophotometrisch quantifiziert und auf eine Konzentration von 8 ng/μl verdünnt.

Es wurde eine Variante der RAPD-Analyse angewandt, die Doppelprimer (dp)RAPD-Analyse, wie von Budahn et al. (2008) beschrieben. Durch die Kombination von jeweils 2 Dekamerprimern können auf einem Gel mehr Fragmente analysiert werden, die dazu noch in einem günstigeren Längenbereich (kleinere Amplifikate) liegen. Die verwendeten Dekamerprimer waren:

OPA 07 5'-GAAACGGGTG-3'+ OPA 08 5'-GTGACGTAGG-3'  
 OPA 09 5'-GGGTAACGCC-3'+ OPA 10 5'-GTGATCGCAG-3'  
 OPA 17 5'-GACCGTTGT-3'+ OPA 18 5'-AGGTGACCGT-3'  
 OPB 01 5'-GTTTCGCTCC-3'+ OPB 02 5'-TGATCCCTGG-3'  
 OPB 05 5'-TGCGCCCTTC-3'+ OPB 06 5'-TGCTCTGCCC-3'  
 OPB 07 5'-GGTGACGCAG-3'+ OPB 08 5'-GTCCACACGG-3'  
 OPB 09 5'-TGGGGGACTC-3'+ OPB 10 5'-CTGCTGGGAC-3'  
 OPB 11 5'-GTAGACCCGT-3'+ OPB 12 5'-CCTTGACGCA-3'



**Abb. 1** Elektrophoretische Auftrennung der dpRAPD-Amplifikation OPA 17 + OPA 18 von 28 *Gaultheria*-Arten (jeweils Doppelbestimmung)

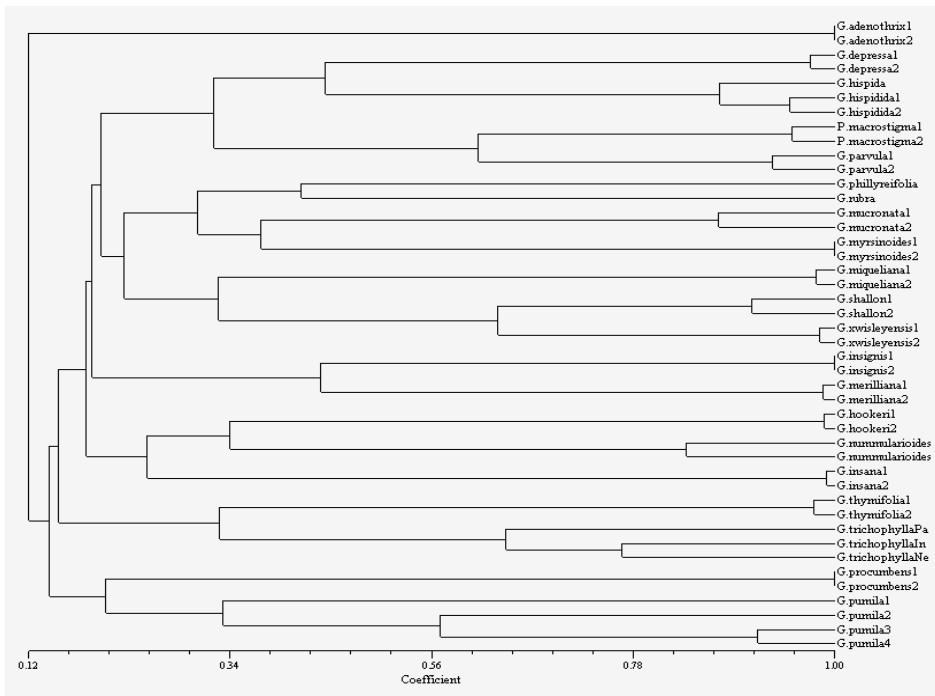
Die Amplifikate wurden mit dem gleichen Volumen Probenladepuffer versetzt, denaturiert, auf ein 4 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel (SequigenGT, Bio-Rad, 50 cm Trennstrecke) geladen, für zwei Stunden bei 50 °C und 100 W aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Als Größenmarker wurde die 100 bp ladder der Firma Invitrogen verwendet.

Von den ursprünglich 28 verwendeten *Gaultheria*-Arten konnten sechs Arten nicht in der Distanzanalyse berücksichtigt werden, da nach PCR dieser Proben zu häufig keine Amplifikate vorhanden waren.

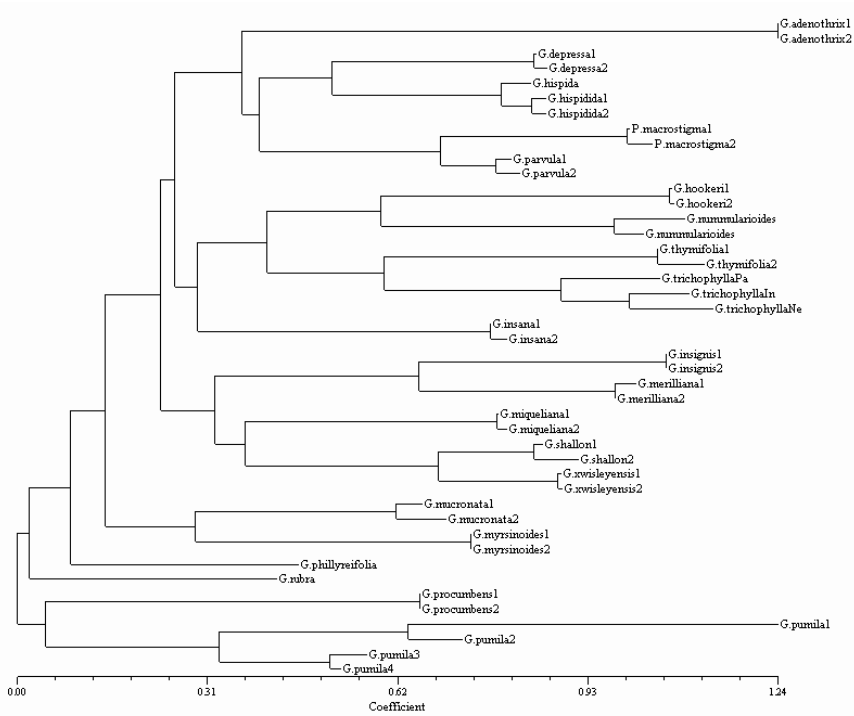
### Ergebnisse

Für die Distanzanalyse wurden ausschließlich freiliegende und starke Banden verwendet. Auf den acht PAA-Gelen wurden 596 Banden identifiziert und ausgewertet, die diesen Anforderungen entsprachen (Abbildung 1).

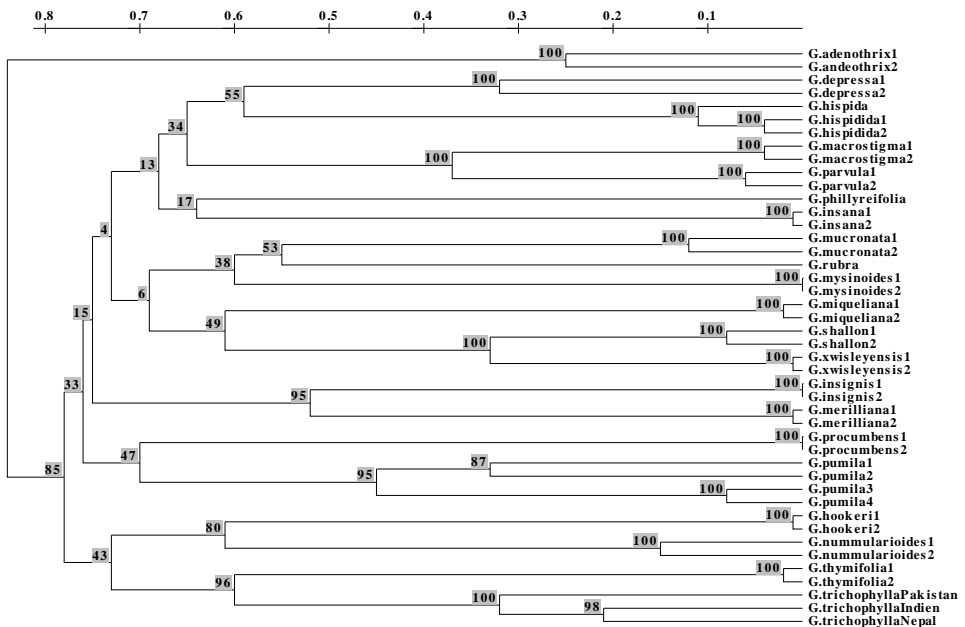
Diese wurden in einer 1/0-Matrix erfasst und mit dem NTSYSpc Programm Version 2.2 und dem Treecon 1.3b Programm ausgewertet. Die Verrechnung mit NTSYSpc erfolgte mit der Sequential Agglomerative Hierarchical Nested cluster analysis (SAHN-Methode) (Abbildung 2) und mit der Neighbor Joining (NJ)-Methode (Abbildung 3). Mittels Treecon 1.3b Programm wurde ein Dendrogramm erstellt (Abbildung 4). In den Abbildungen 2 und 3 wird die Ähnlichkeit angegeben, das heißt, hohe Werte bedeuten eine große Ähnlichkeit. In Abbildung 4 wird eine Distanz angegeben, das heißt niedrige Werte bedeuten eine große Ähnlichkeit. Die beiden Proben einer Art sind in aller Regel sehr ähnlich. Einige Arten zeigen in allen drei Dendrogrammen eine erhöhte Ähnlichkeit zueinander auf, was auf eine nahe Verwandtschaft schließen lässt. Diese sind als konsistente Gruppen (Tabelle 1) aufgelistet.



**Abb. 2** Dendrogramm der untersuchten *Gaultheria*-Arten nach der SAHN Methode im NTSYSpc Programm



**Abb. 3** Dendrogramm der untersuchten *Gaultheria*-Arten nach der NJ Methode im NTSYSpc Programm



**Abb. 4** Dendrogramm der untersuchten *Gaultheria*-Arten nach dem Treecon 1.3b Programm

**Tab. 1** Konsistente Gruppen von *Gaultheria*-Arten ermittelt aus den Distanzanalysen

Gruppennummer	<i>Gaultheria</i> -Arten
1	<i>G. hispida</i> , <i>G. hispidida</i> , <i>G. depressa</i> , <i>G. macrostigma</i> , <i>G. parvula</i>
2	<i>G. miqueliana</i> , <i>G. x wisleyensis</i> , <i>G. shallon</i>
3	<i>G. griffithiana</i> var. <i>insignis</i> , <i>G. merilliana</i>
4	<i>G. procumbens</i> , <i>G. pumila</i>
5	<i>G. nummularioides</i> , <i>G. hookeri</i>
6	<i>G. trichophylla</i> Pakistan, <i>G. trichophylla</i> Indien, <i>G. trichophylla</i> Nepal, <i>G. thymifolia</i>
7	<i>G. mucronata</i> , <i>G. myrsinoides</i>

## Diskussion

Die beiden Pflanzen jeder *Gaultheria*-Art weisen eine hohe Übereinstimmung auf. Dagegen ist anhand der Ähnlichkeits-Koeffizienten deutlich zu erkennen, dass die genetische Entfernung der Arten zueinander relativ hoch ist. Damit sind Schwierigkeiten bei einem angestrebten Artkreuzungsprogramm zu erwarten. Bei einer möglichen Wiederholung des Experimentes sollten weitere Akzessionen innerhalb *Gaultheria procumbens* mit einbezogen werden um die große Distanz zu den Wildarten bewerten zu können.

Als genetisch am engsten verwandte Art zu *Gaultheria procumbens* konnte *Gaultheria pumila* ermittelt werden. Diese wurde in allen verwendeten Rechenmodellen als am engsten verwandte Art ermittelt und wäre demnach ein geeigneter Kreuzungspartner. Ergebnisse zu Resistenz/Anfälligkeit von *Gaultheria pumila* gegenüber dem Pathogen liegen noch nicht vor. Für eine detaillierte Abstufung der Verwandtschaftsverhältnisse zu anderen *Gaultheria*-Arten müssten Untersuchungen mit bedeutend mehr Markern durchgeführt werden.

Danksagung: Die vorliegenden Untersuchungen und Ergebnisse sind Teil des Kooperationsprojektes „Erschließung neuer Resistenzquellen in der Gattung *Gaultheria* gegen den Pilz *Colletotrichum gloeosporioides*“ (FK22814101506) gefördert durch das BMELV innerhalb der Innovationsförderung (Projekträger BLE) in Zusammenarbeit mit der Gartenbau Holz GbR, Weeze.

## Literatur

Budahn, H., O. Schrader, H. Peterka (2008):  
Development of a complete set of disomic  
rape-radish chromosome addition lines.  
*Euphytica* **162**, 117-128.

Rogers, S. O., A. J. Bendich. (1985): Extraction  
of DNA from milligram amounts of fresh,  
herbarium and mummified plant-tissues.  
*Plant Mol. Biol.* **5**, 69-76.