

Abschlussbericht

Dienstleistungsvertrag Az.: 514-06.01-2809BE011

Molekulargenetische Sortenüberprüfung der Deutschen Genbank Obst: Süß- und Sauerkirsche



Laufzeit: 16.01.2012 - 15.01.2014

Kompetenzzentrum Obstbau-Bodensee (KOB)

Auftraggeber:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Deichmanns Aue 29

53179 Bonn

Vertreten durch den Präsidenten Herrn Dr. Eiden

Auftragnehmer:

Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee (KOB)

Schuhmacherhof 6

88213 Ravensburg

Vertreten durch den Geschäftsführer Dr. Manfred Büchele

Dienstleistungsvertrag Az.: 514-06.01-2809BE011

Molekulargenetische Sortenüberprüfung der Deutschen Genbank Obst: Süß- und Sauerkirsche
Laufzeit 16.01.2012 – 15.1.2014

Berichtszeitraum: 16. 01. 2012- 15.01. 2014

Der Auftrag „Molekulargenetische Sortenbestimmung der Genbank Obst – Süß- und Sauerkirsche“ wurde finanziert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), Deutschland, über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Deutschland.

Inhalt

1. Ziele und Aufgabenstellung des Auftrags	1
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand für die Durchführung der Untersuchungen.....	2
3. Planung und Ablauf des Auftrags	3
4. Material und Methoden	4
4.1 Durchführung der Probenahme	4
4.2 Methodik Sortenbestimmung	7
5. Darstellung der Ergebnisse.....	9
6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	13
7. Zusammenfassung	14
8. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlichen erreichten Zielen, Hinweis auf weiterführende Fragestellungen.....	14
9. Literaturverzeichnis.....	15

1. Ziele und Aufgabenstellung des Auftrags

Ziel der Deutschen Genbank Obst (DGO) ist die Sammlung und Erhaltung von genetischen Ressourcen bei Obst in wissenschaftlicher, langfristig abgesicherter, nachhaltiger sowie kosteneffizienter Art und Weise. Koordinierungsstelle der DGO ist das Institut für Züchtungsforschung an Obst, Dresden-Pillnitz (ZO), des Julius-Kühn-Instituts (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen.

Gegenstand des Arbeitsauftrags ist die molekulargenetisch Überprüfung aller Süß- und Sauerkirschsorten der Deutschen Genbank Obst, die im Rahmen der Erhebung „Pomologische Sortenbestimmung der Genbank Obst-Süßkirsche (09BE007) bzw. Sauerkirsche (09 BE 008)“ bereits bestimmt worden sind oder noch bestimmt werden.

Die molekulargenetische Überprüfung soll entsprechend der ausgearbeiteten Richtlinien des „Fruit Network of the European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECP/GR)“ erfolgen, nach denen die zu verwendenden Mikrosatelliten-Marker-Systeme und die Referenzgenotypen für jede Baumobstart exakt definiert worden sind. Die Ergebnisse sollen der Datenbank der DGO zugearbeitet werden.

Mitte Januar 2012 hat das Kompetenzzentrum Obstbau-Bodensee (KOB) als Auftragnehmer des Dienstleistungsvertrags (Aktenzeichen: 514-06.01-2809BE011) die molekulargenetische Sortenüberprüfung der Deutschen Genbank Obst: Süß- und Sauerkirsche als Auftrag erhalten.

Der vorliegende Abschlussbericht gibt eine ausführliche Darstellung zu den Probenahmen, zur Etablierung der Labormethoden sowie zur Auswertung und Darstellung der erzielten Ergebnisse und deren Nutzen und Verwertbarkeit. Dabei werden für jeden untersuchten Einzelbaum aus den sieben Kirschsortensammlungen die molekulargenetischen Kenndaten dargestellt.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand für die Durchführung der Untersuchungen

Für die molekulargenetische Überprüfung der Süß- und Sauerkirschsorten der Deutschen Genbank Obst stehen grundsätzlich unterschiedliche molekulare Techniken zur Verfügung:

- RAPD (Random Amplified Polymorphe DNA)
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism)
- SSR (Simple Sequence Repeat) Mikrosatelliten

Die SSR Mikrosatelliten Technik liefert zuverlässige Ergebnisse für DNA-Fingerprintanalysen und für Studien zur genetischen Vielfalt für eine Vielzahl von Pflanzen (Gupta et al. 1996). Die Methode ist für die Bewertung der genetischen Variabilität innerhalb der Pflanzenarten und der genetischen Beziehungen zwischen den Arten gut geeignet (Powell et al. 1996).

Die Methode zur Sortenidentifizierung mit Hilfe der SSR-Mikrosatelliten-Technik ist im molekulargenetischen Labor des KOB für mehrere Fruchtarten etabliert (Xuan 2007a, b; Xuan et al. 2009, 2010, 2011, 2012, 2013). Bei der Auswahl der Mikrosatelliten-Marker, sowie für die Methodvalidierung, wurde entsprechend des von der *Prunus*-Gruppe des ECPGR (European Collaborative Programm for Genetische Resources) empfohlenen Standard-Sets von Mikrosatelliten-Markern und einer Liste der Standard-Genotypen ausgegangen (Clarke et al. 2008, Clarke und Tobutt, 2009). Dabei handelt es sich um folgende 16 SSR Marker: EMPA002, EMPA003, EMPA017, PceGA34, EMPaS12, EMPaS02, EMPaS06, EMPaS10, BPPCT037, EMPaS14, EMPaS01, UDP98-412, CPPCT022, PS05Co3, EMPa026 und CPPCT006. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden folgende acht Genotypen als Referenz verwendet: *P. avium* F12/1, *P. avium* 'Goodnestone Black', *P. avium* 'Napoleon', *P. avium* 'Noble', *P. avium* 'Noir de Mechet', *P. incisa* E621, *P. mahaleb* SL64, *P. nipponica* F1292.

3. Planung und Ablauf des Auftrags

Der Auftrag wurde in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase wurden die zu verwendenden Mikrosatelliten-Markersysteme 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. In der letzten Phase wurden die Rohdaten analysiert und wenn nötig Wiederholungen durchgeführt.

Auftragsetablierung

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 Template in der PCR vorhanden sein. Zur Isolation genomischer DNA aus *Prunus* Blättern zwecks PCR Analysen, hat sich der Qiagen-Mini Plant Kit als beste Methode zur Extraktion geeigneter DNA-Qualitäten erwiesen.

Die vom Auftraggeber definierten Mikrosatelliten-Markersysteme wurden in multiplex PCR etabliert und bezüglich Robustheit, Stabilität, Minimierung der Nebenprodukte und dem spezifischen Fragment der Marker grob charakterisiert.

Die vom ECP/GR empfohlenen Marker mussten als Multiplex-PCR etabliert werden. Es wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 und Cy5.5 modifizierte PCR Primer eingesetzt, so dass die Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese erfolgen konnte. Die verwendeten SSR-Marker wurden in fünf Multiplex PCR Gruppen analysiert.

Abwiegen, Isolation der DNA, Verdünnung der DNA, PCR und Kapillarelektrophorese

Das Abwiegen der Blattproben, die Isolation der DNA, die Verdünnung der DNA sowie die Herstellung der DNA 96-Wellplatten für PCR erfolgten manuell. Nach der PCR wurden die Fragmente mittels CEQ 8000 Genetic Analysis System DNA Sequenzer von Fa. Beckmann Coulter analysiert. Die 16 SSR-Marker jeder Probe wurden in 5 Multiplex PCR (die Gruppen: KD, Stk1, Stk2, Stk5, Stk6) so kombiniert, dass eindeutige Ergebnisse erwartet werden konnten bzw. möglichst geringe wechselseitige Signalstörung zu erwarten waren.

Datenanalyse

Die Datenauswertung erfolgte nur wenn die Kontrollen auf der jeweiligen Platte die zu erwartenden Resultate zeigten und 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.

4. Material und Methoden

4.1 Durchführung der Probenahme

Fünf Referenzsorten, 'Napoleon', 'Noble', *P. mahaleb* SL64, *P. nipponica* F1292 und *P. avium* F12/1 wurden vom JKI, Institut für Züchtungsforschung an Obst, Dresden dem KOB zur Verfügung gestellt. Weitere, von Clarke & Tobutt (2009) empfohlene 8 Referenzsorten, 'Napoleon', 'Noble', *P. mahaleb* SL64, *P. nipponica* F1292, *P. avium* F12/1, 'Goodnestone Black', 'Noir de Meched' und *P. incisa* E621, wurden vom East Malling Research Centre, England bezogen.

Das Probematerial für die genetischen Untersuchungen wurde von den Sammlungshaltenden Netzwerkpartnern vor Ort entnommen. Im Einzelnen sind dies folgende Institutionen:

- 1) Julius-Kühn-Institut (JKI), Institut für Züchtungsforschung an Obst (ZO), Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden
- 2) Bundessortenamt, Hauptstr. 36, 14476 Marquardt
- 3) Kyffhäuserkreis, Markt 9, 99706 Sondershausen
- 4) Gemeinde Hagen a. T. W., Schulstr.7, 49170 Hagen a.T.W.
- 5) Stadt Witzenhausen, Am Markt 1, 37213 Witzenhausen
- 6) Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen, Kölnische Straße 48-50, 34117 Kassel
- 7) Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau Sachsen-Anhalt, Strenzfelder Allee 22, 06406 Bernburg

Die Probenahmen vor Ort erfolgten in der Vegetationszeit von Ende Mai bis Mitte August 2012. Im Laufe der Probenahme musste festgestellt werden, dass in allen Einrichtungen, insbesondere aber beim Partner Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen teilweise erhebliche Diskrepanzen zwischen der im Projektbericht zur pomologischen Untersuchung dokumentierten Akzessionen und den Probenehmern vorgelegten Listen bzw. den tatsächlich

vor Ort aufzufindenden Bäumen auftraten. Bäume waren abgestorben und/oder an deren Stelle/Nummerierung wurden bereits neue, teilweise andere Sorten aufgepflanzt. Im Zuge des dynamischen Prozesses kam es teilweise zum Austausch von Bäumen bis hin zu umfangreichen Rodungen, ohne dass dies dann irgendwo für den Auftragnehmer vermerkt wurde. Der Partner Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen hatte zum Zeitpunkt der Nachprobe sämtliche noch pomologisch beurteilte Sorten gerodet.

Zur Probenahme wurde der probenehmenden Person eine Übersicht des Sortenquartiers mit den Einzelbäumen, die zur Probenahme vorgesehen waren, zur Verfügung gestellt. Bei jedem Baum wurde überprüft ob die von der Institution individuell vergebene Baumnummer mit der Liste aus der pomologischen Bestimmung übereinstimmt. Es wurde dann eine eindeutige Probenummer zugeordnet, bestehend aus einem Namenskürzel für den Ort und einer laufenden Nummer. In den Sammlungen fehlende oder abgestorbene Bäume wurden in der Liste vermerkt.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht zu den analysierten Akzessionen und Proben. Ausgehend von den Ergebnissen der pomologischen Echtheitsüberprüfung („Pomologenliste“) wurden bei der KOB Probenahme im Einzelnen folgende Feststellungen berücksichtigt:

- Gegenüber der pomologischen Echtheitsüberprüfung wurden weitere abgestorbene Akzessionen bzw. Fehlstellen festgestellt. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. (2.)
- Gegenüber der pomologischen Echtheitsüberprüfung wurden doch mit vitalen Bäumen bzw. Akzessionen belegte Plätze festgestellt. Dies waren teilweise auch ältere Bäume, es ist eine Fehleintragung in der Pomologenliste zu vermuten (3.)
- Entsprechend dem Auftrag der BLE wurden von jeder Sorte Proben von 2 Akzessionen genommen. Einige Einrichtungen wie z.B. das JKI haben 3 Akzessionen je Sorte die alle in der pomologischen Echtheitsüberprüfung bestimmt wurden. Von diesen waren keine Proben zu ziehen. Die Platznummer ist jeweils dokumentiert (4.)
- Von einigen pomologisch nicht beurteilten Sorten wurden Proben analysiert, auch wenn dies im Auftrag nicht so vorgesehen war. („Zusätzliche Akzessionen“)

Tabelle 1: Stand Probenahme an den einzelnen Standorten

Standort	Pomologenliste 1)			KOB Probenahme				Proben Insgesamt
	Anzahl gelistet	davon tot bzw. versetzt	Verbleiben Pomolgisch	Nicht möglich 2)	doch belegt 3)	"Dritte" 4)	Zusätzliche Akzess.	
Süßkirschen								
JKI	482	25	457	16	3	110	2	336
LLFG	217	1	216	3			1	214
Kyffh	236	3	233	12	1	10		212
Hagen	261	7	254	3	3	1	4	257
Witz	33	8	25	1	1		3	28
LLH	79	12	67	67				0
Summe Süßk.	1308	56	1252	102	8	121	10	1047
Sauerkirschen								
JKI	182	4	178	3		40	2	137
BSA	96	0	96	1		2		93
LLFG	60	0	60			4		56
Kyffh	65	0	65	2		1		62
Hagen	2		2					2
Witz	1	0	1					1
LLH	25	5	20	20				0
Summe Sauerk.	431	9	422	26		47	2	351
Insgesamt	1739	65	1674	128	8	168	12	1398

- 1) Pomologische Echtheitsüberprüfung der Süß- bzw. Sauerkirscharten der Deutschen Genbank Obst (Braun-Lüllemann 2012)
- 2) Baum abgestorben oder Fehlstelle vorgefunden
- 3) Akzession lt. Pomologischer Echtheitsprüfung abgestorben aber lebende Akzession vorgefunden
- 4) Als 3. Akzession einer Sorte gemäß Auftrag nicht genetisch analysiert.

4.2 Methodik Sortenbestimmung

Etablierung der Methode zur Sortenbestimmung

Bei der SSR-Mikrosatellitenmethode (Simple Sequence Repeat) wird eine Sorte über einen individuellen Abschnitt ihres Erbmaterials (DNA) charakterisiert. Mutationen von Obstsorten auf DNA-Ebene können noch nicht sicher identifiziert werden.

Zur Gewinnung der DNA wurde der ‚DNeasy Plant Mini Kit‘ der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Das DNA-Extrakt wurde mittels Nano Photometer (Fa. Implen, München) quantifiziert und anschließend zu 1-5 ng/µl für die Analyse verdünnt.

Markierung der Marker: Zur Charakterisierung der Kirschsorten wurden zunächst die 16 vom ECP/GR empfohlenen SSR Markern (Clarke & Tobutt, 2009) verwendet. Die Marker EmpaS14, EmpaS10, PceGA34, Empa003, Cppct006 und EmpaS02 wurden mit Cy5.5 markiert, während die Marker Empa002, Empa017, EmpaS12, EmpaS06, BPPCT037, EmpaS01, UDP98-412, Cppct022, Ps05c03 und Empa026 mit Cy5 markiert wurden.

Wechsel der Marker: Im Laufe der Analysen hat sich gezeigt, dass die empfohlenen Marker PceGA34 und Ps05c03 bei einheitlicher Multiplex-PCR keine stabilen Ergebnisse zeigen, da diese Marker andere PCR-Bedingungen als die übrigen 14 SSR-Markern benötigen.

Außerdem weist PceGA34 wiederholt eine Instabilität auf, die sich bei bestimmten Sorten in unterschiedlichen Fragmenten äußert. Diese zwei Marker wurden daher in Absprache mit dem Fachexperten und nach Genehmigung durch den Auftraggeber durch UDP-98-411 bzw. UDP-98-410 ersetzt.

PCR (Polymerase-Kettenreaktion): Zur Vervielfältigung der Fragmente wurde mit GE TaqPolymerase gearbeitet. Es erfolgte eine Multiplex PCR mit jeweils 3 bis 4 SSR-Markern bei folgenden PCR Bedingungen:

94°C 2 min, 37 Zyklen von 45 sec bei 94°C, 1 min bei 56°C, 2 min bei 72°C und einem ‚final extension step‘ von 10 min bei 72°C.

Multiplex PCR

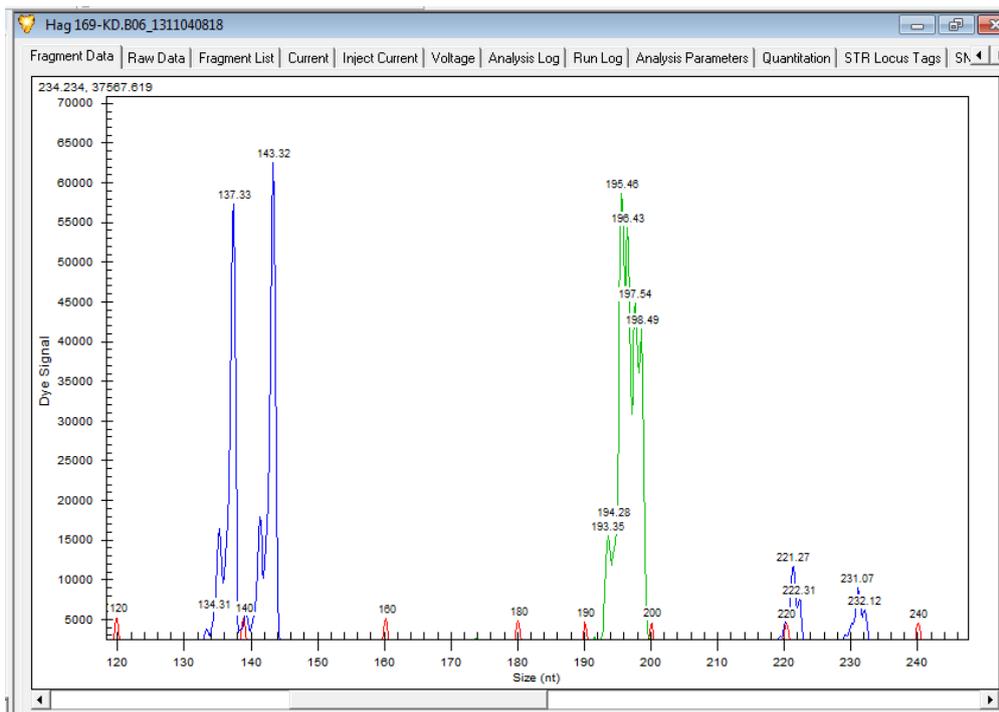
Gruppe	Marker	Dye	Farbe	Gruppe	Marker	Dye	Farbe		
KD	KD1	EmpaS12	Cy5	Stk6	Stk6a	UDP-98-410	Cy5	blau	
	KD2	EmpaS14	Cy5.5		Stk6b	UDP-98-411	Cy5.5	grün	
	KD3	EmpaS01	Cy5		Stk6c	Empa017	Cy5	blau	
Stk1	Stk1a	Empa002	Cy5						
	Stk1b	EmpaS02	Cy5.5		grün				
	Stk1c	Cppct006	Cy5.5		grün				
	Stk1d	Cppct022	Cy5		blau				
Stk2	Stk2a	UDP-98-412	Cy5	Stk3	Stk3a	Ps05c03	Cy5	blau	
	Stk2b	EmpaS10	Cy5.5		grün	Stk3b	Empa003	Cy5.5	grün
	Stk2c	Empa026	Cy5		blau	Stk3c	EmpaS06	Cy5	blau
Stk5	Stk5a	Bppct037	Cy5	Stk4	Stk4a	Bppct037	Cy5	blau	
	Stk5b	Empa003	Cy5.5		grün	Stk4b	PceGA034	Cy5.5	grün
	Stk5c	EmpaS06	Cy5		blau	Stk4c	Empa017	Cy5	blau

Die PCR-Produkte wurden zur Fragmentanalyse auf einen 8-Kapillarsequenzierer (CEQ 8000, Beckman & Coulter) aufgetragen.

5. Darstellung der Ergebnisse

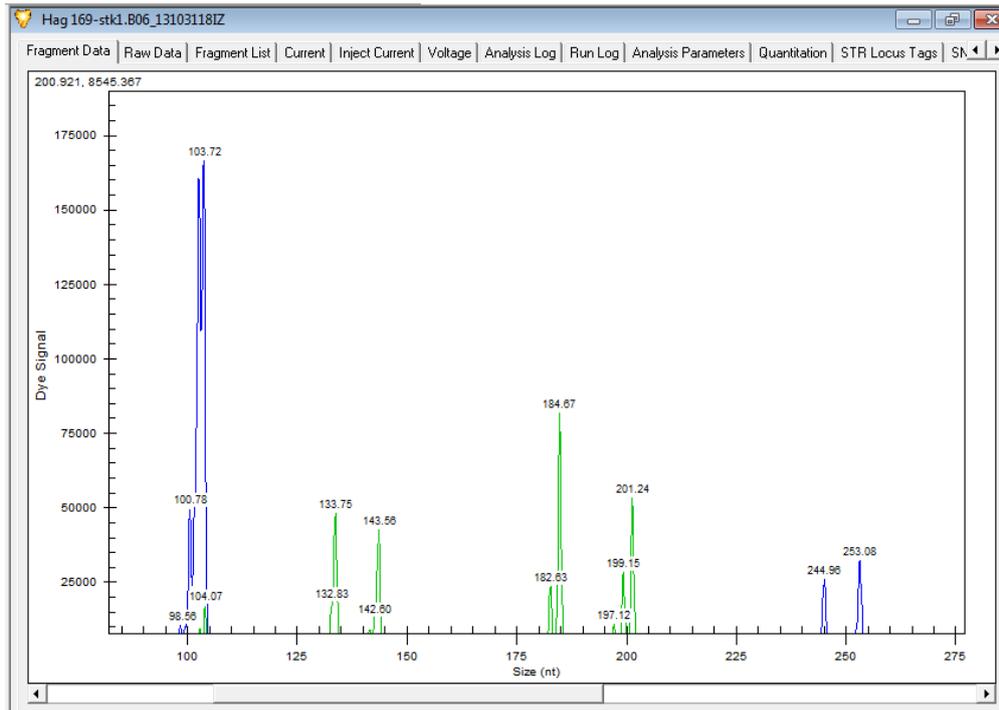
Jeder verwendete Mikrosatellitenmarker zeigt individuelle Eigenschaften unter anderem bezüglich der vorkommenden Allelgrößen, Stotterbanden, Signalintensität und Rauschen. In den folgenden 5 Abbildungen wird jeweils exemplarisch das Chromatogramm der Probe Hag169 (=Hagen 169) in einer multiplex Analyse (5 PCR Gruppen: KD, stk1, stk2, stk5 und stk6) und die Größe der Allelen (x-Achse, Fragmentlänge in bp; y-Achse, Fluoreszenzintensität in CEQ Einheiten- ct, dye signal) gezeigt.

Abbildung 1:



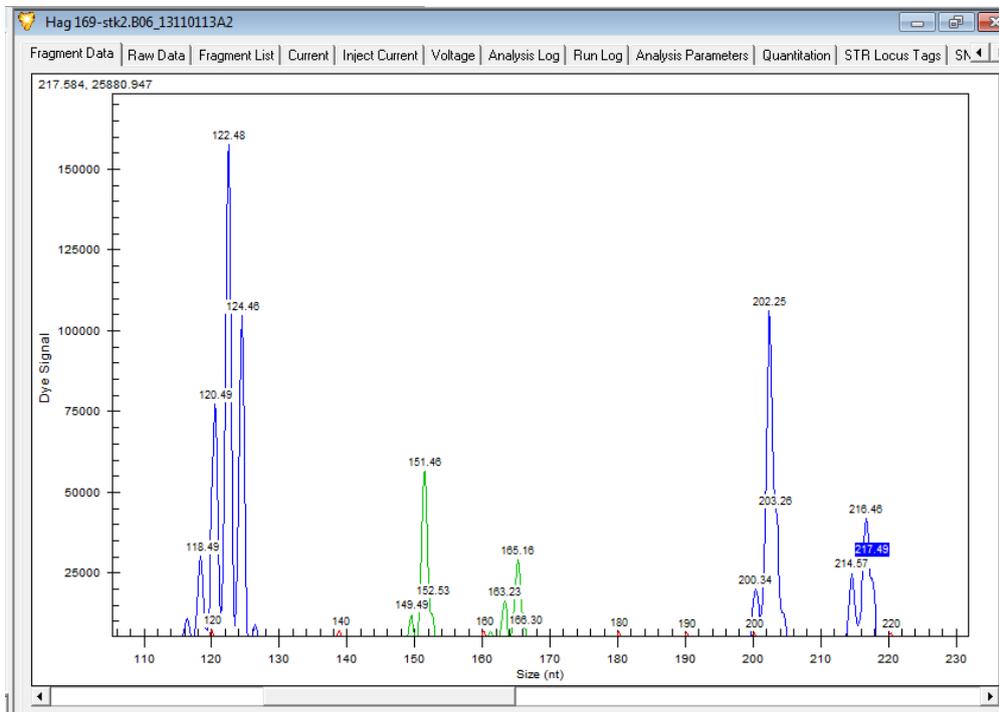
Hag 169-KD (Lab. Nr. Hagen 169): **KD1 (EmpaS12, blau)**: 137bp, 143bp; **KD2 (EmpaS14, grün)**: 196bp, 198bp; **KD3 (EmpaS01, blau)**: 222bp, 232bp.

Abbildung 2:



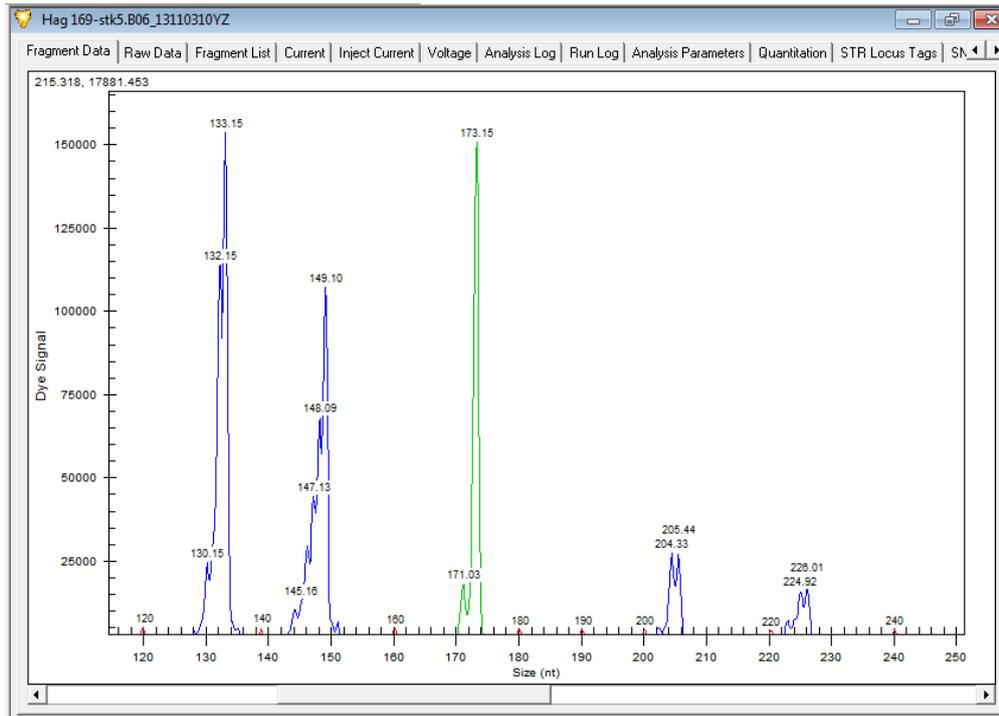
Hag 169-stk1 (Lab. Nr. Hagen 169): **stk1a (Empa002, blau)**: 104bp; **stk1b (EmpaS02, grün)**: 134bp, 144bp; **stk1c (Cpct006, grün)**: 185bp, 201bp; **stk1d (Cpct022, blau)**: 245bp, 253bp.

Abbildung 3



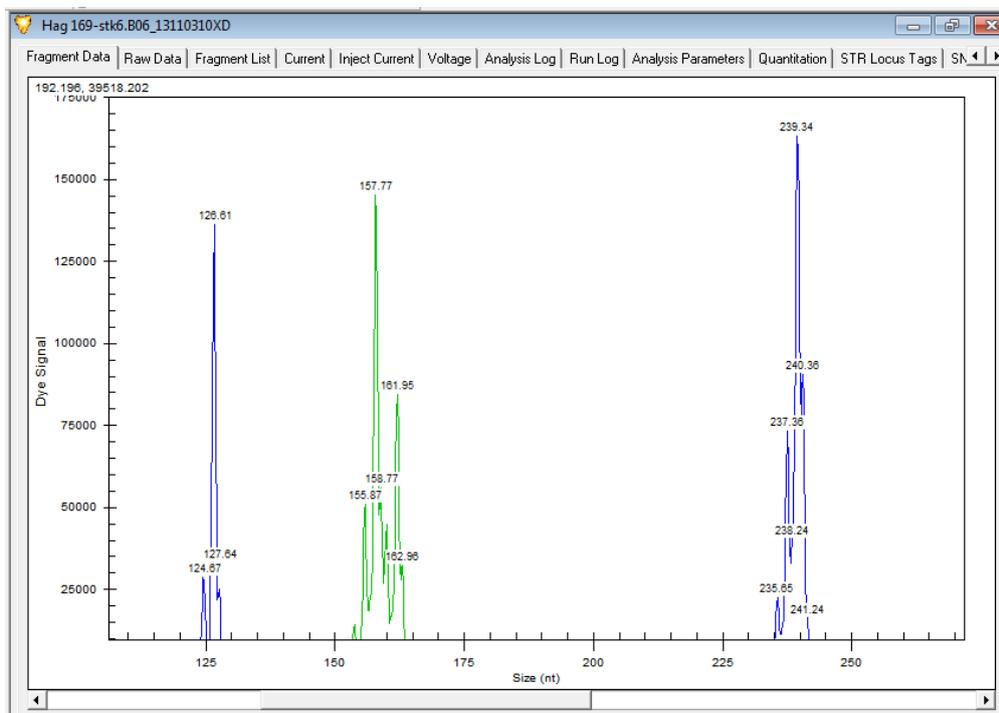
Hag 169-stk2 (Lab. Nr. Hagen 169): **stk2a (UDP98-412, blau)**: 123bp, 125bp; **stk2b (EmpaS10, grün)**: 152bp, 166bp; **stk2c (Empa026, blau)**: 203bp, 217bp.

Abbildung 4:



Hag 169-stk5 (Lab. Nr. Hagen 169): **stk5a** (Bpct037, blau): 134bp, 150bp; **stk5b** (Empa003, grün): 173bp; **stk5c** (EmpaS06, blau): 205bp, 226bp.

Abbildung 5:



Hag 169-stk6 (Lab. Nr. Hagen 169): **stk6a** (UDP98-410, blau): 127bp; **stk6b** (UDP98-411, grün): 158bp, 163bp; **stk6c** (Empa017, blau): 240bp.

Die Ergebnisse der molekular-genetischen Sortenprüfung von 351 Sauer- und 1047 Süßkirschenakzessionen sowie 8 Referenzsorten sind in der mitgelieferten Excel-Datei (*Ergebnisse-Fingerprinting-nach Probenamen.xls*) dargestellt.

Zu der Datei ,Ergebnisse-Fingerprinting-nach Probenamen.xls‘:

Die Fingerprints der 16 SSR Marker sind entsprechend der Anordnung zur Dokumentation der Probenahme bzw. zur Dokumentation in der pomologischen Untersuchung hinter den Kommentaren aus der pomologischen Untersuchung bzw. Bemerkungen zur Probenahme jeder Sorte gelistet. Die Leerstellen resultieren vorwiegend aus der Tatsache dass in der pomologischen Untersuchung alle Bäume betrachtet wurden, in der genetischen Untersuchung waren jeweils 2 Akzessionen zu prüfen.

6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Untersuchung brachte für die genetische Sortenidentifizierung sowie für den internationalen Datenaustausch bei Süß- und Sauerkirschsorten sehr gut verwendbare Ergebnisse. Es hat sich gezeigt, dass in vielen Fällen die Sortenbezeichnung am Erhaltungsstandort, die pomologische Identifizierung sowie die genetische Identifizierung übereinstimmt. Folgende Ursachen für Abweichungen bei der Listung in den Einrichtungen zu pomologischen zur genetischen Identifizierung sind möglich.

- Fehler bzw. Verwechslungen bei der Aufpflanzung in den Erhaltungsgärten, angefangen von der Gewinnung von Veredlungsmaterial, Versand und Austausch von Material, beim Veredeln und Aufschulen, beim Aufpflanzen der Akzessionen bis hin zur Dokumentation der Aufpflanzung. Das genetische Material ging durch viele Hände so dass Verwechslungen fast zwangsläufig vorkamen. Untersuchungen des KOB in anderen Sortengärten haben gezeigt, dass solche Falschpflanzungen regelmäßig auftreten können, so z.B. auch in den langjährigen Bundessortenversuchen, an denen das KOB beteiligt war.
- Das Auftreten von Synonymen ist auch bei anderen Obstarten insbesondere beim Apfel bekannt. Hier spielen Gesichtspunkte wie Umbenennungen bei der Verbreitung von Sorten, sowie beim Sammeln der Sorten durch Einzelinitiativen eine Rolle. Dies scheint insbesondere bei älteren „traditionellen“ Sorten ausgeprägter zu sein.
- Mögliche Ursache können im Rahmen der Untersuchung auch Verwechslungen bei der Probenahme sowie im Labor inkl. Dokumentation sein.
- Phänologisch unterschiedliche Sorten können genetisch identisch sein weil die genetischen Ursachen für offensichtlich unterschiedliche Phänologie durch die angewandte Methode bzw. mit den vorgegebenen Markern nicht ermittelt werden kann.

Die Ergebnisse können als Referenz bei der Bewertung von noch nicht erfassten Sorten aus der Kulturlandschaft vor der Aufpflanzung in Erhaltungsgärten herangezogen werden.

7. Zusammenfassung

Süß- und Sauerkirschsorten (*Prunus*), welche in der Deutschen Genbank Obst (DGO) erhalten und pomologisch bestimmt werden bzw. worden sind, wurden im Hinblick auf Sortenechtheitsbestimmung molekulargenetisch analysiert. Es wurden 1047 Süß- und 351 Sauerkirschsorten anhand 16 ausgewählter Mikrosatelliten-Markersysteme analysiert und deren Resultate in übersichtlicher Form dargestellt.

Im vorliegenden Auftrag wurden die folgenden spezifischen Marker verwendet: EMPA002, EMPA003, EMPA017, EMPaS12, EMPaS02, EMPaS06, EMPaS10, BPPCT037, EMPaS14, EMPaS01, UDP 98-412, CPPCT022, EMPa026, CPPCT006, UDP 98-410 und UDP 98-411. Die entsprechenden Loci wurden in fünf Multiplex PCR Ansätzen amplifiziert und die entstanden Fragmentlängen mittels Kapillarelektrophorese bestimmt.

Sämtliche analysierten Proben wurden ohne Ausfalldaten genetisch identifiziert. Zukünftige Sortenechtheitsüberprüfungen können mit den im Rahmen dieses Auftrages gewonnenen Daten zuverlässig und günstig durchgeführt werden.

Der Auftrag „Molekulargenetische Sortenüberprüfung der Deutschen Genbank Obst: Süß- und Sauerkirsche“ wurde finanziert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), Deutschland, über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Deutschland.

8. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlichen erreichten Zielen, Hinweis auf weiterführende Fragestellungen

Die vertraglich vereinbarten Ziele wurden erreicht. In Abweichung vom ursprünglichen Auftrag wurden in Absprache mit Auftraggeber und wissenschaftlicher Koordinierungsstelle zwei alternative Marker verwendet, um die Qualität der Ergebnisse bei den zu überprüfenden Sorten zu verbessern, sowie zukünftige Arbeiten zur Identifizierung von Kirschsorten methodisch zu erleichtern.

Aus der Untersuchung ergaben sich die in 6. ausgeführten Fragestellungen bzgl. der möglichen Ursachen für Abweichungen sowie im Bericht Entscheidungshilfe Hinweise zum weiteren Vorgehen in der Bereinigung. Hierzu bietet das Arbeitsergebnis eine gute Grundlage.

9. Literaturverzeichnis

- Braun-Lüllemann, A., Pomologische Echtheitsüberprüfung der Süß- bzw. Sauerkirscharten der Deutschen Genbank Obst; Abschlussbericht. AZ Nr. 114-02.05-20.0384/09-D
- Clarke, J. B., Sargent, D. J., Boskovic, R. I., Belaj, A. and Tobutt, K. R. 2008. A cherry map from the inter-specific cross *Prunus avium* 'Napoleon' x *P. nipponica* based on microsatellite, gene-specific and isoenzyme markers. Tree Genetics & Genomes DOI 10.1007/s11295-008-0166-9.
- Clarke, J. B. und Tobutt, K. R. 2009. A standard set of accessions, microsatellites and genotypes for harmonising the fingerprinting of cherry collections for the ECPGR. Acta Hort. 814, 615-618
- Gupta, P. K., Balyan, H. S., Sharma, P. C. and Ramesh, B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. Curr. Sci. 70: 45-54.
- Powell, W., Machray, G. C. and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci. 1: 215-221.
- Xuan, H. 2007a. Identification of heritage apple cultivars at KOB by SSR primers. 27th International Horticultural Congress. 13-19th August. 2006, Seoul, Southkorea. Acta Horticultura 760: 149-156.
- Xuan, H. 2007b. Identifying European pear (*Pyrus communis* L.) cultivars by using apple SSRs. Acta Hort. 800. 439-445.
- Xuan, H., Wang, R., Möller, O., Büchele, M. and Hartmann, W. 2009. Microsatellite markers (SSR) as a tool to assist in identification of sweet (*Prunus avium*) and sour cherry (*Prunus cerasus*) cultivars. Acta Hort. No. 839: 507-514.
- Xuan, H., Mayr, U. and Buechele, M. 2010. Fingerprinting Practices Applied to the KOB Heritage Apple Cultivars Using SSRs as Proposed by the ECPGR_FN. Acta Hort. 859. 183-190.
- Xuan, H., Ding, Y., Neumueller, M., Moeller, O. and Buechele, M. 2011. Microsatellite markers (SSR) as a tool to assist in identification of European plum (*Prunus domestica*). Acta Hort. 918. 689-692.
- Xuan, H., Fritzmann, C. and Schilling, K. 2012. A microsatellite (SSR)-based genetic method to identify strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars. 7th International Strawberry Symposium. 18th-22th Feb. 2012, Beijing, P. R. China. (submitted)
- Xuan, H., Spann, D., and Neumueller, M. 2013. Identifying Quince (*Cydonia oblonga*) Cultivars by means of Apple- and Pear Microsatellites. Acta Hort. 976. 305-310.

Ravensburg, 24.9. 2014

Auftragnehmer:

(Dr. Manfred Büchele)