

Molekulare Diagnostik in der Landwirtschaft

Molekulargenetische Methoden haben heute in der landwirtschaftlichen Forschung ein breites Anwendungsspektrum. Wohl am bekanntesten, weil ethisch heftig umstritten, ist der Bereich der Transformationstechnologie, in dem artfremde Gene in Organismen eingebaut werden, um sie mit neuen Eigenschaften zu versehen. Im Gegensatz dazu ist die molekulare Diagnostik ethisch unproblematisch, da hier das Genom (die Gesamtheit der Gene eines Organismus) lediglich analysiert und nicht verändert wird. Innerhalb weniger Jahre hat deshalb die molekulare Diagnostik eine wichtige Stellung in der agronomischen Forschung und Beratung erlangt. Im Folgenden werden einige wichtige Anwendungsgebiete in der Agronomie kurz vorgestellt und anhand von Beispielen aus unseren Labors an der Eidgenössischen Forschungsanstalt Wädenswil (FAW) illustriert.

JÜRGEN ERNST FREY, ELISABETH BOSSHARD, JÜRGEN GAFNER, WERNER HELLER, MAJA HILBER, MARKUS KELLERHALS, JUDITH LADNER, HANS-JAKOB SCHÄRER UND ROBERT THEILER, EIDGENÖSSISCHE FORSCHUNGSANSTALT WÄDENSWIL

Die in der molekulargenetischen Diagnostik eingesetzte Technologie ist dieselbe, die in Kriminalfällen Verwendung findet. Kleinste Gewebestücke reichen aus, um die darin enthaltene DNS* (*siehe Glossar), deren Gesamtheit unsere Gene* ausmacht, zu extrahieren. Mit der so genannten Polymerase-Kettenreaktion* (PCR) wird anschliessend ein Fragment (Stück) eines Gens selektiv vervielfältigt (welches Gen untersucht wird, hängt von der Fragestellung ab). Dieses Genfragment wird danach auf einem Gel* unter ultraviolettem Licht als hell leuchtende Bande sichtbar gemacht. Falls die so erhaltene Information noch nicht die gewünschte Differenzierung erlaubt, kann das Genfragment genauer untersucht werden. Dies geschieht zum Beispiel mit einer Restriktionsanalyse*, bei der das Genfragment in noch kleinere Stücke von unterschiedlicher Länge geschnitten wird. Auch diese Fragmentstücke erscheinen auf dem Gel als Banden. Falls ein solches Fragmentstück stets zusammen mit einer bestimmten Eigenschaft auftritt, kann es als genetischer Marker* für diese Eigenschaft verwendet werden.

Bei den Eukaryoten* ist die genetische Information auf linearen DNS Stücken, den Chromosomen*, angeordnet. Beim sogenannten Karyotyping* werden die Chromosomen isoliert, auf einem Gel aufgetrennt und wieder wie oben unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Molekulare Marker für Eigenschaften in der Obstzüchtung

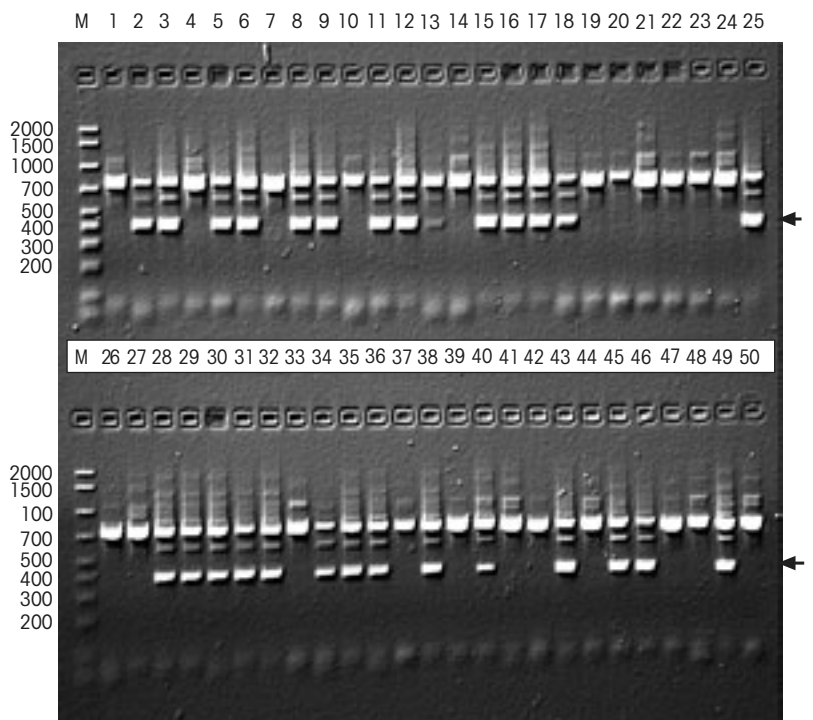
Markergestützte Selektion

Die Apfelzüchtung hat zum Ziel, Apfelsorten zu entwickeln, die sich durch hohe Qualität der Früchte, regelmässige und gute Ernten und durch nachhaltige

Resistenz* gegen Schädlinge und Krankheiten auszeichnen (Kellerhals et al. 2000). Die traditionelle Züchtung ist sehr zeitaufwändig und teuer. Die Fähigkeit zu einer Vorselektion von Setzlingen zur Identifikation von Individuen mit der richtigen Kombination von erwünschten Fähigkeiten oder Eigenschaften vor dem Auspflanzen ins Feld würde die Kosten stark reduzieren und gleichzeitig die Effizienz steigern. Der Einsatz von molekulargenetischen Markern ist ein wichtiges Werkzeug zur Erreichung dieses Ziels.

An der FAW wird zur Zeit vor allem die Resistenz gegen den Schorf und den Mehltau bearbeitet. Zur Förderung der Dauerhaftigkeit der Resistenz wird versucht, eine Kombination verschiedener Resistenzen in einer Sorte zu vereinigen. Da der Nachweis kombinierter Resistenz mit klassischen Mitteln sehr schwie-

Abb. 1: Markergestützte Selektion in der Obstzüchtung. Sämlinge, die das Gen für Resistenz gegen Schorf tragen, weisen die Bande der Grösse von 400 Basenpaaren (Pfeil) auf. M = Grössenmarker; Nummern identifizieren jeweils einen Apfelsämling.



rig ist, verwenden wir dazu molekulare (genetische) Marker. Im Rahmen des European Apple Genome Mapping Projects wurden Marker für Schorfresistenz und Mehlttauresistenz entwickelt. Der Marker, der Vf-Resistenz anzeigt, ist die Bande der Grösse 400, das heisst, ein DNS-Fragment bestehend aus 400 Basenpaaren (Abb. 1). Dieses DNS-Fragment tritt nur in solchen Apfelindividuen auf, die eine genetisch vererbte Resistenz gegen den Apfelschorf aufweisen. An der FAW wird diese Methode routinemässig eingesetzt, um vor dem Auspflanzen solche Individuen auszusondern, die nicht über die richtige Kombination von erwünschten Eigenschaften verfügen. Zur Zeit wird weltweit intensiv an der Entwicklung weiterer molekularer Marker für Eigenschaften wie Fruchtqualität, Schädlings- und Krankheitsresistenz beim Apfel und anderen Obst- und auch bei Gemüsesorten gearbeitet.

Kompatibilitätsgruppen bei Kirschen

Kirschen sind wie viele andere Pflanzenarten fremdbestäubt und es kommt nur dann zur Fruchtbildung, wenn eine Befruchtung durch den Pollen einer anderen Kirschenpflanze stattgefunden hat. Unter den vielen Kirschenarten, die heutzutage existieren und auch neu gezüchtet werden, bestehen allerdings so genannte Kompatibilitäts- oder Sterilitätsgruppen. Gehören zwei Sorten in dieselbe Sterilitätsgruppe, ist eine Befruchtung unmöglich.

Die Zugehörigkeit der Kirschenarten zu den Sterilitätsgruppen wurde bisher in aufwändigen Feldversuchen ermittelt. Herkömmliche Befruchtungsversuche im Feldversuch müssen während zweier Jahre durchgeführt werden, um eine eindeutige Aussage zu ermöglichen.

Als Alternative zur Feldbestimmung wurde kürzlich ein molekularer Marker entwickelt, der eine Zuordnung zu den verschiedenen Sterilitätsgruppen erlaubt (Wiersma et al. 2001). Man fand bei Süsskirschenarten zwei Sterilitätsallele (S-Allele*). Sind diese Allele zweier Sorten identisch, können sie sich gegenseitig nicht befruchten. Stimmt nur ein Allel überein, ist der Befruchtungserfolg zumeist reduziert. Aufgrund der S-Allele werden die Kirschenarten in Intersterilitätsgruppen eingeteilt. Diese S-Allele können mit gut etablierten molekularbiologischen Methoden (Polymerase-Kettenreaktion* und anschliessende DNS-Sequenzierung*) bestimmt werden. Die Durchführung der Laborarbeiten dauert ungefähr einen Tag und erlaubt die gleichzeitige Zuordnung von mehreren Dutzend Kirschenarten in die Intersterilitätsgruppen. Zwar sind die Materialkosten der molekularen Diagnostik höher als bei den Feldversuchen, jedoch wird dadurch eine enorm hohe Einsparung an Arbeitszeit und damit an Personalkosten erzielt.

Molekulare Marker zur Identifikation in der Obstzüchtung und im Weinbau

Viele Apfel- und weitere Obstsorten, aber auch eine rasch zunehmende Zahl von Gemüsen und Feldfrüchten können heute mit molekularen Markern, meistens so genannten Mikrosatelliten*, eindeutig identifiziert werden. Dadurch profitiert einerseits die

Züchtung, andererseits können so genetische Ressourcen validiert und deren Unterhalt optimiert werden. In der Gewebekulturtechnik ist heute die molekulare Identifikation von Klonen* eine gängige Methode zur Qualitätssicherung.

Die Mikrosatelliten-Methode wird an der FAW auch eingesetzt, um verschiedene Rebsorten eindeutig zu identifizieren. Mit dieser Methode können wir Bestimmungen verifizieren, die mit der klassischen, auf äusserlichen Merkmalen basierenden Methode nicht eindeutig ausgefallen sind.

Pflanzenschutz – molekulare Marker zur Identifikation von Schadorganismen

In Bezug auf die Empfindlichkeit gegen Pestizide unterscheiden sich auch nahe verwandte Arten von Schädlingen und Krankheiten oft stark. Die präzise Identifikation ist daher eine der wichtigsten Voraussetzungen für einen erfolgreichen und nachhaltigen Pflanzenschutz. Bei den meisten Schadorganismen kann es zu Situationen kommen, in denen eine klare Identifikation mit herkömmlichen Mitteln entweder nicht möglich oder sehr aufwändig ist. So existieren zwar für die meisten Insektenschädlinge gute Bestimmungsschlüssel, mit welchen eine Identifikation aufgrund der äusseren Erscheinung möglich ist. Dies gilt jedoch nicht für alle Entwicklungsstadien. Ausserdem sind die Unterschiede zwischen nahe verwandten Arten oft so gering, dass nur ein hoch qualifizierter Fachmann eine endgültige Identifikation durchführen kann. Solche Unterschiede können auch geschlechtsspezifisch sein. So können bei Schildläusen der Gattung *Quadraspidiotus* die Weibchen sehr gut anhand äusserer Merkmale identifiziert werden (Kozar 1995b). Die Männchen vieler Arten dieser Gat-

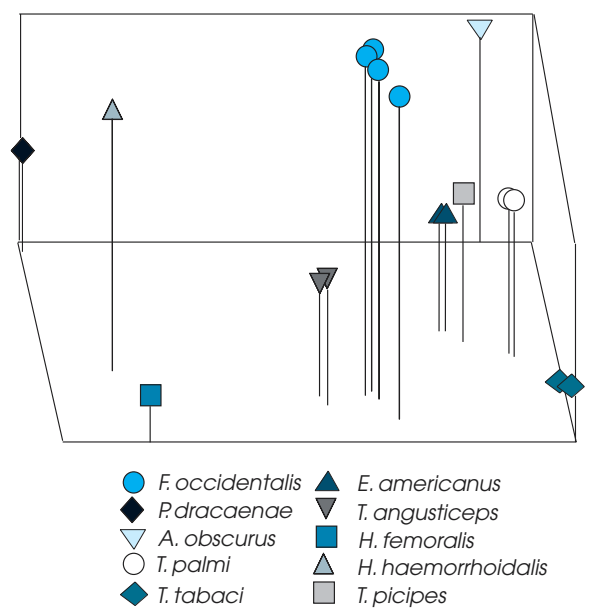


Abb. 2: Differenzierung zwischen verschiedenen Arten von Thrips (*Thysanoptera*) mittels molekularer Marker. Im dreidimensionalen Raum kann leicht erkannt werden, wie gut sich die verschiedenen Arten voneinander unterscheiden.

tung sind dagegen äusserlich absolut identisch und eine Identifikation der Art ist nur mit molekulargenetischen Methoden möglich (Frey and Frey 1995).

Insekten/Milben/Nematoden

Zur molekularen Identifikation von Insekten verwenden wir als Marker einen kleinen Abschnitt des Gens Cytochrom Oxidase I. Dieses Gen ist bei allen Lebewesen auf dem Mitochondriengenom lokalisiert. Mitochondrien sind kleine Zellbestandteile mit eigenständiger DNS, die für die Energiegewinnung der Zelle zuständig sind. Dieses Gen ist deshalb für die Artendiagnose ausgezeichnet geeignet, weil innerhalb von Arten praktisch keine Variation zu finden ist, zwischen verschiedenen Arten aber ungefähr 10 bis 20% Differenzen existieren. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass der von uns verwendete Abschnitt bei vielen Arten von Thripsen (Fransenflüglern) eine sehr rasche und zuverlässige Identifikation erlaubt (Brunner et al. 2002; Abb. 2). Zur Zeit arbeiten wir an einer Ausweitung des Bestimmungsschlüssels auf ökonomisch wichtige Arten von Wicklern, Blattläusen und Gallmücken und wir untersuchen seine Anwendbarkeit bei Nematoden. Ein kürzlich lanciertes fünfjähriges COST-Projekt (COST Action 853; <http://www.admin.ch/faw/COST853/>) hat ausserdem zum Ziel, diese Analysen mit Hilfe der neuen Microarray-Technologie durchzuführen, was den Prozess der Identifikation massgeblich vereinfachen wird.

Pilze: *Chalara sp.* - geographische Diversität von bodenbürtigen Pilzen

Es ist seit langem bekannt, dass die bodenbürtigen Pilze *Thielaviopsis basicola* (syn. *Chalara elegans*) und *Chalaropsis thielavioides* (syn. *Chalara thielavioides*) Karotten und andere Gemüsearten zu ihrem Wirkkreis zählen.

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass vor allem *Thielaviopsis basicola* auch bei mehrjährigen Pflanzen wie Kirschbäumen, Johannis- und Stachelbeeren auf kalkhaltigen Böden zum Absterben der Pflanzen führen kann.

Eine vertiefte Kenntnis der genetischen Variabilität der Schweizer Populationen dieser beiden bodenbürtigen Pilze würde ermöglichen festzustellen, ob der Pilz sich bereits seit langem in den Anbaugebieten befindet oder ob es sich um rezente Kontaminationen der Anbaugebiete durch Auspflanzen von verseuchtem Setzlings- und Jungpflanzenmaterial handelt. Zur Zeit werden Isolate der beiden Pilze von infizierten Pflanzen bekannter geographischer Herkunft gesammelt und in einer Mycothek («Pilzbank») kultiviert. Die genetische Differenzierung zwischen diesen Isolaten wird mit molekularen Markern untersucht.

Pflanzenschutz – molekulare Marker für Eigenschaften: Pestizidresistenz

Ob ein Schädling oder eine Krankheit gegen ein Pestizid resistent* oder empfindlich ist, kann in den seltensten Fällen aufgrund äusserlicher Merkmale bestimmt werden.

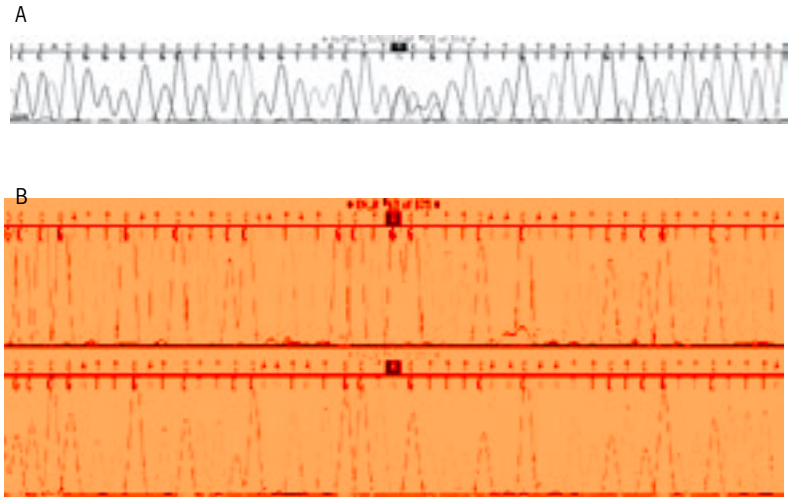


Abb. 3: Marker für Pestizidresistenz. A: (siehe auch S. 465) Teil der DNS-Sequenz des Natriumionenkanals eines Thrips, der in Bezug auf das Merkmal Pyrethroidresistenz mischerbig ist, also sowohl ein Allel für Resistenz (Basenfolge ATG) als auch eines für Empfindlichkeit (Basenfolge GGT) hat. **B:** Teil des psbA-Gens des Gemeinen Kreuzkrauts mit der DNS-Sequenz für ein bezüglich Triazin resistentes (oben; hervorgehobene Base = G) und ein empfindliches (unten; hervorgehobene Base = A) Individuum.

Die Zunahme der Resistenz* gegen Pestizide ist nicht nur in der Humanmedizin ein immer grösseres Problem, auch in der Landwirtschaft tauchen resistente Schadorganismen oft schon bald nach der Einführung eines neuen Pestizids auf. Die Situation wird dadurch verschärft, dass immer mehr multiple Resistenzen auftreten, das heisst, dass einzelne Individuen gleichzeitig gegen mehrere unterschiedliche Pestizide resistent sind. Der Nachweis einer multiplen Resistenz mit herkömmlichen Resistenztests ist ausserordentlich schwierig und liefert nur ungenaue Resultate. Für ein nachhaltiges Resistenzmanagement sind aber präzise Informationen über das Auftreten und die Häufigkeit einzelner Resistenzgene und deren Kombinationen unerlässlich. Deshalb wird weltweit an entsprechenden molekularen Markern gearbeitet. Wir haben an der FAW einen Marker für Pyrethroidresistenz beim Kalifornischen Blüenthrisp *Frankliniella occidentalis* (Abb. 3A; Forcioli et al. 2002) und einen Marker für Triazin-Resistenz beim Gemeinen Kreuzkraut *Senecio vulgaris* (Bild 3B; Frey et al. 1999) entwickelt. Diese Marker geben bereits heute interessante Informationen über epidemiologische Aspekte von Resistenzen; allerdings wird die eigentliche Wertschöpfung erst erreicht werden, wenn von den betreffenden Organismen Marker für mehrere Resistenzen entwickelt worden sind.

Quarantäne – Zertifizierung von Obstgehölzen

Im zunehmend geöffneten Handelsraum der Europäischen Union sind sowohl der Nachweis von krankheitsbefallenen Pflanzen wie auch die Produktion von gesundem Pflanzenmaterial von grosser Bedeu-

tung. Die klassische Methode zum Nachweis einer Viruserkrankung arbeitet mit Indikatorpflanzen und dauert in der Regel zwei bis drei Jahre. Molekulargenetische Methoden würden die Zeit auf wenige Tage reduzieren. Damit molekulargenetische Methoden auch in diesem Bereich eingesetzt werden können, wurden in einem von der Europäischen Union finanzierten Projekt (FAIR CT 97-3889 «Validierung von diagnostischen Methoden an *in vitro* Pflanzen zur Zertifizierung von Obstgehölzen»; teilnehmende Länder A, D, I, BE, F; Lamier et al. 2002) verschiedene hochsensible molekulargenetische und biochemische Methoden verglichen. Im Rahmen dieses Projekts wurde die molekulare Diagnose mittels PCR* vieler aggressiver Viren wie des nekrotischen Kirschenringfleckenvirus oder des Apfelmosaikvirus und von Phytoplasmen wie dem Besenwuchs des Apfels optimiert. Diese Methoden befinden sich nun in der Phase der Umsetzung in die Routinediagnose. An der FAW wird zur Zeit routinemässig das ACLSV (apple chlorotic leaf spot virus, chlorotischer Blattfleckenvirus) auf Apfel, Birne und Zierpflanzen nachgewiesen.

Qualitätskontrolle im Bereich Getränkemikrobiologie

Die Qualität von Fruchtsäften, Weinen und Destillaten ist nur gesichert, wenn der Produzent weiss, ob in seinem Produkt erwünschte oder unerwünschte, tote oder lebende Mikroorganismen enthalten sind. Mit molekulargenetischen Methoden identifiziert die Arbeitsgruppe Mikrobiologie der FAW in der Getränketechnologie seit über zehn Jahren praxisrelevante Mikroorganismen (Bakterien und Hefen). Die FAW verfügt über eine reichhaltige Bakterien- und Hefestammsammlung, in der die Organismen auf Art- und Stammesebene mit verschiedenen molekulargenetischen Methoden bestimmt worden sind. In einem vorerst zweijährigen KTI (Kommission für Technologische Innovation)-Projekt versuchen wir in Zusammenarbeit mit der Hochschule Wädenswil (HSW) und der Hochschule Wallis (HEV) ein Detektionssystem für die Praxis zu etablieren. Dieses System soll zuerst einmal dem Weinproduzenten in der Praxis ermöglichen, auf einfache Weise tote und lebende sowie erwünschte und unerwünschte Mikroorganismen

nachzuweisen. Eine Etablierung dieses praxis-tauglichen Detektionssystems ist möglich, weil wir seit über zehn Jahren die praxisrelevanten Mikroorganismen in Getränken auf Sorten- und Stammesebene molekulargenetisch identifiziert haben (Abb. 4, Schütz and Gafner 1993, 1994). Dieses Detektionssystem soll nach erfolgreicher Anwendung im Bereich Wein auch zur Qualitätssicherung in Fruchtsäften und in Destillaten ausgeweitet werden.

Literatur

Brunner P.C., Fleming C. and Frey J.E.: A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agricultural and Forest Entomology* 4, 127–136, 2002.

Forcioli D., Frey B. and Frey J.E.: High Nucleotide Diversity in the para-like Voltage Sensitive Sodium Channel Gene Sequence in the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 95, 838–848, 2002.

Frey J.E. and Frey B.: Molecular identification of six species of scales (*Quadraspidiolus* sp.) by RAPD-PCR: Assessing the field-specificity of pheromone traps. *Mol. Ecol.* 4: 777–780, 1995.

Frey J.E., Müller-Schärer H., Frey B. and Frei D.: Complex relation between triazine-susceptible phenotype and genotype in the weed *Senecio vulgaris* may be caused by chloroplast DNA polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 99, 578–586, 1999.

Heller W.: Schwarzfleckenpilze: unterschätzte Krankheitserreger der Karotte? *AGRARForschung* 7, 420–423, 2000.

Kellerhals M., Dolega E., Dilworth E., Koller B. and Gessler C.: 2002 Advances in marker-assisted apple breeding. *Proc. EUCARPIA Symp. On Fruit Breed. And Genetics*, M. Geibel, M. Fischer and C. Fischer (eds.). *Acta Hort.* 538, ISHS 2000, 535–540, 2002.

Kozár F.: [Investigations on the morphology of male scale insects belonging to the genus *Quadraspidiolus*.] *Quadraspidiolus nembe tartozó pajjizstetű fajok himjeinek morfológiai vizsgálata* (Homoptera: Coccoidea). (In Hungarian). *Növényvédelmi Tudományos Napok [Plant Protection Science Days]* p. 51, 1995b.

Lamier M., Bertaccini A., Kummer J., Candresse T. and Jelkmann W.: FAIR CT 97-3889: Validierung von diagnostischen Methoden an *in vitro* Pflanzen zur Zertifizierung von Obstgehölzen. *Erwerbsobstbau* 44, 76–81, 2002.

Schütz M. and Gafner J.: Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 551–558, 1993.

Schütz M. and Gafner J.: Dynamics of the yeast strain population during spontaneous and induced alcoholic fermentations determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology* 19, 253–257, 1994.

Wiersma P.A., Wu Z., Zhou L., Hampson C. and Kappel F.: Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing. *Theor. Appl. Genet.* 102, 700–708, 2001.

*Glossar:

- Allel, Allele:** Die verschiedenen Formen eines Gens an demselben Ort.
- Chromosomen:** Träger der genetischen Information, die hauptsächlich aus Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Histon-Proteinen bestehen; intensiv färbare, faden- und schleifenförmige Bestandteile des Zellkerns, auf denen die Gene (Erbanlagen) linear angeordnet sind.
- DNS:** Desoxyribonukleinsäure. Erbsubstanz, enthält die Gene.
- DNS-Sequenzierung:** Vorgang zur Bestimmung der Abfolge der Basen (Bausteine der Erbsubstanz DNS*) in einem Gen.
- Eukaryoten:** Zusammenfassende Bezeichnung für alle Organismen, deren Zellen einen echten Zellkern und membranumgrenzte Organellen besitzen (Einzeller, Pflanzen, Tiere und der Mensch).
- Gel:** Ein Gel hat meistens die Form eines flachen Quaders und besteht aus einer gallertartigen Masse, z.B. aus Agarose, Polyacrylamid oder Stärke. Gele werden eingesetzt, um Proteine oder DNA-Fragmente entsprechend ihrer Ladung und/oder Grösse aufzutrennen und sichtbar zu machen. Die Auftrennung geschieht in der Regel in einem elektrischen Feld mittels der sogenannten Gelelektrophorese*. Das Ergebnis der Elektrophorese kann durch spezielle Anfärbetechniken oder unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden.

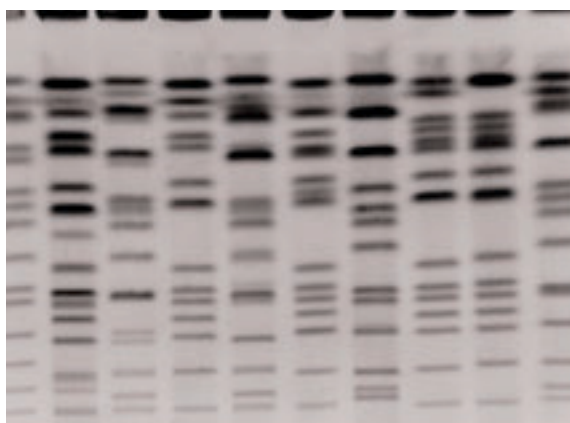


Abb. 4: Differenzierung von Hefestämmen mit Karyotyping. Das Genom der Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält 16 Chromosomenpaare. Unterschiedliche Bandenmuster bedeuten unterschiedliche Hefestämme; gleiche Muster bedeuten vermutlich gleiche Hefestämme.

Gelelektrophorese: Prozess, bei dem in einem Gel* (eine gallertartige Masse), meistens bestehend aus Agarose oder Polyacrylamid, unter Einsatz von Strom die DNS entsprechend der Fragmentlänge aufgetrennt wird. Die Auftrennung beruht auf der negativen elektrischen Ladung der DNS. Die DNS wandert als Bande durch das Gel, wobei kleine DNS-Fragmente schneller wandern als grosse. Durch Zusatz von DNS-bindende Substanzen (z.B. Ethidiumbromid), die unter ultraviolettem Licht fluoreszieren, können die Banden sichtbar gemacht werden.

Gen: Erbinheit, stofflicher Träger der Erbanlagen. Die Gene bestimmen die erblichen körperlichen und geistigen Merkmale. Sie liegen in den Chromosomen in bestimmter Anordnung. Träger der genetischen Information ist die Desoxyribonukleinsäure (DNS, DNA); bei einigen Viren übernimmt die Ribonukleinsäure (RNS, RNA) diese Rolle (genetischer Code). Die Gesamtheit aller Gene eines Organismus wird als Genom bezeichnet.

Genetischer Marker: Ein genetischer Marker ist eine Bande (also ein DNS-Fragment) auf einem Gel, die stets mit der Eigenschaft von Interesse zusammen auftritt. Ein gut beschriebener genetischer Marker erlaubt daher eine klare Zuordnung bei Fragen der Identifikation oder der Charakterisierung von genetischen Eigenschaften.

Karyotyping: Spezielle Art der Elektrophorese, bei der ganze Chromosomen aufgetrennt werden. Da in der Regel jedes Chromosom eine ihm eigene Länge aufweist, kann so die Gesamtheit der Chromosomen sichtbar gemacht werden.

Klon, Klone: In der Gewebekulturtechnik die Bezeichnung für eine Population genetisch einheitlicher Zellen, die sich von einer einzigen Zelle ableiten.

Mikrosatelliten: Meistens nicht-codierende Abschnitte von DNS, die ein kurzes Motiv mehrere Male repetieren, zum Beispiel «CACACACA-CA» (fünf Wiederholungen von «CA») oder «GTAGTAGTA» (drei Wiederholungen von «GTA»). Die Anzahl der Repetitionen wird allelisch vererbt.

Polymerase-Kettenreaktion: Meist nur PCR (Polymerase Chain Reaction) genannt. Mit der PCR können spezifische DNS-Abschnitte so stark vermehrt beziehungsweise amplifiziert werden, dass diese anschliessend mit einfachen Methoden leicht nachgewiesen werden können. Dazu werden einer Reaktionslösung spezifische Primer* zusammen mit der DNS und einem hitzestabilen Polymerase-Enzym (Taq Polymerase) beigegeben. Anschliessend wird die Reaktionslösung in 25 bis 35 Zyklen zuerst auf 94degC erhitzt, um die DNS zu denaturieren, also einzelsträngig zu machen, dann wird auf zirka 50degC abgekühlt (je nach Länge und Basenzusammensetzung der Primer), um den Primern zu erlauben, an die entsprechende Stelle auf dem Genom zu binden, und im dritten Schritt wird auf 72degC erhitzt und so der Taq Polymerase ermöglicht, die fehlenden Teile der einzelsträngigen DNS aufzufüllen. Dieser Prozess führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des DNS-Abschnittes, der von den Primern flankiert wird. Die Primer müssen für jeden Organismus und jedes zu untersuchende Gen optimiert werden, was oft einen grossen Entwicklungsaufwand bedeutet.

Primer: Kurze DNS-Fragmente, die den zu vervielfältigenden DNS-Abschnitt flankieren.

Resistenz; resistent: Unempfindlichkeit gegen Schädlinge und Krankheiten beziehungsweise Verlust der Empfindlichkeit gegenüber Pestiziden; unempfindlich gegen Pestizide.

Restriktionsanalyse: Reaktion, bei der zur genaueren Untersuchung von DNS-Fragmenten Restriktionsenzyme eingesetzt werden. Diese aus Bakterien isolierten Enzyme erkennen eine bestimmte DNS-Sequenz und schneiden den DNS-Strang an dieser Stelle. Aus einem DNS-Fragment, das die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym einmal enthält, entstehen so zwei Fragmente, meistens unterschiedlicher Länge. Zum Beispiel erkennt und schneidet das Restriktionsenzym AluI die Sequenz «AGCT». Diese so genannten Restriktionsfragmente können mittels Gelelektrophorese* aufgetrennt werden. Das so erzeugte Bandenmuster ermöglicht oft eine Identifikation.

RÉSUMÉ

Le diagnostic moléculaire dans l'agriculture

Les méthodes de la génétique moléculaire trouvent aujourd'hui une vaste application dans la recherche. Le domaine le plus connu, parce que sujet à une polémique véhémente, est sans doute celui de la technologie de transformation qui consiste à introduire des gènes exogènes dans un organisme pour le doter de nouvelles propriétés. Le diagnostic moléculaire ne pose pas ce genre de problèmes éthiques, puisqu'il a pour seul propos d'analyser le génome (l'ensemble des gènes d'un organisme) sans le modifier d'aucune façon. L'objectif consiste donc à identifier et typer avec précision une caractéristique spécifique de l'organisme analysé. Pour beaucoup d'organismes qui jouent un rôle important dans l'agriculture, l'identification par les méthodes classiques basées sur des différences extérieures nécessite des démarches laborieuses. Ces méthodes prennent beaucoup de temps et sont réticentes à l'automatisation, de sorte qu'elles ne conviennent pas pour les besoins d'études épidémiologiques. Concernant des propriétés héréditaires, comme par exemple la résistance d'une pomme à la tavelure, il n'est généralement pas possible de faire une distinction entre individus d'une espèce à l'appui de caractéristiques extérieures. C'est pourquoi le diagnostic moléculaire a conquis en l'espace de quelques années seulement une position dominante dans la recherche et la consultation agronomiques. L'article que voici fait une présentation succincte de quelques domaines d'application importants dans l'agronomie et les illustre à l'appui d'exemples tirés de la pratique de nos laboratoires à la Station fédérale de recherches à Wädenswil.