

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema: Sicherung der Zukunft der Landwirtschaft durch mobile, bioporengestützte, universelle Hochdurchsatzsequenzierung zur Detektion von Krankheitserregern und Parasiten der Pflanzen (AGRIFUTURE)

Zuwendungsempfänger: Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung; Prof. Dr. Marco Thines

Förderkennzeichen: Förderkennzeichen: 28A8702X19

Laufzeit: 15.02.2021-14.02.2024

Monat der Erstellung: 08/2024

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorenschaft.

Inhaltsverzeichnis

I.	Kurzbericht	1
1.	Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie der wissenschaftliche und technische Stand an den angeknüpft wurde	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.	Ablauf des Vorhabens.....	1
3.	Wesentliche Ergebnisse	Fehler! Textmarke nicht definiert.
II.	Ausführliche Darstellung der Ergebnisse	3
1.	Darstellung der erzielten Ergebnisse.....	3
2.	Erläuterung zu den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	9
3.	Erläuterung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit	9
4.	Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	11
5.	Angaben zu während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	12
6.	Angaben zu erfolgten und geplanten Veröffentlichungen nach Nr. 5 der NABF	12

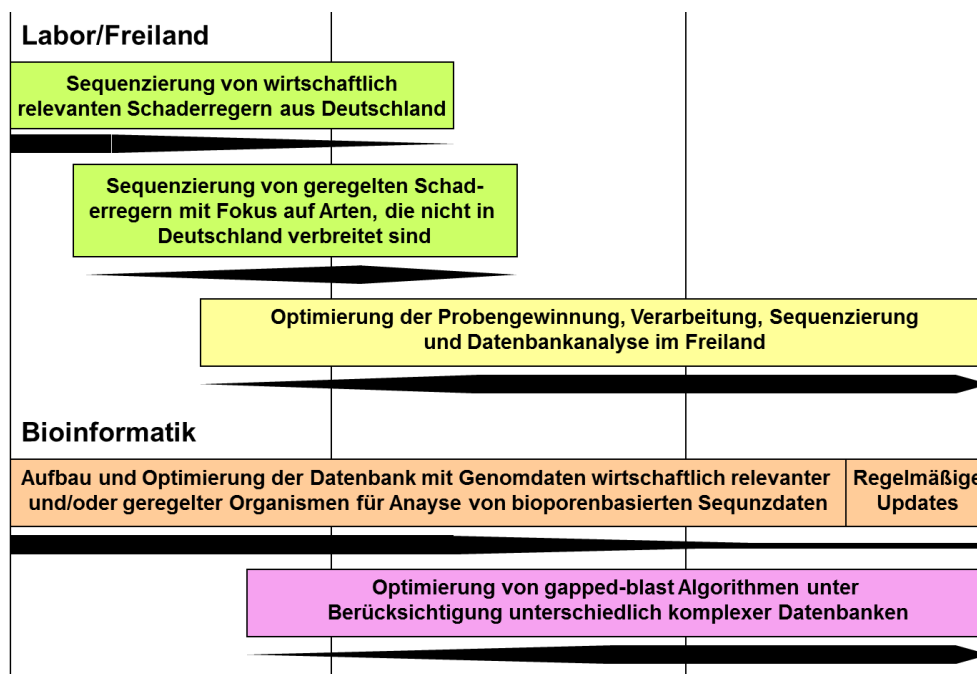
I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Die landwirtschaftliche Produktion in Deutschland wird durch eine ganze Reihe an Schadorganismen bedroht. Diese sind außerordentlich divers und beinhalten Erreger aus zahlreichen Großgruppen der Bakterien und Eukaryonten. Für eine wirkungsvolle Eindämmung von Schaderregern und eine effiziente Quarantäne, um die Einschleppung von neuen Schaderregern zu verhindern, ist eine sichere, schnelle und leicht durchzuführende Diagnose vonnöten. Dies wird jedoch erschwert durch zum Teil langwierige Aussaatversuche, sehr unterschiedliche Nachweismethoden (optisch, ELISA, PCR, qPCR, Sequenzierung, etc.) und die umfangreiche Laborausrüstung, die für die entsprechenden Nachweise benötigt wird. Hinzu kommt, dass für neu auftretende Schadorganismen oft keine adäquaten Tests zur Verfügung stehen und bei unklaren Symptomen ein Nachweis oft schwer zu führen ist. Das Projekt AGRIFUTURE hat zum Ziel, die Landwirtschaft in Deutschland langfristig zu sichern, indem es die zuvor beschriebenen Limitierungen adressiert und überwindet. Hierfür soll im Rahmen des Projektes ein im Ansatz getestetes Verfahren so weit entwickelt werden, dass es möglich ist, ohne a priori Annahmen einen Nachweis für eine beliebige Organismengruppe zu führen. Der Nachweis wird dabei mit modernster, aber robuster, portabler Technologie durchgeführt, wobei bioporen-gestützte Hochdurchsatzsequenzierung mit Datenbankanalysen kombiniert wird.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Projektlaufzeit erstreckte sich über drei Jahre. Die einzelnen Arbeitsschritte sollten dabei wie im untenstehenden Balkendiagramm zeitlich verteilt werden.



3. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projektes wurde erfolgreich eine hochmoderne Methodik entwickelt, die es ermöglicht, eine Vielzahl von Pathogenen in äußerst kurzer Zeit nachzuweisen. Zu diesem Zweck sollte intensiv mit dem Julius-Kühn-Institut zusammengearbeitet werden, da in Deutschland nur dieses

direkten Zugang zu Quarantäneschadernregern hat. Leider verlief die Zusammenarbeit nicht zufriedenstellend. Trotz mehrmaliger Anfragen, unter anderem bei einer Kontaktperson, mit der zuvor gut kooperiert wurde, wurden keinerlei Erregerstämme oder DNA von Seiten des JKI zur Verfügung gestellt. Begründet wurde das mit internen Vorbehalten beim JKI, ohne dass diese spezifiziert werden konnten. Daher waren wir bei den Sequenzierungen auf andere Partner angewiesen. So stellte beispielsweise das Westerdijk Institute aus den Niederlanden (vormals CBS), rund 200 Pathogene für die Sequenzierung zur Verfügung, auch von anderen Instituten kam Unterstützung. Dadurch konnten wir 205 Genome von ausländischen Pathogenen sequenzieren. Damit wurde das Ziel bezüglich der Pathogen Genome übertroffen, wenngleich leider wegen Zollbeschränkungen und der fehlenden Zusammenarbeit seitens des JKI kein so starker Fokus auf Quarantäneschadernreger gelegt werden konnte. Trotz dieser Hindernisse konnten die primären Ziele mit der Unterstützung anderer Institutionen vollumfänglich erreicht werden und ein Verfahren etabliert werden, das den Nachweis beliebiger Schadereger auf Basis bioporengestützter Erbgutbestimmung ermöglicht. Diese Methodik stellt einen bedeutenden Fortschritt in der biologischen Überwachung dar und basiert auf Daten von Hunderten von Genomen, sowohl aus eigener Sequenzierung als auch aus Datenbanken. Diese Genome wurden sorgfältig ausgewählt, um ein breites Spektrum an pathogenen Organismen abzudecken, die in der Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion von Bedeutung sind. Diese Genome bildeten die Grundlage für den Aufbau einer leistungsfähigen Datenbank, die umfangreiche Informationen über die Sequenzen, deren Eigenschaften und verwandte Daten speichert. Diese Datenbank ermöglicht eine schnellere Identifikation und Charakterisierung von Pathogenen über den Erbgutsequenzabgleich, was in der Praxis von entscheidender Bedeutung ist. Dafür wurde eine fortschrittliche Analysepipeline eingerichtet, die es erlaubt, die resultierenden Sequenzdaten effizient zu verarbeiten, zu analysieren und zu interpretieren. Diese Pipeline wurde so optimiert, dass sie einen nahtlosen und schnellen Zugang zu den benötigten Informationen gewährleistet.

Durch gezielte Verbesserungen der bioporenbasierten Sequenzierungstechnologie konnte die Nachweiszeit für Pathogene auf nur zwei Stunden reduziert werden. Diese rasche Reaktionszeit ist von entscheidender Bedeutung für den erfolgreichen Einsatz in kritischen Bereichen wie der Landwirtschaft, der Lebensmittelproduktion und der öffentlichen Gesundheit. Insbesondere in Situationen, in denen eine schnelle Identifikation von Bedrohungen erforderlich ist, kann diese Methodik einen erheblichen Unterschied machen. Der jetzt verfügbare Datensatz und die dazugehörige Analysepipeline stehen Fachleuten in der Pathogendiagnostik zur Verfügung und können als wertvolles Werkzeug dienen, um die Effizienz und Genauigkeit von Diagnosen zu steigern. In Zukunft wird angestrebt, die etablierte Methodik in kompakte, benutzerfreundliche Geräte zu integrieren. Solche Geräte würden den routinemäßigen Einsatz der Technologie sowohl am Zoll als auch in diagnostischen Einrichtungen erheblich erleichtern. Dies würde nicht nur die schnelle Erkennung von Pathogenbedrohungen ermöglichen, sondern auch zur Sicherheit und Gesundheit von Pflanzen und Lebensmitteln beitragen. Die Implementierung dieser Technologie in praktische Anwendungen wird eine bedeutende Verbesserung der Überwachungs- und Reaktionskapazitäten im Bereich der Phytopathologie darstellen und könnte letztlich auch dazu beitragen, die landwirtschaftliche Produktivität nachhaltig zu erhöhen.

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Der ursprüngliche Arbeitsplan umfasste fünf Pakete. Im Einzelnen war der Arbeitsplan wie folgt gegliedert.

1.1 Bioporen-gestützte Genomsequenzierung von neu auftretenden Schaderregern

In diesem Arbeitspaket sollten bis zu 100 Genome von wirtschaftlich relevanten Schaderregern sequenziert werden, die in Europa vorhanden waren. Die Priorisierung sollte in Abstimmung mit Pflanzenschutzdiensten und dem Julius-Kühn-Institut erfolgen, wobei vierteljährliche Videokonferenzen geplant waren. Die bioporen-gestützte Sequenzierung sollte damit die Detektion und das Monitoring problematischer Erreger ermöglichen. Die Sequenzierung sollte mit einer Abdeckung von 50-fach durchgeführt werden und Tools wie Canu und RACON zur Assemblierung nutzen. Die Stämme sollten von Kooperationspartnern bezogen werden. Ziel war die Ressourcenschaffung zur Datenbankerstellung (1.4).

1.2 Sequenzierung von Genomen geregelter Schaderreger mit hohem Schadpotenzial

Dieses Arbeitspaket war eng mit 4.1 verknüpft. Genome von Organismen, die noch nicht in Deutschland verbreitet waren, sollten sequenziert werden, wobei auf die Einfuhr lebender Stämme verzichtet werden sollte. DNA-Extrakte von Partnern wie USDA oder Agriculture and Agri-Food Canada sollten hierfür genutzt werden. Die Priorisierung sollte in Abstimmung mit Julius-Kühn-Instituten und Pflanzenschutzämtern erfolgen, wobei der Fokus auf Bakterien und Pilzen liegen sollte. Ziel war ebenfalls die Ressourcenschaffung zur Datenbankerstellung (1.4).

1.3 Optimierung des Workflows zur Datenerhebung bei Feldproben

Die bioporen-basierte Sequenzierung sollte portabel sein und die Probenahme direkt im Feld ermöglichen. Proben sollten mit einem portablen Probenaufschlussgerät aufbereitet werden. Das Setup sollte validiert werden, ohne mobile Geräte zu entwickeln, um die Praxisfähigkeit sicherzustellen. Nukleinsäuren sollten auf ein Gerät von Oxford Nanopore übertragen und sequenziert werden. Ziel sollte sein, den Workflow so zu optimieren, dass von der Probenahme bis zu den ersten Ergebnissen so wenig benötigt wird, dass eine Identifizierung in weniger als einem halben Tag möglich sein würde, idealerweise binnen einer Stunde. Verschiedene Faktoren wie RNA- oder DNA-Extraktion und Sequenzbibliothekserstellung sollten zudem getestet werden.

1.4 Aufbau einer erweiterten Datenbank von Schaderregergenomenen

Die Datenbank sollte mit Genomen aus öffentlichen Quellen und neuen Sequenzen aufgebaut werden. Neben Genomen sollten auch Informationen wie Herkunft und assoziierte Wirtspflanzen abgelegt werden. Unsere angestellte Bioinformatikerin sollte den Aufbau der Datenbank begleiten, die so gestaltet sein sollte, dass verschiedene Ebenen für Sequenzvergleiche genutzt werden konnten.

Ziel sollte eine kontinuierliche Integration neuer Daten zur Verbesserung der Identifikation von Schaderregern sein.

1.5 Optimierung von gapped-BLAST-Ansätzen zur Identifikation von Schaderregern

Gapped-BLAST-Ansätze sollten parametrisiert werden, um die spezifischen Anforderungen der bioporen-gestützten Sequenzierung zu erfüllen. Hierbei sollten verschiedene Schaderreger-Gruppen betrachtet werden, um sichere Identifikationsgrenzen zu ermitteln. Unsere Bioinformatikerin sollte die Optimierung begleiten, die von einer neu einzustellenden Bioinformatikerin unterstützt werden sollte. Für die Arbeitspakete 4.1-4.3 sollte eine Fachkraft für moderne Sequenziertechniken eingestellt werden, während für die Datenbankentwicklung ein wissenschaftlicher Mitarbeiter gesucht werden sollte. Zudem wurden Hilfskräfte für Routinearbeiten beantragt.

1.6 Arbeitspakete und Meilensteinerreichung in der Übersicht

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
AP 1 Bioporen-gestützte Genomsequenzierung der in Deutschland wirtschaftlich relevantesten Schaderreger	03/2021 bis 09/2022	Das Ziel wurde übertroffen, statt der geplanten „bis zu 100 Genome“ wurden insgesamt 190 Schaderregergenome sequenziert.
AP 2 Bioporen-gestützte Sequenzierung von bis zu 100 Genomen von geregelten Schaderregern die noch nicht in Deutschland verbreitet sind, aber ein hohes Schadpotenzial haben	06/2021 bis 12/2022	Leider verlief die Zusammenarbeit mit dem JKI ausgesprochen schlecht. Trotz mehrmaliger Anfragen bei der Kontaktperson, mit der ich zuvor gut kooperiert habe, wurden keinerlei Erregerstämme oder DNA von Seiten des JKI zur Verfügung gestellt. Begründet wurde das mit internen Vorbehalten beim JKI, ohne dass diese spezifiziert werden konnten. Daher waren wir bei den Sequenzierungen auf andere Partner angewiesen. So stellte beispielsweise das Westerdijk Insitute aus den Niederlanden (vormals CBS), rund 200 Pathogene für die Sequenzierung zur Verfügung, auch von anderen Instituten kam Unterstützung. Dadurch konnten wir 205 Genome von ausländischen Pathogenen durchführen. Damit wurde das Ziel bezüglich der Pathogen Genome übertroffen, wenngleich leider wegen Zollbschränkungen und der fehlenden Zusammenarbeit seitens des JKI kein Fokus auf Quarantäneschaderrreger gelegt werden konnte.
AP 3 Optimierung eines mobilen Workflows zur Aufarbeitung,	09/2021 bis 02/2024	Es wurden sämtliche Laborverfahren vollständig entwickelt und in die Anwendung übertragen. Eine Sequenzierung im Feld wurde durchgeführt. Dabei wurde die nächste Generation der ONT

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
Sequenzierung und Analyse von Feldproben		Flowcell-Technologie und Chemie (V14), die seit 2023 die ältere Technologie (Kit 9 und Kit 10) abgelöst hat, getestet und validiert. Die neue Technologie hat eine reduzierte Fehlerrate und ermöglichte daher eine noch präzisere Pathogenidentifikation. Die mobile Sequenzierung konnte vollumfänglich umgesetzt werden und die angestrebte Detektion von Pathogenen in weniger als zwei Stunden Bearbeitungszeit wurde erreicht.
AP 4 Aufbau einer beliebig erweiterbaren Datenbank von Schaderregern	03/2021 bis 02/2024	Die Sequenzdatenbanken wurden vollständig aufgebaut und validiert. Durch eine Infrastrukturförderung konnten diese bereits auf einem Server implementiert werden und stehen unter http://agrifuture.senckenberg.de öffentlich zur Verfügung.
AP 5 Optimierung von gapped-BLAST Ansätzen zur Identifikation von Schaderregern	01/2022 bis 02/2024	Durch die Verbesserung der Datenbankstruktur und Innovationen bei Suchalgorithmen, die um ein mehrfaches schneller sind als die zuvor verwendeten automatisierten BLAST Analysen war es möglich, sämtliche Komplexitätsstufen und Organismengruppen mit einer Applikation abzubilden respektive nachzuweisen. Dadurch wurden alle Ziele in diesem Bereich erreicht, mit einer höheren Effizienz als dies durch gapped BLAST möglich gewesen wäre.

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	Fälligkeit (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
M 1 (50) und M 2 (100) Genome für in Deutschland relevante neue Schaderreger liegen vor, davon mindestens 20/50 selbst sequenziert.	09/2021 und 11/2023	Beide Meilensteine konnten wie geplant erreicht werden.
M 3 100 Genome in Deutschland nicht verbreiteter, geregelter Schaderreger liegen vor, davon min. 50 selbst sequenziert.	01/2024	Es wurden mehr als 200 Genome von in Deutschland nicht verbreiteten Pathogenen sequenziert werden. Dadurch konnte der Meilenstein quantitativ erreicht werden, wegen fehlender Zusendung von DNA / Stämmen seitens des JKI konnten aber weniger geregelte Arten sequenziert werden als ursprünglich geplant.

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	Fälligkeit (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
M 4 Verarbeitung von Proben bis zur Sequenzierung in weniger als einer Stunde	12/2022	Der Meilenstein konnte wie geplant erreicht werden.
M 5 Detektion und Bestimmung von Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilze) aus Feldproben in weniger als zwei Stunden	02/2024	Dieser wohl wichtigste Meilenstein konnte wie geplant erreicht werden.
M 6 Datenbank mit verfügbaren Genomen bestückt (min. 50)	12/2022	Der Meilenstein konnte wie geplant erreicht werden.
M 7 Datenbanken mit mindestens drei Komplexitätsstufen (komplette Genome, ohne Redundanz, kodierende Bereiche) für mindestens 200 Genome einsatzbereit	02/2023	Der Meilenstein konnte wie geplant erreicht werden. Später konnte das Verfahren durch Innovationen bei Sequenzsuchalgorithmen und Sequenzierertechnologie so verbessert werden, dass eine Differenzierung in unterschiedlichste Komplexitätsstufen nicht mehr nötig war.
M 8 (Komplexitätsstufen) und M9 (Organismengruppen) Identifikations- Algorithmen für optimiert	10/2023 und 02/2024	Durch die Optimierung der Sequenzabgleichsalgorithmen gekoppelt mit Innovationen in der Sequenzierertechnologie wurde eine gestaffelte Optimierung unnötig, es konnte dadurch der Fokus darauf gerichtet werden, den Gesamtalgorithmus zu verbessern, wodurch die Detektion schneller und genauer wurde, als es zuvor mit spezialisierten Algorithmen möglich gewesen wäre. Der Meilenstein konnte somit erreicht werden.

1.7 Detaillierte Darstellung des Ablaufs und Abweichungen vom ursprünglichen Arbeitsplan

Arbeitspakete 1 und 2 zu Grundziel 1: Bioporen-gestützte Genomsequenzierung von neu in Deutschland auftretenden Schaderregern und zu Grundziel 2: Bioporen-gestützte Sequenzierung von bis zu 100 Genomen von geregelten Schaderregern unterschiedlicher, die noch nicht in Deutschland vorhanden sind:

- Insgesamt wurden 190 Genome von Schaderregern sequenziert, die bislang nicht in Datenbanken vertreten waren.
- Die neuen Genome wurden der Pathogendatenbank hinzugeführt, zusätzlich wurden die in GenBank neu eingestellten Genome ergänzt. Die Datenbank konnte dadurch mit weit über 6000 Genomen relevanter Schaderreger bestückt werden, die zu mehr als 300 Arten gehören und kann jederzeit um neue Schaderreger ergänzt werden. Dies war deutlich mehr, als wir bei der Antragstellung glaubten, erfüllen zu können. Wir waren damals von weniger als 100 Arten ausgegangen.
- Leider verlief die Zusammenarbeit nicht zufriedenstellend. Trotz mehrmaliger Anfragen, unter anderem bei einer Kontaktperson, mit der zuvor gut kooperiert wurde, wurden keinerlei Erregerstämme oder DNA von Seiten des JKI zur Verfügung gestellt. Begründet wurde das mit internen Vorbehalten beim JKI, ohne dass diese spezifiziert werden konnten. Daher waren wir bei den Sequenzierungen auf andere Partner angewiesen. So stellte beispielsweise das Westerdijk Institute aus den Niederlanden (vormals CBS), rund 200 Pathogene für die Sequenzierung zur Verfügung, auch von anderen Instituten kam Unterstützung. Dadurch konnten wir 205 Genome von ausländischen Pathogenen sequenzieren. Schwerpunkte wurden dabei auf die Gattungen *Fusarium* und *Phytophthora* gelegt, da diese zahlreiche Arten beinhalten, die mit herkömmlichen Methoden nur sehr schwer nachzuweisen und zu bestimmen sind, obgleich diese von globaler Bedeutung sind. Aufgrund quarantänerechtlicher Hürden konnten allerdings keine Quarantäneschaderreger von ausländischen Kooperationspartnern eingeführt werden. Dass das JKI keine DNA oder inaktivierte Kulturen von Quarantäneschaderregern zur Verfügung gestellt hat, führte daher zu einer erheblichen Schwächung des Projekts. Die Ziele, die wir selbst in der Hand hatten wurden allerdings sämtlich erreicht, bzw. übererfüllt.
- Abgesehen von den genannten Schwierigkeiten wurden **die Meilensteine 1-3 erreicht**, wenngleich für MS3 überwiegend auf Pathogene in Datenbanken zurückgegriffen werden musste.

Arbeitspaket 3 zu Grundziel 3: Optimierung der Datenerhebung und des Workflows zur Aufarbeitung, Sequenzierung und Analyse von Feldproben:

- Es wurden sämtliche Laborverfahren vollständig entwickelt und in die Anwendung übertragen. Eine Sequenzierung im Feld wurde durchgeführt. Dabei wurde die nächste

Generation der ONT Flowcell-Technologie und Chemie (V14), die seit 2023 die ältere Technologie (Kit 9 und Kit 10) abgelöst hat, getestet und validiert. Die neue Technologie hat eine reduzierte Fehlerrate und ermöglichte daher eine noch präzisere Pathogenidentifikation. Die mobile Sequenzierung konnte vollumfänglich umgesetzt werden. Alle benötigten Utensilien können in einen gut tragbaren Metallkoffer untergebracht werden (ca. 12 kg Gewicht), das benötigte Laptop kann in einem Rucksack getragen werden. Das System ist also vollständig portabel.

- Die angestrebte Detektion von Pathogenen in weniger als zwei Stunden Bearbeitungszeit wurde erreicht.
- Insgesamt konnten **Meilensteine MS4 und MS5 damit vollumfänglich erreicht werden.**

Arbeitspaket 4 zu Grundziel 4: Aufbau einer öffentlich zugänglichen, beliebig erweiterbaren Datenbank von Schaderregern:

- Die Sequenzdatenbanken aufgebaut und validiert. Durch eine Infrastrukturförderung konnten diese bereits auf einem Server implementiert werden und stehen unter <http://agrifuture.senckenberg.de> öffentlich zur Verfügung. Meilensteine MS6 und MS7 konnten daher vollumfänglich erreicht werden.

Arbeitspaket 5 zu Grundziel 5: Optimierung von gapped-BLAST Ansätzen zur Identifikation von Schaderregern:

- Eine optimierte Pipeline konnte fertiggestellt werden und steht unter https://github.com/SteveKnobloch/RAPiD_pipeline zum Herunterladen und Nutzen zur Verfügung. Zusätzlich zur Cloud-basierte Analyse-Pipeline wurde eine zweite Pipeline zur allgemeinen Untersuchung der Sequenzdaten in die Webapplikation mit eingebunden („Minimizer sampling“ Abgleichungen gegen einen Suchindex des gesamten NCBI „nucleotide database“). Dies hat den Vorteil, dass auch Schadorganismen ohne Referenzgenom in höhere taxonomische Gruppen einklassifiziert werden können. Dies ermöglicht es, Pathogene ohne Referenzgenom zumindest zu klassifizieren und dadurch neu auftretende Pathogene in ansosnten gut untersuchten Gruppen rasch auszumachen. Dadurch wurden **Meilensteine MS6 und MS7 erreicht.**
- Durch die Verbesserung der Datenbankstruktur und Innovationen bei Suchalgorithmen, die um ein mehrfaches schneller sind als die zuvor verwendeten automatisierten BLAST Analysen war es möglich, sämtliche Komplexitätsstufen und Organismengruppen mit einer Applikation abzubilden respektive nachzuweisen. Durch diese Innovationen wurden **Meilensteine MS8 und MS9 erreicht**, ohne dass weitere Anpassungen vorgenommen werden mussten.

Insgesamt wurden somit alle wesentlichen Ziele erreicht und meist deutlich übererfüllt, da während des Projektverlaufs verbesserte Lösungen aufgrund von Fortschritten bei der Sequenzierung erarbeitet werden konnten.

2. Erläuterungen zu den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Im Rahmen des Projekts wurden folgende zentrale Positionen besetzt und Sachmittel eingesetzt, die im nachfolgenden Bericht detailliert erläutert werden. Die wichtigsten Positionen und deren Nutzung sind wie folgt zusammengefasst:

1. Position 0812 - Personalkosten für Postdocs

Es wurde ein Postdoc im Zeitraum vom 01.07.2021 bis 14.02.2024 eingestellt. Aufgrund einer neuen Anstellung an einer anderen Universität hat er das Projekt vorzeitig zum 31.07.2024 verlassen. Um den Projektabschluss zu unterstützen, wurde ab dem 01.07.2023 ein anderer Postdoc anteilig (50 % Arbeitszeit) als Ersatz eingestellt, seine Anstellung lief bis zum 13.02.2024. Diese Personalbesetzung stellte sicher, dass alle wissenschaftlichen und technischen Anforderungen während des gesamten Projektzeitraums erfüllt wurden und der Übergang reibungslos verlief.

2. Position 0817 - Personalkosten für Bioinformatikerin

Eine Bioinformatikerin über diese Position beschäftigt, anfangs mit einem Stellenanteil von 75 %, der später auf 50 % reduziert wurde (TV-H, E 11).

3. Position 0843 - Sachmittel für Sequenzierungsmaterialien

Im Rahmen dieser Position wurden Sachmittel in Höhe von insgesamt 49.985,89 EUR bereitgestellt. Diese Kosten umfassten notwendige Materialien für die Sequenzierung, darunter Labormaterialien, Flow Cells und verschiedene Kits von Nanopore. Diese Materialien ermöglichten die Erhebung und Bearbeitung von Proben und stellten die Basis für die Durchführung der geplanten Sequenzierungen dar.

4. Position 0850 - Eppendorf epMotion 5073t und Zubehör

Diese Position umfasste die Beschaffung eines Eppendorf epMotion 5073t, eines vollautomatischen Liquid-Handling-Roboters. Der Roboter war von entscheidender Bedeutung für die Automatisierung der DNA-Aufreinigung und der Erstellung von Sequenzierungsbibliotheken. Auch wurden notwendige Zusatzmaterialien für die Inbetriebnahme des Geräts und den kontinuierlichen Betrieb innerhalb des Projekts finanziert.

2. Erläuterungen zur Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit

Die geleistete Projektarbeit zur Bioporen-gestützten Genomsequenzierung und zur Optimierung der Pathogenidentifikation war vor dem Hintergrund der zunehmenden Globalisierung und dem damit verbundenen Risiko der Einschleppung neuer Schaderreger von hoher Notwendigkeit und daher eine Projektförderung in diesem Bereich eine angemessene Maßnahme um dieser Bedrohung entgegenzuwirken. Die Bedrohung durch neu auftretende Schadorganismen erfordert zunehmend schnelle und präzise Methoden zur Identifikation und Analyse dieser Pathogene, da insbesondere

agrarökonomisch relevante Kulturen gefährdet sind. Durch die umfassende Sequenzierung von zahlreichen Genomen, die bisher nicht in Datenbanken erfasst waren, und die Erweiterung der Pathogendatenbank auf über 6.000 Genome, wurde ein wertvoller Beitrag zur Schaffung einer soliden Datenbasis geleistet. Die erhöhte Zahl sequenzierter Genome – weit über den ursprünglichen Plan hinaus – unterstreicht das Engagement und den wissenschaftlichen Fortschritt, der durch das Projekt erzielt wurde.

Trotz Schwierigkeiten bei der Zusammenarbeit mit dem JKI und der damit verbundenen Einschränkungen im Zugang zu Proben und DNA von Quarantäneschadorganismen konnte das Projekt die geplanten Ziele erreichen und sogar übertreffen. So wurden von anderen internationalen Partnern, wie dem Westerdijk Institute, über 200 Pathogene zur Verfügung gestellt. Der dabei vorgenommene Fokus auf die Gattungen *Fusarium* und *Phytophthora* ist besonders wertvoll, da diese Gruppen global von hoher Relevanz sind und aufgrund ihrer komplexen Genomstruktur und dynamischen Evolutionsgeschichte schwer zu identifizieren sind. Hierdurch wurde das Projektziel, schwer nachweisbare Pathogene umfassend zu sequenzieren und identifizierbar zu machen, voll erfüllt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung einer Methodik, die Pathogenidentifikationen direkt im Feld ermöglicht. Dies wurde mit der Implementierung neuer ONT MinION Flowcell-Technologie und einer mobilen Laborausstattung, die in einen einzelnen Metallkoffer passt, erfolgreich realisiert. Die Möglichkeit, Pathogene innerhalb von weniger als zwei Stunden zu detektieren, stellt eine wesentliche Optimierung dar, die besonders in akuten Schadensfällen von hoher Relevanz ist. Die Technologie ist vollständig mobil und anwenderfreundlich gestaltet, was ihre Anwendung in der Praxis erleichtert.

Zudem ist die Schaffung öffentlich zugänglicher Genomressourcen ein bedeutender Schritt hin zur Erhöhung der Transparenz und des Wissensaustauschs. Diese frei zugängliche Ressource ermöglicht es Forschern und Praktikern weltweit, die gewonnenen Erkenntnisse zu nutzen. Implementierung innovativer Algorithmen in der Analysepipeline ermöglicht eine schnelle und sichere Identifikation von Pathogenen. Durch die Einbindung dieser Pipeline in eine Webanwendung, die durch zusätzliche Förderung ermöglicht wurde, konnte die Datenverarbeitung zusätzlich vereinfacht und beschleunigt werden. Diese Fortschritte und Innovationen spiegeln die Angemessenheit der Projektarbeit wider und zeigen, wie die verbesserten Arbeitsabläufe und Technologien zu einer erfolgreichen Umsetzung der gesetzten Ziele geführt haben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Projektarbeit nicht nur die gesetzten Ziele erfüllt, sondern diese in wesentlichen Bereichen auch übertroffen hat. Die entwickelten und optimierten Methoden bieten einen erheblichen Mehrwert für das Management und die Kontrolle von Schadorganismen und leisten einen entscheidenden Beitrag zur modernen Phytopathologie.

4. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Es soll kein Patent oder Schutzrecht angemeldet werden, da das Verfahren zum Wohle der Menschheit angewendet werden sollte, was durch entsprechende Anmeldungen erschwert würde.

b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Ergebnisse des Projektes können genutzt werden, um mit kommerziellen Partnern ein integriertes Gerät zu entwickeln, das die Arbeitsschritte bis zur Sequenzierung erheblich erleichtert und dadurch einen Einsatz durch beliebigen Personen mit nur geringen Kenntnissen in Molekularbiologie nach kurzer Schulung ermöglicht. Die nötige Entwicklungszeit beträgt 3-4 Jahre.

c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Im Laufe des Projekts wurde die Basis für einen technischen und wissenschaftlichen Erfolg der Methode gelegt. Wenn eine weitere Förderung zur Entwicklung eines integrierten Gerätes erfolgen würde, bestehen gute Aussichten, dass die Technologie in 3-5 Jahren zur Routinemäßigen Anwendung am Zoll oder in Landwirtschaftsbehörden eingesetzt werden kann.

d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Das Verfahren wird im Rahmen eines Leibniz-Labs zu „Pandemic Preparedness“ der Leibniz Gemeinschaft zum Einsatz kommen, das sich zum Ziel gesetzt hat, bei künftigen Pandemien rascher einsatzfähig zu sein und effiziente Gegenmaßnahmen einleiten zu können. Wie bereits erwähnt würde die Entwicklung eines integrierten Gerätes auf der Basis der validierten Methode einen gewaltigen Vorteil in der Pathogendiagnostik bringen, die auch auf Krankheitserreger beim Menschen ausgeweitet werden könnte. Hier böte sich auch für Diagnostikfirmen eine gute Möglichkeit, um optimierte integrierte Geräte auf den Markt zu bringen, der potenziell gewaltig ist und auch Arztpraxen und Krankenhäuser umfasst.

5. Angaben zu während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Seit Projektbeginn sind von dritter Seite keine neuen FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind.

Das Patent “CN114707559A Rapid pathogen classification method and system based on nanopore electric signals” scheint im Konflikt zum bearbeiteten Projekt zu stehen, da wir jedoch eine computergestützte Analyse verwenden und die Anwendung der Sequenzierertechnologie für die Pathogendetektion bereits vor der Patentanmeldung mehrfach proklamiert worden ist, gibt es hier keine Schutzrechtlichen Bedenken.

6. Angaben zu erfolgten und geplanten Veröffentlichungen nach Nr. 5 der NABF

Das Verfahren ist zur Publikation in der internationalen Fachzeitschrift PeerJ eingereicht worden und wurde dort nach geringen Änderungen akzeptiert. Die Veröffentlichung ist mittlerweile unter dem Titel „RAPiD: A rapid and accurate plant pathogen identification pipeline for on-site nanopore sequencing“ erfolgt. Der Link zum Abrufen der Publikation ist <https://doi.org/10.7717/peerj.17893>.

Die Publikation mehrerer Genome von *Fusarium* ist mittlerweile eingereicht, und steht nach einer Revision nun kurz vor der Akzeptanz durch die Fachzeitschrift *Mycological Progress*. Es werden voraussichtlich in den nächsten 12 Monaten weitere Publikationen zu *Fusarium*, *Phytophthora* und anderen pflanzenpathogenen Gattungen folgen.