

Molekulare Marker für die Weizenzüchtung

M. WOLF, H. LUERSSSEN, A. POLLEY, M. RÖDER und M. GANAL

Einleitung

Molekulare Marker gewinnen in der Pflanzenzüchtung und Genomanalyse immer mehr an Wichtigkeit. Neben der Lokalisierung von monogenen Merkmalen werden sie intensiv zur Identifikation von Loci verwendet, welche bei quantitativ vererbten Merkmalen (quantitative trait loci, QTLs) eine Rolle spielen. Mit der Durchführung von Projekten im Rahmen der Genomanalyse, welche zur Identifikation der meisten Gene einer Pflanze durch die EST (expressed sequence tags) Analyse geführt haben, hat das Konzept der Assoziationsgenetik an Interesse gewonnen. Dieses Konzept basiert darauf, dass durch die Assoziation von einzelnen Markern mit Merkmalen in einer Population von nicht verwandten Linien Gene und QTLs identifiziert, präzise lokalisiert und langfristig isoliert werden können. Voraussetzung für die Merkmalsidentifikation mit Hilfe assoziationsgenetischer Methoden ist einerseits ein fundiertes Wissen über die populationsgenetische Struktur des untersuchten Pflanzenmaterials und andererseits die Verfügbarkeit einer sehr großen Anzahl von Markern oder von Kandidatengenen für die untersuchten Merkmale. Als Marker der Wahl haben sich für derartige Untersuchungen SNP (single nucleotide polymorphism) Marker erwiesen. SNPs sind Unterschiede auf der Ebene von einzelnen Basen. Damit sind solche Marker in großer Anzahl im Genom vorhanden und beschreiben für Kandidatengene die Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen den untersuchten Genotypen. Das hier vorgestellte Projekt im Rahmen der InnoPlanta-Initiative hatte zum Ziel Voraussetzungen für die Assoziationsgenetik beim hexaploiden Weizen *Triticum aestivum* zu schaffen. Einerseits sollte mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern eine Markerdatenbank mit etwa 1.000 Weizensorten etabliert werden, mit welcher die

Populationsstruktur im Zuchtmaterial untersucht werden kann. Andererseits sollte untersucht werden, welche effizienten Techniken es zur Identifikation von SNP-Markern in allopolyploiden Weizen gibt und wie hoch das Polymorphismusniveau bezüglich der im Zuchtmaterial nutzbaren SNPs ist, da nur solche SNPs für assoziationsgenetische Untersuchungen nutzbar sind (RAFALSKI, 2002).

Ergebnisse

a) Markerdatenbank

Zur Erstellung der Markerdatenbank wurde eine große Anzahl von Weizensorten gesammelt. Das Ziel des Projektes bestand darin einen Überblick über aktuelles Zuchtmaterial aus Europa und Nordamerika zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden auch Sorten aus früheren Untersuchungen am IPK zusammengestellt. *Tabelle 1* zeigt eine Zusammenfassung des verwendeten Materials.

Zur Untersuchung dieser Linien wurde aus dem am IPK und bei TraitGenetics vorliegenden Satz an Mikrosatellitenmarkern (>1.000) ein Anzahl von Markern ausgewählt. Diese Marker mussten auf der genetischen Karte der ITMI-Population kartiert und möglichst gleichmäßig über die 21 Chromosomen des Weizens verteilt sein. Ferner ist es für die Erstellung einer solchen Datenbank notwendig, dass die Marker klar definierte Amplifikationsprodukte liefern, welche ohne Probleme ausgewertet werden können. Um dies zu erreichen, wurden hauptsächlich solche Marker ausgewählt, welche nur ein klar definiertes Amplifi-

kationsprodukt lieferten. Aus den Markern wurden 227 qualitativ hochwertige und gleichmäßig über das Genom verteilte Marker für die Genotypisierung ausgewählt. Die Markeranalysen wurden im Hochdurchsatz durchgeführt und insgesamt wurden etwa 270.000 Datenpunkte erzeugt. Die erhaltenen Markerdatenbanken wurden zur Untersuchung der genetischen Variabilität und zur Verwandtschaftsanalyse des Materiales verwendet.

Die Ergebnisse zeigen klar eine Populationsstruktur bezogen auf die regionale Herkunft, die Verwendung und die Einteilung in Winter- und Sommerformen. Europäische Winterweizen unterscheiden sich, wie erwartet, signifikant von europäischen Sommerweizen. Ebenso unterscheiden sich klar nordamerikanische Winter- und Sommerweizen. Innerhalb der europäischen Winterweizensorten gibt es gewisse Hinweise auf eine Populationsstruktur, welche aber nicht so signifikant sind, wie beispielsweise zwischen europäischen und nordamerikanischen Formen oder Sommer- und Winterformen. Aktuell werden diese Daten weiter hinsichtlich der genauen Populationsstruktur und das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes (linkage disequilibrium) untersucht.

b) SNP-Entwicklung

Die SNP-Entwicklung bei Weizen ist, bedingt durch die hexaploide Genomstruktur schwierig. PCR-Produkte können nicht direkt sequenziert werden, weil normalerweise von allen drei Genomen gleichzeitig amplifiziert wird und in der Regel Insertionen/Deletionen zwischen

Tabelle 1: Zusammenfassung der Sortenherkünfte für die Untersuchungen

624	aktuelle europäische Sorten
213	Sorten aus den US und Canada
199	ältere europäische Sorten von 1940 - 1990
212	Standards, Duplikate und sonstige Linien
1.248	Proben gesamt

Autoren: Dr. Markus WOLF, Dr. Hartmut LUERSSSEN, Dr. Andreas POLLEY und Dr. Martin GANAL, TraitGenetics GmbH, Am Schwabeplan 1b, D-06466 GATERSLEBEN; Dr. Marion RÖDER, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN



Tabelle 2: Auswertung der sequenzierten Amplikons hinsichtlich Polymorphismus in den untersuchten Weizenlinien

202	Gesamtzahl sequenzierter genomspezifischer Amplicons
69	Anzahl Amplikons mit mindestens einem SNP in einer Linie
19	Anzahl Amplikons mit SNP(s) nur in nicht-europäischem Material
15	Anzahl Amplikons mit SNP(s) nur in europäischen Sorten
35	Anzahl Amplikons mit SNP(s) sowohl in europäischem als auch nicht-europäischem Material

den Amplifikationsprodukten auftreten. Aus diesem Grund ist es notwendig in einem ersten Schritt genomspezifische Primer zur Amplifikation von PCR-Produkten aus nur einem der drei Genome abzuleiten. Dazu wurde in der ersten Phase bioinformatisch EST-Sequenzen geclustert und für einzelne Gene die homologen Sequenzen aus den drei Genomen identifiziert (SOMERS et al., 2003). Basierend auf diesen Informationen wurden anschließend solche Primer abgeleitet, welche es erlauben sollen, genomspezifische Produkte zu amplifizieren. DNA von vier Typlinen wurden dazu verwendet, um zu prüfen, ob ein mit solchen Primerpaaren definiertes Fragment amplifiziert wurde.

In einer zweiten Phase wurde die Genomspezifität des Amplifikationsproduktes jedes funktionalen Primerpaars auf einem Set von diploiden und tetraploiden Weizenlinien getestet. Dieses Set bestand aus zwei *Triticum urartu* (A-Genom-Donor) Linien, zwei *Aegilops tauschii* (D-Genom-Donor) und zwei *Triticum durum* (tetraploid, A und B-Genom) Linien. Dieses Set erlaubte in sechs PCR-Reaktionen eine erste Genomzuordnung durchzuführen. In der dritten Phase wurden alle genomspezifischen

Amplikons auf sogenannten nullitetrasonen Linien in der Sorte Chinese Spring amplifiziert. Nullitetrasonen Linien sind Linien bei denen jeweils ein Chromosomenpaar fehlt und durch zwei zusätzliche Kopien eines anderen homologen Chromosoms ersetzt ist.

Mit den nullitetrasonen Linien lässt sich ein genomspezifisches Amplifikationsprodukt einem spezifischen Weizenchromosom zuordnen. In der vierten Phase wurden alle Amplifikationsprodukte aus einem oder zwei Genomen in einem Panel von 12 Linien vergleichend sequenziert.

Das Panel der 12 Linien wurde dabei so ausgewählt, dass es sowohl die Eltern der wichtigsten internationalen Kartierungspopulation (Opata x Synthetic) enthielt, als auch ein Set von 8 europäischen Weizenlinien (Aztec, Flair, Recital, Renan, Rialto, Ritmo, Soisson und Victor), sowie eine typische kanadische Sorte (AC Barrie) und die Weizenstandardlinie Chinese Spring. Das Set der europäischen Sorten wurde basierend auf Mikrosatellitendaten ausgewählt, damit diese Sorten das gesamte Spektrum der genetischen Variabilität des europäischen Winterweizens repräsentieren.

Basierend auf 202 in dem Weizenpanel

sequenzierten genomspezifischen Amplikons, welche über alle 21 Weizenchromosomen verteilt waren, ergaben sich die in *Tabelle 2* dargestellten Ergebnisse.

Die Ergebnisse zeigen, dass nur 34% aller sequenzierten Amplikons SNPs in mindestens einer der untersuchten Linien zeigen. Damit liegt Weizen hinsichtlich des Polymorphismusniveaus klar am unteren Ende der bisher untersuchten Kulturpflanzen.

Nach ersten Berechnungen ergibt sich damit ein SNP pro etwa 400 Basenpaare in den untersuchten 12 Linien und eine Frequenz von etwa einem SNP pro 600 Basenpaare im europäischen Sortenmaterial. Diese Zahlen liegen deutlich niedriger als die bisher publizierten Daten bei Weizen (SOMERS et al., 2003) und deuten darauf hin, dass eine SNP-Identifikation in großem Maßstab im europäischen Sortenmaterial bei Weizen sehr aufwendig sein wird.

Literatur

- RAFALSKI, A., 2002: Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 94-100.
- SOMERS, D.J., R. KIRKPATRICK, M. MONIWA and A. WALSH, 2003: Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome* 46: 431-437.