

DArT: Genotypisierung von Pflanzengenomen im Hochdurchsatz

V. MOHLER, F. STADLER, B. ROS, G. WENZEL, A. KILIAN, N. HOWES und R.F. PARK

Einleitung

Diversity Arrays Technology (DArT) basiert auf der DNA-DNA-Hybridisierung und nutzt als Technikplattform die parallele Natur der Mikroarrays aus, wodurch mehrere tausend Loci gleichzeitig typisiert werden können. Ein solcher Mikroarray wird für jede Art erstellt und enthält DNA-Fragmente, die aus einer genomischen Repräsentation mehrerer Genotypen, welche idealerweise die Biodiversität einer Art abdecken, selektiert wurden. Eine genomische Repräsentation ist das Produkt einer Methode, die reproduzierbar ein definiertes Set von DNA-Fragmenten eines Genoms darstellt. Die Vorgehensweise zur Erzeugung genomischer Repräsentationen ist in WENZL et al. (2004) beschrieben. DArT erzeugt genetische Fingerprints durch die Inventur der An- bzw. Abwesenheit von DNA-Fragmenten in genomischen Repräsentationen von Analyseproben.

DArT wurde ursprünglich bei Reis entwickelt, einem diploiden Getreide mit einem kleinen Genom von 430 Mbp (JACCOUD et al. 1991). Seitdem wurde die Technologie bei einer Reihe anderer Pflanzenarten angewendet, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (WITTENBERG et al. 2005), Gerste (WENZL et al. 2004, 2006) und Weizen (AKBARI et al. 2006). Diese Technologie ist als Serviceleistung für Gerste und Weizen über Triticarte™, einem Joint Venture zwischen dem Value Added Wheat Cooperative Research Centre (North Ryde, Australien) und Diversity Arrays Technology Pty Ltd (Yarralumla, Australien), erhältlich.

DArT bei der Gerste

Durch die Erstellung einer Konsensuskarte aus 10 verschiedenen Populationen konnten bislang mehr als 2000 DArT-

Marker im Gerstengenom lokalisiert werden (WENZL et al. 2006). Diese genetische Karte verfügt über 2935 Marker (2085 DArT, 850 SSR/RFLP/STS), die auf 1629 einzigartige Loci verteilt sind. Die Gesamtkartenlänge beträgt 1161 cM, mit einem durchschnittlichen Abstand der Markerloci von $0,7 \pm 1,0$ cM. Mit einer einzigen DArT-Analyse (DArT-Marker der PstI/BstNI genomischen Repräsentation = bPb) konnte eine Abdeckung der genetischen Karte von 98,1% erreicht werden. Durch die Verwendung von DArT-Markern einer anderen genomischen Repräsentation ließ sich diese auf 99,7% erhöhen. Von den 1546 bPb-DArT-Markern spalteten fast zwei Drittel (1117) in zwei oder mehr Kreuzungen. Annähernd noch 250 Marker konnten in vier Populationen kartiert werden. In dieser Studie konnte auch eine wichtige Aussage zur Assoziation von DArT-Markern mit agronomisch bedeutsamen Merkmalen getroffen werden. Durchschnittlich lokalisierten 14 ± 9 DArT-Marker innerhalb von 5 cM zu beiden Seiten von SSR/RFLP/STS-Markern, die mit phänotypischen Merkmalen gekoppelt waren. Mehr als die Hälfte (35/66) der Loci wiesen mehr als 10 DArT-Marker in ihrer unmittelbaren Nähe auf (Abbildung 1).

DArT beim Weizen

Wie bei der Gerste konnten bislang mehr als 2000 DArT-Marker im Weizengenom kartiert werden (HOWES et al. 2005). Die meisten DArT-Marker (45%) konnten dem B-Genom zugeordnet werden, gefolgt vom A-Genom mit 38% und dem D-Genom mit 17%. Diese ungleichmäßige Verteilung der DArT-Marker über das Weizengenom stimmt mit anderen Markersystemen überein. Dies zeigt, dass sich DArT-Marker wie alle anderen Markertypen nach der Verteilung von DNA-Polymorphismen im

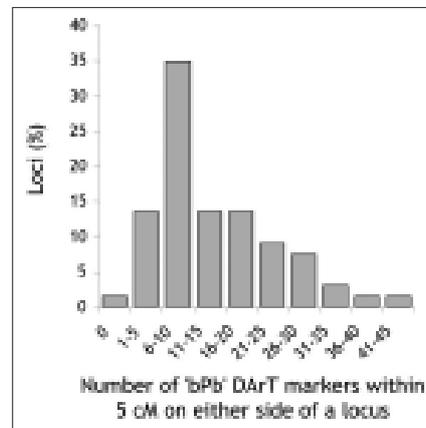


Abbildung 1: Anzahl von DArT-Markern in unmittelbarer Nähe von SSR/RFLP/STS-Loci mit Kopplung zu agronomisch wichtigen Merkmalen bei der Gerste (WENZL et al. 2006)

Weizengenom richten. Gegenwärtig wird an der Erstellung einer Konsensuskarte für Weizen gearbeitet.

Die Verwendung von DArT-Markern für die Analyse phänotypischer Pools dürfte gegenwärtig die schnellste Methode zur subchromosomalen Lokalisierung qualitativer Merkmale sein. Für ein Braunrostresistenzgen aus dem Dinkel konnten 15 polymorphe DArT-Marker identifiziert werden, von denen 13 auf dem Weizenchromosom 1B lokalisiert sind. Die beiden verbliebenen Marker waren bislang noch keinem Chromosom zugeordnet. Das Ergebnis aus der DArT-Analyse konnte durch die Kartierung von Mikrosatelliten verifiziert werden.

Eine weitere Anwendung der DArT-Technologie liegt in der schnellen Identifizierung von Translokationen im Zuchtgang (Abbildung 2). Zu diesem Zweck wurden für die Erstellung des DArT-Arrays auch Genotypen, die Translokationen tragen, verwendet: Grebe (T1BL.1RS aus *S. cereale*, Lr26/Sr31), Trident (VPM1 aus *T. ventricosa*, Sr38/Lr37/Yr17), Cranbrook (*T. turgidum* var. *dicoccum*, Sr2), Janz (*Th.*

Autoren: Dr. Volker MOHLER, Florian STADLER, Barbara ROS und Gerhard WENZEL, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Technische Universität München, D-85350 FREISING; Andrzej KILIAN, Diversity Arrays Technology, YARRALUMLA, ACT 2600, Australia; Neil HOWES, Robert F. PARK, Plant Breeding Institute Cobbitty, University of SYDNEY, Australia

ponticum, Sr24/Lr24), Currawong (*Th. ponticum*, Sr26) und Sunland (*T. timopheevii*, Sr36). Für jede dieser Translokationen konnten diagnostische Marker gefunden werden, was wiederum zeigte, dass DNA-Fragmente dieser Genotypen signifikant auf dem Genotypisierungs-Array vertreten sind.

DArT bei der Bambara Erdnuss

Für die Bambara Erdnuss (*Vigna subterranea* L.) soll im Rahmen eines von der Europäischen Union geförderten Verbundprojekts ein DArT-Array unter Verwendung von 38 Genotypen erstellt werden. Durch eine AFLP-basierte Verwandtschaftsanalyse wurden 36 Genotypen selektiert (SINGRÜN und SCHENKEL 2003), die die genetische Diversität dieser Art repräsentieren. Zusätzlich wurden die beiden Eltern der Standardkartierungspopulation miteingeschlossen.

Schlussfolgerungen

Im Durchschnitt detektiert eine einzige DArT-Analyse (bPb-DArT) ~ 420 polymorphe Marker pro Gerstenkreuzung; diese Anzahl ist gegenwärtig auch für Weizenkreuzungen zu erwarten, für weite Kreuzungen konnten höhere Polymorphiegrade beobachtet werden. Durch die Kombination von DArT-Markern verschiedener genomischer Repräsentationen, so wie beim Zuckerrohr beabsichtigt (HELLER-USZYNSKA et al. 2006), kann eine durchschnittlich höhere Anzahl polymorpher DArT-Marker erreicht werden. Die Kosten (DNA-to-data) betragen ~ 0,06 EUR pro Datenpunkt (94 Genotypen: 2800 EUR), somit stellt

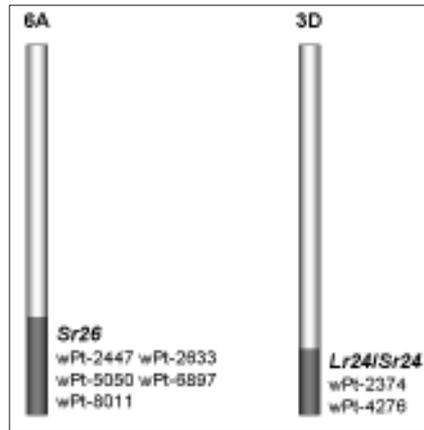


Abbildung 2: Identifizierung von Translokationen mit Rostresistenz aus *Thynopyrum ponticum* im Weizengenom

DArT ein kostengünstiges Verfahren der Genotypisierung dar. Die Verfügbarkeit der DNA-Sequenzen der DArT-Marker - gegenwärtig für Gerste, bald für Weizen - eröffnet die Möglichkeit der Entwicklung sequenzspezifischer PCR-Marker für die markergestützte Selektion einiger ausgewählter Merkmale.

Literatur

AKBARI, M., P. WENZL, V. CAIG, J. CARLING, L. XIA, S. YANG, G. USZYNSKI, V. MOHLER, A. LEHMENSIEK, H. KUCHEL, M.J. HAYDEN, N. HOWES, P. SHARP, P. VAUGHAN, B. RATHMELL, E. HUTTNER and A. KILIAN, 2006: Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor Appl Genet* 113:1409-1420.

HELLER-USZYNSKA, K., V. CAIG, J. CARLING, M. EVERS, G. USZYNSKI, G. PIPERIDIS, R. GILMOUR, K. AITKEN, P. JACKSON, E. HUTTNER and A. KILIAN, 2006: Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput, whole-genome molecular analysis in sugarcane. *Tropical Crops Biotechnology*

Conference, 16th-19th August, Cairns, Australia <http://www.diversityarrays.com/publications.html>.

- HOWES, N., H. BARIANA, P. SHARP, M.-K. TAN, A. KILIAN, E. HUTTNER, K. NAZARI, O. ANSARI and V. MOHLER, 2005: The identification of translocations in the wheat genome associated with rust resistance using Diversity Arrays Technology™ (DArT). In: Park RF, Bariana H, Wellings CR (eds) *Global Landscapes in Cereal Rust Control*, 20th-22nd September 2005, Katoomba, Australia, pp 54.
- JACCOUD, D., K. PENG, D. FEINSTEIN and A. KILIAN, 2001: Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* 29:e25
- SINGRÜN, C. and W. SCHENKEL, 2003: Fingerprinting of Bambara groundnut germplasm with molecular markers. *Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium*, 8th-2nd August 2003, Botswana College of Agriculture, Gaborone, Botswana, pp 161-173.
- WENZL, P., J. CARLING, D. KUDRNA, D. JACCOUD, E. HUTTNER, A. KLEINHOFES and A. KILIAN, 2004: Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9915-9920.
- WENZL, P., H. LI, J. CARLING, M. ZHOU, H. RAMAN, E. PAUL, P. HEARNDEN, C. MAIER, L. XIA, V. CAIG, J. OVESNÁ, M. CAKIR, D. POULSEN, J. WANG, R. RAMAN, K.P. SMITH, G.J. MUEHLBAUER, K.J. CHALMERS, A. KLEINHOFES, E. HUTTNER and A. KILIAN, 2006: A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics* 7:206.
- WITTENBERG, A.H.J., T. VAN DER LEE, C. CAYLA, A. KILIAN, R.G.F. VISSER and H.J. SCHOUTEN, 2005: Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 274:30-39.
- YANG, S., W. PANG, G. ASH, J. HARPER, J. CARLING, P. WENZL, E. HUTTNER and A. KILIAN, 2006: Low level of genetic diversity in cultivated pigeonpea compared to its wild relatives is revealed by diversity arrays technology (DArT). *Theor Appl Genet* 113:585-595.