

Auftragnehmer:

Microsynth ecogenics GmbH,
Schützenstrasse 15
9436 Balgach
Schweiz

Auftraggeber:



Abschlussbericht

Projektnummer:

2820BE002

Thema:

**Erste molekulargenetische Bestimmung der Pflaumensorten
der Deutschen Genbank Obst**

Laufzeit:

16.02.2021 – 15.02.2023

Berichtszeitraum:

16.02.2021 – 09.02.2023

Balgach, 13. März 2023

1. Übersicht zu den durchgeführten Tätigkeiten

Um die Sammlung und Erhaltung von genetischen Ressourcen bei Obst in wissenschaftlicher, langfristig abgesicherter und nachhaltiger Weise zu gewährleisten, hat sich die Deutsche Genbank Obst (DGO) zum Ziel gesetzt, das Sortenspektrum der Pflaume pomologisch und genetisch zu bestimmen. Das Sortenspektrum umfasst die deutschen Sorten einschließlich Neuzüchtungen, Sorten mit soziokulturellem, lokalem oder historischem Bezug zu Deutschland und Sorten, die Spender für wichtige obstbauliche Merkmale sind. Der Echtheitsüberprüfung der Pflaumen wird höchste Priorität beigemessen.

Microsynth Ecogenics wurde beauftragt, die molekulargenetische Überprüfung von 1430 Pflaumenbäumen der Deutschen Genbank Obst (DGO) Sammlung durchzuführen. Die molekulare Überprüfung erfolgte nach den Richtlinien des "Fruit Network of the European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR)" mit 9 SSR Markern (UDP98-407, PacA33, CPST026, BPPCT040, BPPCT007, BPPCT014, BPPCT034, UDP96-005 und BPPCT039, beschrieben in Sehic et al. (2015) und Gaši et al. (2020)).

Die Nutzung von Mikrosatelliten als genetische Marker ist eine der ältesten und gleichzeitig immer noch zuverlässigsten Methoden für die Genotypisierung von Individuen (Ellegren 2004). Die mikrosatellitenbasierte Genotypisierung zur Sortenidentifikation 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 wurden beschrieben (Frey et al. 2007) und werden für die Analyse von Pflaumen angewandt.

Zu Beginn des Projekts wurde die Methodik auf den Referenzgenotypen geprüft und die Organisation und Durchführung der Beprobung auf Trockeneis mit anschließender Probenlagerung bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$ geplant und durchgeführt. Anschließend wurden die gesammelten Proben mittels DNA-Isolation und Genotypisierung mit den etablierten Multiplex-Polymerasen-Ketten-Reaktion-(PCR)-Assays analysiert. Für jede Probe wurde ein molekulargenetisches Profil erstellt. Die Sortenprüfung-Profile wurden mittels paarweiser Distanzen und Clusteranalyse einer Gengruppe zugeordnet.

2. Beschreibung der erhobenen Daten

Insgesamt wurden für die Probensammlung 1546 (1. und 2. Analyserunde, inkl. Referenzen) angemeldet (Appendix, Tabelle 1). Um die vom „Fruit Network of the European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR)“ empfohlenen 9 SSR Marker zu untersuchen und zu validieren, erhielten wir von Frau Dr. Monika Höfer fünf von sieben ECPGR-Referenzgenotypen (Valor', 'Hanita', 'Topfirst', 'Reine Claude Violette', 'Stanley', 'Mirabelle de Nancy' und 'Bistrica'). Wobei 'Bistrica' und 'Topfirst' nicht für die Etablierung zur Verfügung standen. Die Referenz 'Reine Claude Violette' (Probennummer 156255) passte nicht mit dem angegebenen Referenzprofil überein. Aus der Publikation wurden für die Etablierung vier weitere Sortenprofile für eine vergleichbare Analyse herangezogen: 'Reine Claude d'Oullins', 'Bühler Frühzwetsche', 'Ersinger Frühzwetsche' und 'Kirke'. Diese Referenzen wurden aus dem Nuklearstock von Agroscope APSD, Müller-Thurgau-Strasse 29, 8820 Wädenswil, Schweiz für die Etablierung bestellt. Insgesamt wurden für die Etablierung 9 Referenzen analysiert, wovon 8 Sortenprofile für die Validierung der Analyse erfolgreich reproduziert werden konnten. Die Zielstellung der Etablierung, 8 Referenzen zu verwenden, wurde erreicht.

Die Probennahme vor Ort begann in einem Zeitraum von Juni bis August 2021. Am 26.03.2021 erhielten wir den Bescheid von Herrn Dr. Schlegel (verantwortlich für das Netzwerk Pflaume, Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau, Dezernat 26 – Gartenbau, 06484 Quedlinburg), dass jeder der neun sammlungshaltenden Partner (Bundessortenamt, Prüfstelle Wurzen (BSA); Esteburg – Obstbauzentrum Jork, Julius-Kühn Institut (JKI); Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau Sachsen-Anhalt (LLFG); Landwirtschaftliche Lehranstalten Triesdorf Obstlehrgarten (LLA Triesdorf); Oberlaussitz-Stiftung; Landratsamt Kyffhäuserkreis (Kyffhäuserkreis); Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT); Bayrisches Obstzentrum (BayOZ)) die Liste mit den zu untersuchenden Bäumen erhalten hat und dass wir mit der Kontaktaufnahme beginnen können. Die Listen der Partner enthielten Informationen zum Standort des Baumes, Sortenname in der Sammlung, Akzessionsnummer und Probennummer der molekularen Sortenprüfung. Die Sammlung der Proben erfolgte planmäßig von Juni bis August 2021. Alle Partner wurden dahingehend im Mai 2021 informiert. Die Sammlung wurde von zwei Studenten der Universität Göttingen durchgeführt. Des Weiteren waren zwei Mitarbeiter der Microsynth Seqlab GmbH an der Sammlung beteiligt. Alle Sammler wurden für einen konstanten Ablauf zuvor geschult. Einzig für den Standort Oberlaussitz-Stiftung sammelte Frau Bettina Schlitt, da es wohl Probleme bei der Terminvereinbarung gab. Diese Proben trafen aber termingerecht bei uns ein. Alle Sammlungen erfolgten ausschließlich bei gutem Wetter, um eine optimale Blattqualität zu erhalten.

Um unsererseits eine genaue Zuordnung der Proben und Bäume zu gewährleisten, arbeiteten wir mit Barcode- und Schlaufenetiketten. Dabei erhielt jedes Probencouvert eine Barcode Etikette, eine identische Etikette wurde auf die Liste zu der jeweiligen Probennummer geklebt und der jeweilige Baum mit einer Schlaufenetikette und einer identischen Barcodenummer versehen.

Abgestorbene oder nicht vorhandene Bäume wurden auf der Liste vermerkt und im Nachhinein elektronisch erfasst. Als Probenmaterial wurden jeweils zwei möglichst junge Blätter aus der Baumkrone gesammelt und in ein Probencouvert gegeben. Während des Sammelns wurden die Probencouverts in einem isolierten, mit Trockeneis gekühlten, Rucksack aufbewahrt. Am Ende des Tages wurden alle Proben bei -80°C aufbewahrt.

Für die erste Analyserunde wurden 1420 Proben angemeldet. Proben von 30 Bäumen fehlten, da die Bäume nicht mehr vorhanden waren. Drei Bäume aus der Sammlung der Oberlaussitz-Stiftung wurden zusätzlich beprobt. Insgesamt wurden 1393 Proben analysiert. Zusammen mit den 22 Proben, die mit der Bezeichnung „Referenz“ analysiert wurden und den 9 Referenzproben aus der Methoden-etablierung, ergibt ein Total von 1424 analysierte Proben für die erste Analyserunde.

Einige Proben wurden wiederholt analysiert, wodurch sich die Anzahl der Datensätze von der Probenanzahl unterscheidet. Von 7 Referenzen und 6 Blindproben wurden vier Wiederholungen gemacht. Von zwei Proben gibt es keine Datensätze da diese trotz Wiederholung der Analyse nicht erfolgreich amplifiziert werden konnten. Die Probe mit der Barcode Nummer 155946, wurde einmal als normale Probe und einmal als Referenzprobe mit 4-facher Wiederholung, analysiert. Für die Probe mit der Barcode Nummer 155946 liegen somit insgesamt 6 Datensätze vor. Die final vorhandene Anzahl Datensätze für die erste Analyserunde beträgt 1474.

Für die zweite Analyserunde wurden 91 Proben angemeldet. 11 Proben fielen aus, da die Bäume nicht mehr vorhanden waren und 3 Proben wurden zusätzlich zur Analyse geschickt. Da es sich um nur sehr wenige Probennahmen pro Standort handelte wurden uns die Proben, in Absprache mit Herrn Dr. Thomas Schlegel, direkt von den jeweiligen Standorten per Post zugesandt. Im Voraus erhielt jeder der Sammlungshaltenden Partner eine Sammelliste mit den entsprechenden Barcodes und ein vorfrankiertes Rücksendecouvert. Die Sammlung am Standort Landwirtschaftliche Lehranstalten Triesdorf Obstlehrgarten und am Standort Landratsamt Kyffhäuserkreis (Kyffhäuserkreis) wurden von Mitarbeitern der Microsynth AG und der Microsynth Seqlab AG durchgeführt. Insgesamt wurden 83 Proben analysiert. Die Amplifikation und Fragment Analyse von 10 Proben war unzureichend und wurde wiederholt. Die Resultate dieser Wiederholungen wurden im Datensatz belassen. Die final vorhandene Anzahl Datensätze für die zweite Analyserunde beträgt 93.

Für die erste und zweite Analyserunde sind insgesamt 1567 Datensätze vorhanden. Eine Übersicht aller Proben für die erste und zweite Analyserunde ist im Appendix (Tabelle 1) dargestellt.

Bei der Genotypisierung ist die Qualität der DNA, welche aus den Blättern isoliert wird, von großer Bedeutung. Darüber hinaus darf die PCR nicht inhibiert werden und es muss genügend DNA für alle PCRs vorliegen. Zudem muss die DNA-Isolation so erfolgen, dass Probenvertauschungen und Kreuzkontaminationen ausgeschlossen werden können. Um letztere Ziele zu erreichen, wurden sämtliche Proben mit einer Probennummer und mit einem Barcode versehen und alle Arbeitsschritte in 96-Well-Platten mit entsprechenden Kontrollen durchgeführt.

Als geeignete Methode zur Isolation genomischer DNA aus Pflaumenbaum-Blättern hat sich Machery Nagel NucleoSpin Plant II Kit im 96-Well-Platten-Format erwiesen. Aus dem gesammelten Material wurde eine Blattstanz abgeschnitten, lysiert und nach Kithersteller-Protokoll abgearbeitet. Im Anschluss an die Isolation wurde ein Aliquot des Isolates für die nachfolgende PCR verdünnt. Die unverdünnten Isolate wurden bei -20°C eingelagert. Jede 96-Well-Platte beinhaltete eine Isolationskontrolle (kein Blattmaterial), eine PCR-Kontrolle (keine Templat DNA) und eine Positivkontrolle (bekannte Probe).

Die festgelegten Mikrosatellitenmarker wurden hinsichtlich Robustheit auf den Referenzproben evaluiert und anschließend so kombiniert, dass sie in zwei Multiplex-PCR-Ansätzen analysiert werden konnten. Die Marker und die Fluorophore wurden so verteilt, dass eine möglichst geringe gegenseitige Signalstörung zu erwarten war. Eine Übersicht der Marker-Kombinationen und der Primer-Sequenzen ist im Appendix (Tabelle 2) dargestellt.

Die zu verwendenden Mikrosatelliten-Marker Systeme wurden so etabliert und angepasst, dass mit den verwendeten DNA-Isolaten robuste, reproduzierbare Daten erzeugt werden können. Der Forward-PCR-Primer vom jedem Mikrosatelliten-Marker ist am 5'-Ende mit einem Fluorophor modifiziert, um die Fragment-Detektion auf dem Kapillarelektrophoresegerät zu ermöglichen. Im blauen Detektionskanal wurden Oligonukleotide, welche mit 6-FAM (Fluorescein) modifiziert sind verwendet, für die Kanäle grün, gelb und rot wurden die Rhodamin-Farbstoffe ATTO532, ATTO550 und ATTO565 verwendet. Alle Primer wurden bei der Microsynth AG, Schweiz synthetisiert. Für die PCR wurde Qiagen Hotstar Taq Polymerase (0.05U/ µl, 15 mM MgCl₂, 200 µM von jedem dNTP, 1mg/ml BSA (New England Biolabs) und 1% PVP40 (Sigma)) verwendet und folgendes Thermocycler-Programm durchgeführt: 95°C, 10 min Denaturierung, gefolgt von 40 Zyklen mit 94 °C, 0.5 min; 55 °C, 1.5 min; 72 °C, 1 min und einer finalen Elongation bei 72 °C für 30 min.

Die Fragmentlängenanalysen wurden mit dem Längenstandard GeneScan LIZ500 (Applied biosystems) auf einem Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer durchgeführt. Folgende Laufbedingungen wurden eingehalten: Injektionszeit, 10 s; Injektionsspannung, 1.6 kV; Laufzeit, 2100 s; Laufspannung, 15 kV; Kapillarlänge, 50 cm; Polymer, POP7; Filter, Dye Set G5. Um die Laufqualität des Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer für jeden einzelnen Lauf zu überprüfen, wurde zu Projektbeginn mit den auserwählten Referenzgenotypen für jeden Multiplex-PCR-Assay eine Positivkontrolle erstellt.

Um die Vergleichbarkeit der Daten aller Proben innerhalb der Studie zu gewährleisten, wurden für jeden Marker Regeln für die Interpretation aufgestellt. Jeder Marker erzeugt ein spezifisches Muster. Zur Illustration wurde für jeden verwendeten Marker ein repräsentatives Chromatogramm abgebildet (Abbildungen 2 – 10).

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit kommerziell erhältlicher Software GeneMarker V2.6.4. und wurde bei jeder Probe auf Korrektheit überprüft. Um die Zuordnung der Allele robust zu gewährleisten, wurde in der Analysesoftware anhand der Referenzdaten für jeden Mikrosatelliten-Marker und dessen Allele, ein Allel-Raster für jeden Marker festgelegt. Die Datenauswertung mit

dem GeneMarker-Programm erfolgte nur, wenn die Qualitätskontrollen bestanden haben und wenn die Fragmente des verwendeten Größenstandards einwandfrei zugeordnet werden konnten. Die so erzeugten Probenprofile waren untereinander abzugleichen und einer Gengruppe zuzuordnen. Die Gengruppen wurden basierend auf den paarweisen Distanzen der Allel Daten mittels Clusteranalysen ermittelt. Paarweisen Distanzen ergeben sich, indem man die paarweisen Übereinstimmungen von eins subtrahiert (Abbildung 1). Aufgrund unserer Erfahrung können sehr kleine Längenunterschiede (± 1 bp) nicht zuverlässig zugeordnet werden. Daher wurde eine Unschärfe von ± 1 bp bei der Berechnung der paarweisen Distanzen zugelassen.

$$\text{paarweise Übereinstimmungen} = \frac{2 * \sum \text{Gemeinsame Allele}}{\sum \text{Allele Probe 1} + \sum \text{Allele Probe 2}}$$

$$\text{paarweise Distanzen} = 1 - \text{paarweise Übereinstimmungen}$$

Abbildung 1. Berechnung paarweise Distanzen

Als Grenzwert für die Definition einer Gengruppe wurde 0.2 bzw. 20% Unterschied zwischen den Probenprofilen definiert. Damit werden alle Proben, welche zu 80-100% identisch sind, derselbe Gengruppe zugeordnet. Dieser Cut-Off Wert wurde anhand der Verteilung der paarweisen Distanzen im vorhandenen Datensatz ermittelt (Abbildung 11). Die paarweisen Distanzen und Clusteranalysen somit die Definition der Gengruppen wurde mittels der Statistiksoftware R und eines intern entwickelten Python-Scripts berechnet.

3. Darstellung der Projektergebnisse und darüber hinaus gewonnene Erkenntnisse

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

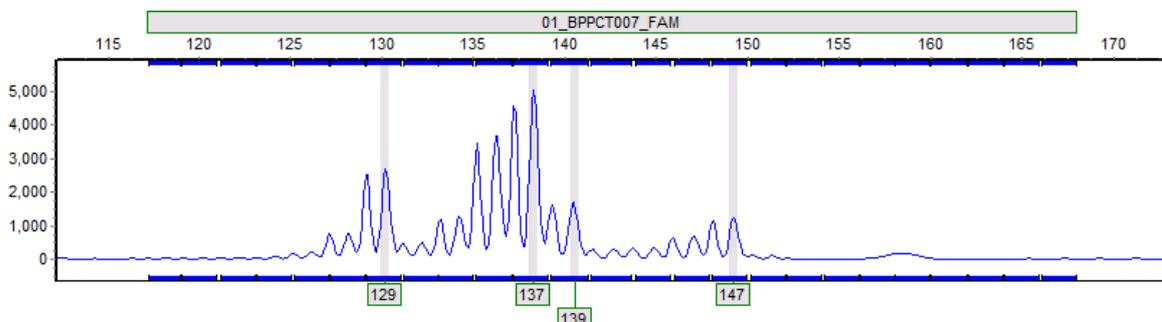


Abbildung 2. Elektropherogramm des SSR Markers BPPCT007 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 129/137/139/147.

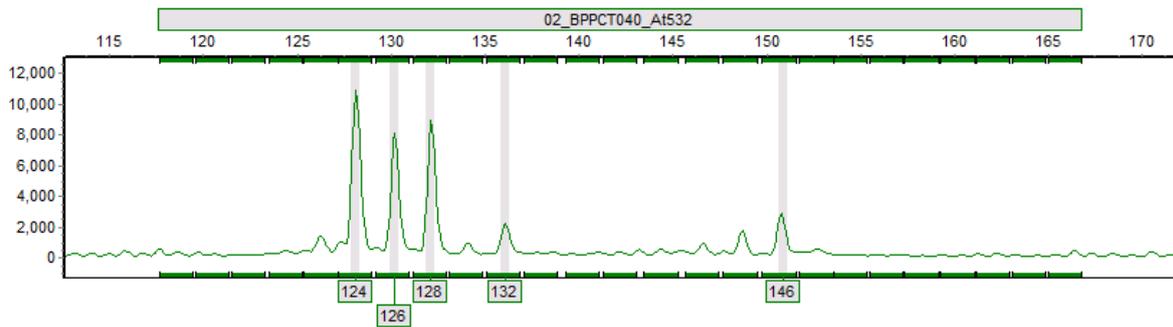


Abbildung 3. Elektropherogramm des SSR Markers BPPCT040 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 124/126/128/132.

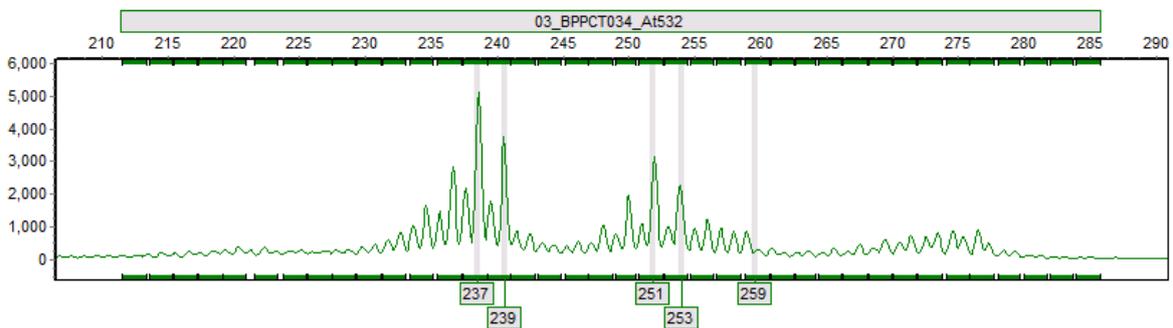


Abbildung 4. Elektropherogramm des SSR Markers BPPCT034 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 237/239/251/253/259.

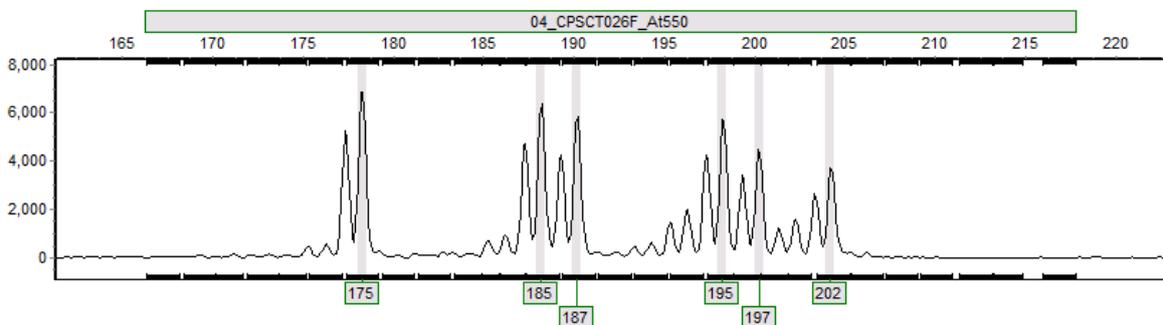


Abbildung 5. Elektropherogramm des SSR Markers CPST026 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 175/185/187/195/197/202.

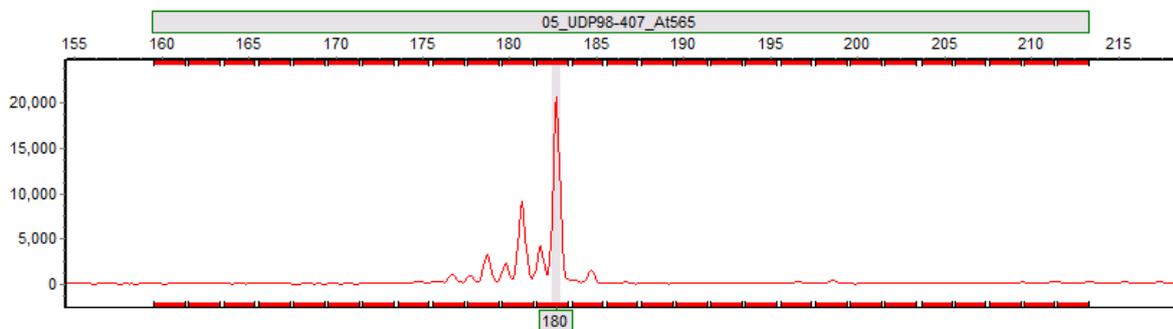


Abbildung 6. Elektropherogramm des SSR Markers UDP98-407 der Probe Mirabelle de Nancy mit dem Allel 180.

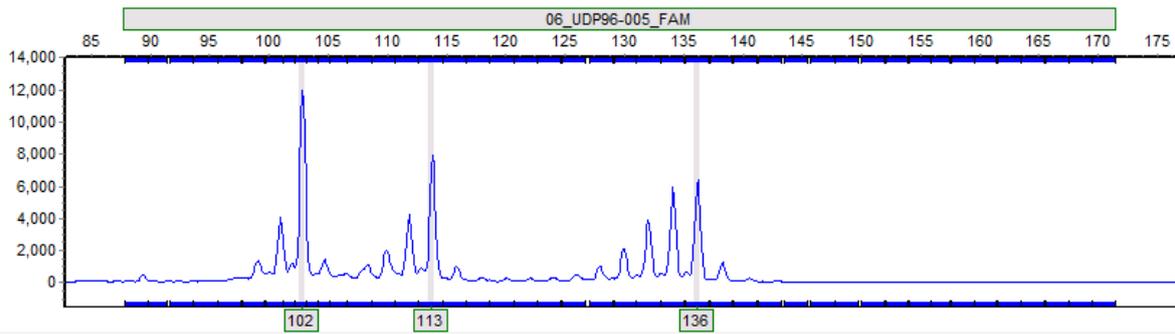


Abbildung 7. Elektropherogramm des SSR Markers UDP96-005 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 102/113/136.

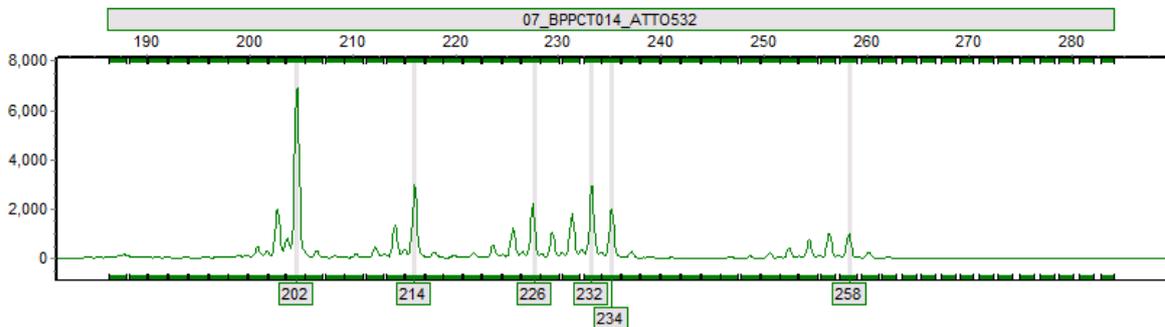


Abbildung 8. Elektropherogramm des SSR Markers BPPCT014 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 202/214/226/232/234/258.

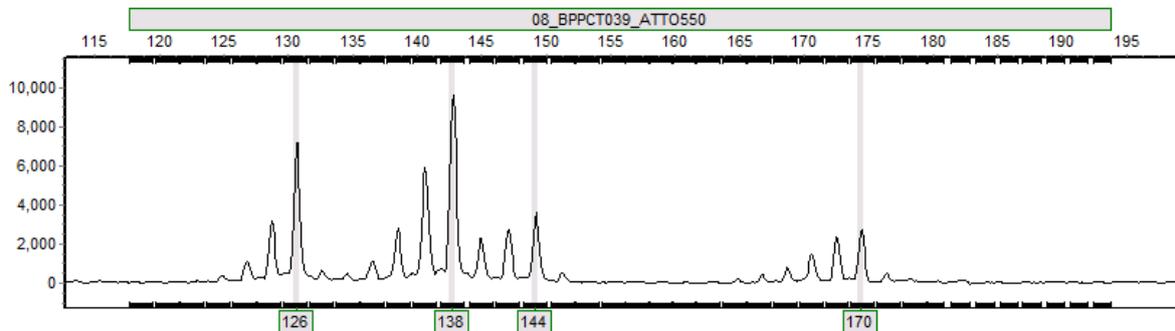


Abbildung 9. Elektropherogramm des SSR Markers BPPCT039 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 126/138/144/170.

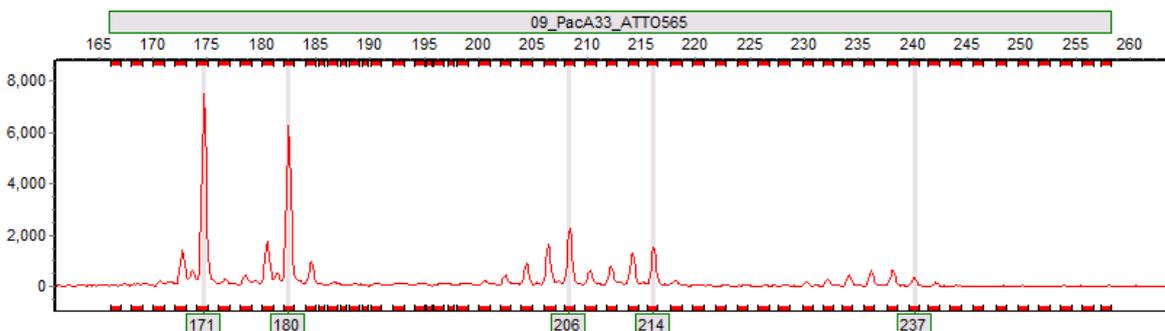


Abbildung 10. Elektropherogramm des SSR Markers PacA33 der Probe Mirabelle de Nancy mit den Allelen 171/180/206/214/237.

Die Mikrosatelliten-basierte Genotypisierung birgt aus verschiedenen Gründen das Risiko von Null-Allelen und Allel-Ausfällen in sich. Aufgrund der vorliegenden Daten kann nicht zwischen echten Null-Allelen (z.B. Mutation innerhalb der Primer-Bindungsstelle) 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. Eine noch höhere Datensicherheit und Qualität könnten durch Replikate, d.h. mehrfache Wiederholung der PCR erreicht werden.

Ecogenics hat bereits in früheren Projekten Erfahrung mit der Genotypisierung von Pflaume gesammelt und bei der Durchführung der Analyse sind keine größeren Komplikationen aufgetreten. Allerdings muss erwähnt werden, dass Pflaumen hexaploid sind. Dieser hohe Ploidiegrad kann zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Allele führen und somit zu Ausfall oder zusätzlichen Allelen. Die klare Definition und Reproduzierbarkeit eines Sortenprofils werden somit erschwert. Die Gengruppenerstellung mit Schwellenwert 0.2 Paarweisen Distanzen hat gut funktioniert. Die Verteilung der paarweisen Unterschiede für den gesamten Datensatz ist im Histogramm: „Dissimilarities observed in pairwise comparisons“ (Abbildung 11) dargestellt. Die X-Achse beschreibt das Resultat von 0.0-1.0 paarweisen Unterschieden (Dissimilarities). Die Y-Achse (Counts) beschreibt die Anzahl der paarweisen Vergleiche. Es wurde jedes Probenprofil mit allen Probenprofilen im Datensatz verglichen. Gut ersichtlich ist die Unterscheidung von Eigenvergleichen sehr ähnlicher Genprofile (0-0.2 Distanzen bzw. 80-100% identisch) und sehr unterschiedlicher Genprofile (>0.2 Distanzen bzw. 0-80% identisch). Somit fallen die meisten paarweisen Vergleiche der Genprofile in den Bereich ab 0.2 Distanzen bzw. sind weniger als 80% identisch. Basierend auf dieser Beobachtung wurde der Grenzwert (Cut-off) für die Definition einer Gengruppe bei der Clusteranalyse bei 0.2 festgelegt. Damit fallen alle Probenprofile, welche mehr als 80% identische Allele aufweisen, in eine Gengruppe. Es kann aufgrund der Polyploidie von Pflaumen keine feinere Unterteilung, zum Beispiel Genuntergruppen, vorgenommen werden.

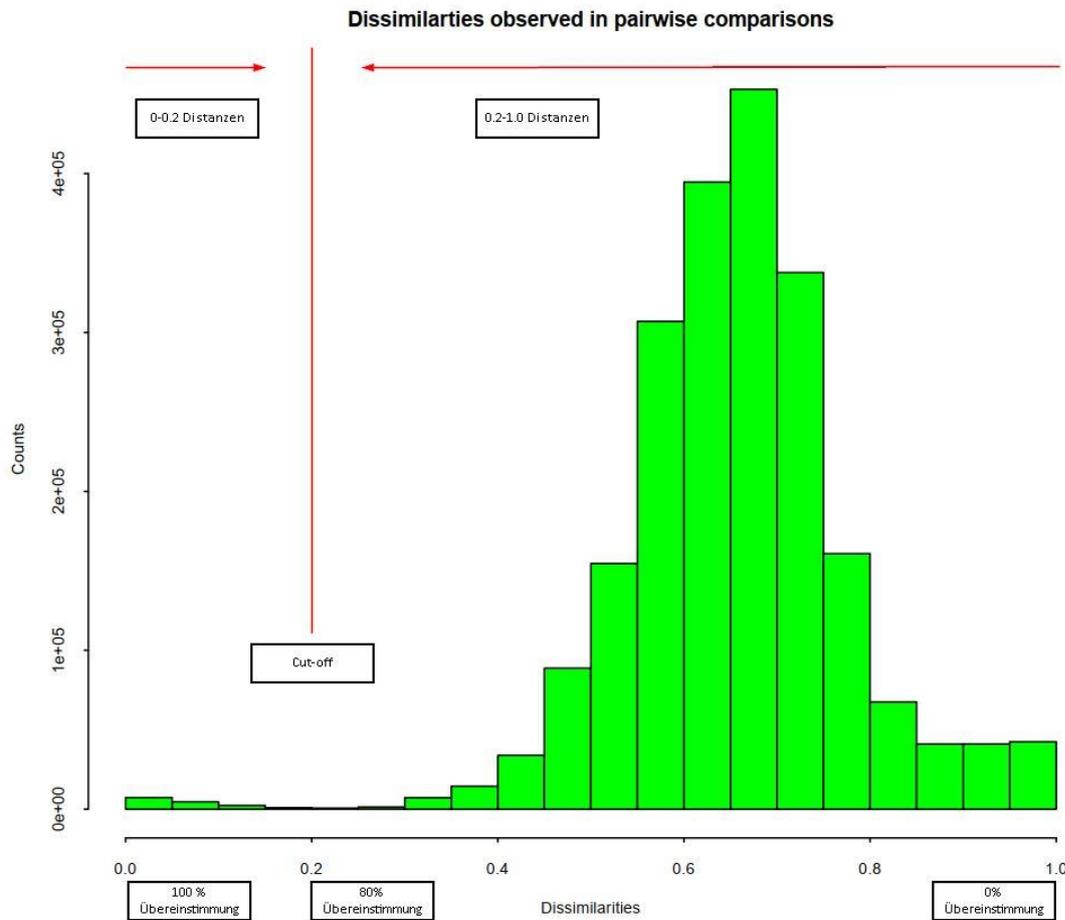


Abbildung 11. Verteilung der paarweisen Distanzen im Pflaumen-Datensatz.

Im Rahmen dieser Genotypisierung konnten 351 Gengruppen mit einem Cut-off-Wert von 0.2-Distanzen ermittelt werden. 346 Gengruppen wurden in der ersten Analyserunde definiert und beim Abgleich der 83 Proben aus der zweiten Analyserunde mit den Gengruppen aus der ersten Analyserunde, konnten 78 Proben (davon eine Probe aus der Oberlausitzstiftung) einer bestehenden Gengruppe zugeordnet werden. Fünf Proben (davon zwei Proben aus der Oberlausitzstiftung) konnten keiner bestehenden Gengruppe zugeordnet werden. Diese Probenprofile haben eine neue Gengruppennummer (361-365) erhalten.

Da die Fragmentanalyse Resultate von 10 Proben aus der zweiten Analyserunde zum Teil sehr schwach ausgefallen sind, wurde die PCR Amplifikation und die Fragmentanalyse für diese Proben wiederholt. Durch die Wiederholungen konnte für vier Proben ein verbessertes Allel Profil generiert werden. Dieses verbesserte Allel Profil führte zu einer höheren %- Übereinstimmung mit der Gengruppe. Die ursprüngliche Zuordnung zur Gengruppe blieb jedoch unverändert.

Basierend auf den vorhandenen Daten kann eine Datenbank mit Referenz Genotypen für die verschiedenen Gengruppen, respektive Sorten, aufgesetzt werden. Gegen diese Datenbank können weitere Proben für die Sortenprüfung abgeglichen werden. Der Wert der Daten kann noch deutlich erhöht werden, wenn weitere, ähnliche Studien von anderen Auftraggebern mit denselben Markern, oder allenfalls einer Auswahl davon, durchgeführt werden. Durch die Zusammenstellung der Gengruppen in eine Datenbank, können diese Daten als Grundlage für zukünftige Sortenabgleiche benutzt werden.

4. Bestätigung der Einhaltung vorgegebener Referenzen und Datenstrukturen, sowie der erfolgreichen Übernahme der Ergebnisse, Rohdaten und DNA-Stammlösungen durch die Koordinierungsstelle der Deutschen Genbank Obst

Die ursprünglich geplanten, vertraglich festgehaltenen Ziele wurden weitgehend erreicht. Insgesamt wurden 1546 Proben zur Überprüfung angemeldet und 1507 Proben (inkl 3 Proben zu Lasten der Oberlausitz-Stiftung) gesammelt.

Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse wurde eine Validierung der Allelgrößen anhand der Referenzgenotypen durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in tabellarischer Form und enthält die Standortnummer des Baumes sowie die Probennummer und die Allelgrößen für die ausgewählten Marker. Außerdem wurden die Daten nach identischen Probenprofilen sortiert und eine eindeutige Identifikationsnummer (Gengruppennummer) vergeben.

Die Ergebnisse (221215_210090_Pflaumen_BLE_Allelreport_Gengr_v3.xls) wurde am 20.12.2022, mit einer Verzögerung von zwei Monaten, erfolgreich der Koordinationsstelle der DGO per E-Mail übermittelt. Die Verzögerung der Lieferung war bedingt durch Schwierigkeiten eines Standortes die Proben innerhalb der festgelegten Frist zuzusenden. Die Probenblätter, DNA-Proben, Primer Stammlösungen und FSA-Rohdaten wurden am 07.02.2023 an das JKI zu Händen von Frau Dr. Monika Höfer geliefert.

5. Zusammenfassung

Insgesamt wurden 1507 Blattproben, welche die biologische Vielfalt der Pflaumensorten in Deutschland repräsentieren, molekulargenetisch analysiert. Die Proben-DNA wurde mittels Machery Nagel NucleoSpin Plant Kit II aus den Blattproben isoliert. Von jeder Probe wurden 9 bekannte Mikrosatelliten Loci mit zwei Multiplex PCR amplifiziert und mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die so erzeugten Chromatogramme wurden ausgewertet und für jede Probe ein entsprechendes molekulargenetisches Profil erstellt. Alle molekulargenetischen Proben-Profile wurden mittels paarweiser Distanzen und Clusteranalyse einer Gengruppe zugeordnet. Es wurden 351 Gengruppen mit repräsentativen Proben-Profil definiert, welche als Referenzen für zukünftige Sortenprüfungen verwendet werden können.

6. Literaturverzeichnis

Sehic et al. 2015. Genetic diversity and structure of Nordic plum germplasm preserved ex situ and on farm. *Scientia Horticulturae* 190:195-202; <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.034>

Gaši et al. 2020. Genetic assessment of the pomological classification of plum *Prunus domestica* L. accessions sampled across Europe. *Genet Resour Crop Evol* 67:1137-1161; <https://doi.org/10.1007/s10722-020-00901-y>

Ellegren H, 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-445.

Frey JE, Koller B, Frey B & Bünter M, 2007. Identifikation von Obstsorten: Validierung einer Analyse-methode. *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.

7. Appendix

Tabelle 1. Angaben zur Anzahl gesammelter Proben pro Standort

Standort	# Proben Sammelliste		# Probenausfälle		# zusätzliche Proben		# analysierte Proben	
	1. Runde	2. Runde	1. Runde	2. Runde	1. Runde	2. Runde	1. Runde	2. Runde
BayOZ	528	13	10	-	-	-	518+3 Referenzen	13
BSA	134	1	-	-	-	-	134+7 ¹⁾ Referenzen	1
Esteburg	133	9	8	-	-	-	125+1 ²⁾ Referenz	9
HSWT	59	-	-	-	-	-	59+0 Referenzen	-
JKI	69	1	6	-	-	1 ⁶⁾	63+12 ²⁾ Referenzen	1
Kyffhäuser	219	32	1	11	-	-	218+1 Referenz	21
LLA Triesdorf	212	24	4	-	-	-	208+2 Referenzen	24
LLG	18	1	1	-	-	3 ⁶⁾	17+1 Referenz	1
Oberlausitz	48	10	-	-	3	3 ⁷⁾	51+0 ³⁾ Referenzen	13 ⁷⁾
Agroscope	-	-	-	-	-	-	0+4 ⁴⁾ Referenzen	-
nicht in DGO	-	-	-	-	-	-	0+0 ⁵⁾ Referenzen	-
Total	1420	91	30	11	3	3/7	1424*	83**

Bayrisches Obstzentrum (BayOZ); Bundessortenamt, Prüfstelle Wurz (BSA); Esteburg – Obstbauzentrum Jork; Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT); Julius-Kühn Institut (JKI); Landratsamt Kyffhäuserkreis (Kyffhäuserkreis); Landwirtschaftliche Lehranstalten Triesdorf Obstlehrgarten (LLA Triesdorf); Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau Sachsen-Anhalt (LLG); Oberlausitz-Stiftung; Agroscope (Schweizer Forschung für Landwirtschaft, Ernährung und Umwelt)

* Aus den gesamten analysierten Proben fielen, trotz Wiederholung der Analyse, zwei Proben aus. Zusammen mit der 4-fachen Wiederholung von 7 Referenzproben und 6 Blindproben sind final 1474 Datensätze für die erste Analyserunde vorhanden. Die Probe (155946) wurde einmal als Probe und einmal als Referenz analysiert.

** Aufgrund von rePCRs von 10 Proben und daraus zusätzlich resultierenden Allel Informationen sind final 93 Datensätze für die zweite Analyserunde vorhanden.

1) ursprünglich handelte es sich um 8 Referenzen, 1 Probe wurde gesammelt und war zum Zeitpunkt der Analysen unauffindbar. Diese 7 Referenzproben wurden 4-fach wiederholt. Die Probe (155946) wurde einmal als Probe und einmal als Referenz analysiert.

2) davon sind 5 Proben aus dem Vorversand für die Etablierung der Methode

3) 2 Proben als Referenzen angemeldet, fehlten

4) Für die Etablierung wurden diese 4 Referenzen aus dem Nuklearstock von Agroscope APSD, Müller-Thurgau-Strasse 29, 8820 Wädenswil, Schweiz bestellt

5) 2 zusätzliche Referenzen angemeldet, fehlten

6) wurde nicht analysiert

7) wurde zu Lasten der Oberlausitz-Stiftung, Dr. Michael Schlitt, Mühlweg 12, 02826 Görlitz, analysiert

Tabelle 2. Zwei Multiplex PCR Ansätze für 9-SSR Marker

<i>PCR-Ansatz</i>	<i>Markername</i>	<i>Fluorophor</i>	<i>F Primer Sequenz</i>	<i>R Primer Sequenz</i>
<i>(M: Multiplex)</i>				
M1	BPPCT040	ATTO532	ATGAGGACGTGTCTGAATGG	AGCCAAACCCCTCTTATACG
	BPPCT007	FAM	TCATTGCTCGTCATCAGC	CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA
	UDP98-407	ATTO565	AGCGGCAGGCTAAATATCAA	AATCGCCGATCAAAGCAAC
	CPSCT026	ATTO550	TCTCACACGCTTTCGTC AAC	AAAAAGCCAAAAGGGTGT
	BPPCT034	ATTO532	CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT	CAATGGAGAATGGGGTGC
M2	UDP96-005	FAM	GTAACGCTCGCTACCACAAA	CCTGCATATCACCACCCAG*
	BPPCT039	ATTO550	ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC	GATGTCATGAAGATTGGAGAGG
	PacA33	ATTO565	TCAGTCTCATCCTGCATACG	CATGTGGCTCAAGGATCAAA
	BPPCT014	ATTO532	TTGTCTGCCTCTCATCTTAACC	CATCGCAGAGAACTGAGAGC

*Unterschiedliche Reverse Primer in Literatur - aus dem Artikel "ECPGR recommended simple sequences repeat loci for analyses of European plum (*Prunus domestica*) collections"