

Varshney, R.K., Nayak, S.N., May, G.C., Jackson, S.A. 2009: Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. Trends in Biotechnology 27: 522-530.

WSII 45

## **Charakterisierung der intraspezifischen Variabilität bei Petersilie mittels molekularer Marker sowie klassischer und nicht-zielgerichteter Bestimmung flüchtiger Inhaltsstoffe**

Characterization of the intraspecific variability in parsley using molecular markers as well as classical and non-targeted determination of volatile metabolites

H. Budahn<sup>1</sup>, T. Bruchmüller<sup>1</sup>, D. Ulrich<sup>2</sup>, H. Krüger<sup>2</sup>, U. Lohwasser<sup>3</sup> und F. Marthe<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst (ZGO-Q) und <sup>2</sup> Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz (ÖPV) des Julius Kühn-Institutes (JKI) - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, D-06484 Quedlinburg,

<sup>3</sup> Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben, [holger.budahn@jki.bund.de](mailto:holger.budahn@jki.bund.de)

### **Abstract**

The complete assortment of parsley (*Petroselinum crispum*) accessions (200) of the IPK gene bank and 19 genotypes from the JKI were grown in parallel in Gatersleben and in Quedlinburg. They were characterized morphologically as well as for resistance traits, aromatic components, taste, and flavour. All genotypes were characterized with 206 molecular markers. The 1/0 matrix was used for distance analysis showing clear separation into two main groups. All crisped-leafed types were found in the larger subgroup, whereas the smaller one includes all root-types. Leaf-types were dispersed over both subgroups. Separation into the same two subgroups was found after PCA of the holistic analysis of volatile substances. Combining both results the subgroups according molecular analysis and chemotypes were identical with the exception of only 8 genotypes. Good correlation has been found between genetic distances and content of different oil components.

### **Einleitung**

Die Petersilie (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) ist eine Kulturpflanze, die eine sehr lange Anbaugeschichte aufweist. In der Antike wurde sie vor allem als Heilpflanze und zu kultischen Zwecken genutzt. Die harntreibende Wirkung der Petersilie wird auch heute noch in der Naturheilkunde geschätzt. Allerdings steht mittlerweile die Nutzung als Gewürz in der Nahrungsmittelzubereitung klar im Vordergrund. Petersilie hat mit 1700 ha die größte Anbaufläche aller Gewürzpflanzen in Deutschland. Das Weltsortiment Petersilie der Genbank des IPK, Gatersleben wurde erstmalig einer genetischen Distanzanalyse unterzogen. Gleichzeitig wurden die Konzentrationen wichtiger flüchtiger Inhaltsstoffe durch Hydrodestillation bestimmt und die Gesamtheit der flüchtigen Inhaltsstoffe in einem holistischen Ansatz, einer sogenannten nicht-zielgerichteten Analytik erfasst. Diese Ausgangsdaten werden für erste Assoziationsstudien zwischen molekularen Markern und Merkmalen genutzt.

## Material und Methoden

Das Weltsortiment der Bundeszentralen *ex situ*-Genbank des IPK, Gatersleben (200 Akzessionen) und weitere 19 Herkünfte des JKI, Quedlinburg wurden an den Standorten Quedlinburg und Gatersleben angebaut und morphologische sowie Resistenzmerkmale mehrmals in der Vegetationszeit erfasst.

Die DNA-Isolation erfolgte aus Mischproben der Genotypen nach einer leicht variierten Methode von POREBSKI *et al.* (1997). Die RAPD-Analyse folgte entsprechend dem Protokoll von WILLIAMS *et al.* (1990), jedoch wurden die Amplifikationsprodukte auf PAAGE-Gelen (Sequigene GT, BIO-RAD, 38 x 50 cm) aufgetrennt. Die Banden wurden durch Silberfärbung nach BASSAM *et al.* (1991) sichtbar gemacht. Für die Doppel-Primer (dp) RAPD-Technik wurde jeweils ein unmarkierter und ein fluoreszenzmarkierter Decamer-Primer kombiniert und nach Amplifikation mittels RAPD-Protokoll, die Produkte mit dem ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt und detektiert (BUDAHN *et al.* 2008). SRAP-Marker wurden gemäß LI und QUIROS (2001) analysiert. Die Amplifikation der AFLP-Fragmente erfolgte nach dem Protokoll von VOS *et al.* (1995) und deren Auftrennung und Detektion mittels LICOR 4300S. Die erhaltene 1/0-Matrix wurde mit dem Programm PAUP im Neighbor joining-Modus (NEI und LI 1979) verrechnet.

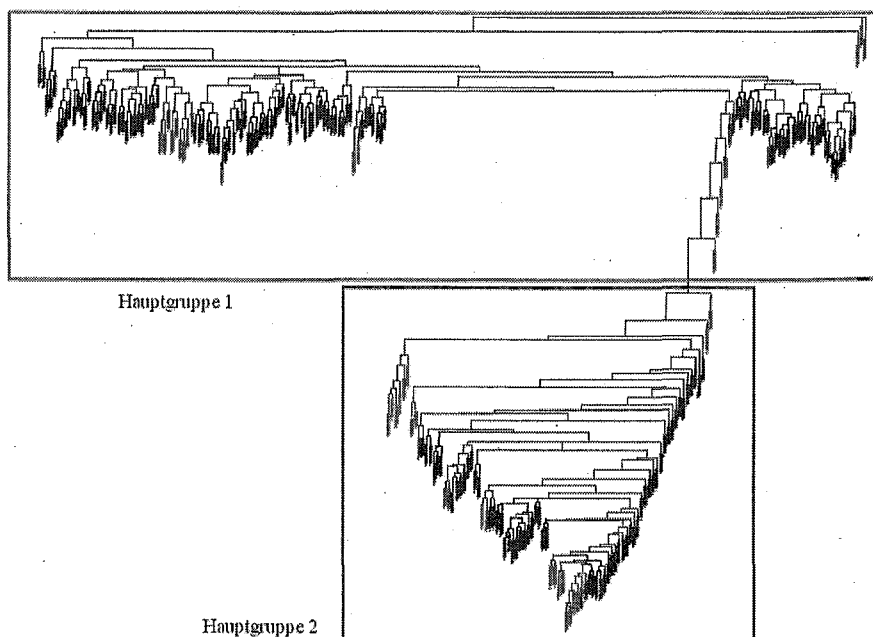


Abb. 1: Dendrogramm der Distanzanalyse von 219 Akzessionen der Petersilien (*Petroselinum crispum*) basierend auf 206 molekularen Markern

Für die Bestimmung der flüchtigen Inhaltstoffe wurde ein holistischer Ansatz gewählt. Blattmaterial wurde homogenisiert, enzyminhibiert und einer HS-SPME (automated headspace solid

phase microextraction) unterzogen. Die an einer 100 µm Polydimethylsiloxane-Faser (Supelco, Bellefonte, PA, USA) absorbierten flüchtigen Substanzen wurden mittels Gaschromatographie (GC Agilent Technologies 6890) aufgetrennt. Alle erhaltenen Peaks über einem Schwellenwert wurden anschließend einer Mustererkennung unterzogen und die erhaltenen Daten mittels Principal Component Analysis (PCA) visualisiert (ULRICH *et al.* 2003). Parallele GC/MS-Läufe mit definierten Substanzen dienten der Identifikation ausgewählter Peaks.

Zur quantitativen Bestimmung wertbestimmender Inhaltsstoffe wurde das ätherische Öl durch Destillation gewonnen und anschließend mittels Gaschromatographie aufgetrennt.

### Ergebnisse und Diskussion

Die 219 zu untersuchenden Akzessionen wurden in Quedlinburg und Gatersleben angebaut. Die Blattpetersilien-Typen (Convarietät *crispum*) wurden nach ihrem Habitus den Varietäten *vulgaris* (glattblättrige Formen), *neapolitanicum* (glattblättrige Formen mit verlängerten Petiolen) und *crispum* (krausblättrige Formen) zugeordnet und von der Convarietät *radicosum* (Wurzelpetersilien-Typen) unterschieden.

Alle 219 Akzessionen wurden mit 206 Markern (22 RAPD-, 66 dpRAPD-, 53 SRAP- und 65 AFLP-Marker) untersucht. Nach Analyse der 1/0-Matrix mit dem Programm PAUP ergaben sich zwei sehr klar unterschiedene Hauptgruppen von 132 bzw. 87 Akzessionen (Abbildung 1).

Alle krausblättrigen Petersilien-Typen waren der größeren Hauptgruppe (HG 1) zugeordnet und untereinander stark geclustert, alle Wurzelpetersilien-Typen fanden sich in der kleineren Hauptgruppe (HG 2) wieder. Die restlichen Blattpetersilien-Akzessionen (sowohl der Varietät *vulgaris*, als auch der Varietät *neapolitanicum*) waren über beide Hauptgruppen verteilt.

Die Gesamtheit der flüchtigen Inhaltsstoffe, insgesamt 133 Peaks, wurde für alle Akzessionen erfasst und die Daten mittels PCA verrechnet. Dabei ergaben sich gleichfalls genau zwei Hauptgruppen (Chemotypen). Beim Vergleich der molekularen Gruppierung und der Gruppierung nach Chemotypen ergab sich eine sehr hohe Übereinstimmung. Nur 8 Akzessionen wurden durch die beiden völlig unabhängigen Bestimmungen nicht übereinstimmend gruppiert. Der Grad an genetischen Unterschieden wird also sehr gut vom Spektrum an flüchtigen Inhaltsstoffen wiedergespiegelt.

Schließlich wurden der Gesamtgehalt und 11 Einzelkomponenten des ätherischen Blattöls in den 219 Akzessionen quantifiziert. Insbesondere bei Myrcen und  $\beta$ -Phellandren konnte eine klare Korrelation mit der genetischen Distanz festgestellt werden. Der  $\beta$ -Phellandren-Anteil am jeweiligen Gesamtgehalt des ätherischen Öls war in der HG 1 im Durchschnitt doppelt so hoch wie in HG 2. Dagegen ist der durchschnittliche Myrcen-Gehalt der Akzessionen in der HG 2 2,3-mal so hoch wie in der HG 1. Auf diesen Ergebnissen aufbauende Assoziationsstudien von individuellen molekularen Markern und Merkmalen sollen die Grundlage für eine markergestützte Selektion bei der Petersilie schaffen.

### Literatur

- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. 1991: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Appl Biochem Biotechnol* 42:181-188
- Budahn, H., Schrader, O., Peterka, H. 2008: Development of a complete set of disomic rapeseed chromosome addition lines. *Euphytica* 162: 117-128
- Li, G., Quiros, C.F. 2001: Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet* 103: 455-461

- Nei, M., Li, W.H. 1979: Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269-5273
- Porebski, S., Bailey, G., Baum, B.R. 1997: Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15: 8-15
- Ulrich, D., Nothnagel, T., Hoberg, E., Straka, P. 2003: Analysis of aroma types by rapid GC methods in carrot breeding research. In (Eds.) Le Quere, J.L. Etievant, P.X.: *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century*. Lavoisier, London-Paris-New York, 440-444
- Vos, P., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 21: 4407-4414
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535