

Sortenidentifikation von Süß- und Sauerkirschen mittels Mikrosatelliten-Analyse

M. Wolf, S. A. Kraft

Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie e.V. (fzmb e.V.), Abteilung Veterinärmedizinische Diagnostik, Erfurt, Deutschland.

EINLEITUNG

Der Gesundheitsstatus und die Sortenreinheit bei Obstgehölzen sind von besonderem wirtschaftlichem Interesse. Nur hochleistungsfähiges und einheitliches Pflanzgut kann effiziente Produktionssysteme garantieren. Als problematisch gelten nicht sortenreine Bestände und der unbekannt Virusstatus, auch bei Zulieferbetrieben. Herkömmliche Methoden der Sortenidentifikation sind zu langwierig (Früchte erst nach 3 Jahren, Blühverhalten, Viruserkrankungen) und nur an Einzelpflanzen nachzuweisen. Bei der in-vitro-Kultur zur Produktion von Pflanzenklonen muss die Sortenreinheit garantiert werden können. Gerade bei dieser neuen Vermehrungsmethode ist der Beweis der Sortenreinheit von besonderer Bedeutung. Zudem könnten sich bei der Langzeitlagerung von Klonen genetische Veränderungen zeigen.

Im Rahmen des TLL-Projektes „Schaffung und Erhaltung von hochwertigem Vermehrungsmaterial bei Steinobst durch in-vitro-Kultur“ wurde für die Baumschulen Oberdorla GmbH ein Sortenidentifikationssystem für 20 Sorten wichtiger Süß- und Sauerkirschen sowie spezieller Unterlagen dafür geschaffen. Dieses dient als Ein- und Ausgangskontrolle für Kirschbäume und Unterlagen aus der in-vitro-Vermehrung zur Verringerung des Haftungsrisikos und Erhöhung der Investitionssicherheit im intensiven Steinobstanbau.

Bei Mikrosatelliten bzw. SSRs (Short Singel Repeat) handelt es sich um tandemartig wiederholte kurze Sequenzmotive, die über das ganze Genom verteilt sind. Die Motive bestehen meist aus zwei bis sechs Basenpaaren und unterscheiden sich zwischen den einzelnen Genotypen, aufgrund der Anzahl an Wiederholungen an einem Markerlocus. Die Analyse der Mikrosatelliten erfolgt durch PCR-Amplifikation mit Primern, die an die flankierenden, stark konservierten Bereiche der Mikrosatelliten binden. Aufgrund ihres zahlreichen Vorkommens, ihrer kodominanten Ausprägung und des Auftretens vieler verschiedener Allele je Locus sind Mikrosatelliten ein häufig genutztes Markersystem. Da SSR-Genabschnitte hoch polymorph und stark konservativ sind, eignen sie sich besonders zur molekularen Sortenidentifikation. Mikrosatelliten-Analysen von verschiedenen *Prunus*-Arten sind in der Literatur bereits beschrieben^{1, 2, 3}. So entfiel die Suche nach neuen Primern zur Amplifikation der SSR-Abschnitte. Es wurden Primer aus den Veröffentlichungen von Dirlwanger *et al.* 2002 und Cantini *et al.* 2001 auf Eignung getestet.

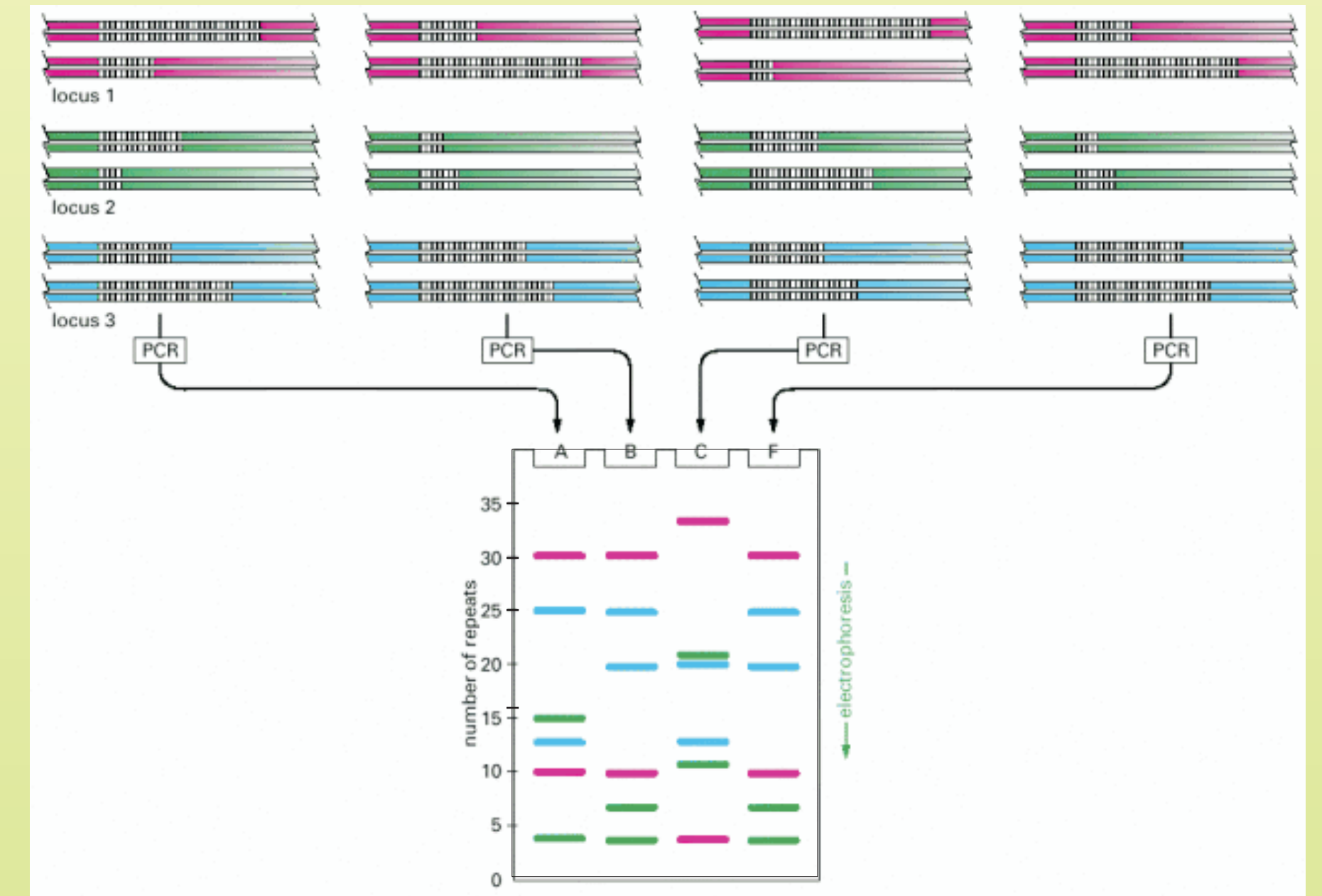


Abb. 1 Schematische Darstellung der Mikrosatelliten-Analyse

MATERIAL und METHODEN

DNA-Extraktion: Die Mini-Präparation der DNA aus frischem Blattmaterial erfolgte in Anlehnung an die CTAB-Methode von Saghai Maroof *et al.*⁴ 1984.

PCR und Mikrosatellitenanalyse: Es wurden 32 für Kirschen relevante Primer gewählt und in spezifisch optimierten PCRs auf eine mögliche Sortenidentifikation getestet. Für die Auftrennung der Amplifikate wurden 12 %ige native Polyacrylamid (PAA) -Gele verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,5 x TBE bei 200 V für ca. 60 min. Zur anschließenden Ethidiumbromid- (EtBr) Färbung wurden 2 µl EtBr-Konzentrat mit 100 ml 0,5 x TAE Puffer vermischt. Das Gel wurde 10 min im Färbegrad inkubiert und anschließend 10 min in Wasser entfärbt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Gel Doc 2000 der Firma Biorad.

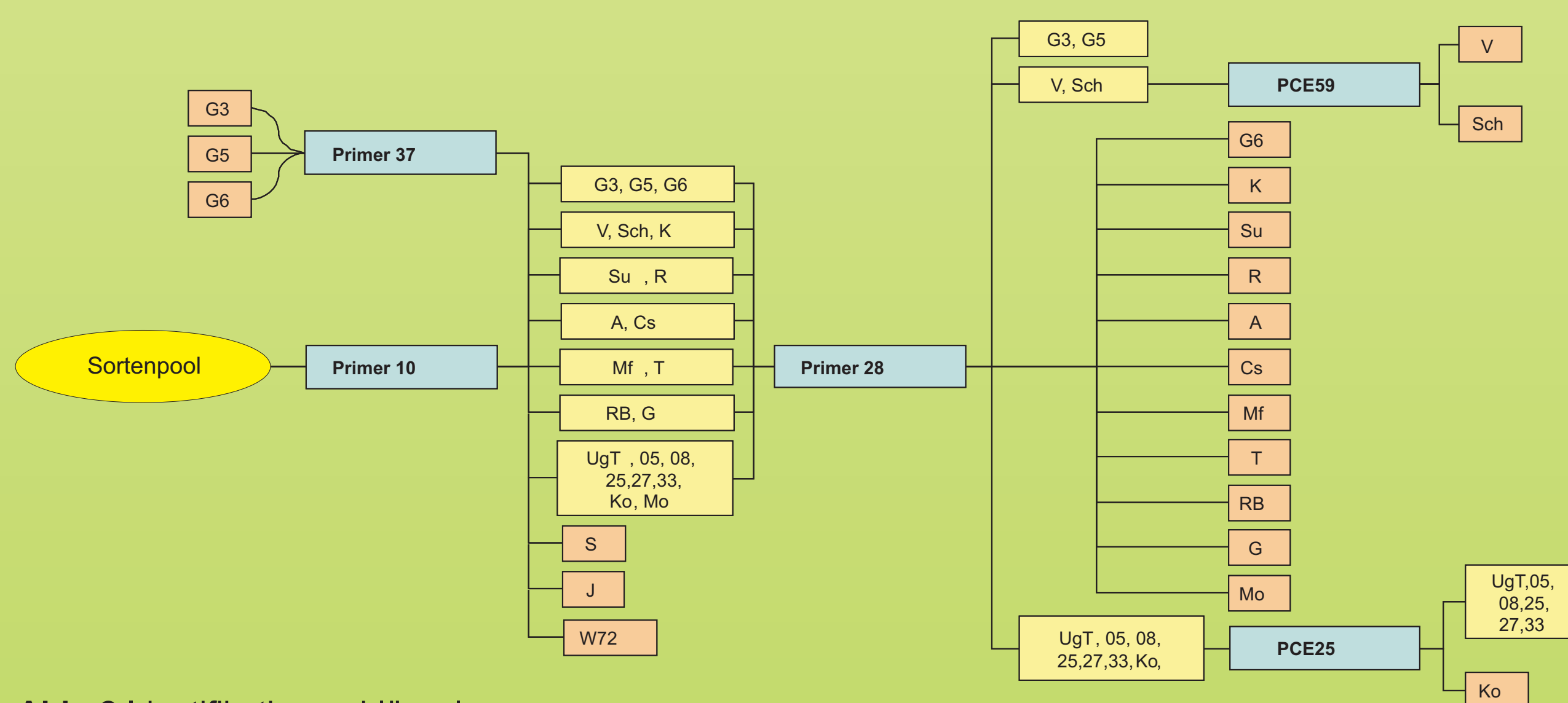


Abb. 2 Identifikationsschlüssel

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Es konnten ein Identifikationsschlüssel und Identifikationsfolien entwickelt werden, die eine Sortenidentifikation des zur Verfügung gestellten Sortenspektrums ermöglichen. Ein Großteil der untersuchten Sorten kann im Bandenfragmentmustervergleich mit Primer 10 und 28 unterschieden werden. Für die restlichen Sorten sind weitere Primer notwendig, um eine Identifikation zu gewährleisten. Einzig Ungarische Traubige kann nicht von ihren Klonen unterschieden werden. Diese Klone sind Einzelbaumauslesen, deren phänotypische Unterschiede nicht zwangsläufig genetisch bedingt sein müssen und somit auch molekularbiologisch nicht nachweisbar sind.

Das etablierte Sortenidentifikationssystem kann jederzeit durch Integration neuer Sorten erweitert werden und fand bereits erfolgreiche Anwendung bei der Aufdeckung von falsch deklarierten Ausgangsmaterial, das der Baumschulen Oberdorla GmbH geliefert wurde.

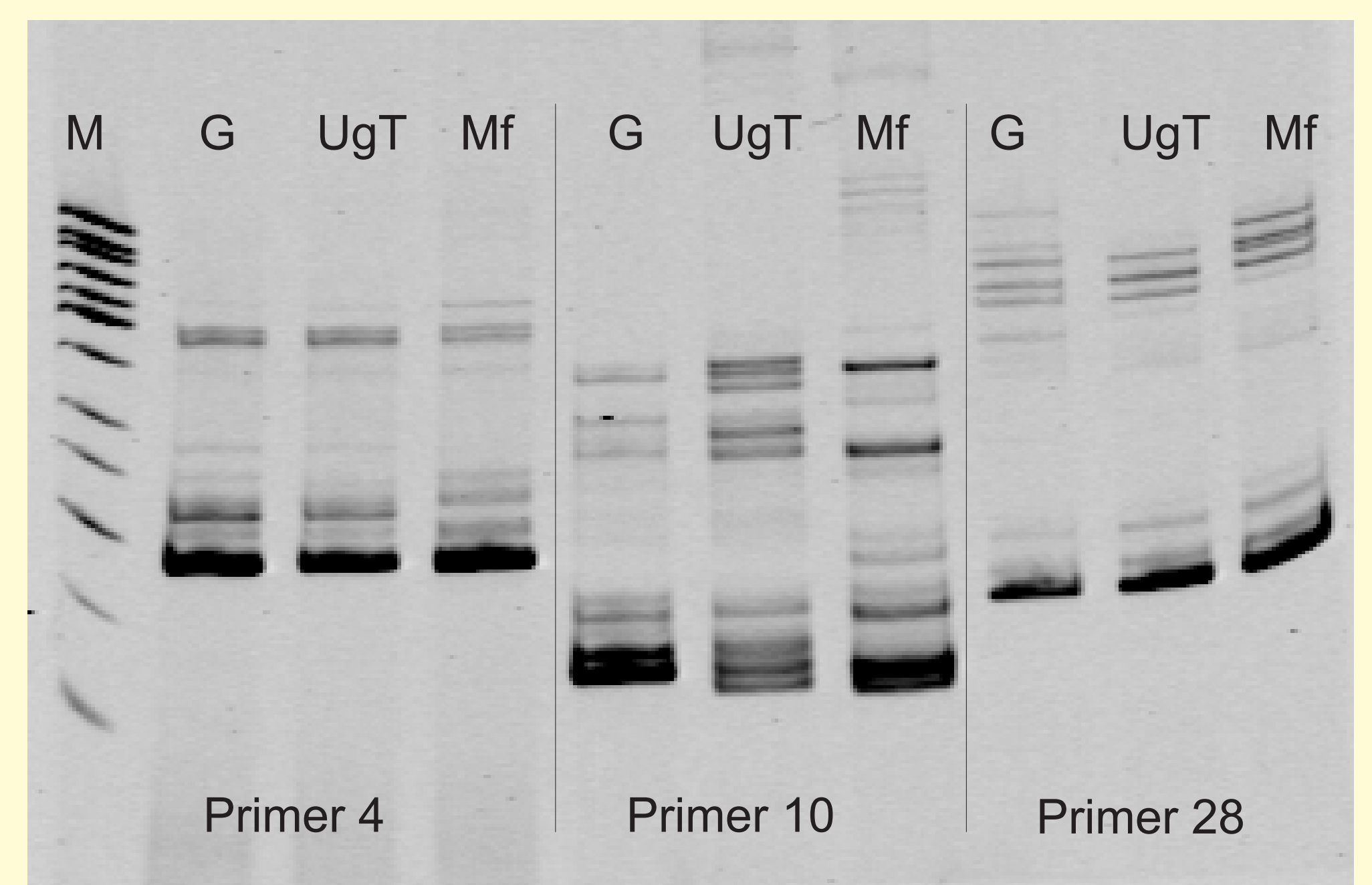


Abb. 3 Identifikation dreier Sorten mittels SSR-Analyse (G-Gerema; UgT-Ungarische Traubige; Mf-Morellenfeuer)

Literatur

- [1] Dirlwanger *et al.* (2002) *Theor Appl Genet* 105: 127-138
- [2] Cantini *et al.* (2001) *J Amer Soc* 126: 205-209
- [3] Boritzki *et al.* (2000) *Acta Hort* 538: 505-510
- [4] Maroof *et al.* (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466

Danksagung

Die Arbeiten wurden über die Förderrichtlinie "Förderung der Vermarktung landwirtschaftlicher Qualitätserzeugnisse" der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft gefördert (Nr.: 330-340102-028/03). Jegliches Pflanzenmaterial wurde von der Baumschule Oberdorla GmbH zur Verfügung gestellt. Für technische Assistenz danken wir Heide Dorfmann.