

Molekulare Marker: Technologie und Anwendung

W. MICHALEK

Einleitung

Die Fortschritte der Molekularbiologie haben zu einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in der Pflanzenzüchtung geführt. Von besonderem Interesse ist dabei die Verwendung molekularer Marker auf DNA Basis. Diese Marker können Anwendung finden zur Genotypisierung von Pflanzen, zur markergestützten Selektion (marker assisted selection, MAS) in großen Nachkommenschaften, zur Effizienzsteigerung in Rückkreuzungsprogrammen (marker assisted Back Crossing, MABC) bis hin zum Einsatz zur Qualitätssicherung in Saatgutchargen.

Hinsichtlich der großen Anzahl von Typen molekularer Marker haben sich vor allem SSR's (simple sequence repeats oder Mikrosatelliten) und neuerdings SNP's (single nucleotide polymorphisms, Punktmutationen) in der Laborpraxis bei Pflanzenzüchtern etabliert. Beide Systeme erfordern relativ hohe Aufwendungen in der Entwicklungsphase. In der praktischen Anwendung können SSR's auf Gelsystemen oder automatischen Sequenziersystemen betrieben werden, beide Vorgehensweisen können als ausgereift betrachtet werden, dem Anwender bleibt es überlassen die für sein Labor geeignete Lösung zusammenzustellen. Für die Analyse von SNP's hingegen steht eine große Anzahl von Analysentechniken zur Verfügung, die sich jedoch hinsichtlich Anwendungsfeld, Robustheit, Komplexität der Anwendung, Automatisierbarkeit und nicht zuletzt Preis stark unterscheiden. Eine gute generelle Übersicht zu diesem Thema bieten CHEN und SULLIVAN (2003), GIANCOLA et al. (2006) beschreiben und bewerten die Anwendung einiger Techniken bei Pflanzen.

Markeranwendung

Die praktische Anwendung von Markertechnologie wird von einer Vielzahl Faktoren beeinflusst. Die Verfügbarkeit von

Genominformation (genetische Karten, Sequenzinformation) und genomischen Ressourcen (cDNA Banken, BAC Banken) spielt ebenso eine Rolle, wie die Genetik und phänotypische Ausprägung des zu bearbeitenden Merkmals. Verfügbarkeit und Preis von externen oder internen Laborkapazitäten interagieren mit Parametern der Projektstruktur (Umfang, Logistik, Termin) und nicht zuletzt gilt es in diesem Zusammenhang Alternativen zu berücksichtigen.

Bei PLANTA werden Zuckerrübe, Mais, Raps und Getreide bearbeitet. Die dabei eingesetzten Markertypen umfassen vor allem SSR- und SNP-Marker in den Anwendungsgebieten MAS, MABC, Genotypisierung und Qualitätssicherung. Aufgrund der meist multiallelischen Ausprägung werden SSR Marker in erster Linie in Genotypisierungsprojekten eingesetzt. Als technische Plattform dienen Kapillarelektrophoresegeräte, die zwar hinsichtlich Anschaffung und Auswertesoftware teuer sind, andererseits jedoch ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit bieten und geringen Arbeitszeitbedarf bei der Analyse der DNA Fragmente zur Folge haben.

SNP-Marker sind i.d.R. biallelisch und deshalb grundsätzlich besser für Hochdurchsatztechnologien geeignet. Im Rahmen von Genomics Projekten wurden umfangreiche Ressourcen (v.a. Sequenzdatenbanken) geschaffen, die die Basis für den Zugang zu dieser Markerklasse bilden. Spezifische Markerassays, welche in öffentlichen Projekten entwickelt werden, sind meist nicht auf den gleichen technologischen Plattformen etabliert worden wie sie in Servicelaboren Verwendung finden, weshalb gewöhnlich zusätzliche Aufwendungen für diesen Etablierungsschritt getätigt werden müssen. Im PLANTA Labor kommen die Plattformen TaqMan (Endpunktanalyse) und Pyrosequencing zum Einsatz.

Die TaqMan Methode benötigt nur einen Arbeitsschritt, ein Vorteil der auch

die nächsten Jahre bestehen bleiben wird, speziell für Projekte in welchen nur wenige (1-3) Marker pro Probe vorgesehen und demzufolge Multiplexechniken nicht effizient sind. Für den ökonomisch sinnvollen Einsatz ist es erforderlich, dass derartige Marker in einem Umfang von >3000 Analysen/Jahr eingesetzt werden (interner Richtwert). In erster Linie sind dies MAS-Projekte mit einer Projektstruktur von wenigen Markern pro Probe, die im Idealfall einen Umfang haben, der ein Vielfaches von 384 Proben (=Probenträgergröße) beträgt.

Die Kostenersparnis im Vergleich zur Analyse von Fragmentlängen (SSR) kann bei Verfügbarkeit der genannten Plattformen mehr als 50% betragen. Für SNP Marker, die nicht diesen Nachfrageumfang erreichen, wird Pyrosequencing genutzt, eine Technologie, die kurze DNA Sequenzen generiert. Diese Technik liefert zuverlässige Daten und ist hinsichtlich des zu lagernden Verbrauchsmaterials anspruchloser als die TaqMan Technologie. Darüberhinaus ist diese Methode in der Lage bei geeigneten Markern Allele in Mischproben von bis zu 5 (diploiden) Pflanzen zu detektieren.

Ausblick

Da SNP Marker einen geringeren Informationsgehalt als SSR's aufweisen müssen pro Analyse entsprechend mehr Marker angewendet werden, um z.B. bei einer Genotypisierung die gleiche Aussagekraft zu erreichen. Wirtschaftlichkeit lässt sich in diesen Anwendungsgebieten nur durch die gleichzeitige Analyse von Markersets (Multiplexen) erreichen. Neben Chiptechnologien, die in der Regel relativ große Markersets umfassen und bei der SNP Detektion oftmals Probleme in der Reproduzierbarkeit aufweisen, sind seit kurzem Methoden für mittelgroße Sets (10 - 50 Marker) auf den Markt gekommen die auf gängigen Kapillarelektrophoresegeräten analysiert

Autor: Dr. Wolfgang MICHALEK, PLANTA GmbH, Grimsehlstraße 31, D-37555 EINBECK



werden können. Da mit einer Reduktion der Analysekosten um 80% gerechnet werden kann, ist anzunehmen, dass der Anwendungsumfang bei diesen Methoden in naher Zukunft steigen wird. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass zur Realisierung dieser Vorteile züchterische und labortechnische Projektstrukturen aufeinander abgestimmt werden müssen.

Mittel- und langfristig ist weiterhin mit der Entwicklungen von Methoden zur kostengünstigen Hochdurchsatzanalyse von SNP's zu rechnen, welche nicht nur auf modellhafte Großprojekte anwendbar sein werden. Im Bereich der Sequen-

zierung gibt es eine Reihe technologischer Neuentwicklungen, deren gemeinsames Ziel darin besteht, Sequenzierkosten um mehrere Größenordnungen abzusenken.

Übersichtsartikel zu SNP bzw. Sequenziertechniken haben FAN et al. (2006) und SHENDURE et al. (2004) verfasst. Der Humansektor ist nach wie vor die treibende Kraft der Neuerungen, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Entwicklungen auch die Werkzeuge die der Pflanzenzüchtung zur Genomanalyse zur Verfügung stehen, verändern werden.

Literatur

- CHEN, X. and P.F. SULLIVAN, 2003: Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The Pharmacogenomics Journal* 3:77-96.
- FAN, J.B., M.S. CHEE and K.L. GUNDERSON, 2006: Highly parallel genomic assays. *Nature Rev Genet* 7:632-644.
- GIANCOLA, et al., 2006: Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *Theor Appl Genet* 112:1115-1124.
- SHENDURE, J., R.D. MITRA, C. VARMA, G.M. CHURCH, 2004: Advanced Sequencing Technologies: Methods and Goals. *Nature Reviews Genetics* 5:335-344.