

SNP-Variation in Kandidatengenen bei *Salix* – Vergleich zwischen natürlichen *S. viminalis*-Populationen und einer Zuchtpopulation von *S. spp.*

Karl Gebhardt¹, Birgit Ziegenhagen², Alwin Janßen¹, Marion Hoffmann¹, Sascha Liepelt²

¹Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (NW-FVA), Hann. Münden

²Philipps-Universität Marburg, Marburg

Zusammenfassung

Für die Auswahl von Kreuzungspartnern zur Züchtung schnellwachsender Weiden, ist die gegebene genetische Variation in exprimierten Genen vermutlich bedeutsamer als die bisher vielfach beschriebene genetische Variation an anonymen, neutralen Genorten. Mit der vorgestellten Methodik gelang es Abschnitte der fünf Gene PPO (AF368291), GA 20ox (AJ843624), LFY (U93196), Clavata1 (AT1G75820) und ARK1 (Poptr_004s02720) zu resequenzieren. Mittels BLAST wurde geprüft ob die erhaltenen Sequenzen aus dem Ziel-Gen stammten. Die Genotypisierung von 53 Einzel-nukleotid-Polymorphismen erfolgte mit Hilfe der KASP-Technologie an Individuen aus natürlichen Korbweiden-Populationen von der Elbe sowie an 63 Zuchtsorten der NW-FVA. Mittels einer Hauptkoordinatenanalyse wurde überprüft, ob sich die Züchtungskclone und die Individuen der natürlichen Korbweiden-Populationen bezüglich der Nukleotidvariation in den beschriebenen Genen unterscheiden. Zuchtsorten von *S. viminalis* und deren Hybriden gruppierten jedoch mit den Individuen aus der natürlichen Population während Klone von *S. alba*, *S. x rubens* und *S. fragilis* ein separates Cluster bildeten. Beim Vergleich der allelischen Muster der natürlichen Population und der Zuchtsorten zeigten sich relativ hohe Werte für die Korbweiden und deutlich niedrigere Werte für die Vertreter der Arten *S. alba*, *S. fragilis* und ihrer Hybriden.

Schlüsselworte: Korbweiden, Zuchtsorten, allelische Muster, SNPs

Abstract

SNP variations of candidate genes of *Salix* – comparison between natural *S. viminalis* populations and a breeding population of *Salix* spp.

For the selection of crossing partners for breeding fast-growing willows, the given genetic variation in expressed genes is probably more significant than the previously described genetic variation at anonymous, neutral loci. With the presented methodology we succeeded to resequence sections of the five genes PPO (AF368291), GA-20ox (AJ843624), LFY (U93196), Clavata1 (AT1G75820) and ARK1 (Poptr_004s02720). By BLAST it was examined whether the sequences obtained originated from the target gene. Genotyping of 53 single nucleotide polymorphisms was performed using the KASP-technology with 410 individuals from natural osier-populations and with 63 cultivars of a breeding population of the NW-FVA. By means of a main coordinate analysis it was checked whether different clones of a breeding population and the individuals of the natural osier populations differed in nucleotide variation of the above-described genes. However, cultivars of *S. viminalis* and their hybrids clustered with individuals from a natural population while clones of *S. alba*, *S. x rubens* and *S. fragilis* formed a separate cluster. When comparing the allelic patterns of natural populations and cultivars we found relatively high values for the osier and significantly lower values for the representatives of the species *S. alba*, *S. fragilis* and their hybrids.

Key words: osier; cultivars, allelic pattern, SNPs

Einleitung

Genomische Forschung mit schnellwachsenden Baumarten motiviert sich sowohl durch die Notwendigkeit der züchterischen Verbesserung als auch der Entwicklung diagnostischer Methoden zur Erhaltung, Wiederherstellung und Bewirtschaftung natürlicher Populationen. Wie Neale und Kremer (2011) zusammenfassten wird die genomische Forschung an Waldbäumen durch deren lange Generationszeiten sowie dem Mangel an gut charakterisierten Mutanten und Zuchtlinien behindert. Genomforschung basierend auf dem Nachweis von SNPs ermöglicht es nun einen möglichen genomischen Effekt der Domestikation in physiologisch relevanten Kandidatengen zu überprüfen.

Material und Methoden

Aus den von MOSNER et al. (2012) beschriebenen natürlichen Populationen von *S. viminalis* (26 Bestände) entlang der mittleren Elbe wurden 410 Individuen resequenziert. 63 der verwendeten Weiden-Zuchtsorten stammen aus dem Salicetum Vaake der NW-FVA. Die schwedischen Zuchtsorten Inger (*S. hippohaefolia*) und Tordis (*S_schw_x_vim_x_vim*) wurden ebenfalls untersucht. Von den in Tabelle 1 angeführten Genen konnten PCR-Produkte erstellt werden, die von der Menge und Qualität her für Sequenzierung geeignet waren. Die für Pappel konstruierten Primerpaare sind bei Fladung und Buschbom (2009) beschrieben. Nach Sanger-Sequenzierung wurde mit Hilfe der Software CodonCode Aligner 3.7.1 eine Consensus-Sequenz erstellt. Mittels BLAST wurde geprüft ob die erhaltenen Sequenzen aus dem Ziel-Gen stammten. Die Genotypisierung der 53 SNPs erfolgte mit Hilfe der KASP-Technologie (<http://www.lgcgenomics.com/>). Auf Basis der mit GenAIEx berechneten genetischen Distanzen zwischen Individuen wurden eine Hauptkoordinatenanalyse und ein Vergleich der allelischen Muster durchgeführt.

Tabelle 1: Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) in 5 Kandidatengen

Gen / Identifikation	Funktion	Literatur	Sequenz	Kodierend		Nichtkodierend		Gesamt
				syn	nichtsyn	5'UTR	Intron	
PPO (AF368291)	Polyphenoloxidase Wound response	Constabel et al. (2000)	1628 bp	2	1	0	0	3
GA20ox (AJ843624)	Gibberellic acid 20-oxidase, elongation growth	Israelsson et al (2005)	983 bp	2	2	0	0	4
LEAFY (LFY) (U93196)	Meristem identity transcription factor	Rottmann et al. (2000)	842 bp	3	0	0	25	28
Clavata1 (CLV1) (AT1G75820)	Receptor kinase, (secondary) growth regulation	Bush (2008)	915 bp	9	10	2	0	21
ARK1 (Poptr_004s02720)	Serin-/Threonin- Kinase/trans- membranes Re- zeptorprotein	Groover et al. (2006)	2845 bp	15	8	0	9	32

Ergebnisse und Diskussion

Wie in Tabelle 1 summarisch dargestellt, enthielt das Polyphenoloxidase-Gen keine Introns und zeigte die geringste Variabilität. Es wurden 3 SNPs detektiert. Nur PPO_491 zeigte eine nicht-synonyme Variation. Vom Gibberellinsäure-Oxidase-Gen konnten 3 Abschnitte sequenziert werden wobei ein Abschnitt sich nicht erfolgreich mit der Referenz verschneiden ließ. Von 4 SNPs in den Exon-Regionen waren 2 nichtsynonym und führten zu einem Aminosäureaustausch. Vom Gen Leafy konnte nur ein 294bp langer Abschnitt des Exons sequenziert werden. Dieser enthielt 3 synonyme SNP's und keine nicht-synonyme Variation. Der Intronbereich zeigte sich mit 25bp als reich an

Variation. Vom CLAVATA1-Gen konnte etwa das erste Drittel erfolgreich analysiert werden. Dieser Bereich war frei von Introns, jedoch wurden 69 bp des 5'-nicht-transkribierten Bereiches sequenziert. Letzterer enthielt 2 SNPs. 19 SNPs fanden sich im kodierenden Bereich wovon 10 nichtsynonym waren. Das ARK1-Gen (Serin-/Threonin-Kinase) wurde nahezu vollständig resequenziert. Es wurden 32 SNPs dieses Gens detektiert. Davon lagen 9 in Introns vor, 15 waren synonym und 8 nichtsynonym.

Mittels einer Hauptkoordinatenanalyse (Abb. 1) wurde überprüft, ob sich die Züchtungskclone und die Individuen einer natürlichen Population bezüglich der Nukleotidvariation in den beschriebenen Genen unterscheiden. Zuchtsorten von *S. viminalis* und deren Hybriden gruppieren jedoch mit den Individuen aus der nat. Population während Klone von *S. alba*, *S. x rubens* und *S. fragilis* ein separates Cluster bilden. Beim Vergleich der allelischen Muster der natürlichen Population und der Zuchtsorten (Abb. 2) zeigten sich vgl. hohe Werte für die Korbweiden und deutlich niedrigere Werte für die Art *S. alba* und ihre Hybriden *S. x rubens*.

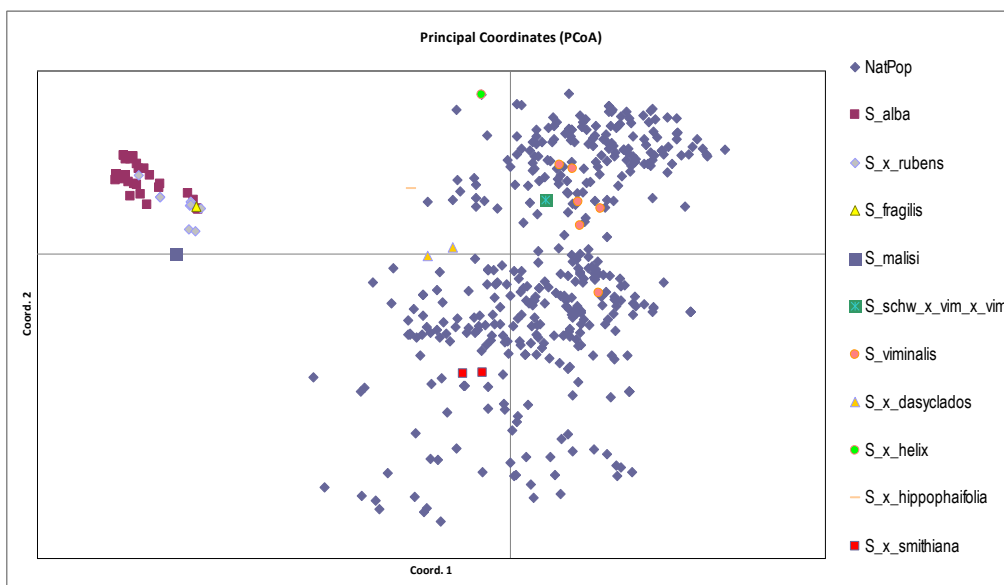


Abb. 1: Hauptkoordinaten-Analyse auf der Grundlage von 53 SNP-Loci

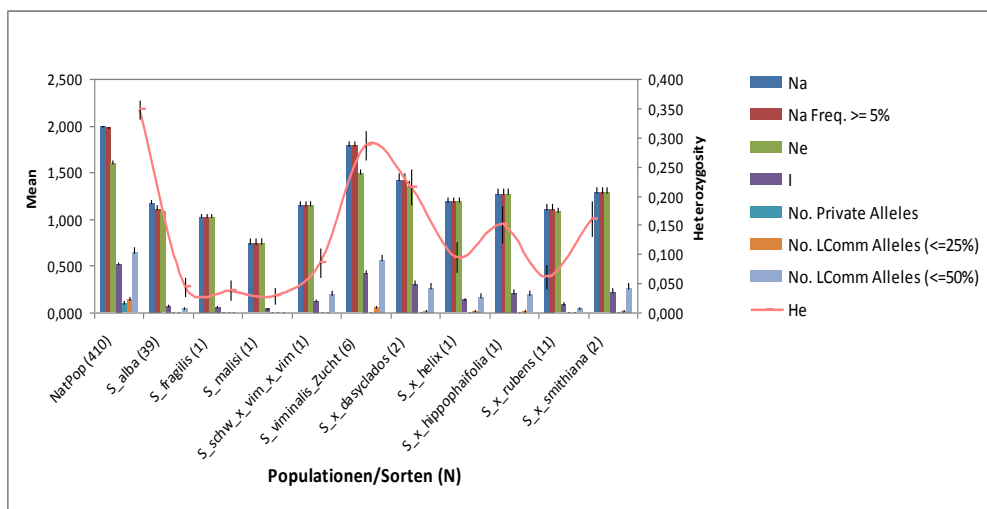


Abb. 2: Allelische Muster der Populationen/Sorten

Für die Auswahl von Kreuzungspartnern zur Züchtung schnellwachsender Weiden, die sich für die Zwecke der Energieholzgewinnung in kurzen Umtrieben eignen, ist die gegebene genetische Variation in exprimierten Genen vermutlich bedeutsamer als die bisher vielfach beschriebene genetische Variation an anonymen, neutralen Genorten. Mit der vorgestellten Methodik gelang es Abschnitte von 5 Genen zu resequenzieren, Einzelnukleotid-Polymorphismen zu detektieren und eine größere Probenzahl zu genotypisieren.

Danksagung und Hinweis

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft u. Verbraucherschutz vom 1.06.10 bis 31.5.13 unter dem FKZ: 22013709 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt liegt bei den Autoren.

Literatur

- Bush MJ, 2008: Identifying genes that regulate secondary growth in poplar. Master Thesis, Queens Univ., Kingston, Ontario, Canada.
- Constabel CP, Yip L, Patton JJ, Christopher ME, 2000: Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 124: 285–295.
- Fladung M, Buschbom J, 2009: Identification of single nucleotide polymorphisms in different *Populus* species. *Trees* 23: 1199-1212.
- Groover AT, Mansfield SD, DiFazio SP, Dupper G, Fontana JR, Millar R, Wang Y, 2006: The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX1 reveals overlapping mechanisms regulating the shoot apical meristem and the vascular cambium. *Plant Mol Biol* 61(6): 917-932.
- Israelsson M, Sundberg B, Moritz T, 2005: Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin biosynthetic and signalling genes in wood-forming tissues in aspen. *The Plant Journal* 44: 494-504.
- Mosner E, Liepelt S, Ziegenhagen B, Leyer I, 2012: Floodplain willows in fragmented river landscapes: Understanding spatiotemporal genetic patterns as a basis for restoration plantings. *Biological Conservation* 153: 211–218.
- Neale DB, Kremer A, 2011: Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* 12: 111-122.
- Rottmann WH, Meilan R, Sheppard LA, Brunner AM, Skinner JS, Ma C, Cheng S, Jouanin L, Pilate G, Strauss SH, 2000: Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and Arabidopsis. *Plant Journal*. 22: 235-246.

Korrespondierender Autor:

Dr. Karl Gebhardt
Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (NW-FVA)
Abteilung Waldgenressourcen
Prof.-Oelkers-Str. 6
34346 Hann. Münden
karl.gebhardt@nw-fva.de