

Molekulare Charakterisierung von Sorten und Klonen – Methoden zur Verbesserung der Zusammenarbeit verschiedener Labore

Pascal Eusemann, Steffen Fehrenz, Hilke Schröder, Birgit Ziegenhagen und Ronald Bialozyt

Die morphologische Unterscheidung von Sorten und Klonen bei Bäumen ist schwierig. Gerade in der Zucht langlebiger Baumarten aber, die in Klonsammlungen Jahrzehnte überdauern können, ist es von großem Interesse, die Zugehörigkeit eines Baumes zu einer bestimmten Sorte auch nachträglich sicher belegen zu können. Große Hoffnung wurde hierbei in den genetischen Fingerabdruck gesetzt. Leider ist die Vergleichbarkeit der so ermittelten Genotypen zwischen Laboren limitiert. Versuche, die Vergleichbarkeit durch allelische Leitern zu verbessern, verliefen wenig befriedigend. Im Rahmen eines Ringversuches wurde daher untersucht, inwieweit die Ergebnisse verschiedener Labore mithilfe softwaregestützter Methoden verglichen werden können. Hierzu wurde die Software „Allelogram“ verwendet, die vom Sequenzierer gelieferte Fragmentlängen analysiert und in Allelklassen (Bins) sortiert. Eine Besonderheit des Programms ist die Möglichkeit, Standardproben zu definieren, die genutzt werden können um Genotypen zu normalisieren. Hierbei werden Fragmentlängen, die auf verschiedenen Sequenzierern ermittelt wurden und sich daher gerätebedingt unterscheiden, einander automatisch angeglichen. Die Normalisierung ist wichtig, um echte Allele von technisch bedingten Unterschieden trennen zu können.

Untersucht wurde ein Probensatz von 48 Pflanzen. Dieser bestand aus 10 von der NW-FVA bereitgestellten Pappel-Standardklonen und 38 Proben von *Populus nigra*, *P. deltoides* und *P. x canadensis*. Alle Proben wurden an je sechs Mikrosatelliten-Loci untersucht: WPMS 09, 14, 18, 20 und PMGC 14, 2163. Der gesamte Probensatz wurde an der Universität Marburg in zwei separaten PCRs amplifiziert. Jede dieser PCRs wurde zweimal getrennt auf dem Sequenzierer des Institutes analysiert. Die PCR-Produkte der ersten PCR wurden zusätzlich auf dem Sequenzierer des vTI in Großhansdorf untersucht. 40 Proben des Gesamtprobensatzes wurden in der NW-FVA in Hann. Münden in einer dritten PCR amplifiziert und auf dem dortigen Sequenzierer analysiert. Dieses Vorgehen ermöglichte es, die Ergebnisse verschiedener Labore, Bearbeiter und Geräte direkt miteinander zu vergleichen. Die erhaltenen Genotypen wurden in „Allelogram“ eingelesen und mithilfe der Standardklone normalisiert. Die normalisierten Daten wurden für die Definition von Allelklassen verwendet und anschließend jedes Fragment einer Allelklasse zugeordnet (Binning). Beim Vergleich der resultierenden Genotypen wurden

Genotypisierungs- und Binningfehler unterschieden. Als Genotypisierungsfehler wurde gewertet, wenn eine identische Probe einmal als homo- und einmal als heterozygot analysiert wurde oder zwei als identisch bekannte Allele Bins zugeordnet wurden, die mehr als eine Motivlänge Abstand voneinander aufwiesen. Als Binningfehler wurde betrachtet, wenn als identisch bekannte Allele unterschiedlichen, aber direkt benachbarten Bins zugeordnet wurden.

Insgesamt konnten bei den sechs getrennten Analysen der sechs Loci 3058 Allele erfasst werden. Unter diesen wurden 129 Fälle entdeckt, in denen sich Allellängen zwischen verschiedenen Läufen unterschieden. 94 dieser Fälle wurden als Genotypisierungsfehler erkannt. Die restlichen 35 Fälle wurden als echte Binningfehler gewertet. Der Vergleich der vier Analysen innerhalb des Marburger Labors enthielt 8 Genotypisierungsfehler und einen Binningfehler unter 2130 erfassten Allelen. Daraus ergibt sich eine Gesamtfehlerrate pro Allel von 4,20 %. Diese teilt sich auf in einen Genotypisierungsfehler von 3,10 % und einen Binningfehler von 1,10 %. Der Vergleich der Analysen eines einzigen Labors ergibt einen Gesamtfehler von 0,42 %, einen Genotypisierungsfehler von 0,37 % und einen Binningfehler von 0,05 %. Damit liegt die Fehlerrate verschiedener Labore im Bereich anderer Studien. Innerhalb desselben Labors liegt der Fehler weit unterhalb der üblicherweise bestimmten Fehlerraten.

Es kann daher eine klare Empfehlung für die Verwendung der Software „Allelogram“ für alle Genotypisierungsprojekte ausgesprochen werden. Für die Vergleichbarkeit von Genotypen, die in verschiedenen Laboren und auf unterschiedlichen Geräten produziert wurden, ist eine Software mit Normalisierungsfunktion von grundlegender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die Software in der Lage ist, Daten unterschiedlicher Herkunft konsistent zu kategorisieren und dabei den Fehler in akzeptablen Grenzen zu halten. Innerhalb desselben Institutes verwendet, reduziert das Programm die Fehlerrate gegenüber klassischen Auswertemethoden merklich und eignet sich damit auch für Projekte, die keine Beteiligung unterschiedlicher Labore erfordern.

Stichworte: Allelklassen, Allelische Leitern, Binning, Genotypisierung, Mikrosatelliten, Standardklone

Korrespondierender Autor:

Dr. Pascal Eusemann
Philipps-Universität Marburg
FB Biologie – AG Naturschutzbiologie
Karl-von-Frisch-Straße 8, 35032 Marburg
E-Mail: pascal.eusemann@biologie.uni-marburg.de