

## Verbesserung der Vergleichbarkeit verschiedener Labore

# Charakterisierung von Sorten und Klonen der Pappel

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

*Die morphologische Unterscheidung von Sorten und Klonen in der Gattung Populus ist aufgrund ihrer ausgeprägten phänotypischen Plastizität schwierig [1]. Voraussetzung für die Züchtung neuer Sorten ist immer die Evaluierung bestehender Klonsammlungen. Wichtig ist dabei, die aufgrund ihrer Langlebigkeit in Klonsammlungen Jahrzehnte überdauernden Bäume jederzeit einer bestimmten Sorte zuweisen zu können. Große Hoffnung wurde hier in den genetischen Fingerabdruck gesetzt. Allerdings sind in verschiedenen Laboren erstellte Fingerabdrücke nicht direkt vergleichbar. Im vorliegenden Beitrag wird eine Methode vorgestellt, die einen solchen Vergleich ermöglicht.*

Genetische Fingerabdrücke werden üblicherweise mit Mikrosatelliten auf Kapillar- oder Plattensequenzierern erstellt. Die Größenbestimmung der Mikrosatelliten wird durch interne Größenstandards vorgenommen. Technische Unterschiede zwischen Sequenzierern unterschiedlicher Bauweise und Hersteller sowie unterschiedliche Farbmarkierung der Mikrosatelliten bewirken unterschiedliches Laufverhalten von Fragmenten in der Elektrophoresematrix. Dies hat zur Folge, dass die Länge identischer Fragmente auf verschiedenen Geräten unterschiedlich erscheint [2, 3]. Darüber hinaus bewirken Unterschiede zwischen einzelnen Läufen auf demselben Gerät Schwankungen in der Größenbestimmung der Fragmente [4]. Aus diesen

Gründen ist die Vergleichbarkeit der ermittelten Genotypen zwischen Laboren limitiert. Um aber Sorten und Klonlinien eindeutig identifizierbar zu machen, ist es von entscheidender Bedeutung, über standardisierte genetische Fingerabdrücke zu verfügen und diese zwischen Laboren und über alle eingesetzte Technik hinweg vergleichbar zu halten.

### Software und molekulare Methoden

Im Rahmen eines Ringversuches wurde untersucht, inwieweit die Ergebnisse verschiedener Labore mithilfe softwaregestützter Methoden verglichen werden können. Hierzu wurde die Software „Allelogram“ [4] 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. Als Standardprobe wird eine Probe verwendet, die bei allen Analysen („Läufe“) jeweils einmal mitanalysiert wird. Diese Probe muss bei allen Läufen identisch sein. Die Abweichungen der ermittelten Fragmentlängen dieser Probe zwischen den verschiedenen Läufen können daher verwendet werden, um die Fragmentlängen aller anderen Proben automatisch anzugleichen. Diese Normalisierung ist wichtig, um echte Unter-

schiede (Allele) von technisch bedingten Abweichungen trennen zu können.

Untersucht wurde ein Probensatz von 48 Pflanzen. Dieser bestand aus zehn 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 und 20 [5,6] sowie PMGC 14 und 2163 [7]. Der gesamte Probensatz wurde an der Universität Marburg in zwei separaten PCRs amplifiziert. Jede dieser PCRs wurde zweimal getrennt auf dem dortigen Sequenzierer (kapillarbasiertes Gerät) analysiert. Die PCR-Produkte der ersten PCR wurden zusätzlich auf dem Sequenzierer des vTI in Großhansdorf (ebenfalls kapillarbasiert) untersucht. 40 Proben des Gesamtprobensatzes wurden in der NW-FVA in Hann. Münden in einer dritten PCR amplifiziert und auf dem dortigen Sequenzierer analysiert (plattenbasiertes Gerät).

Dieses Vorgehen ermöglichte es, die Ergebnisse verschiedener Labore, Bearbeiter und Geräte direkt miteinander zu vergleichen. Die erhaltenen Genotypen wurden laufweise in das Programm eingelesen (Abb. 1a), nach ihrer Größe sortiert (Abb. 1b) und mithilfe der Standardklone normalisiert (Abb. 1c). Die normalisierten Daten wurden für die Definition von Alle-

Dr. P. Eusemann ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Botanik und Landschaftsökologie der Universität Greifswald. S. Fehrenz ist wissenschaftlicher Mitarbeiter in der forstgenetischen Abteilung der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt. Dr. H. Schröder ist wissenschaftliche Mitarbeiterin am forstgenetischen Institut des Johann Heinrich von Thünen-Instituts.

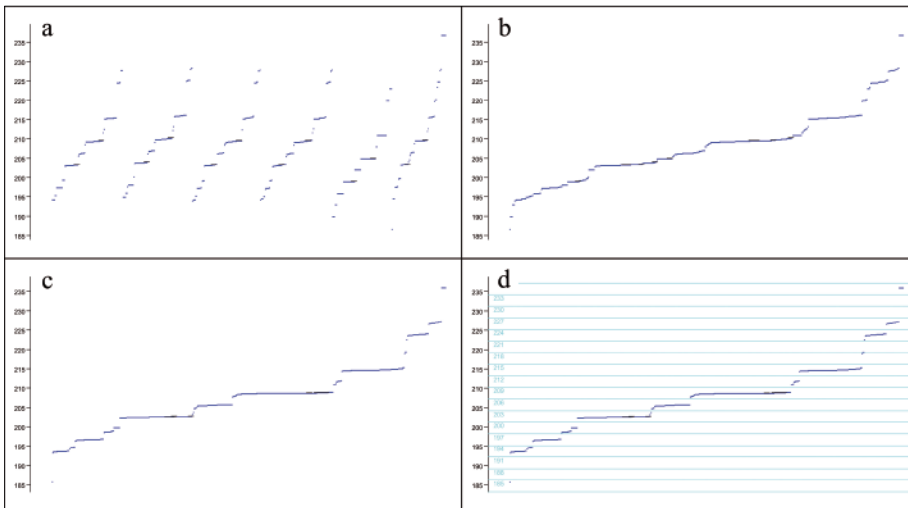
Prof. Dr. B. Ziegenhagen ist Leiterin des Instituts für Naturschutzbiologie der Universität Marburg. Dr. R. Bialozyt ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Naturschutzbiologie der Universität Marburg.



**Pascal Eusemann**  
pascal.eusemann@uni-greifswald.de

**Tab. 1: Fehlerraten beim Vergleich von Genotypen innerhalb desselben und zwischen verschiedenen Laboren bei Verwendung der Binningsoftware „Allelogram“**

	Gesamtanalyse	Labor Uni Marburg
Analysen	6	4
Gezählte Allele	3 058	2 130
Einzelfehler Genotypisierung	94	8
Einzelfehler Binning	35	1
Genotypisierungsfehler	3,07 %	0,37 %
Binningfehler	1,14 %	0,05 %
Gesamtfehler	4,21 %	0,42 %



**Abb. 1:** Vier Schritte im Genotypisierungsprozess mit Allelogramm. Skala: Fragmentlänge in Basenpaaren. (a) Sechs verschiedene Analysen desselben Probensatzes, (b) Sortierung des Datensatzes nach Fragmentlänge vor Normalisierung, (c) normalisierter Datensatz, (d) angepasste Allelklassen nach Normalisierung (hellblau)

Allelklassen verwendet und anschließend jedes Fragment einer Allelklasse zugeordnet („Binning“, Abb. 1d).

## Genotypisierung und Binning

Beim Vergleich der resultierenden Genotypen wurde zwischen Genotypisierungs- und Binningfehlern unterschieden. Als Genotypisierungsfehler wurde gewertet, wenn eine Probe in zwei Läufen 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 wur-

den 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 (Tab. 1). Mit den ermittelten Werten liegt die Fehlerrate für Analysen mehrerer Labore im Bereich anderer Studien [8,9]. Innerhalb desselben Labors liegt der Fehler weit unterhalb der üblicherweise bestimmten Fehlerraten.

## Folgerungen

Für die Vergleichbarkeit von Genotypen, die in verschiedenen Laboren und auf unterschiedlichen Geräten produziert

wurden, ist eine Software mit Normalisierungsfunktion von grundlegender Bedeutung. Ohne Normalisierung ist eine klare Einteilung der Fragmente in Bins, insbesondere bei Genotypen unterschiedlicher Herkunft und Mikrosatelliten mit kurzen Wiederholungsmotiven schwierig bis unmöglich (Abb. 1b).

Es konnte gezeigt werden, dass die Software „Allelogramm“ in der Lage ist, Daten unterschiedlicher Herkunft konsistent zu kategorisieren und dabei den Fehler in akzeptablen Grenzen zu halten. Damit kann sie für die Verwendung in Verbundprojekten uneingeschränkt empfohlen werden. 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.

## **i** Die Software Allelogramm

kann kostenlos heruntergeladen werden unter <http://code.google.com/p/allelogram/>.

## Literaturhinweise:

- [1] RATHMACHER, G.; NIGGEMANN, M.; WYPUKOL, H.; GEBHARDT, K.; ZIEGENHAGEN, B.; BIALOZYT, R. (2009): Allelic ladders and reference genotypes for rigorous standardization of poplar microsatellite data. *Trees* 23: 673-683. [2] AMOS, W.; HOFFMAN, J.; FRODSHAM, A.; ZHANG, L.; BEST, S.; HILL, A. V. S. (2007): Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* 7: 10-14. [3] VALK, H. A. de; MEIS, J. F. G. M.; KLAASSEN, C. H. W. (2007): Microsatellite based typing of *Aspergillus fumigatus*: Strengths, pitfalls and solutions. *Journal of Microbiological Methods* 69: 268-272. [4] MORIN, P. A.; MANASTER, C.; MESNICK, S. L.; HOLLAND, R. (2009): Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with ALLELOGRAM. *Molecular Ecology Resources* 9: 1451-1455. [5] SCHOOT, J. VAN DER; POSPIŠKOVÁ, M.; VOSMAN, B.; SMULDERS M. J. M. (2000): Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra*). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 317-322. [6] SMULDERS, M. J. M.; SCHOOT, J. van der; ARENS, P.; VOSMAN, B. (2001): Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra*). *Molecular Ecology Notes* 1: 188-190. [7] The International Populus Genome Consortium SSR Resources: [http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr\\_resource.htm](http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm). [8] BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; BRONKEN-EIDENSEN, P.; POMPANON, F.; BROCHMANN, C.; TABERLET, P. (2004): How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13: 3261-3273. [9] HOFFMAN, J. I.; AMOS, W. (2005): Microsatellite genotyping errors: detection approaches; common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* 14: 599-612.