

# Selektionstechnologie für resistente Kartoffelsorten mit ausgeprägter industrieller Verarbeitungsneigung

Günter Brader<sup>1\*</sup>, Friederike Trognitz<sup>1</sup>, Felix Fuchs<sup>2</sup>, Alexandra Weilharter<sup>1</sup> und Bodo Trognitz<sup>1</sup>

## Abstract

### Technology for selection of resistant potato cultivars with processing quality

Important factors for potato breeding are quality, size and color of tubers as well as resistance to late blight, abiotic stresses and processing quality (e.g. chips, starch quality and amount). A breeding program where expression of marker genes is observed shall be used as basis for a faster and more effective selection program. For this purpose a microarray presented here was developed. The microarray contains 5322 elements representing 4331 different cDNAs. Each element is represented twice on the 11200 dot microarray. The cDNAs of the microarray are derived from a library of *Phytophthora infestans* infected leaves of the potato cultivar Yungay and are selected from the TIGR EST collection or are specifically amplified with PCR on the base of a database entry. The microarray is specifically enriched for elements in defense, light, photoperiod, stress, hormone, signaling, starch-and tuber development.

**Keywords:** Microarray, potato resistance breeding, *Solanum tuberosum*

## Einleitung

Bedeutsam für die Züchtung und Weiterentwicklung von Kartoffelsorten sind eine Reihe wichtiger Faktoren. Neben Ertrag, Form und Farbe der Kartoffel spielen für künftige Weiterentwicklungen Resistenz und Toleranz gegen biotische (z.B. Krautfäule (*Phytophthora infestans*)) und abiotische Faktoren sowie die industrielle Eignung bezüglich Stärkeertrag und -qualität und Verarbeitungsneigung für Chips und Pommes frites eine wesentliche Rolle.

In der klassischen Kartoffelzüchtung erfolgt die Selektion anhand phänotypischer Merkmale. Diese zeit- und arbeitsaufwendigen Methoden können mit Hilfe molekularer Marker beschleunigt und vereinfacht werden. Im vorliegenden Projekt sollen die effizientere und objektivere Selektion mit Hilfe von spezifisch exprimierten Schlüsselgenen erfolgen. Das Auffinden dieser Gene soll mit Hilfe eines am ARC entwickelten Microarraychips erfolgen. Im Folgenden soll die Zusammensetzung und Aufbau des Microarrays beschrieben werden. Dieser Microarray ist speziell für die Anwendungen Stress/Krautfäuleresistenz sowie Stärke-

stoffwechsel und Knollenbildung ausgerichtet und kann bei Bedarf erweitert werden.

## Methoden und Ergebnisse

### Microarrayvorbereitung

*E. coli* mit cDNA Klonen aus Kartoffel in den Plasmiden pCMVSPORT, pBlueScript-SK und pSC-A wurde auf Luria Bertani Medium mit Kalium, Phosphat und Magnesiumzusatz in Platten (96) kultiviert. Das Medium enthielt darüber hinaus 200 mg/L Ampicillin sowie 4.4% Glycerol. Nach 24h Wachstum bei 37°C und Schütteln bei 200rpm wurden jeweils 100µL zur Konservierung direkt eingefroren.

Diese cDNA-Kollektionen dienten als Vorlage für die Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden jeweils 0.5µL in 50µL PCR-Reaktionsgemisch pipettiert und T3/T7 bzw. M13-20/T7 (pCMVSPORT) Primer zur Vermehrung der klonierten Gene eingesetzt. Die Produkte wurden auf Reinheit, Länge und Konzentration untersucht. Saubere Produkte mit Kettenlänge >350bp wurden in 384 Platten getrocknet und mit Hilfe eines Omnigridd Arrayers in Pipettierlösung auf Microarray-Glasplatten aufgetragen (Gesamt 11200 dot array). Jede Sonde wurde dabei in zwei Wiederholungen aufgetragen. Zusätzlich zu den in der nächsten Sektion beschriebenen Sonden enthält der Microarray 18 Kontrollen, die in 48 Wiederholungen auf den Microarray aufgetragen wurden.

### Auswahl der Sonden für den Microarray

Die Sonden für den Microarray wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt:

Klonierte, exprimierte Sequenzen (ESTs) aus einer cDNA Bibliothek, die aus mit *Phytophthora infestans* behandelten Blättern der Kartoffelsorte Yungay stammt. Diese mit Krautfäule infizierten Pflanzen haben Boten RNA, die für die Verteidigung wichtig sind bzw. spezifisch bei Infektion eingeschaltet sind, angereichert. Aus der normalisierten cDNA Yungay Bibliothek wurden 3475 Klone sequenziert und für den Microarray Chip verwendet.

1645 cDNA Klone der Kartoffelsorten Kennebec und Binjite wurden aus Sammlungen des Institutes für Genomforschung (TIGR) ausgewählt. Die cDNAs stammen aus folgenden Bibliotheken: ruhende Knollen, Stolone, keimende Augen, *P. infestans* infizierte Blätter, Wurzeln, abiotischer Stress, Kallus sowie gemischte Bibliotheken. Die TIGR Sammlung wird im Arizona Genomics Institute (AGI) aufbewahrt und

<sup>1</sup> Austrian Research Centers GmbH - ARC, Biogenetics-Natural Resources Division, Bioresources Department, A-2444 SEIBERSDORF

<sup>2</sup> NÖ Saatbaugenossenschaft, Meires 25, A-3841 WINDIGSTEIG

\* Ansprechpartner: Dr. Günter BRADER, guenter.brader@arcs.ac.at



Die Auswahlkriterien wurden anhand der Literatur sowie anhand der Gene Ontology-(GO-) Annotierungen getroffen. Ein Teil des Stärkestoffwechsels mit der Anzahl der auf dem Microarray vorhandenen Sonden ist in *Abbildung 1* illustriert. Die Stärkestoffwechselwege wurden den Publikationen von BURRELL (2003), FERNIE et al. (2002), GEIGENBERGER (2003), KLOOSTERMAN et al. (2005) und LYTOVCHENKO et al. (2007) entnommen.

Zusätzlich zu bekannten Genen des Stärkestoffwechsels wurden einige Sonden anhand von Co-expressionsdaten mit regulierten Genen des Stärkestoffwechsels ausgewählt. Dazu wurden 228 Microarrayexperimente ausgewählt, an denen aufgrund der gewählten Bedingungen (Behandlung mit Zuckern, variierende Stickstoff- und Phosphatkonzentrationen, Kälte, Tageslängenänderung) Variation in der Expression von Genen des Stärkestoffwechsels zu erwarten sind. Die Affymetrix Microarraydaten wurden in R (Bioconductor Projekt) mit Robust Multichip Average (RMA) normalisiert und ausgewählte, regulierte Gene als Köder (bait) zur Pearson-Korrelationsberechnung verwendet. Insgesamt wurden hier 78 zusätzliche Sonden mit einer Pearson-Korrelation von >0.8 ausgewählt. Als Beispiel seien hier in *Tabelle 2* jene Gene, die ein ähnliches Expressionsmuster wie das Stärkeverzweigungsenzym (SBE2.1) aufweisen. Hingewiesen sei hier auf die mit einem Stern markierten Gene, die anhand der Co-expressionsanalyse gefunden wurden, die aber auch bekannte Gene des Stärkestoffwechsels sind und daher die Methode validieren.

116 Gene, die zwar aus Kartoffel EST Datenbanken bekannt sind, aber entweder in den bestellten ESTs nicht vermehrt werden konnten oder aus anderen EST Bibliotheken stammen, wurden mit PCR aus einer gemischten Stress-cDNA Bibliothek vermehrt und in pSC-A geklont. Darüber hinaus wurden 19 potentielle R-Gen Fragmente mit PCR vermehrt, geklont und in den Microarray aufgenommen.

18 Kontrollen wurden in den Microarray in zumindest 48 Wiederholungen aufgenommen. Diese beinhalten 9

Haushaltsgene der Kartoffel, DNA-freies Pufferreaktionsgemisch sowie DNA-Fragmente die zur Microarraystandardisierung verwendet werden. Insgesamt sind zurzeit 5322 Sonden, die 4331 unterschiedlichen cDNAs entsprechen, auf dem Microarray vorhanden.

## Ausblick

Ob und in welcher Herkunft und zu welchem Zeitpunkt ein Gen eingeschaltet wird, kann zur Beurteilung ob ein bestimmter Phänotyp auftritt verwendet werden. Im Zuge dieses Projektes soll anstelle der Selektion nach phänotypischen Kriterien oder bloßem Vorhandenseins eines Genes die Genexpression als Selektionsgrundlage benutzt werden. Als Versuchsmaterial wurden verschiedene Sorten ohne (Agata, Erika, Fabiola, Roko, Suleika) bzw mit Agria, Fontane, Innovator, Umatilla Russet, Sinora) Verarbeitungseignung (insgesamt je 17 Sorten) und unterschiedlicher Krautfäuleresistenz vom NÖS zur Verfügung gestellt. Die Genexpression wird in verschiedenen Entwicklungsstadien mit Microarray und bei Kandidatengen auch mit quantitativer reverse transcript-(qRT)-PCR untersucht.

Der im ARC entwickelte Microarray hat gegenüber bisher weltweit entwickelten (und z.T. eingestellten) Microarrays den Vorteil der Verfügbarkeit und bietet mit der kompletten in Haus Produktion auch die Möglichkeit einer ständigen Neuanpassung bei Bedarf. Ein weiterer Vorteil bietet die spezifische Anreicherung von Sonden für Stress-, Stärke- und Knollenbildungsspezifischen Genen mit relevante Elementen für die moderne Kartoffelzüchtung.

## Danksagung

Dieses Projekt wird vom FFG Projekt BRIDGE 815472, der Niederösterreichische Saatbau GmbH, der AGRANA Stärke GmbH und Raiffeisen Ware Austria AG gefördert.

*Tabelle 2: Mit SBE2.1 ko-exprimierte A. thaliana Gene in 228 ausgewählten Experimenten*

Probennummer	Bezeichnung	Exp 1	Exp 2	228 Experimente	Pearson Korrelation
bait **	SBE2.1 (STARCH BRANCHING ENZYME 2.1)	9,147117393	9,414529473	....	bait
<b>263912_at</b>	<b>SBE2.1 (STARCH BRANCHING ENZYME 2.1)*</b>	9,147117393	9,414529473	....	<b>1,000</b>
<b>246829_at</b>	<b>PWD (PHOSPHOGLUCAN WATER DIKINASE)*</b>	9,556487227	9,223559393	....	<b>0,892</b>
<b>252468_at</b>	<b>ATPHS2/PHS2 (ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2)*</b>	10,461565450	10,321447020	....	<b>0,886</b>
<b>262784_at</b>	<b>SEX1 (STARCH EXCESS 1)*</b>	10,545539860	10,469329800	....	<b>0,876</b>
255331_at	similar to unnamed protein product	7,801089565	7,985836237	....	0,854
266120_at	ATIDD5 (INDETERMINATE(ID)-DOMAIN 5)	8,756171686	8,835821639	....	0,853
<b>256746_at</b>	<b>glucan phosphorylase*</b>	8,817071621	9,194602354	....	<b>0,832</b>
261075_at	binding	8,286032751	8,080182703	....	0,830
255013_at	similar to unknown protein	7,079337667	7,159626989	....	0,829
<b>245094_at</b>	<b>DPE2 (DISPROPORTIONATING ENZYME 2)*</b>	10,387997490	10,377982270	....	<b>0,829</b>
266856_at	ATPDR4/PDR4 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 4)	9,716184915	9,396301525	....	0,828
262629_at	ACD32.1 (ALPHA-CRYSTALLIN DOMAIN 31.2)	10,412384890	10,512624030	....	0,826
251155_at	unknown protein	9,882539919	9,631175706	....	0,826
<b>245712_at</b>	<b>ATLDA/ATPU1 (PULLULANASE 1)*</b>	8,034138486	7,799917751	....	<b>0,823</b>
257832_at	CCL (CCR-LIKE)	9,867257979	10,153346270	....	0,823
...>22500 probe sets					
248518_at	similar to unknown protein	4,684512821	4,598534054	....	-0,795

\* Bekannte in den Stärkemetabolismus involvierte Gene

\*\* Die Pearsonkorrelation wurde jeweils mit dem bait im Vergleich zu allen anderen Genen einzeln berechnet

## Literatur

- BURRELL, M.M., 2003: Starch: the need for improved quality or quantity - an overview. *J. Exp. Bot.* 54, 451-456.
- FERNIE, A.R., L. WILLMITZER und R.N. TRETHERWEY, 2002: Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Tr. Plant Sci.* 7, 35-41.
- GEIGENBERGER, P., 2003: Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J. Exp. Bot.* 54, 457-465.
- KLOOSTERMAN, B., O. VORST, R.D. HALL, R.G.F. VISSER und C.W. BACHEM, 2005: Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant Biotech. J.* 3, 505-519.
- LYTOVCHENKO, A., U. SONNEWALD and A.R. FERNIE, 2007: The complex network of non-cellulosic carbohydrate metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 227-235.