

November 2013

ABSCHLUSSBERICHT

Auftraggeber

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee (KOB)

Auftragnehmer:

ecogenics GmbH, Grabenstrasse 11a, 8952 Schlieren, Schweiz

Projektnummern:

- I. 514-06.01-2809BE010 (BLE): Molekulargenetische Sortenbestimmung von pomologisch bestimmten Apfelsorten
- II. 314-06.01-2813BE001 (BLE): Nachbestellung der molekulargenetischen Sortenbestimmung von pomologisch nicht bestimmten Apfelsorten
- III. 2013183 (KOB): Molekulargenetische Sortenbestimmung von zusätzlichen Apfelsorten

Thema:

Molekulargenetische Sortenbestimmung der Deutschen Genbank Obst: Apfel

Laufzeit:

Januar 2012 – Januar 2014

Berichtszeitraum:

Januar 2012 – November 2013

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Sämtliche in der Deutschen Genbank Obst (DGO) erhaltenen Apfelsorten (*Malus*) sollen molekulargenetisch charakterisiert werden. Im Rahmen des ersten Projektes (I) sollen die pomologisch vorgängig bestimmten Sorten charakterisiert werden. In den nachfolgenden Projekten sollen die verbleibenden Sorten der DGO, welche nicht pomologisch bestimmt wurden (II), und zusätzliche Proben der KOB (III) analysiert werden. Die molekulargenetische Charakterisierung soll mit 17 bekannten Mikrosatelliten-Markernsystemen erfolgen und die Daten mit Referenzsorten verglichen werden. Der Auftraggeber stellt Blattproben der zu überprüfenden Sorten zur Verfügung, ecogenics führt die Analysen im Verlauf von maximal zwei Jahren durch und liefert die Daten und die isolierte DNA an den Auftraggeber.

2. Planung und Ablauf des Projekts

Das Projekt wurde in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase wurden die zu verwendenden Mikrosatelliten-Markernsysteme im Rahmen von multiplex PCR Assays etabliert und so angepasst, dass mit den verwendeten DNA Isolaten robuste, reproduzierbare Daten erzeugt werden können. In der zweiten Phase wurden die eigentlichen Analysen durchgeführt, Samples wurden extrahiert und mittels den drei vorher etablierten multiplex Polymerasen Ketten Reaktion (PCR) Assays analysiert. Die Analyse der pomologisch vorgängig bestimmten Sorten wurden prioritär ausgeführt. In der letzten Phase wurden die Daten analysiert und wenn nötig Wiederholungen durchgeführt.

Projektetablierung

Die aus den Blättern isolierte DNA muss für die nachfolgenden PCR Analysen geeignet sein. Die Reinheit der DNA muss gewährleisten, dass keine Inhibition der PCR stattfindet und es muss genügend DNA als Templat in der PCR vorhanden sein. Als geeignetste Methode zur Isolation genomischer DNA aus *Malus* Blättern zwecks PCR Analysen, hat sich die alkalische Lyse in Anwesenheit milder Detergenzien mit anschließender pH-Neutralisation erwiesen. Zudem muss die DNA Isolation so erfolgen, dass Probenvertauschungen und Kreuzkontaminationen weitestgehend ausgeschlossen werden können. Um letztere Ziele zu

erreichen, wurden sämtliche Arbeitsschritte in 96-Well-Platten mit entsprechenden Kontrollen durchgeführt.

Die vom Auftraggeber definierten Mikrosatelliten-Markensysteme wurden in multiplex PCR etabliert und bezüglich Robustheit, Ausfallrate und Interpretation grob charakterisiert. Für die Validierung dieser Resultate wurden für bekannte Referenzproben publizierte Allelgrößen (<http://www.hidras.unimi.it/>) beigezogen. Die folgenden von ECP/GR empfohlenen Marker sollten als Multiplex-PCR etabliert werden: CH01f02, CH01f03b, CH01h01, CH01h10, CH02c06, CH02c09, CH02c11, CH02d08, CH03d07, CH04c07, CH04e05, CH04f10, CH05f06, GD12, GD147, Hi02c07 und NZ05g8. Es wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen modifizierte PCR Primer eingesetzt, so dass die Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese erfolgen kann. Die Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe und die zu erwartenden Allelgrößen schränken die möglichen Kombinationen von Mikrosatelliten Markern in den einzelnen multiplex PCR ein. Das Ziel war, die 17 Marker in drei PCR kombinieren zu können.

Das aufgrund von Empfehlungen der ECP/GR festgelegte Markersset wurde hinsichtlich Robustheit evaluiert und nach Rücksprache mit dem Auftraggeber angepasst. Folgende vier im vorgeschlagenen Set enthaltenen Marker waren gemäss unserer Erfahrung wenig robust bei der Anwendung auf DNA Extrakten: CH01h10, CH02c06, CH02c11 und NZ05g8. Um ein möglichst lückenloses und verlässliches Datenset generieren zu können, wurden eine Reihe weiterer Marker für *Malus* gemäss <http://www.hidras.unimi.it/> evaluiert. In Rücksprache mit dem Auftraggeber wurden die vier erwähnten Marker durch folgende vier Marker ersetzt: CH01f07a, CH02g09, CH05e03 und COL. Die Ausfallrate dieser Marker ist im Vergleich zu den ersetzten Markern deutlich geringer.

Die 17 verwendeten Mikrosatelliten Marker wurden so kombiniert, dass sie in drei multiplex PCR Ansätzen analysiert werden können. Folgende Marker Kombinationen wurden gewählt:

<i>PCR Ansatz</i>	<i>Marker</i>	<i>Fluorophor</i>
1	CH04c07	ATTO 550
	CH01h01	FAM
	CH01f03b	ATTO 565
	CH05f06	ATTO 550
	CH03d07	ATTO 532
	CH01f07a	FAM

2	CH02g09	ATTO 565
	CH05e03	ATTO 550
	GD12	FAM
	CH01f02	ATTO 565
	CH02d08	ATTO 532
	CH02c09	ATTO 550
3	Hi02c07	ATTO 550
	GD147	ATTO 565
	CH04f10	FAM
	CH04e05	ATTO 550
	COL	ATTO 532

Die Marker und die Fluorophore wurden so verteilt, dass eine möglichst geringe gegenseitige Signalstörung zu erwarten ist. Die genauen Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Um die zu erwartenden Fragmentgrößen vorgängig abschätzen zu können, wurden die auf <http://www.hidras.unimi.it/> publizierten Allelgrößen verwendet.

DNA Isolation, multiplex PCR Analyse und Kapillarelektrophorese

Grundsätzlich erfolgten sämtliche Schritte im Rahmen der DNA Isolation, PCR Amplifikation und Kapillarelektrophorese in 96-Wellplatten. Aus dem vom Auftraggeber zur Verfügung gestellten Material wurde ein Blattstück ausgestanzt und in ein Well der Isolationsplatte gegeben und extrahiert. Im Anschluss an die Isolation wurde ein Aliquot des Isolates für die nachfolgende PCR geeignet verdünnt, die unverdünnten Isolate wurden bei -20°C eingelagert. Die drei multiplex PCR Assays wurden mit den verdünnten Isolaten durchgeführt und, zusammen mit einem internen Größenstandard, auf einem Kapillarelektrophoresegerät analysiert. Jede Platte beinhaltete Extraktionskontrolle (kein Blattmaterial), PCR Kontrolle (keine Templat DNA in PCR) und positiv Kontrolle (vorgängig isolierte *Malus* DNA als Templat).

Datenanalyse

Die Datenauswertung erfolgte nur wenn die Kontrollen auf der jeweiligen Platte die zu erwartenden Resultate zeigten und wenn die Fragmente des verwendeten Grössenstandards mit hoher Linearität zugeordnet werden konnten. Um die Zuordnung der Allele robust zu gewährleisten, wurden für jeden Mikrosatelliten-Marker so genannte Bins definiert. Die Interpretation der Chromatogramme erfolgte mit kommerziell erhältlicher Software und wurde bei jeder Probe auf Korrektheit überprüft.

3. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Nutzung von Mikrosatellitensequenzen als genetische Marker ist eine der ältesten und gleichzeitig immer noch bedeutenden Methoden für die Genotypisierung (Ellegren 2004). Die Mikrosatelliten basierte Genotypisierung zur Identifikation von Sorten von Kulturpflanzen ist weit verbreitet und hat sich als Methode bewährt (z. B. McCouch *et al.* 1997). Es hat sich gezeigt, dass die PCR Amplifikation von polymorphen Loci und die anschliessende Fragmentlängenanalyse auf einem Kapillarelektrophoresegerät auch zwischen verschiedenen Labors und unter Verwendung von unterschiedlichen Technologien zu reproduzierbaren Resultaten führt (Frey *et al.* 2007). Bedingung für diese Reproduzierbarkeit ist die gleichzeitige Analyse bekannter Standardsorten, welche erlauben die Daten aus den verschiedenen Labors zu harmonisieren. Entsprechende Verfahren werden angewendet und wurden beschrieben (Frey *et al.* 2007).

4. Material und Methoden

Proben – Die Proben wurden vom Auftraggeber zur Verfügung gestellt und im gefrorenen Zustand transportiert und aufbewahrt. Bei der überwiegenden Mehrheit der Proben handelt es sich um im frischen Zustand eingefrorene *Malus* Blätter, einzelne Blätter wurden vor dem Einfrieren getrocknet. Ein oder mehrere Blätter vom gleichen Baum befinden sich jeweils in einem Plastikbeutel, auf welchem die Probenidentität aufgeführt ist. Um die Logistik zu vereinfachen, wurde die verwendete Nummerierung mit führenden Nullen ergänzt (z. B. JKI_Dresden_506 wurde als JKI_Dresden_0506 erfasst).

DNA Extraktion – Die DNA Isolation wurde mittels alkalischer Lyse in Anwesenheit von TWEEN 20 durchgeführt, gefolgt von einer pH-Neutralisation. Die isolierte DNA befindet

sich in 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% TWEEN 20, 1 mM EDTA. Aufgrund der gewählten Isolationsmethode enthalten die Isolate residuelles Chlorophyll, die PCR Amplifikation und die folgende Fragmentgrößen-Analyse wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst. Die Isolate befinden sich in 96-Well-Platten und können bei -20°C stabil gelagert werden.

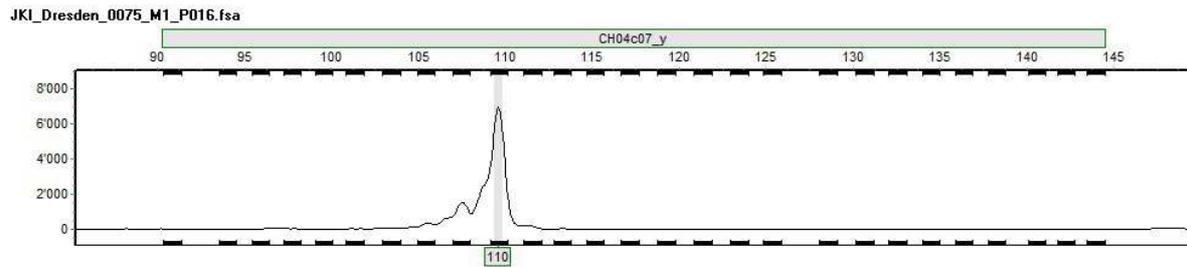
Oligonucleotide – Jeweils ein PCR Primer von jedem Mikrosatelliten-Marker trägt am 5'-Ende einen Fluorophor um die Fragmentdetektion auf dem Kapillarelektrophoresegerät zu ermöglichen. Im blauen Detektionskanal wurden Oligonucleotide (Microsynth AG, Schweiz) welche mit FAM (Fluorescein) modifiziert sind verwendet, für die Kanäle grün, gelb und rot wurden die Rhodamin Farbstoffe ATTO 532, ATTO 550 und ATTO 565 verwendet.

PCR – Für die PCR wurde HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Deutschland) verwendet und folgendes Thermocycler Programm durchgeführt: 95°C, 10 min; 40 x [94°C, 0.5 min; 55°C, 1.5 min; 72°C, 1 min]; 72°C, 30 min.

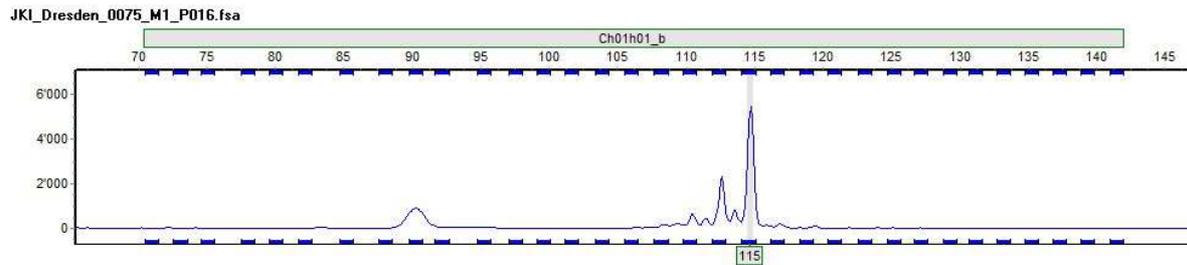
Kapillarelektrophorese – Als Größenstandard für die Kapillarelektrophorese wurde ECO500 (ecogenics GmbH, Schweiz) verwendet, welcher mit dem Fluorophor Dyomics 630 modifizierte Fragmente folgender Länge enthält: 75, 102, 124, 148, 171, 207, 229, 260, 274, 311, 321, 349, 374, 395, 419, 455, 473, 497 Basenpaare (bp). Die Kapillarelektrophorese wurde auf einem Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer mit folgenden Bedingungen durchgeführt: Injektionszeit, 10 s; Injektionsspannung, 1.6 kV; Laufzeit, 2100 s; Laufspannung, 15 kV; Kapillarlänge, 50 cm; Polymer, POP7; Filter, Dye Set G5.

5. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

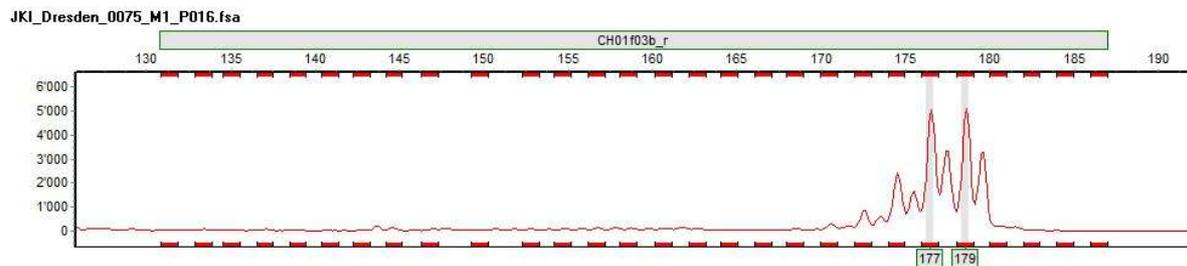
Jeder verwendete Mikrosatellitenmarker zeigt individuelle Eigenschaften unter anderem bezüglich der vorkommenden Allelgrößen, Stotterbanden, Signalintensität und Rauschen. Entsprechend sind in einigen Fällen die Interpretation der Chromatogramme und die Allelzuordnung nicht eindeutig möglich. Im Folgenden werden sämtliche Marker kurz illustriert und spezielle Eigenschaften erwähnt. Es wird jeweils exemplarisch das Chromatogramm der Probe JKI_Dresden_0075 im für den jeweiligen Marker relevanten Größenbereich gezeigt (x-Achse, Fragmentlänge in bp; y-Achse, Fluoreszenzintensität in willkürlichen Einheiten). Die Boxen unterhalb der x-Achse zeigen identifizierte Allele an. Die auf den x-Achsen farbig hervorgehobenen Bereiche definieren die Bins.



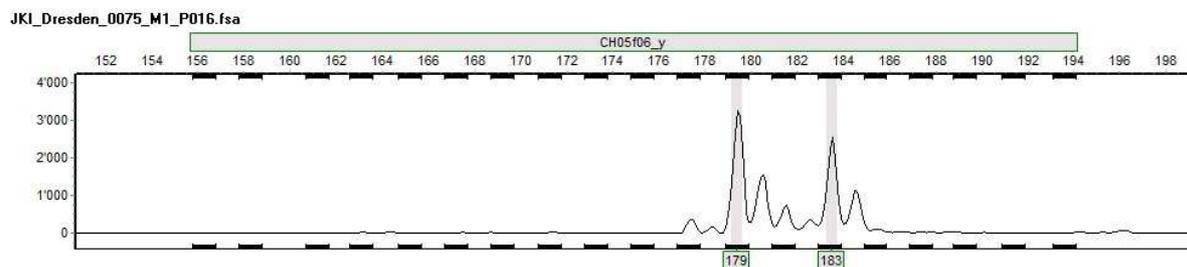
Marker CH04c07, ATTO 550, multiplex PCR 1. Ausfallrate 0.1%.



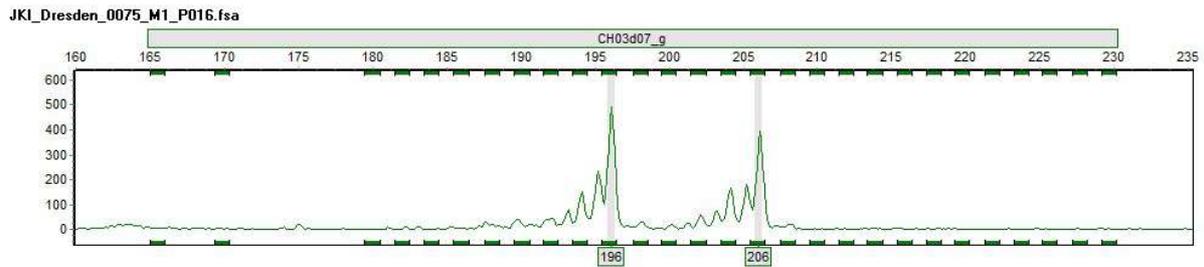
Marker CH01h01, FAM, multiplex PCR 1. Artefakt Signal („dye blob“) bei ca. 91 bp. Ausfallrate <0.1%.



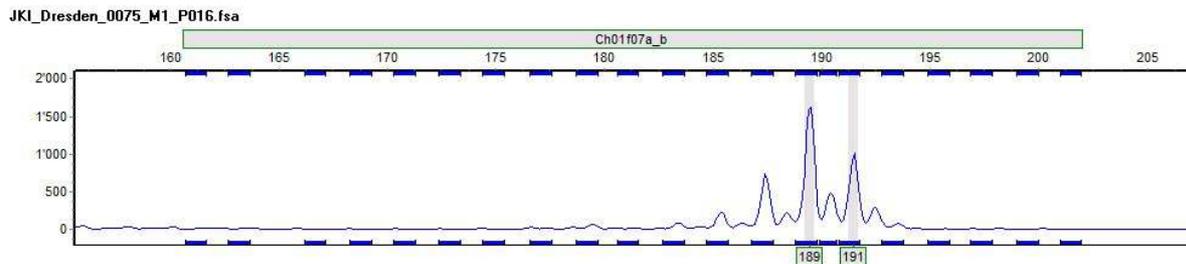
Marker CH01f03b, ATTO 565, multiplex PCR 1. Ausfallrate <0.1%.



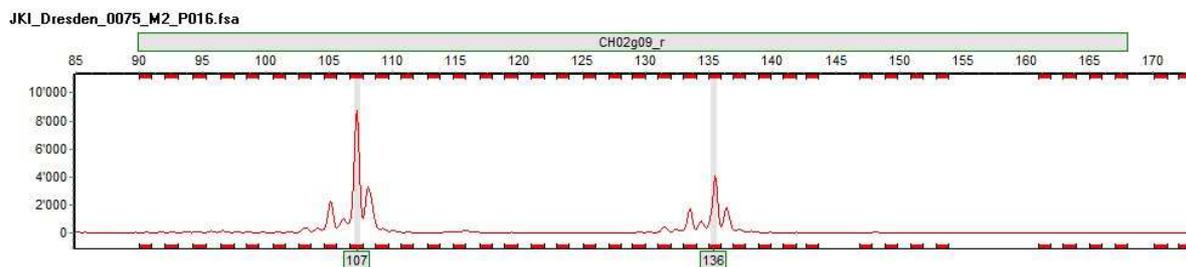
Marker CH05f06, ATTO 550, multiplex PCR 1. Ausfallrate 0.2%.



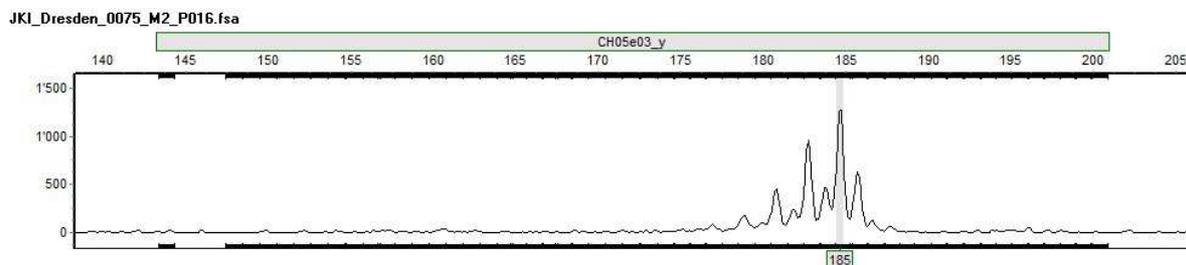
Marker *CH03d07*, ATTO 532, multiplex PCR 1. Signalintensität teilweise gering. Ausfallrate 0.4%.



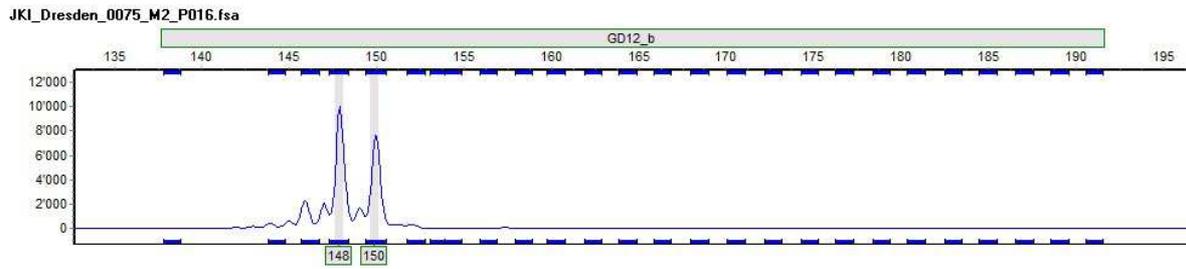
Marker *CH01f07a*, FAM, multiplex PCR 1. 1 bp Abstände zwischen den Allelen kommen vor. Ausfallrate <0.1%.



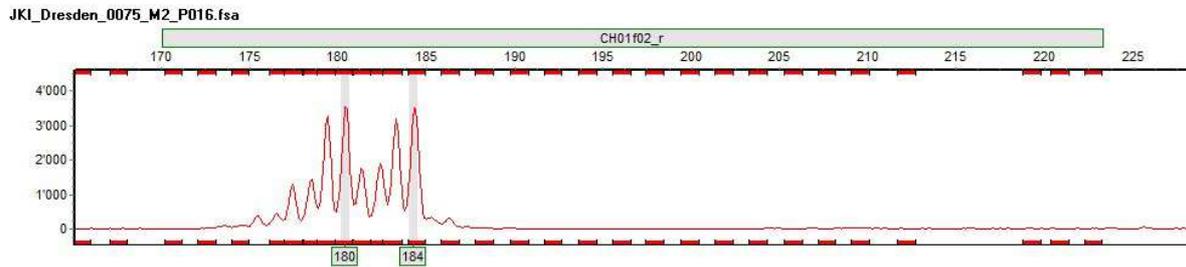
Marker *CH02g09*, ATTO 565, multiplex PCR 2. In einigen Fällen überlappender Grössenbereich mit Marker *CH01f02*. Allelzuordnung aufgrund der charakteristischen Stutterpeaks („allele shape“) möglich. Ausfallrate <0.1%.



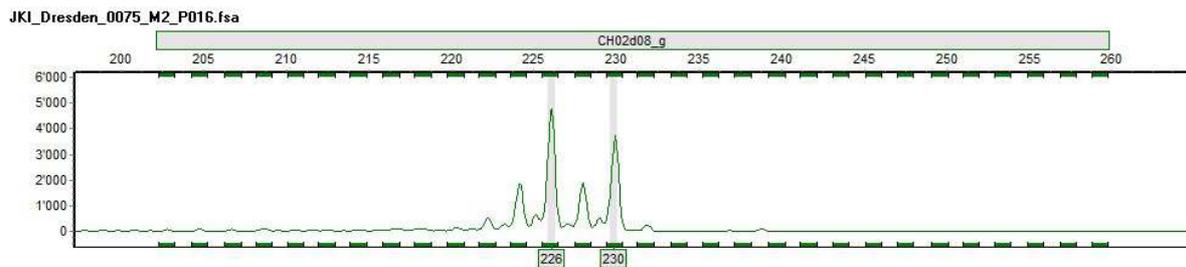
Marker *CH05e03*, ATTO 550, multiplex PCR 2. 1 bp Abstände zwischen den Allelen kommen häufig vor. Ausfallrate 2.2%



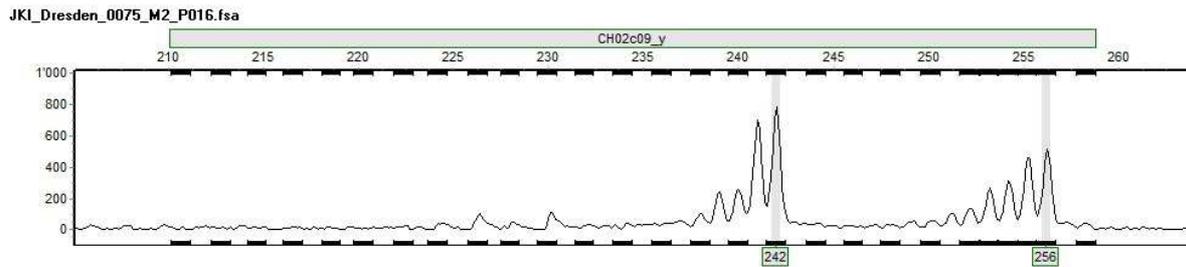
Marker *GD12*, *FAM*, *multiplex PCR 2*. 1 bp Abstände zwischen den Allelen kommen vor. Ausfallrate <0.1%



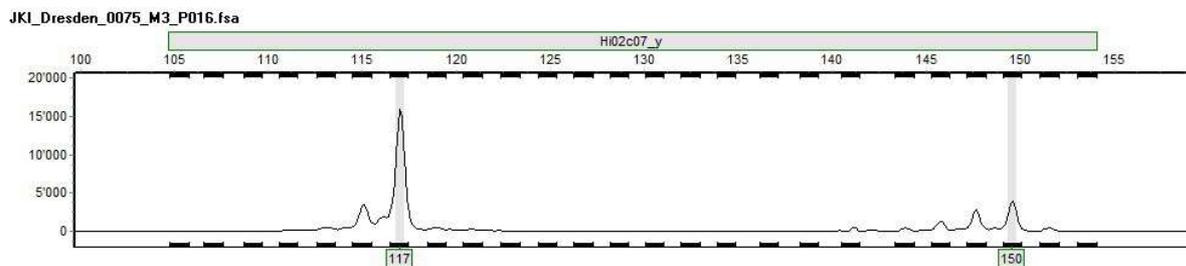
Marker *CH01f02*, *ATTO 565*, *multiplex PCR 2*. In einigen Fällen überlappender Grössenbereich mit Marker *CH02g09*. Allelzuordnung aufgrund der charakteristischen Stutterpeaks („allele shape“) möglich. 1 bp Abstände zwischen den Allelen kommen vor. Ausfallrate <0.1%.



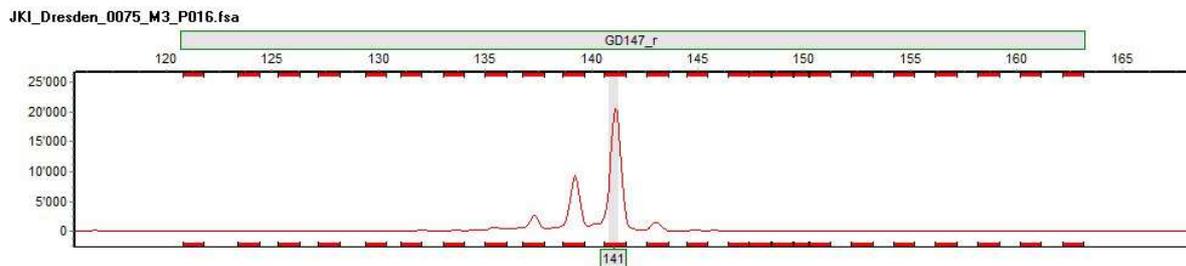
Marker *CH02d08*, *ATTO 532*, *multiplex PCR 2*. Teilweise Signaldurchschläge zu Marker *CH02c09*. Ausfallrate 0.1%.



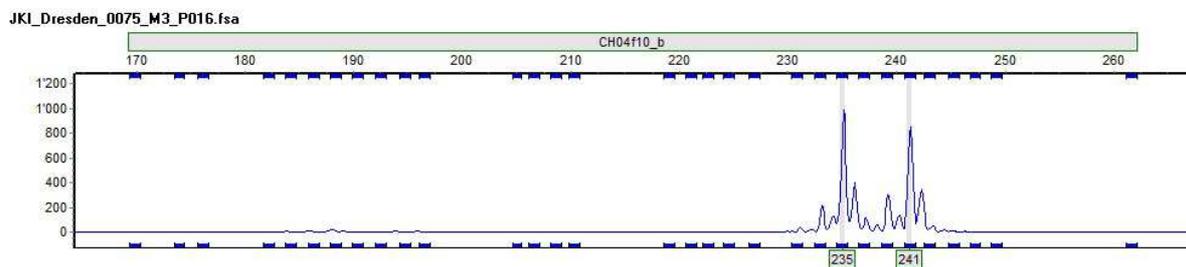
Marker *CH02c09*, ATTO 550, multiplex PCR 2. Teilweise Signaldurchschläge von Marker *CH02d08*. 1 bp Abstände zwischen den Allelen kommen vor. Ausfallrate 1.1%.



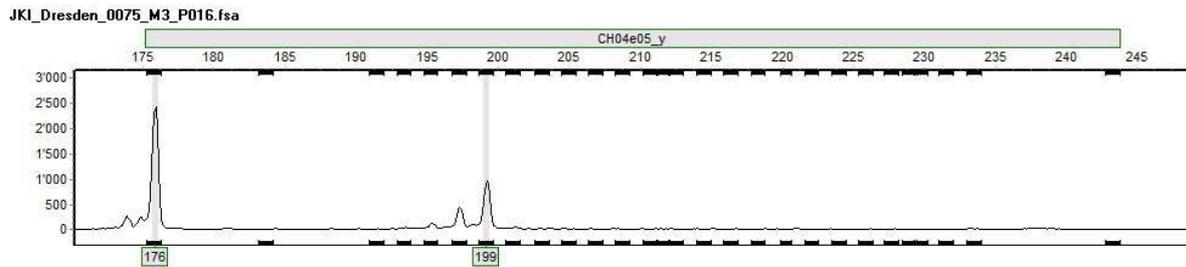
Marker *Hi02c07*, ATTO 550, multiplex PCR 3. Ausfallrate <0.1%.



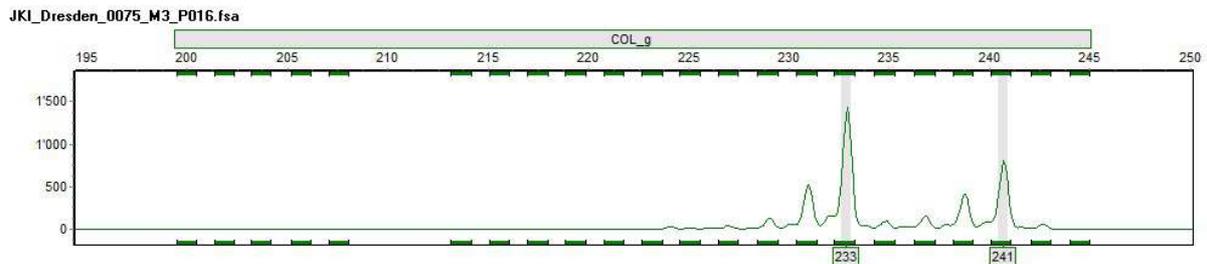
Marker *GD147*, ATTO 565, multiplex PCR 3. 1 bp Abstände zwischen den Allelen kommen vor. Ausfallrate <0.1%.



Marker *CH04f10*, FAM, multiplex PCR 3. Ausfallrate 2.2%.



Marker *CH04e05*, ATTO 550, multiplex PCR 3. Teilweise Signaldurchschläge von Marker COL. 1 bp Abstände zwischen den Allelen kommen vor. Ausfallrate 0.2%.



Marker *COL*, ATTO 532, multiplex PCR 3. Teilweise Signaldurchschläge zu Marker *CH04e05*. Ausfallrate <0.1%.

Die verwendete Methodik, Mikrosatelliten basiertes Genotypisieren, birgt das Risiko von Null-Allelen und Allelausfällen aus verschiedenen Gründen. Aufgrund der vorliegenden Daten kann nicht zwischen echten Null-Allelen (z. B. Mutation innerhalb der Primerbindungsstelle) und Ausfällen einzelner Marker aufgrund von ungeeigneten experimentellen Bedingungen (z. B. PCR Inhibition) unterschieden werden. Im Falle von gehäuften Ausfällen (d. h. kein Allel konnte zugeordnet werden) eines einzelnen Samples in mehreren multiplex PCRs kann die Isolation oder die Qualität des Ausgangsmaterials der Grund für die Ausfälle sein. Bei mehreren Ausfällen innerhalb nur eines PCR-Systems kann ein PCR-Artefakt nicht ausgeschlossen werden. In beiden Fällen wurde sowohl die Isolation, wie auch die betroffenen multiplex PCR wiederholt. Eine höhere Datensicherheit und Qualität könnte durch Replikate erreicht werden. Die überwiegende Mehrheit der Samples hat für jeden der 17 getesteten Marker mindesten ein zugeordnetes Allel (93.8%). Praktisch alle analysierten Samples weisen höchstens einen Marker ohne positives Resultat auf (99.6%).

Analog zu den getesteten Blattproben haben wir die uns zur Verfügung gestellte DNA von acht Referenzproben analysiert (Delicious, Fiesta, Michelin, Prima, Worchester Parmain, *Malus floribunda* 821, *Malus x robusta* 5 und Malling 9). Die Qualität der mit dem Extract-N-

Amp™ Plant Kit (Sigma Aldrich, USA) isolierte DNA wurde durch ecogenics mittels phenolischer Aufreinigung erhöht um eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit den bei ecogenics isolierten DNA Proben zu gewährleisten.

6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Rahmen dieses Projektes erzeugten Genotypingdaten für 3'042 Apfelproben stellen eine sehr gute Grundlage für zukünftige Sortenechtheitsbestimmungen dar. Der Wert der Daten kann noch deutlich erhöht werden, wenn weitere, ähnliche Studien von anderen Auftraggebern mit den selben Markern, oder allenfalls einem Subset davon, durchgeführt werden.

7. Zusammenfassung

Gut 3'034 Blattproben, welche die biologische Vielfalt des Apfels in Deutschland repräsentieren, wurden molekulargenetisch analysiert. Die DNA wurde mittels alkalischer Lyse aus den Blattproben isoliert. Von jeder Probe wurden 17 bekannte Mikrosatelliten Loci mit drei multiplex PCR amplifiziert und mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die so erzeugten Chromatogramme wurden ausgewertet und für jede Sorte ein entsprechendes molekulargenetisches Profil erstellt.

8. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Die ursprünglich geplanten, vertraglich festgehaltenen Ziele wurden weitgehend erreicht. In Abweichung von der ursprünglich gefassten Zielsetzung wurde ein leicht adaptiertes Set von Mikrosatelliten Markern verwendet. Dies geschah im Interesse der Robustheit und in Rücksprache mit dem Auftraggeber.

9. Literaturverzeichnis

Ellegren H, 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-45.

Frey JE, Koller B, Frey B & Bünter M, 2007. Identifikation von Obstsorten: Validierung einer Analyseverfahren. *Agrarforschung* **14**(11-12):536-541.

McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T & Blair M, 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol Biol* **35**(1-2):89-99.

Schlieren, November 2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Haugstetter', written in a cursive style.

Dr. Johannes Haugstetter, ecogenics GmbH

Anhang

<i>Marker</i>	<i>PCR Primer</i>	<i>5'-3'-Sequenz</i>	<i>5'-Fluorophor</i>
CH01f02	CH01f02_F_AT565 CH01f02_R	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG CTGGTTTGTTCCTCCAGC	ATTO 565
CH01f03b	CH01f03b_F_AT565 CH01f03b_R	GAGAAGCAAATGCAAAACCC CTCCCCGGCTCCTATTCTAC	ATTO 565
CH01f07a	CH01f07a_F_FAM CH01f07a_R	CCCTACACAGTTTCTCAACCC CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC	FAM
CH01h01	CH01h01_F_FAM CH01h01_R	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	FAM
CH02c09	CH02c09_F_AT550 CH02c09_R	TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC AGAAGCAGCAGAGGAGGATG	ATTO 550
CH02d08	CH02d08_F_AT532 CH02d08_R	TCCAAAATGGCGTACCTCTC GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	ATTO 532
CH02g09	CH02g09_F_AT565 CH02g09_R	TCAGACAGAAGAGGAAGTATTG CAAACAAACCAGTACCGCAA	ATTO 565
CH03d07	CH03d07_F_AT532 CH03d07_R	CAAATCAATGCAAAACTGTCA GGCTTCTGGCCATGATTTTA	ATTO 532
CH04c07	CH04c07_F_AT532 CH04c07_R	GGCCTTCCATGTCTCAGAAG CCTCATGCCCTCCACTAACA	ATTO 550
CH04e05	CH04e05_F_AT550 CH04e05_R	AGGCTAACAGAAATGTGGTTTG ATGGCTCCTATTGCCATCAT	ATTO 550
CH04f10	CH04f10_F_FAM CH04f10_R	GTAATGGAAATACAGTTTCACAA TTAAATGCTTGGTGTGTTTTGC	FAM
CH05e03	CH05e03_F_AT550 CH05e03_R	CGAATATTTTCACTCTGACTGGG CAAGTTGTTGTACTGCTCCGAC	ATTO 550
CH05f06	CH05f06_F_AT550 CH05f06_R	TTAGATCCGGTCACTCTCCACT TGGAGGAAGACGAAGAAGAAAG	ATTO 550
COL	COL_F_AT532 COL_R	AGGAGAAAGGCGTTTACCTG GACTCATTCTTCGTCGTCACTG	ATTO 532
GD12	GD12_F_FAM GD12_R	TTGAGGTGTTTCTCCCATTTGGA CTAACGAAGCCGCCATTTCTTT	FAM
GD147	GD147_F_AT565 GD147_R	TCCCGCCATTTCTCTGC GTTTAAACCGCTGCTGCTGAAC	ATTO 565
Hi02c07	Hi02c07_F_AT550 Hi02c07_R	AGAGCTACGGGATCCAAAT GTTTAAAGCATCCCGATTGAAAGG	ATTO 550

Table 1. Liste der verwendeten DNA Primer.