

# Entwicklung eines auf Mikrosatelliten basierenden Nachweissystems zur Differenzierung von Gerstensorten

## Development of a microsatellite-based detection system for the differentiation of barley varieties

Jun Wang<sup>1,2</sup>, Verena Peterseil<sup>1\*</sup>, Helmut K. Mayer<sup>2</sup> und Rupert Hohegger<sup>1</sup>

### Abstract

This document presents a Quadruplex-PCR targeting microsatellites for the differentiation of barley varieties. It can be seen as an alternative to the proposed SDS-PAGE of the hordeins of barley as proposed in UPOV tg/19/10, or be used as a complement to other differences in morphological or physiological characteristics. The advantage of this method in comparison to morphological or physiological traits is the considerable shorter time of analysis. Within a few days, a clear distinction can be made. DNA of single barley kernels was extracted, analysis of microsatellites by using Multiplex-PCR was performed, and finally these microsatellites were separated by gel electrophoresis. The microsatellite pattern of each barley variety can be seen as a fingerprint thereof and so be used for molecular biological differentiation of barley varieties.

### Keywords

Differentiation of varieties, *Hordeum vulgare*, microsatellites

### Einleitung

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist als viertwichtigstes Getreide weltweit bekannt (SCREENIVASULU et al. 2008). Sie wird verwendet als Futtermittel und zur Herstellung von Malz und Malzextrakt, welche hauptsächlich für die Bierproduktion, aber auch in anderen Bereichen der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Malz- und in der Folge Bierqualität sind sortenabhängig und verlangen somit bei reinsortiger Verwendung bzw. bei von mehreren Sorten einen entsprechenden Herstellungsprozess (LIN et al. 2007) weshalb die Frage der Sortenauswahl bzw. in weiterer Hinsicht jene der Sortenreinheit sowie -bestimmung von großer Bedeutung ist.

Zur Sortendifferenzierung kann laut UPOV (Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen; www.upov.org) die SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacryl Amide Gel Electrophoresis) der Hordeinfraktionen als Sortencharakteristikum herangezogen werden. Es wird

allerdings darauf hingewiesen, dass dieses Merkmal für sich alleine nicht ausreichend ist. Bei sehr nahe verwandten Gerstensorten wie zum Beispiel Geschwistern, kann es vorkommen, dass diese nicht anhand von Proteinsternen unterschieden werden können. In diesem Fall können die morphologischen und physiologischen Merkmale der Gerste laut DUS-Prüfung (UPOV 1994) herangezogen werden oder - wenn zum Auswuchs der Pflanze nicht die benötigte Zeit vorhanden ist - eine molekularbiologische Methode basierend auf DNA-Analyse (molekulare Marker) angewendet werden.

Molekulare Marker sind kurze DNA-Abschnitte, die eine eindeutige Identifizierung von Organismen erlauben. Als molekulare Marker eignen sich DNA-Abschnitte die mit Hilfe diverser DNA-Techniken analysiert werden können (beispielsweise RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphisms*; RAPD, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Mikrosatelliten sind DNA-Abschnitte, die sich aus wiederholten Motiven zusammensetzen (HAMADA et al. 1982, LITT und LUTY 1989), die Motive sind 1-6 bp groß, z.B. (G)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub> oder (GATA)<sub>n</sub>. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der Wiederholungen (Längenpolymorphismus). Diese Mikrosatelliten- (SSR, *Simple Sequence Repeats*) Marker weisen einen sehr hohen Polymorphiegrad auf (AKKAYA et al. 1992, WU und TANKSLEY 1993, BELL und ECKER 1994, PLASCHKE et al. 1995, STRUSS und PLIESKE 1998) und eignen sich daher gut zur Sortendifferenzierung.

Ziel dieser Arbeit war es für spezielle Gerstensorten, die anhand der SDS-PAGE der Hordeine nicht eindeutig unterscheidbar sind, ein System zur Unterscheidung mittels molekularbiologischer Analyse zu entwickeln, besonders wenn dies innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne erforderlich ist - im Gegensatz zur DUS-Prüfung, welche unter Umständen eine ganze Wachstumsperiode dauern kann.

### Material und Methoden

Für die Arbeit wurden 15 Gerstensorten ausgewählt die im jeweiligen Hordein-Elektropherogramm keine oder nur sehr geringe Unterschiede aufweisen. Die Differenzierung anhand von Mikrosatelliten erfolgte in drei Etappen:

<sup>1</sup> Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

<sup>2</sup> Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Muthgasse 11, A-1190 WIEN

\* Ansprechpartner: Verena PETERSEIL, verena.peterseil@ages.at



(1) Extraktion der Gersten-DNA aus Einzelkörnern, (2) Amplifizierung der Mikrosatelliten mittels PCR (*Polymere Chain Reaction*), (3) Auftrennung der Mikrosatelliten mittels Elektrophorese. Zur Verifizierung der erfolgreichen Extraktion bzw. PCR wurde anschließend an den jeweiligen Arbeitsschritt eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Das Sichtbarmachen der Mikrosatelliten in Form definierter Banden auf einem Gel erlaubt es, einer bestimmten Sorte einen spezifischen Fingerprint zuzuordnen und somit ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zu erhalten.

### Extraktion der DNA

Die einzelnen Gerstenkörner wurden mit einer Zange zerquetscht und anschließend jeweils separat dem Extraktionsprozess unterworfen. Die Messung der DNA-Ausbeute erfolgte mittels UV-Photometer. Die Bestimmung der DNA-Ausbeute ist von Bedeutung, um die Konzentration der DNA-Arbeitslösung bei der im Folgenden durchgeführten Amplifikation der Mikrosatelliten optimal einstellen zu können.

### Amplifizierung der Mikrosatelliten mittels PCR

Anhand von Literaturrecherchen wurden 17 potentielle Mikrosatelliten ausgewählt, die in Single-PCRs separat ausgetestet wurden. 4 speziell ausgewählte Mikrosatelliten-PCRs wurden anschließend zu einer Multiplex-PCR zusammengelegt. Folgende Charakteristika waren für die Auswahl der Mikrosatelliten-PCRs ausschlaggebend:

(i) PIC-Wert (*Polymorphismus Information Content*): Der PIC-Wert ist ein Maß für den Polymorphiegrad und hat Aussagekraft zur Differenzierung zwischen Populationen und Individuen (BOTSTEIN et al. 1980) und wird nach folgender Formel berechnet:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

wobei  $PIC_i$  der Polymorphic Information Content von Marker  $i$  ist und  $P_{ij}$  die Häufigkeit des Allels  $j$  des Marker  $i$  über die gesamte Probenzahl.

(ii) Erwartete Produktgrößen (der Mikrosatelliten): Im Hinblick auf das Multiplexen ist es von Vorteil, wenn die einzelnen Mikrosatelliten der Single-Reaktionen genügend große Unterschiede in der Produktgröße haben, damit sie im Zuge der elektrophoretischen Auftrennung deutlich abgegrenzte Bereiche darstellen und einander nicht überlappen und dadurch die Auswertung beeinträchtigen.

(iii) Annealing-Temperatur der Single-Reaktionen: Auch im Hinblick auf das anschlie-

bende Multiplexen ist es von Vorteil, wenn die Annealing-Temperaturen in einem ähnlichen Bereich liegen

(iv) Verteilung der Mikrosatelliten im Genom

(v) Interaktionen beim Multiplexen: Da beim Multiplexen mehrere Reaktionen nebeneinander stattfinden, kann es vorkommen, dass diese Reaktionen einander beeinflussen. Sie können einander beeinträchtigen bzw. gänzlich stören, sodass eine Single-Reaktion gar nicht stattfindet, oder die Produktgrößen nicht den Erwartungen entsprechen.

Im Hinblick auf das Elektrophorese-Detektionssystem wird bei der PCR neben dem Forward- und Reverse-Primer ein zusätzlicher M13-Primer, welcher mit einem speziellen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, integriert. Dieser Farbstoff fluoresziert bei genau der Wellenlänge, mit der das Elektrophoresesystem die aufgetrennten Amplifikate detektiert. Als M13 bezeichnet man eine Sequenz eines Phagen, die hier als Träger des Fluoreszenzfarbstoffes dient. Im Zuge der PCR wird der markierte M13-Primer während der Zyklen in die Produkte eingearbeitet. Die Markierung hat den Vorteil, dass die Proben vor der elektrophoretischen Auftrennung nicht vorbehandelt oder vorgereinigt werden müssen.

### Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die mit Gel-Ladepuffer versehenen Proben sowie ein Größenstandard werden auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt online mittels Laser. Die Laser-Wellenlänge entspricht jener des bei der PCR verwendeten Farbstoffes, somit werden nur markierte Produkte erfasst. Die Detektion erfolgt online mittels Laserscan, so entsteht ein Elektropherogramm anhand dessen die Auswertung vorgenommen werden kann. Aufgrund der Quadruplex-Reaktion werden 4 Bereiche erwartet in denen Banden zu sehen sind (*Abbildung 1*).

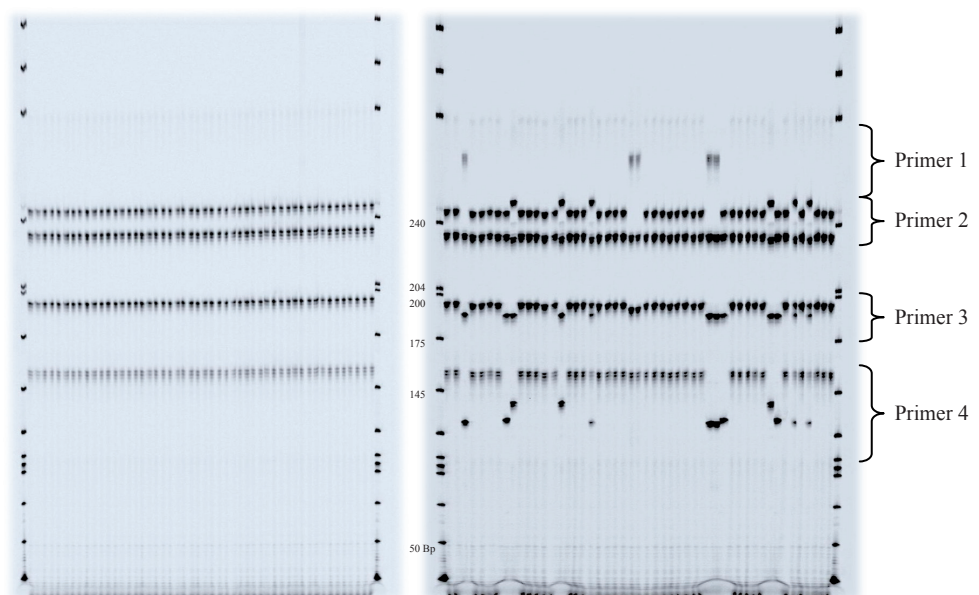


Abbildung 1: Elektrophorese von Körnern der Sorte Breunskylyie (links) sowie von einer 50 Korn Probe (rechts)

Figure 1: Electrophoresis of 50 kernels of barley variety Breunskylyie (left) and a 50 kernels sample of different varieties (right)

## Ergebnisse

In *Abbildung 1* ist das Elektropherogramm der Sorte Breunskylije sowie einer 50-Korn Probe zu sehen. Die Fingerprints von Breunskylije sind untereinander identisch, die 50 Proben entsprechen derselben Sorte während es sich bei der 50-Korn Probe offensichtlich um ein Gemisch von mehreren Sorten handelt.

## Zusammenfassung

Diese Methode, basierend auf DNA-Mikrosatelliten, dient zur Unterscheidung diverser Gerstensorten.

Sie kann als molekularbiologische Alternativmethode zur in der TG/19/10 (UPOV 1994) vorgeschlagenen SDS-PAGE betrachtet werden. Sollte ein Unterschied innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums (Tage) notwendig sein, kann diese Methode angewendet werden. In Anbetracht der relativ kurzen Analysendauer - im Gegensatz zur Beobachtung der morphologischen Eigenschaften der Gerstenpflanze im Zuge des Anbaus bzw. der Prüfung der physiologischen Eigenschaften im Zuge des Wachstums - erhält man mit dieser DNA-basierenden Methode ein zufriedenstellendes Ergebnis innerhalb von wenigen Tagen. Weitere Anwendungen können sich auch im Zuge von Sortenreinheitsprüfungen ergeben oder auch bei Verwechslungen von bekannten Saatgutchargen, wobei die betreffenden Sorten wieder dem Saatgut zugeordnet können werden.

## Literatur

AKKAYAMA S, BHAGWAT AA, CREGAN PB, 1992: Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.

BELL CJ, ECKER JR, 1994: Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19: 137-144.

BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW, 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.

HAMADA H, PETRINO MG, KAKUNAGAT, 1982: A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukariotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6465-6469.

LIN Y, LIAO M, YANG G, YU W, GUAN H, FAN W, DONG J, 2007: Identification of barley Varieties used in beer production by microsatellite DNA markers. *J Am Soc Brew Chem* 65: 47-51.

LITT M, LUTY JA, 1989: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397-401.

PLASCHKE J, GANAL MW, RÖDER MS, 1995: Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91: 1001-1007.

SREENIVASULU N, GRANER A, WOBUS U, 2008: Barley genomics: an overview. *Int J Plant Genomics* 2008: 486258 (DOI 10.1155/2008/486258).

STRUSS D, PLIESKE J, 1998: The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet* 97: 308-315.

UPOV, 1994: Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability: Barley (*Hordeum vulgare* L. *sensu lato*). Test guideline TG/19/10. International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva, Switzerland.

WU KS, TANKSLEY SD, 1993: Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241: 225-235.