

---

# Auf der Suche nach anpassungsrelevanten Genen bei Waldbäumen

Barbara Fussi, Eva Cremer, Monika Konnert

**Schlüsselwörter:** adaptive Marker, SNPs, Trockenstress, Rotbuche (*Fagus sylvatica*)

---

**Zusammenfassung:** Die Analyse anpassungsrelevanter Gene, die für bestimmte Eigenschaften verantwortlich sind, wird auch bei Waldbäumen immer wichtiger. Vor allem im Klimawandel benötigt die forstliche Praxis rasche Entscheidungshilfen zur Herkunftswahl. Mittels SNP-Marker soll es in Zukunft gelingen, forstliches Vermehrungsgut zu empfehlen, das mit bestimmten Stressbedingungen besser zurechtkommt. Über Genexpressions- oder Assoziationsstudien werden derzeit phänotypische Merkmale und Reaktionen auf Stressbedingungen mit genetischen Markern in Verbindung gebracht. Vor allem bei Pappel, Kiefer und Eiche sind bereits zahlreiche sogenannte adaptive SNPs entwickelt worden, die nun auf andere Baumarten übertragen werden sollen. Derzeit untersucht das ASP diese Möglichkeiten für Buche unter Einbeziehung von 20 Herkünften vorwiegend aus Deutschland und Bulgarien. Acht potenzielle Kandidatengene für Trockenstress sind im Fokus. Erste Ergebnisse zeigen große Unterschiede in der Variabilität der analysierten Kandidatengene. Sie bilden die Grundlage für weitere Studien in Richtung Trockenstresstoleranz bei diesen Baumarten.

---

## Einleitung

Neben der Baumartenwahl muss im Klimawandel auch der Herkunftswahl große Aufmerksamkeit geschenkt werden. Viele unserer Hauptbaumarten haben ein großes Verbreitungsgebiet und wachsen auch in Regionen, wo es trockener und wärmer ist als bei uns. Herkunftsversuche, wie sie das ASP für unterschiedliche Baumarten betreibt, liefern zwar Aussagen zur Standortverträglichkeit und zur genetischen Anpassungsfähigkeit von Herkünften einer Baumart, beziehen sich aber auf die derzeitigen und nicht auf zukünftige Bedingungen bei uns. Zudem ist die Langfristigkeit solcher Versuche bis zur Umsetzung in praktische Handlungsempfehlungen ein begrenzender Faktor, vor allem angesichts der prognostizierten Schnelligkeit des Klimawandels. Die Waldbesitzer benötigen rasche Entscheidungen und Empfehlungen und sollten auf Ver-

mehrungsgut zurückgreifen können, bei dem die Wahrscheinlichkeit größer ist, dass es mit bestimmten Stressbedingungen (z. B. Trockenstress) besser zurechtkommt.

In genetischen Untersuchungen wurden bislang überwiegend sogenannte neutrale DNA-Marker eingesetzt, die nicht in Beziehung zu bestimmten Eigenschaften der Bäume stehen. Zunehmend jedoch zielen neue genetische Untersuchungsmethoden auf adaptive Genmarker ab, mit denen versucht wird Gene zu finden, die für bestimmte Eigenschaften verantwortlich und damit relevant für die Anpassung sind (Neale 2007). Dabei geht man davon aus, dass Populationen mit höherer Diversität in anpassungsrelevanten Genen besser mit veränderten Umweltbedingungen umgehen können. In den letzten Jahren wurde ein neuer Typ von Genmarkern entwickelt, der auf Einzelnukleotidaustauschen in der DNA basiert und als SNPs (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) bezeichnet wird. Es gibt inzwischen Hinweise, dass einige dieser SNPs bzw. eine Kombination mehrerer SNPs mit Trockenstresstoleranz, Winterhärte, Austriebszeit und Zeit des Blattfalls assoziiert sind (González-Martínez et al. 2006; Wachowiak et al. 2009). Solche SNPs könnten als diagnostische Werkzeuge benutzt werden, um Herkünfte mit bestimmten Eigenschaften auszuwählen.

## Auffinden anpassungsrelevanter Gene – methodische Einsichten

An der Identifizierung von anpassungsrelevanten Genen wird seit einigen Jahren in Feld- und Laborversuchen gearbeitet (z. B. Finkeldey und Hatterer 2010). Physiologische Studien unter kontrollierten Bedingungen zeigen, dass auf bestimmte Umwelt- oder Stressfaktoren spezifische Gene reagieren. Solche Fragestellungen wurden anfangs an Modellpflanzen im Labor studiert (Ingram und Bartels 1996) und später dann auf Bäume ausgeweitet (*Pinus pinaster*, Costa et al. 1998; Dubos et al. 2003). Für die Lokalisierung von Genorten, die für Stressbewältigung zuständig sind, können Studien der sogenannten »Genexpression« dienen. Genexpression ist der Vorgang, bei dem die genetische Infor-

mation der Zelle in ein für den Stoffwechsel benötigtes Produkt umgesetzt wird. Bei Waldbäumen sind Genexpressionsstudien aber noch wenig fortgeschritten. Auf diesem Wege hat man z. B. bei einzelnen Genotypen extreme Unterschiede in der Reaktion auf Trockenheit gefunden (Street et al. 2006).



Abbildung 1: DNA-Extraktion bei der Buche Foto: ASP

### SNP in einem Sequenzabschnitt

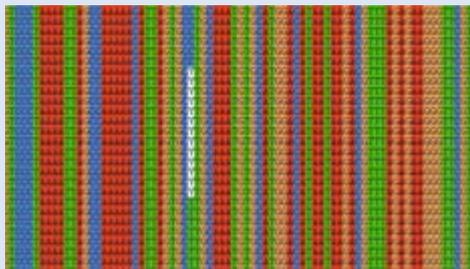


Abbildung 2: SNP in einem Sequenzabschnitt des Gens ALDH bei unterschiedlichen Individuen, die an einer bestimmten Stelle ein C (blau hinterlegt), ein T (grün hinterlegt) oder ein Y (weiß hinterlegt) zeigen; das Y steht für den heterozygoten Status C und T an dieser Stelle

Anpassungsrelevante Gene können auch über »Assoziationsstudien« identifiziert werden. Diese Studien versuchen, phänotypische Variation mit allelischer Variation in Kandidatengen, d. h. mit Genen, die bekannterweise in Zusammenhang mit dem zu untersuchenden phänotypischen Merkmal stehen, zu verbinden (González-Martínez et al. 2008) und dadurch anpassungsrelevante SNPs zu lokalisieren. Wenn die Variation an einem oder mehreren Genorten in Kandidatengen mit der Variation eines wichtigen Merkmals »assoziiert« werden kann, können in einem nächsten Schritt Allele identifiziert werden, die zur Auswahl dieses Merkmals genutzt werden können. Einige Gene, die mit Trockenheitstoleranz in Verbindung stehen, sind bereits bekannt und bei bestimmten Baumarten auch untersucht (*Pinus taeda*, González-Martínez et al. 2006; *Pinus halepensis*, Grivet et al. 2009; *Pinus pinaster*, Eveno et al. 2008). Im Vordergrund solcher Untersuchungen stehen vor allem die beiden mediterranen Kiefernarten, weil die Region, in der sie wachsen, besonders stark vom Klimawandel und dem prognostizierten Niederschlagsrückgang im Mittelmeergebiet betroffen sein wird.

Die Eiche wird als Modellbaumart für Studien bezüglich der Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen verwendet, weil sie sehr große Populationen bildet und hohe Variation in anpassungsrelevanten Genen besitzt (Gailing et al. 2009). So wurde bei Eiche die natürliche Nukleotiddiversität an Kandidatengen, die am Blattaustrieb beteiligt sind, charakterisiert (Vornam et al. 2010) und dabei an einem Gen eine vergleichsweise hohe Differenzierung entlang eines Höhengradienten gefunden. Bei Traubeneiche wurden kürzlich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Populationen entlang eines klimatischen Gradienten an drei Kandidatengen für Trockenstress gefunden; bei Stieleiche fanden sich solche Unterschiede nur bei einem Gen (Homolka et al. 2013). Im Rahmen eines europäischen Projektes (EVOLTREE) wurden auch bei Buche erste Gene identifiziert, für die Funktionen in der Reaktion auf Umweltfaktoren und Stress angenommen werden (Kremer et al. 2010). Zunehmend wird auch bei Buche über die Entdeckung und Analyse von SNPs in Kandidatengen berichtet, die bei Trockenstress und Austrieb eine Rolle spielen könnten (Seifert et al. 2012; Lalagüe et al. 2014). Die bisher gefundene Nukleotiddiversität, d. h. die Anzahl der SNPs in einem Gen, ist nach bisherigen Erkenntnissen bei Buche geringer als z. B. bei Eichen- und Pappelarten (Lalagüe et al. 2014).

## Analyse anpassungsrelevanter Gene

Der Analyse von anpassungsrelevanten Genen in natürlichen Populationen geht eine Analyse mit neutralen Genmarkern voraus, um genetische Unterschiede, deren Ursachen neutrale Prozesse sind, abzugrenzen von solchen, die auf stressbedingte Selektion zurückzuführen sind. Neutrale Marker zeigen genetische Differenzierung zwischen Beständen auf, die auf demografische oder anthropogen bedingte Prozesse (z. B. Genfluss, Rückwanderungsgeschichte, waldbauliche Behandlung) zurückzuführen ist. Solche Untersuchungen werden auch am ASP routinemäßig durchgeführt und bildeten auch in einem Projekt zur Analyse anpassungsrelevanter Marker bei Buche den ersten Schritt. Dabei wurde festgestellt, dass sich Buchenpopulationen aus Deutschland und Bulgarien deutlich in ihrer genetischen Zusammensetzung unterscheiden, auch wenn sie auf Standorten mit ähnlichem Ariditätsindex stocken. Daher müssen sie bei der Analyse anpassungsrelevanter Gene getrennt betrachtet werden.

Die eigentliche Analyse beginnt mit der Auswahl potenzieller Kandidatengene mit bekannter Funktion und damit Relevanz für das zu untersuchende Merkmal (z. B. Reaktion auf Trockenstress) durch Recherchen in der Literatur und in Datenbanken. Die Anzahl solcher Gene ist bei Waldbaumarten noch gering. Zum Auffinden weiterer Kandidatengene kann eine sogenannte Transkriptomanalyse durchgeführt werden an Herkünften, die im gewünschten Merkmal möglichst unterschiedlich sind (z. B. Vorkommen auf trockenen und feuchten Standorten). Für Buche hat eine solche Analyse am IGA-Udine (IT) im Auftrag des ASP zur Identifizierung von 580.000 Positionen in der Basenabfolge geführt, an denen sich die Basen (Buchstaben) in der DNA-Sequenz der Individuen unterscheiden. Daraus wurden 10.000 hochqualitative SNPs ausgewählt, die zwischen Individuen der Herkünfte von trockenen und feuchten Standorten unterschiedlich waren. In einem ersten Schritt wurden aus diesem umfangreichen Datensatz über Abgleich mit Datenbanken drei Genfragmente ausgewählt, die möglicherweise mit Trockenstress in Verbindung stehen.

Als nächster Schritt erfolgt die Sequenzierung der ausgewählten Gene, in Individuen von feuchten und trockenen Standorten, d. h. das Ablesen der Basenreihenfolge (Nukleotidreihenfolge) eines Gens. Dafür werden zuerst die gewünschten Genfragmente (Kandidatengene) in einer PCR-Reaktion (PCR = Polymerase-Kettenreaktion) vervielfältigt. Anschließend erfolgt die eigent-

liche Entschlüsselung der Basen, ein als »Sequenzierung« bezeichneter Vorgang. Dies geschieht voll automatisiert in einem Sequenziergerät, das die Reihenfolge der unterschiedlich fluoreszierenden Nukleotide bestimmen kann. Die Sequenzierung ist zurzeit noch sehr aufwändig und wesentlich kostenintensiver als z. B. die Analyse der Kernmikrosatelliten. Für die Auswertung der Sequenzen und die Berechnung der populationsgenetischen Parameter der analysierten Gene kommen spezielle Computerprogramme zum Einsatz.

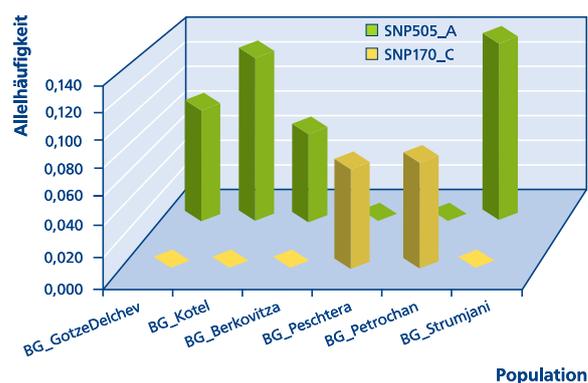


Abbildung 3: Verteilung der SNPs am Gen ALDH innerhalb der bulgarischen Buchenherkünfte am Beispiel von zwei Genorten (505 und 170)

Am ASP werden aktuell 400 Individuen aus 20 Buchenherkünften aus Deutschland und Bulgarien an acht potenziellen Kandidatengenen für Trockenstress untersucht. Beispielfhaft werden in Abbildung 3 erste Ergebnisse am Gen ALDH innerhalb der bulgarischen Herkünfte dargestellt. Am Genort 505 kommt in den beiden feuchten Herkünften BG\_Peschtera und BG\_Petrochan zu 6% die Base »A« vor. In den trockenen Beständen (BG\_GotzeDelchev, BG\_Kotel, BG\_Berkovitzka, BG\_Strumjani) kommt hier nur die Base »G« vor. An einer anderen Stelle (170) innerhalb des Gens ALDH zeigen Individuen der Herkünfte BG\_Peschtera und BG\_Petrochan keine Variation (nur Base G), Individuen der anderen bulgarischen Herkünfte von trockenen Standorten zeigen dort neben »G« auch zwischen 6% und 13% die Base »C«.

In den acht analysierten Kandidatengenen wurden insgesamt 484 polymorphe Nukleotidpositionen gefunden, mit 14 bis 112 variablen Stellen je Gen (Tabelle 1).

Genfragment	Anzahl der Individuen mit erfolgreicher Sequenzierung	Fragmentlänge des Gens (bp)	Variable Stellen	Anzahl der Haplotypen	Haplotypische Diversität
Gen_53	390	154	14	22	0,421
DHN	383	510	49	59	0,736
APX4_1	347	674	66	81	0,867
APX4_2	352	635	43	49	0,841
ALDH	363	505	45	41	0,383
IDH1	343	512	52	48	0,795
Gen_154_1	338	894	103	93	0,827
Gen_8983_2	338	514	112	203	0,893

Tabelle 1: Genetische Parameter der acht sequenzierten Genfragmente

Aus allen variablen Stellen werden pro Gen Haplotypen erstellt, deren Anzahl schwankte zwischen 22 und 203. Je höher ihre Anzahl, umso variabler ist das Gen. Die haplotypische Diversität gibt Auskunft über die Verteilung der einzelnen Haplotypen. Kommen wenige davon sehr häufig vor und viele wiederum selten, ergibt sich daraus ein niedriger Wert. Sind sie annähernd gleichverteilt, entsteht ein höherer Wert.

Das bedeutet, dass je mehr Haplotypen in einer Population vorkommen und je gleichmäßiger sie verteilt sind, die Wahrscheinlichkeit umso höher ist, dass die Population auf unterschiedliche Umweltsituationen positiv reagieren kann.

### Fazit

Die hier dargestellten Untersuchungen bilden die Grundlage für weitere Studien in Richtung genetische Variation adaptiver Merkmale. Diese Arbeiten stehen bei Bäumen erst am Anfang und es ist in Zukunft noch mehr Arbeit nötig. Um den Zusammenhang zwischen einem bestimmten SNP und dem betreffenden Merkmal herstellen und gut absichern zu können, müssen eine große Anzahl von Individuen für dieses Merkmal phänotypisiert und genotypisiert werden. Dies wird nur mittels Hochdurchsatztechnologien möglich sein. Für die Anwendbarkeit von adaptiven Markern für die Praxis müssen die Ergebnisse noch in weiteren Studien abgesichert werden.



Abbildung 4: Buchenbestand in Bulgarien. Foto: ASP

## Literatur

- Costa, P.; Bahrman, N.; Frigerio, J.M.; Kremer, A.; Plomion, C. (1998): Water-deficit-responsive 754 proteins in maritime pine. *Plant Mol Biol* 38, S.587–596
- Dubos, C.; Plomion, C. (2003): Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant Mol Biol* 51, S.249–262
- Eveno, E.; Collada, C.; Guevara, M.A.; Léger, V.; Soto, A.; Díaz, L.; Léger, P. et al. (2008): Contrasting patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. *Mol Biol Evol* 2, S.417–437
- Finkeldey, R.; Hattmer, H.H. (2010): Genetische Variation in Wäldern – Wo stehen wir? *Forstarchiv* 81, Heft, S.123–129
- Gailing, O.; Vornam, B.; Leinemann, L.; Finkeldey, R. (2009): Genetic and genomic approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model. *Physiol Plant* 137, S.509–519
- González-Martínez, S.C.; Ersoz, E.; Brown, G.R.; Wheeler N.C.; Neale, D.B. (2006): DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics* 172, S.1915–1926 DOI: 10.1534/genetics.105.047126
- González-Martínez, S.C.; Huber, D.; Ersoz, E.; Davis, J.M.; Neale, D.B. (2008): Association genetics in *Pinus taeda* L. II. Carbon isotope discrimination. *Heredity* 101, S.19–26
- Grivet, D.; Sebastiani, F.; Vendramin, G.G. (2009): Patterns of polymorphism resulting from long-range colonization in the Mediterranean conifer Aleppo pine. *New Phytol* DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03015.x
- Homolka, A.; Schueler, S.; Burg, K.; Fluch, S.; Kremer, A. (2013): Insights into drought adaptation of two European oak species revealed by nucleotide diversity of candidate genes. *Tree Genetics&Genomics*. DOI 10.1007/s11295-013-0627-7
- Ingram, J.; Bartels, D. (1996): The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, S.377–403
- Kremer, A.; Sederoff, R.; Wheeler, N. (2010): Genomics of forest health in the Fagaceae: meeting report. *TGG*. DOI 10.1007/s11295-010-0277-y
- Lalagüe, H.; Csillery, K.; Oddou-Muratorio, S.; Safrana, J.; de Quattro, C.; Fady, B.; Gonzalez-Martinez, S.C.; Vendramin, G.G. (2014): Nucleotide diversity and linkage disequilibrium at 58 stress response and phenology candidate genes in a European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations from southeastern France. *Tree Genetics&Genomics*. DOI 10.1007/s11295-013-0658-0
- Neale, D.B. (2007): Genomics to tree breeding and forest health. *Curr Opin Genet & Develop* 17, S.539–544
- Seifert, S.; Vornam, B.; Finkeldey, R. (2012): DNA sequence variation and development of SNP markers in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Eur. J. For. Res.* 131, S.1761–1770
- Street, N.R.; Skogström, O.; Sjödin, A.; Tucker, J.; Rodríguez-Acosta, M.; Nielson, P.; Jansson, S.; Taylor, G. (2006): The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *The Plant Journal* 48: S.321–341
- Vornam, B.; Gailing, O.; Finkeldey, R. (2010): Natürliche Nukleotid-Diversität von Kandidatengenen für den Blattaustrieb der Traubeneiche (*Quercus petraea*). *Forstarchiv* 81, S.146–149
- Wachowiak, W.; Balk, P.A.; Savolainen, O. (2009): Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) *TGG* 5: S.117–132 DOI 10.1007/s11295-008-0188-3

**Keywords:** adaptive markers, SNPs, drought stress, European beech (*Fagus sylvatica*)

**Summary:** The analysis of adaptive genes, responsible for certain characteristics, gains importance also in forest trees. Especially under climate change the forest practice needs prompt decision support for choosing the right provenance. Thereby SNP-markers should aid in the process of recommending forest reproductive material, which is able to cope with specific stress conditions. Gene expression and association studies are currently underway in order to link phenotypic traits and reaction to stress conditions with the underlying genes. Mainly in poplar, pine and oak several adaptive SNPs have already been developed, which should now be transferred to other tree species. ASP currently explores this possibility for beech using 20 provenances mainly from Germany and Bulgaria. Eight potential candidate genes for drought resistance are focused on. First results show large differences in the variability of the analyzed candidate genes. They form the basis of further studies dealing with drought tolerance in this tree species.