

Slutrapport

Titel

DNA-markører til forældredvalg

Projektansvarlig og deltagere

Projektansvarlig:

Hanne Grethe Kirk, Landbrugets Kartoffelfond (LKF), Grindstedvej 55, DK-7184 Vandel, tlf. +45 7588 5533, fax +45 7588 5615, hgk@lkfvandel.dk.

Projektdeltager:

Kirsten Kørup Sørensen, Aarhus Universitet, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, DJF, Jordbrugsproduktion og Miljø (JPM), Postboks 50, DK-8830 Tjele, tlf. +45 8999 1737, KirstenK.Sorensen@agrsci.dk

Resumé

Formålet med projektet var at etablere et redskab til at bedømme, hvor nært beslægtede potentielle krydsningsforældre er indenfor de enkelte sortstyper, og dermed undgå indavl. En vigtig del af projektet var en kompetenceopbygning hos LKF i form af indlæring af teknikkerne omkring DNA-oprensning samt håndtering og kørsel af mikrosatellit markører, der gør det muligt fremover at anvende disse i forædlingsarbejdet.

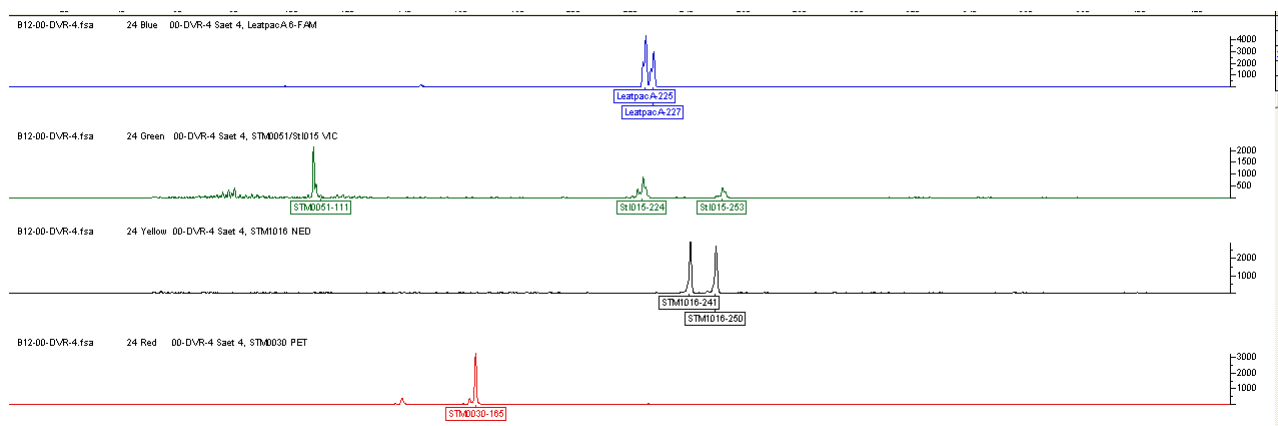
Allerede ved projektets start i 2002 var det klart, at den type DNA-markører, der egnede sig bedst til fremtidigt rutinearbejde, var mikrosatellitterne, også kaldet SSR (simple sequence repeats). På det tidspunkt var der imidlertid ikke fundet tilstrækkeligt af denne type markører i kartofler, så det var nødvendigt at starte med en anden type kaldet AFLP (amplified fragment length polymorphism) for hurtigt at få de første data til slægtskabsberegningerne. AFLP kræver faciliteter til arbejde med radioaktive stoffer og kunne kun udføres ved DJF, Foulum. AFLP-arbejdet strakte sig over perioden 2002-2005 og 116 sorter blev målt.

I 2003 bevilgede KAF et beløb til indkøb af en brugt DNA-sekvenator, der muliggjorde automatisering af mikrosatellit-analyser. Mikrosatellitter består af et antal korte, gentagne sekvenser af DNA. Når cellerne deler sig, kopieres DNA, så der kommer et helt sæt kromosomer i hver celle. Under kopieringen, der foregår ved hjælp af enzymer, sker der i meget sjældne tilfælde en fejl, så originalen og den ufærdige kopi skilles ad for tidligt. DNA er imidlertid "klæbrigt", og da de to strenge passer sammen som nøgle og lås, samles de næsten altid korrekt igen. Hvis kopieringen er kommet til en mikrosatellit, hvor der er flere identiske "låse", kan samlingen gå skævt, så der kommer en eller flere gentagelser for meget eller for lidt i kopien. Alle efterfølgende kopier af denne mikrosatellit vil have den nye længde, så afkommet af den sort, hvor denne fejl er sket, vil skille sig ud fra andre sorter. Det er langt fra alle mikrosatellitter, der findes i forskellige længder (er polymorfe), men fejlen sker tit nok til at man med et tilstrækkeligt stort antal mikrosatellitter kan skille alle sorter fra hinanden. Kartofler har fire sæt kromosomer, så den enkelte sort kan have op til fire størrelser i hver mikrosatellit stammende fra fire fejlkopieringer tilbage i sortens stamtræ. At mikrosatellitter har forskellig længde udnyttes i DNA-sekvenatoren, der ved hjælp af elektrisk spænding kan få DNA-stykkerne til at vandre i en gel - de korteste vandrer hurtigst. Inden kørselen på sekvenatoren bliver stykkerne opformeret i en PCR-maskine, der efterligner den kopiering, der sker i cellen, og forsynet med en fluorescerende farve. Når de passerer en laserstråle, lyser de op, og

passagen registreres af maskinen. Maskinen kan skelne mellem fem farver, hvoraf den ene bruges som standard, så fire forskellige mikrosatellitter kan køres på en gang (Figur 1).

DNA-sekvenatoren blev i første omgang anbragt på DJF, Foulum. Der blev i perioden 2003-2006 afprøvet og optimeret på et stort antal mikrosatellitter, som dels var designet på Ålborg Universitet, men ikke afprøvet i praksis, dels var angivet i litteraturen. Når der er fundet nogle mikrosatellitter, der virker og er polymorfe, skal de samles i sæt, hvor størrelserne ikke overlapper for meget, og som helst skal kunne opformerer og farvemærkes sammen, da det sparer både tid og dyre kemikalier.

Ved overflytningen til LKF i foråret 2006 var der udvalgt og optimeret 52 mikrosatellitter, der kunne køres som 13 sæt á 4 på DNA-sekvenatoren.



Figur 1. Eksempel på toppe i fire farver målt på DNA-sekvenator. De grønne toppe tilhører to forskellige mikrosatellitter.

Efter overførsel til LKF er der sket en yderligere tilpasning af mikrosatellit-sættene, da nogle viste sig at være mindre velegnede til rutinekørsel. Tre mikrosatellitter er udgået og seks nye kommet til. De sidste tre er sat ind i allerede eksisterende sæt, hvor forskellen i størrelse er stor nok til at der kan skelnes mellem f. eks to grønne mikrosatellitter som i Figur 1, hvilket er en meget billig måde at øge antallet af markører på.

I projektets løb er der oprenset DNA fra 1700 sorter, hvoraf 330 sorter i 2006/2007 er karakteriseret med mikrosatellitter. Der er beregnet slægtskab mellem sorterne, der supplerer de afstamningsdata, vi i øvrigt har (Figur 2).

I Figur 2 ses det beregnede slægtskab i en potentiel krydsning mellem Royal og sorten LRC V0416-7, der er af canadisk oprindelse, og som det ikke er lykkedes at finde afstamningen på. Den beregnede indavlskoefficient er 0, da ingen forældre går igen på begge sider. Fingerprintingen, der er beregnet ud fra mikrosatellit-data, giver et tal mellem 0 og 1, hvor en selvbestøvning giver 1. En fingerprintingværdi på 0,382 er ret lav og viser, at denne krydsning kan laves uden risiko for indavl. En yderligere detalje, der er et direkte resultat af et andet projekt om glycoalkaloider i kartofler, er den nederste rubrik. Heri angives, om de mikrosatellitter, der flankerer et gen, der bestemmer glycoalkaloidindholdet i knoldene, indicerer et højt eller lavt indhold. For LRC-sortens vedkommende får vi indikation på et lavt indhold. Royal har ikke den specifikke markørkombination, så der kan ikke siges noget om den.

Skriv sort 1 og 2 eller vælg fra listen

Sor 1: Sor 2:

Female parent		?	?
?		?	
?		?	
?		?	
?		?	
?		?	
LRC V0416-7		?	
?		?	
?		?	
?		?	
?		?	
Male parent		?	

Female parent		?	?
Pruceres		?	
84N37-2	VTN 62-39-6	Dummy 313	
		Dummy 314	
	Siquinchilla	?	
D 47/11		?	
	?	?	
Royal		?	
	Sagitta	Schwalbe	
N85-BAX-10		DUMMY 9	
	N77-ALB-10	70-AEÆ-8	
92-BUY-1		N71-ØY-31	
	N80-AQF-18	Jacova	
N86-BCC-13		S. vernei 1642/2	
	N81-ARY-67	N69-YE-1	
Male parent		N77-ALB-10	

Indavlskvotient (beregnet):

Fingerprint:

Genmarkør:

Figur 2. Beregning af slægtskab i en potentiel krydsning.

Markøren for glycoalkaloidindhold er det første eksempel på, at de markører, der benyttes til slægtskabsberegning, samtidig kan sige noget om specifikke egenskaber. Det forventes, at der i fremtiden vil identificeres mange flere af disse markører.

Projektets faglige forløb

Projektet er foregået i tæt samarbejde mellem DJF og LKF. En oversigt over projektføreløbet fremgår af Tabel 1.

Tabel 1. Oversigt over projektføreløbet

År	DJF	LKF
2002	AFLP-kørsel og manuel scoring af geler.	DNA-oprensning. Udvælgelse af metode samt oprensning af 150 sorter. Opbygning af databasesystem.
2003	AFLP-kørsel og manuel scoring af geler. Start på indkøring af DNA-sekvenator. Marianne Madsen erstattet af Kirsten Kørup som projektleder hos DJF.	DNA-oprensning med ny og bedre metode. Afprøvning af programmet NTSYS til slægtskabsanalyse.
2004	AFLP-kørsel med både traditionelle metoder og på DNA-sekvenator. Start på kørsel af SSR på sekvenator. Test af SSR fra Ålborg Universitet.	DNA-oprensning og manuel scoring af AFLP-geler.
2005	Test af SSR fundet gennem litteraturen samt fra Ålborg Universitet. Optimering af kørsel af SSR på sekvenator. Kursus i brug af sekvenator for LKF-personale ved DJF, Foulum.	DNA- oprensning. Beregning af slægtskab ud fra AFLP data på 116 sorter. Kursus på Foulum.
2006	Optimering af SSR kørsel på sekvenator før flytning til Vandel. Assistance i forbindelse med flytningen og opstarten i Vandel. Kromosomlokalisering af nye SSR fra Ålborg Universitet og STPRINSPG (en SSR fra litteraturen)..	DNA-oprensning. Indkøring af sekvenator på Vandel og måling af SSR. Slægtskabsanalyser.
2007	Sekventering af seks SSR fra Ålborg Universitet. Præsentation af resultater ved Plant Biotech Denmark møde i København.	DNA-oprensning. Måling af SSR på sekvenator. Slægtskabsanalyser. Præsentation af resultater ved Plant Biotech Denmark møde i København.

DNA-oprensning.

Der er oprenset DNA fra både in vitro planter, drivhusplanter og planter fra marken.

Plantematerialet blev til og med 2005 lynfrosset i flydende kvælstof i reagensglas med teflonkugler og knust på rysteapparat (Vortex). Fra 2006 lejedes en svingmølle (Retsch, Mixer mill 301), der knuste plantematerialet meget hurtigere og overflødiggjorde den flydende kvælstof.

Der er i projektet afprøvet flere metoder til oprensning af DNA. I 2002 blev en metode med chloroform/isoamylalkohol og isopropanol tilpasset, dels fra DJF, dels fra Sejet forædlingsstation. Metoden gav et højt udbytte af DNA. Indledende afprøvninger på Foulum viste, at kvaliteten var god nok, og alle oprensningerne i 2002 blev derfor foretaget med denne metode. Efterfølgende viste det sig, at alt for mange analyser ikke virkede, så vi besluttede at finde en bedre metode i 2003.

Der er udviklet mange færdige kits til oprensning af forskellige typer DNA. Et af dem, Nucleospin, blev testet i februar/marts 2003. Det gav DNA af høj kvalitet, men i så små mængder, at metoden blev opgivet. Dernæst prøvedes kittet Genelute, der gav høj-kvalitetsDNA i rimelige mængder. Dette kit er vi fortsat med siden.

AFLP

Markører af typen AFLP blev brugt i begyndelsen af projektet. Ved AFLP skæres kartoflernes DNA i mange små stykker vha. såkaldte restriktionsenzymmer. Disse stykker mærkes med et

radioaktivt stof, mangfoldiggøres og køres på en gel. De forskellige bånd kan ses på et billede af gelen. En enkelt kombination kan give mere end 40 forskellige bånd og AFLP har derfor en høj informations værdi. Til dette projekt blev restriktionsenzymene *EcoRI* (E), *MseI* (M) og *HindIII* (H) afprøvet med i alt 19 kombinationer (Tabel 2), og EB, EC samt EH blev brugt til markøranalyser. I Tabel 2 er primerne angivet med enzymforkortelsen samt yderligere tre bogstaver, der står for DNA-baser. Restriktionsenzymene laver så mange stykker, at hvis de alle opformeres vil man på gelen ikke se en række bånd, men en udtværet skygge. For at reducere antallet af bånd opformeres kun de stykker, der starter med de tre angivne baser.

Tabel 2. Afprøvede primerkombinationer til AFLP. Forkortelser: *EcoRI* (E), *MseI* (M) og *HindIII* (H)

Markør	Pri1navn	Pri2navn
EA	E-AAC	M-CAC
EB	E-AAC	M-CAG
EC	E-ACA	M-CAC
ED	E-ACA	M-CAG
EF	E-ACT	M-CAC
EG	E-ACT	M-CAG
EH	E-AGA	M-CAG
EI	E-ATG	M-CAG
EJ	E-ATG	M-CTA
EK	E-ATG	M-CAC
HA	H-AAC	M-CAC
HB	H-AAC	M-CTA
HC	H-ACT	M-CAC
HD	H-ACT	M-CAG
HE	H-ACT	M-CTA
HF	H-ATG	M-CAC
HH	H-ATG	M-CAG
HJ	H-ACA	M-CAG
HK	H-ATC	M-CAC

Mikrosatellitter (SSR)

Der benyttes 55 SSR fordelt på alle 12 kromosomer (Tabel 3)

Tabel 3. Fordeling af de anvendte SSR mellem kartofflens 12 kromosomer. De, der er markeret med rødt, flankerer et gen for glycoalkaloidindhold på kromosom 1.

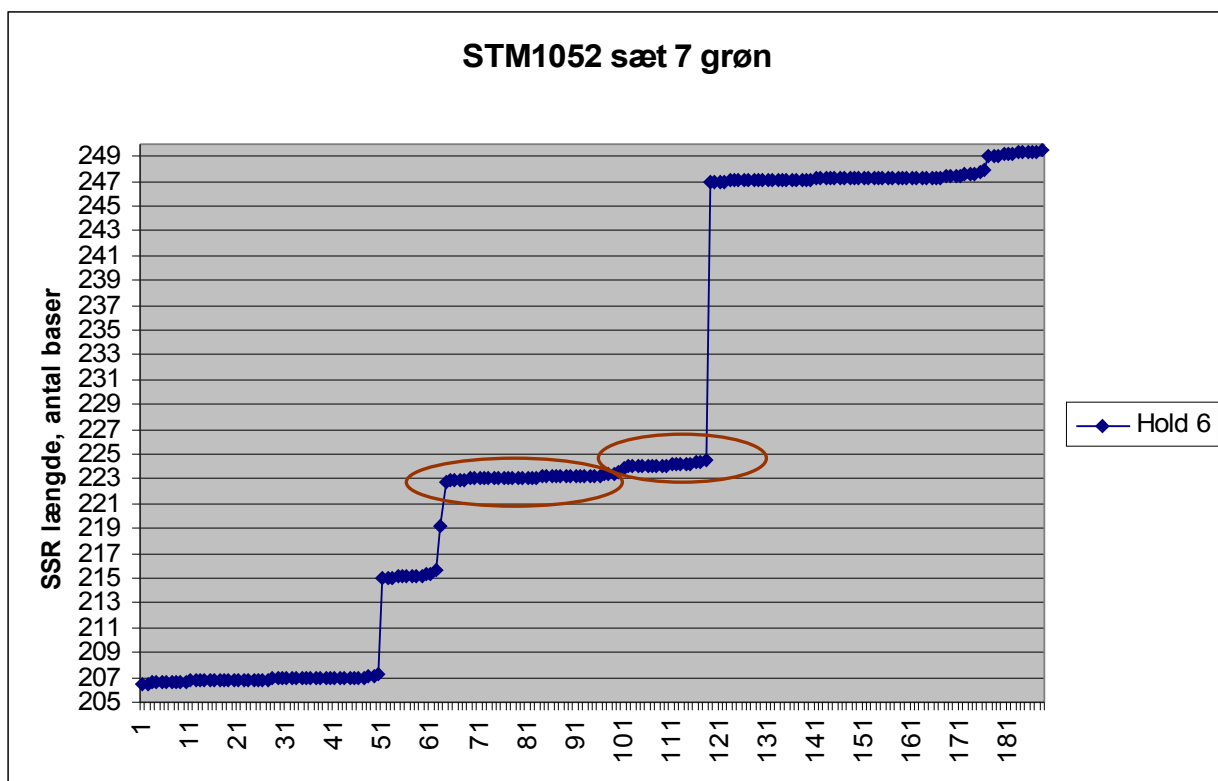
SSR	Kromosom
STM0019b	?
STM2020	I
LeatpacA	I
STM2030	I
STM5136(pt)	I
STM5127	I
STM1049	I
STM1102	I, IX
STM2022	II
STM3001	II
STM0038	II
Sti013	III

SSR	Kromosom
Sti015	VI
Sti016	VI
Sti004	VI
STM0019a	VI
STM0028	VII
STM0052	VII
STM3009	VII
STM0031	VII
TC84379	VII
STM1005/STMFVAX	VIII
STM1024	VIII
STM1016	VIII

STM1054	III
STM1058	III
TC85064	III
STM3016	IV
STM5140	IV
STM3023	IV + ?
STM1051	IX
STM3012	IX
STM1052	IX
STM1017/STGLGPB	IX
STM1031	V
TC75529	V
STPoAc58	V
STPRINPSG	V
STM5148(pt)	V

STWAX-2	VIII
STM1104	VIII
TC77529	VIII
STM1106	X
STM0051	X
TC74728	X
STSNRNA10	X?
STM2005	XI
TC84781	XI
STM5130	XI
STM0025	XI
STM0037	XI
STM2028	XII
STM0030	XII
STM0003	XII
Sti051	XII

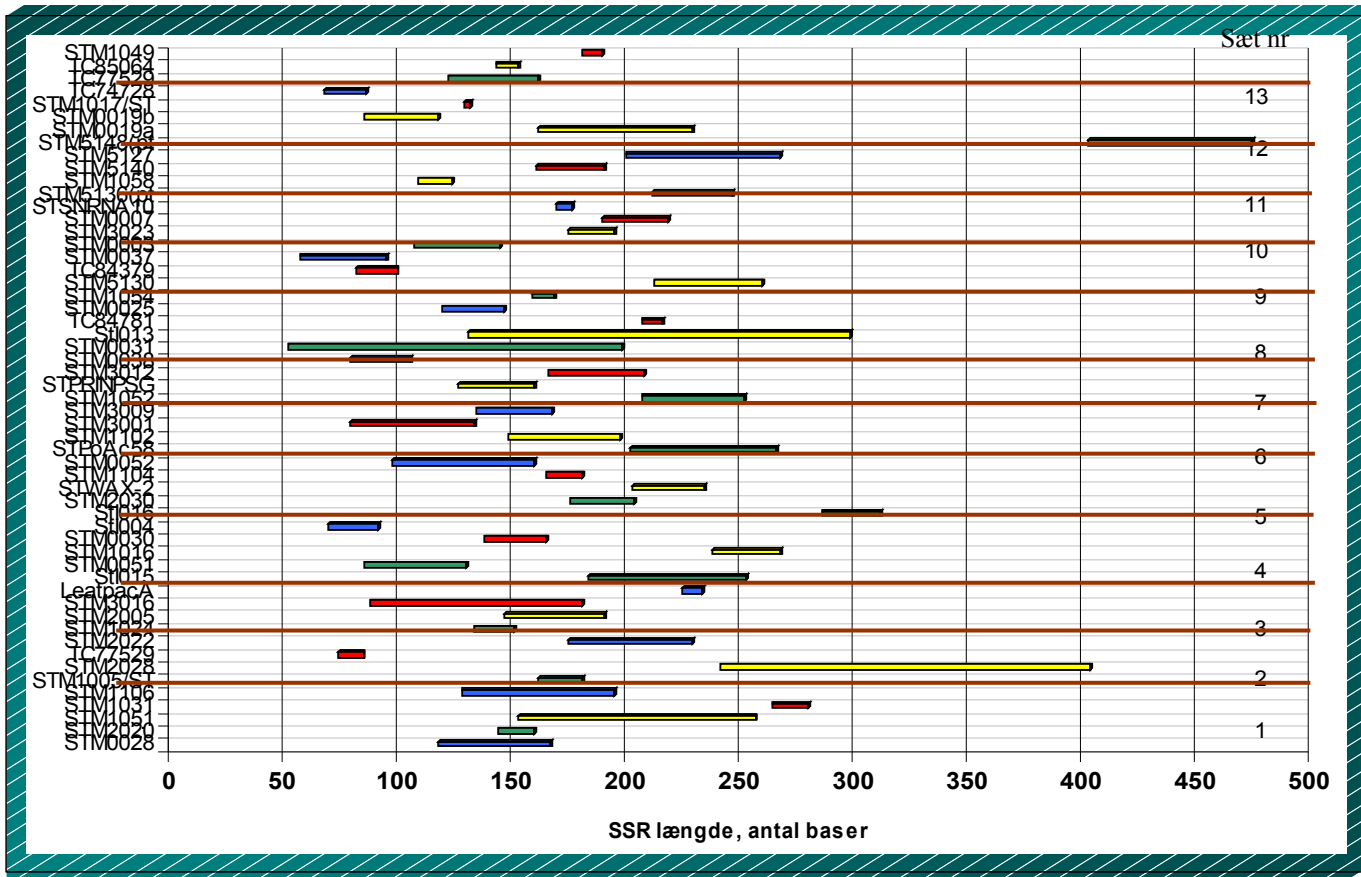
Principielt er forskellene i længderne af en bestemt SSR lig med minimum en repetition, men i praksis kan der være andre variationskilder som f.eks. tab af enkeltbaser. I Figur 3 ses en SSR med dels store spring i længde svarende til hele repetitioner, dels med et dobbeltbånd, der svarer til en forskel på en base (indrammet). Disse variationer er lige så gode markører som de hele spring og registreres så vidt det er muligt at skelne dem.



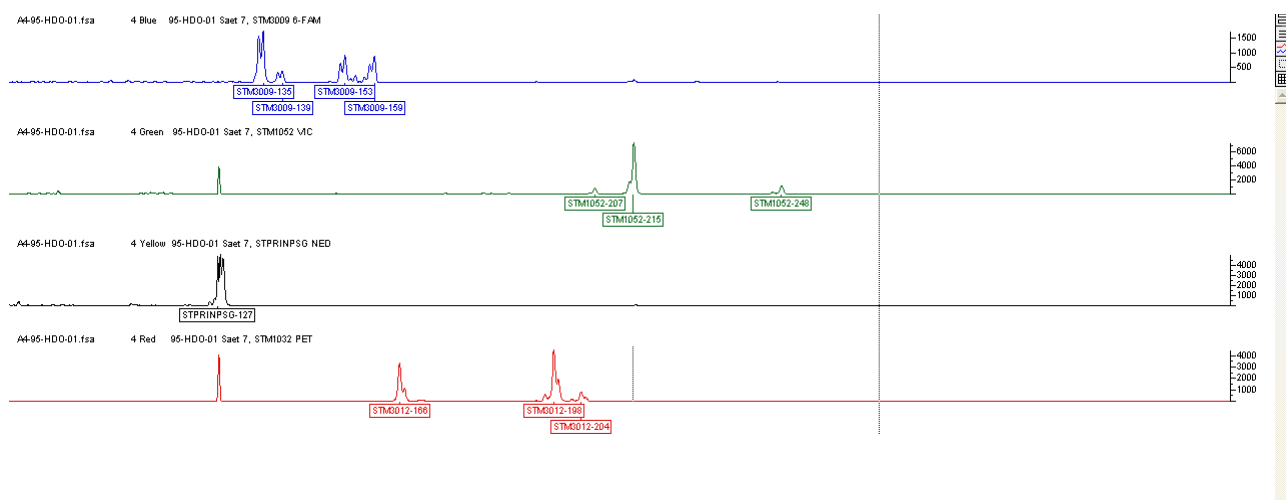
Figur 3. Eksempel på SSR med to meget tætliggende bånd (indrammet), der er svære at skille

Før måling sker en opformering ved hjælp af PCR, hvor en fluorescensfarve sættes på. De enkelte SSR samles i sæt, der så vidt muligt kan opformeres sammen i PCR, og som ikke overlapper for

meget (Figur 4). Hvorfor henvises der til Figur 5 før Figur 4? De fluorescerende farver overlapper i bølgelængde, så f.eks. en meget kraftig rød farve også vil ses som en gul top. Man kan delvis, men ikke helt, undgå problemet ved at definere den relative intensitet af de forskellige farver i de fire målepunkter. De gennemblødningstoppe, der ikke fjernes af maskinen, må derefter vurderes manuelt (Figur 5).



Figur 4. Størrelser af de anvendte SSR. I hvert sæt er der minimum en SSR af hver af de fire farver.



Figur 5. SSR toppe. Den gule top (tegnet med sort for at kunne ses) er meget kraftig og bløder igennem i både den grønne og den røde farve.

Slægtskabsberegning

Til at beregne, hvor tæt beslægtede sorterne er, benyttes programmet NTSYS. Det er et specielt statistikprogram, der sammenligner hver sort med hver af de andre og beregner, hvor ens, de er. Disse beregninger placeres i en tabel, hvorfra fingerprintoplysninger hentes til krydsningsplanlægning (Figur 2). Ud fra tabellen kan programmet tegne et familietræ, der grupperer sorterne efter, hvor ens deres DNA er (Figur 6). Træet læses fra venstre mod højre. Jo mere forskellige to sorter er, jo længere mod venstre ligger forgreningspunktet. Familietræet anvendes til at få overblik over de mulige krydsningspartnere og udpege interessante sorter med en anderledes genetisk baggrund.

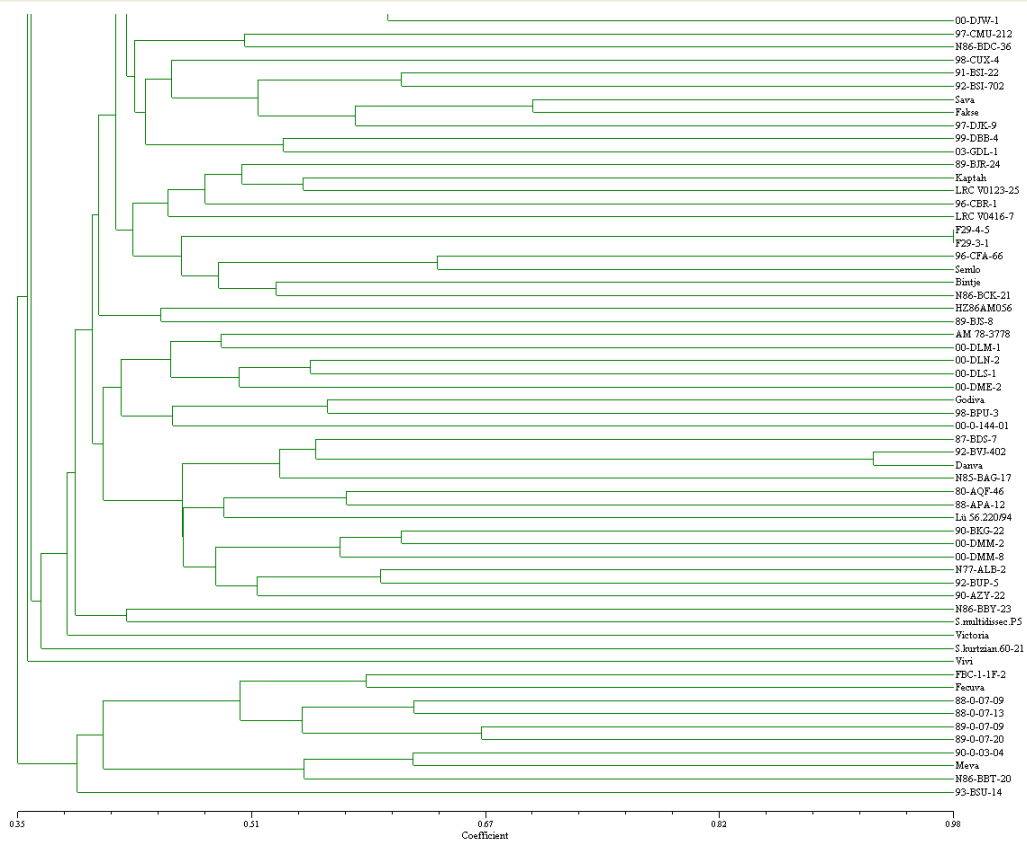
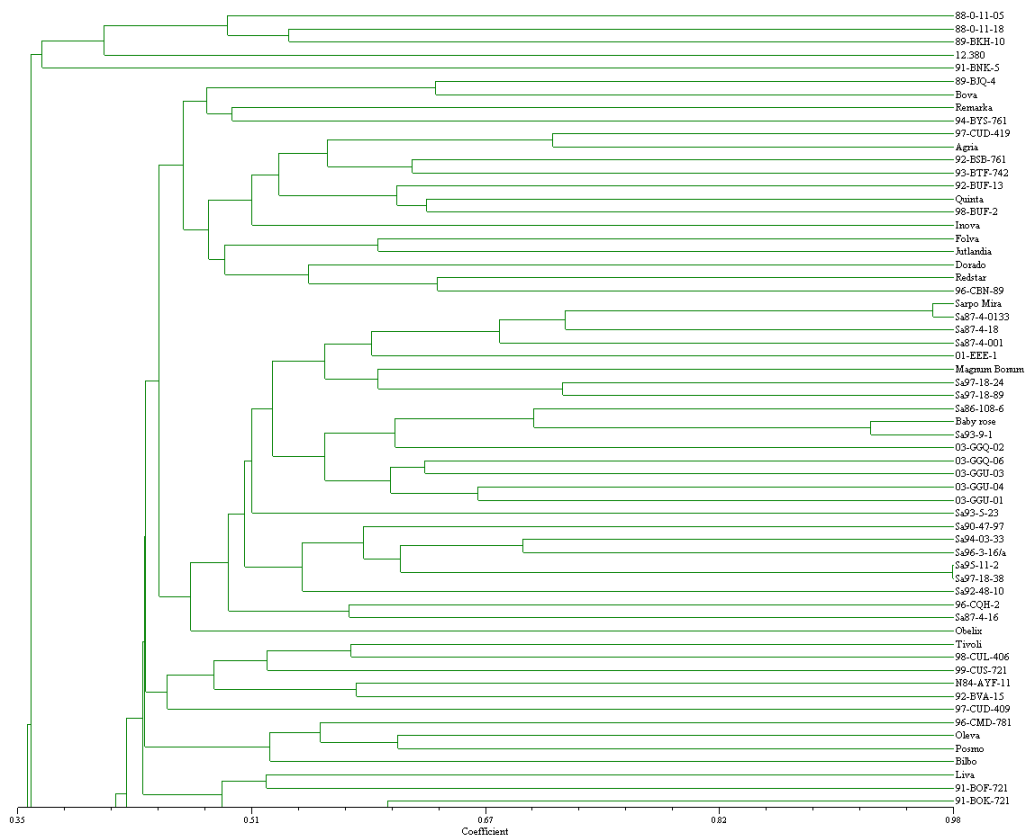
Kromosomlokalisering

En af fordelene ved SSR frem for AFLP er, at de er anvendelige som ankermarkører til identifikation af koblingsgrupper, dvs. at SSR, der i andre studier er kortlagt på bestemte kromosomer, også med meget stor sandsynlighed er placeret på samme kromosom i de aktuelle kloner. Nye designede SSR-markører vil kunne lokaliseres ud fra disse ankermarkører vha. koblingsstudier. En sådan kortlægning af markører til kromosomer kræver at markørerne bliver testet i en familie, dvs. forældre og et passende antal (150-200) afkom. Til dette formål var HCDHDN familien, som blev anvendt i et projekt vedr. glycoalkaloider, til rådighed. Først blev der gennemført laboratorieanalyser af alle markører og kloner. Derefter blev klonerne vurderet mht. om de havde båndet/båndene fra markørerne eller ej. Kun markører, der er polymorfe er informative.

Disse data blev brugt til kortlægningen som blev udført med computerprogrammet JoinMap. Programmet er baseret på statistiske analyser, som beregner rækkefølgen af og afstanden imellem markørerne. Først udvælger programmet de to markører, som med størst sandsynlighed er tættest koblede, og derefter tilføjes mindre tæt koblede markører. Alle markører som er koblet direkte eller indirekte danner en koblingsgruppe. I kartofler findes 12 forskellige koblingsgrupper svarende til de 12 forskellige kromosomer. Hvilket kromosomnummer nye markører er lokaliseret på, kan defineres ud fra ankermarkørerne. I dette projekt blev de seks markører, der starter med TC samt STPRINPSG kortlagt (Tabel 3).

Sekventering

For at udvide antallet af anvendelige SSR-markører i kartofler blev der udviklet seks markører specifikt til dette projekt, og disse markører blev sekventeret. Ved en sekventering fastlægges rækkefølgen af baser, for at efterprøve om markøren er identisk med den kartoffel sekvens, hvorfra den oprindeligt blev designet. Dette er også nødvendigt for at kende den nøjagtige opbygning af DNA-stykket og størrelsen af markøren. Sekventeringen foregår ved at hver enkelt SSR-markør splejses ind i en bestemt type *Eschericia coli* bakterie, hvorefter det inkorporerede stykke mangfoldiggøres ved opformering af bakterierne i et vækstsustrat. Det interessante DNA-stykke kan skæres ud og analyseres på en sekvenator, hvorved rækkefølgen af baser fastlægges. Sekventeringen af de seks nyudviklede SSR i dette projekt (Figur 7) viste at der var god overensstemmelse mellem den forventede og den aktuelle rækkefølge af baser.



Figur 6. Slægtskabstræ for 122 sorter analyseret med SSR


```

HDN-05      118  ACCTGAAAGAGACTGAGCTGAGACTTGGGTT
S. tuberosum 121 ACCTGAAAGAGACTGAGCTGAGACTTGGGTT
*****

```

Figur 7. Sammenligning af sekvenser for seks udviklede SSR mellem 90-HAG-15 forælderen eller HCDHDN afkom (HDN-02, HDN-05, HDN-45 og HDN-135) og *Solanum tuberosum* (kartoffel). Stjerner indikerer identiske nukleotid enheder. Primer sekvenser er understreget, og den repetetive sekvens er markeret med fed skrift.

Afledt arbejde

På LKF har den opkvalificering, der er sket som følge af projektet, åbnet for en vifte af nye muligheder.

I projektet ”Udvikling af et nyt værktøj til forædling af økologiske kartofler med høj naturlig skimmelresistens vha. DNA-markører” undersøges, om skimmelresistensen i et par af de ungarske sorter fra Sarpo-forædlingsstationen er forbundet med bestemte SSR-kombinationer. Vi ved, at resistensen er knyttet til et R-gen og let brydes. Hvis man vha. markører kan udpege sorter med flere R-gener, vil deres resistens være væsentlig mere holdbar.

I projektet ”Glykoalkaloider i kartofler” er der identificeret to SSR, der flankerer et gen for glykoalkaloidindhold i knolde. Disse SSR indgår i de 55, der bliver kørt på alle sorter, og kan derfor benyttes til at vurdere glykoalkaloidindholdet i nye krydsningspartnere.

Det er planlagt at samkøre SSR-data med en række forskellige egenskaber som tørstof, friteringsfarve, udbytte og resistenser for alle målte sorter for på den måde at prøve at finde brugbare sammenhænge, der kan udnyttes i forædlingen.

Konklusion

Projektet har været en stor succes. LKF’s personale er blevet i stand til selvstændigt at udføre DNA-arbejde og et stort antal sorter er analyseret. Resultaterne indgår i høj grad i krydsningsplanlægningen og som et nødvendigt fundament for videre udnyttelse af DNA-teknikkerne.

Denne overførsel af viden er sket i sidste øjeblik, da der ikke længere arbejdes med kartoffelmarkører ved DJF.

Offentliggørelser vedrørende projektet

Sørensen KK, 2005. DNA-markører - et redskab til kartoffelforædling. *Kartoffelproduktion* 31(5): 4-8

Sørensen KK, HG Kirk, J Emmersen, 2007. Familietræer i kartofler og forædling efter højere udbytte. *Kartoffelproduktion* 33(4): 8-9

Artiklerne fra *Kartoffelproduktion* kan læses på: <http://www.kartoffelproduktion.dk/>

Sørensen KK, HG Kirk, J Emmersen, 2007. Microsatellites used for estimation of relationship between potato breeding clones. I: *Plant Biotech Denmark Annual meeting 2007 January 23-24*, University of Copenhagen. Posters 9: Breeding

Bach, IC, KK Sørensen og HG Kirk, 2005. Kartofflens genetiske puslespil – klassisk forædling og ny teknologi.

http://www.planteforskning.dk/planteforskningdk/artikler/planteforaedling/kartofflens_genetiske_puslespil_klassisk_foraedling_og_ny_teknologi