Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

Thema:

Etablierung einer dihaploiden Stärkekartoffelzüchtung und Optimierung der nachhaltigen Rohstoffnutzung (»EDISON«)

Zuwendungsempfänger:

Teilvorhaben 1: Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion GmbH & Co. OHG

Teilvorhaben 2: Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Oekologie (IME)

Teilvorhaben 3: Emsland-Stärke GmbH

Förderkennzeichen:

Teilvorhaben 1: 2220NR065A

Teilvorhaben 2: 2220NR065B

Teilvorhaben 3: 2220NR065C

Laufzeit:

01.10.2020 bis 31.12.2023

Datum der Veröffentlichung:

25.07.2024

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. Aufgabenstellung 1
2. Planung und Ablauf des Vorhabens 1
3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse 1
   a) Arbeitspakete und Meilensteine 1
   b) Zusammenfassung 5

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse 6

1. Erzielte Ergebnisse 6
   Arbeitspaket 1: Erstellung diploider Zuchtklone für Stärkequalitäten, Leistung und Resistenz 6
   Arbeitspaket 2: Überwinden der Selbstinkompatibilität 8
   Arbeitspaket 3: Screening der tetraploiden TILLING-Populationen nach Mutationen in GAME4 und GAME9 und Untersuchung der natürlichen Variation 11
   Arbeitspaket 4: Feldprüfungen 16
   Arbeitspaket 5: Stärke- und Proteinanalytik 17
   Arbeitspaket 6: Aufbau einer Datenbank für die diploide Sortenzüchtung 22
2. Verwertung 22
   a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen 22
   b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende 22
   c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende 23
   d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit 23
3. Erkenntnisse von Dritten 24
4. Veröffentlichungen 25

ANHANG 26

Teilvorhaben 1: Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion GmbH & Co. OHG, FKZ 2220NR065A 26

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens 26
2. Bearbeitete Arbeitspakete (Details siehe gemeinsamer Abschlussbericht) 26
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens Details siehe gemeinsamer Abschlussbericht 27

Teilvorhaben 2: Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Oekologie IME, FKZ2220NR065B 29

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens 29
2. Bearbeitete Arbeitspaket 29
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens *(Details siehe gemeinsamer Abschlussbericht unter: II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse)* 29

Teilvorhaben 3: Emsland-Stärke GmbH, FKZ2220NR065C 31

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens 31
2. Bearbeitete Arbeitspakete 31
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens 31

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Der Fortfall von Subventionen, sich ändernde klimatische Bedingungen und die Reduktion von Wirkstoffen der Agrochemie stellen die Kartoffelstärkeproduktion vor immer neue Herausforderungen. Dies erfordert stete Innovationen im Bereich der Pflanzenzüchtung und den nachgelagerten Bereichen der Stärkeisolierung und Applikation. Zudem soll aus Gründen des Klimaschutzes der Energiebedarf (CO_2-*footprint)* beim Anbau dieser Sorten und der Verwertung der Inhaltsstoffe minimiert werden. Die Züchtung von Spezialstärke-Sorten ermöglicht es, dass Aufreinigungsschritte und chemische Modifikation entfallen. Da es bei der Züchtung auf rezessive Merkmale in der tetraploiden Kartoffel zu sehr langen Züchtungszeiträumen und einem hohen Aufwand im Züchtungsbereich kommt, sollte im vorliegenden Projekt »EDISON« eine Züchtung auf diploidem Ploidieniveau in Kartoffeln etabliert werden mit folgenden technischen Arbeitszielen:

Ziel 1: Reduktion des Chromosomensatzes von (2n=4x) auf (2n=2x)

Ziel 2: Überwindung der gametophytischen Selbstinkompatibilität (GSI)

Ziel 3: Erhöhung der Wertschöpfung durch die Qualitätssteigerung der Inhaltsstoffe

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt »EDISON« erforderte umfängliche Planung- und Koordinationsarbeiten, da beim Züchter das Ausgangsmaterial für die umfänglichen Prüfungen erstellt, phänotypisiert, verteilt und erhalten werden musste sowie die Entscheidungen für die Selektion aufgrund der im Konsortium ermittelten Ergebnisse getroffen wurden.

Die Koordination der Arbeiten erfolgte auf Einladung von BNA in Videokonferenzen, in denen Ergebnisse vorgestellt und die weiteren Arbeiten diskutiert und protokolliert wurden. Die Videokonferenzen wurden durch jährliche Projekttreffen ergänzt, die während der Corona-Pandemie ebenfalls online stattfanden. Auf diese Weise wurden alle anstehenden Arbeiten sehr gut zeitlich aufeinander abgestimmt und der reibungslose Ablauf des Projekts gewährleistet.

3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse

a) Arbeitspakete und Meilensteine

Arbeitspakete (AP) **(lt. Planung im Antrag)**	**Bearbeitungszeitraum** **(lt. Balkenplan im Antrag)**	**Zielerreichung**
AP 1.1 Auskreuzen von EMS-Erbgut von Chromosomen mit inaktiven Allelen	10/2020 bis 06/2023	Kreuzungen zur Reduktion von EMS-Erbgut wurden durchgeführt, das Ziel wurde erreicht.
AP 1.2 Ploidie-Reduktion von Klonen mit inaktiven Allelen durch Kreuzung mit *S. phureja*	10/2020 bis 06/2023	Es wurden Samen ohne roten Samenpunkt von Reduktionskreuzungen in der Gewebekultur angezogen, die Ploidie bestimmt und zur Knollenproduktion ins Gewächshaus gepflanzt. Die produzierten Knollen wurden 2023 als Einzelpflanzen im Feld bonitiert, das Ziel wurde erreicht
AP 1.3 Ploidie-Reduktion von Leistungsklonen durch Kreuzung mit *S. phureja,* Verwandtschaftsanalyse	10/2020 bis 06/2023	In den Jahren 2020 und 2021 wurden Elitezuchtklone mit *S. phureja* gekreuzt. Eine Verwandtschaftsanalyse wurde durchgeführt, das Ziel wurde erreicht.
AP 2.1 Identifizierung von S-RNAsen und Bestimmung von Kompatibilitäts-klassen	10/2020 bis 12/2023	
AP 2.1.1 Bestimmung der Allel-zusammensetzung der in Blüten exprimierten S-Allele im di- und tetraploiden Zuchtmaterial	04/2021 bis 09/2023	Die RNAseq-Analyse beim Unterauftragnehmer eurofins Genomics wurde durchgeführt und die Sequenzdaten ausgewertet. Das Ziel wurde erreicht.
AP 2.1.2 Untersuchung zur Kombinierbarkeit unterschiedlicher S-Allele und Markerentwicklung	03/2021 bis 09/2023	Aufgrund der RNAseq-Daten wurden 2023 Kreuzungen von diploiden Klonen zur

Arbeitspakete (AP) **(lt. Planung im Antrag)**	**Bearbeitungszeitraum** **(lt. Balkenplan im Antrag)**	**Zielerreichung**
		Untersuchung der vorausgesagten Kompatibilität durchgeführt. Das Ziel wurde noch nicht erreicht.
AP 2.2 Einkreuzen von SLI aus *S. chacoense* bzw. homologer Gene aus *S. phureja, S. stenotomum* ssp. *goniocalyx*, 2n-Gameten	03/2021 bis 09/2023	Die Veröffentlichung von Clot *et al*. (2020) und Kaiser *et al*. (2021) identifizieren in amerikanischen Sorten einen SLI-Haplotyp auf Chromosom 12, der mit einer Selbstkompatibilität korreliert. Die Marker wurden zur Testung des diploiden Zuchtmaterial verwendet. Das Ziel wurde erreicht
AP 2.3 Entwicklung diagnostischer Marker für das SLI-Gen und Gegenselektion *S. chacoense*-Erbgut		
AP 3.1 Bestimmung der Sequenzvariabilität von TGA-Biosynthesegenen	10/2020 bis 03/2021	Ein Öko-TILLING zur Bestimmung der Variabilität der Zielgene wurde durchgeführt. Das Ziel wurde erreicht
AP 3.2 Anzucht der TILLING-Populationen aus Knollen und Blatternte zur DNA-Isolierung	10/2020 bis 06/2022	Die TILLING-Populationen wurden angezogen, die Blätter geerntet und DNA isoliert. Bis zum Projektende wurden die Knollen bei 4°C gelagert. Das Ziel wurde erreicht
AP 3.3 Screening der TILLING-Population für TGA-Defektmutanten	01/2021 bis 12/2022	Das Screening der TILLING-Populationen wurde durchgeführt. Das Ziel wurde erreicht
AP 3.4 NGS der Kandidatengene		
AP 3.5 Aufnahme von Kandidatenklonen in die Gewebekultur	03/2022 bis 06/2023	Kandidatenklone mit Defektmutationen wurden erfolgreich in die Gewebekultur aufgenommen. Das Ziel wurde erreicht
AP 4.1 Leistungsprüfung vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien	10/2020 bis 09/2021	Von den aus HATZ vorhandenen 8 primärdihaploiden Klonen konnten nur von zwei Linien Knollen produziert werden. Beide Linien konnten aufgrund der hohen Virusanfälligkeit nicht für eine weitere Leistungsprüfung vermehrt werden. Zudem stellte sich der Klone 37a15 als tetraploid heraus. Das Ziel eine zweijährige Prüfung wurde nicht erreicht.
AP 4.2 Leistungsprüfungen tetraploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien und Linien mit neuen Allelkombinationen inaktiver Allele	10/2020 bis 09/2023	Das Ziel wurde erreicht
AP 4.3 Anbau von diploiden und tetraploiden Leistungssorten	10/2020 bis 09/2023	Lieferung von Knollen an Emsland-Stärke, Blatternte für die DNA-Isolierung und Lieferung an Fraunhofer IME für Öko-TILLING. Das Ziel wurde erreicht
AP 5.1.1 Stärkeanalyse vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien	10/2021 bis 12/2021	Von den aus HATZ vorhandenen 8 primärdihaploiden Klonen konnten nur von zwei Linien Knollen produziert werden (siehe AP4.1). Von diesen beiden Genotypen konnte von der gewonnenen Stärke der Amylosegehalt, die Viskosität, die Partikelgrößenverteilung sowie die Lagerstabilität und die Klarheit der Stärkegele bestimmt werden. Das Ziel einer zweijährigen Prüfung wurde nicht erreicht.
AP 5.1.2 Stärkeanalyse tetraploider HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS^2-Linien	10/2021 bis 12/2023	Von den gelieferten Genotypen konnte von der gewonnenen Stärke der Amylosegehalt, die Viskosität, die Lagerstabilität und die Klarheit der Stärkegele bestimmt werden. Das Ziel wurde erreicht.
AP 5.1.3 Stärkeanalyse von tetraploiden Leistungssorten		Bestimmung der Trockensubstanz und des Stärkegehalts im hergestellten Reibsel. Das Ziel wurde erreicht.
AP 5.2.1 Etablierung neuer Techniken zur quantitativen Proteinanalytik	01/2021 bis 06/2022	Etablierung der HPLC-GPC-Technologie zur Bestimmung der Molekülgrößenverteilung im Kartoffelprotein.

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	**Bearbeitungszeitraum** (lt. Balkenplan im Antrag)	**Zielerreichung**
		Die Methodenentwicklung für die Gel-Permeations-Chromatografie zur Messung der löslichen Proteine wurde durchgeführt. Das Ziel wurde erreicht.
AP 5.2.2 Proteinanalyse vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien	10/2021 bis 12/2021	Von den aus HATZ vorhandenen 8 primärdihaploiden Klonen konnten nur von zwei Linien Knollen produziert werden (siehe AP4.1). Von diesen beiden Genotypen konnte der Protein- und Glykoalkaloidgehalt im Reibsel und die Molekülgrößenverteilung mittels HPLC-GPC ermittelt werden. Das Ziel einer zweijährigen Prüfung wurde nicht erreicht.
AP 5.2.3 Proteinanalyse tetraploider HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS^2-Linien	01/2021 bis 12/2023	Von den gelieferten Klonen wurde der Protein- und Glykoalkaloidgehalt im Reibsel bestimmt; die Molekülgrößenverteilung wurde mittels HPLC-GPC im Kartoffelfruchtwasser gemessen. Das Ziel wurde erreicht.
AP 5.2.4 Proteinanalyse von tetraploiden Leistungssorten	01/2021 bis 12/2023	Von den gelieferten Klonen wurde der Proteingehalt im Reibsel bestimmt; der Glykoalkaloidgehalt und die Molekülgrößenverteilung wurden im Kartoffelfruchtwasser gemessen. Das Ziel wurde erreicht.
AP 6 Aufbau einer Datenbank für die diploide Sortenzüchtung	10/2020 bis 09/2023	Es wurde eine diploide Zuchtdatenbank auf Basis von eBrida im Testmodus etabliert.

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	**Fälligkeit** (lt. Balkenplan im Antrag)	**Zielerreichung**
MI.1-1 Kreuzungen R148, B331, B309 mit Leistungsklonen sind durchgeführt.	Q3/2021	Ziel erreicht
MI.1-2 Rekombinationsanalysen sind durchgeführt	Q3/2022	Ziel teilweise erreicht, wird weiterbearbeitet
MI.2-1 Kreuzungen mit *S. phureja* sind durchgeführt	Q3/2021	Ziel erreicht
MI.2-2 Samen ohne roten Embryopunkt wurden angezogen	Q3/2022	Ziel erreicht
MI.3-1/MI.3-2/MI.3-4 Kreuzungen zur Ploidiereduktion von Leistungsklonen wurden durchgeführt	Q3/2021 Q3/2022 Q3/2023	Ziel erreicht
MI.3-3/MI.3-5 Samen ohne roten Embryopunkt wurden angezogen	Q3/2022 Q2/2023	Ziel erreicht
MI.3-6 Verwandtschaftsanalysen wurden etabliert	Q3/2021	Ziel erreicht
MII.1-1 Pistille sind geerntet	Q3/2021	Ziel erreicht
MII.1-2 RNAseq-Analyse ist abgeschlossen	Q3/2021	Ziel erreicht
MII.1-3 DNA-Marker wurden etabliert (S-RNAsen)	Q2/2023	Ziel teilweise erreicht, wird weiterbearbeitet.
MII.1-4 direkte & reziproke Kreuzungen männlich fertiler DH-Klone sind durchgeführt	Q3/2021	Ziel teilweise erreicht, wird weiterbearbeitet.
MII.1-5 Kreuzungen von männl. fertilen mit männl. infertilen DH-	Q3/2022	Ziel teilweise erreicht, wird weiterbearbeitet.

Meilensteine (M) **(lt. Planung im Antrag)**	**Fälligkeit** **(lt. Balkenplan im Antrag)**	**Zielerreichung**
Klonen ist erfolgt		
MII.2-1 Kreuzungen von *S. chacoense* mit *S. tuberosum* sind durchgeführt	Q3/2021	Ziel erreicht
MII.2-2 Sämlinge wurden angezogen, Knollen sind geerntet	Q4/2022	Ziel erreicht
MII.2-3 Feldramsch ist geerntet	Q4/2023	Ziel erreicht
MII.3-1 KASP-Marker sind ausgewählt und etabliert	Q3/2021	Ziel erreicht
MII.3-2 Marker für den Kandidaten auf Chr.XII (HAT-B) sind entwickelt	Q3/2021	Aufgrund der Klonierung des SLI-Locus auf Chr.12 wurden diese Arbeiten nicht durchgeführt. Stattdessen wurden Marker für SLI entwickelt und sowohl im tetraploiden als auch im diploiden Zuchtpool angewendet.
MIII.1-1 Die Sequenzvariabilität der Zielgene ist bekannt	Q1/2022	Ziel erreicht
MIII.2-1 2 Populationen á 1.500 TILLING-Klone wurden angezogen	Q2/2022	Ziel erreicht
MIII.3-1 Pools wurden erstellt	Q3/2021	Ziel erreicht
MIII.4-1 Die 1. Population á 1500 Klone ist analysiert	Q4/2022	Ziel erreicht
MIV.1-1 Pflanzgut der dihaploiden HAP-, HAP-PLUS-Linien liegen vor	Q4/2020	Ziel erreicht
MIV.1-2 Konsumware 1. Jahr Feld für die Stärkeanalytik liegt vor	Q4/2021	Ziel erreicht
MIV.1-3 Feld- und Nachernteboniturem, 1. Feldgeneration	Q1/2022	Ziel erreicht
MIV.1-4 Pflanzgut für das Folgejahr liegt vor	Q1/2022	Ziel nicht erreicht
MIV.2-1 Pflanzgut tetraploide HAP-Linien für das Folgejahr liegt vor/Jahr 1; Daten der Leistungsprüfung liegen vor; Daten der Laboranalytik liegen vor	Q4/2021	Ziel erreicht
MIV.2-2 Pflanzgut tetraploide HAP-Linien für das Folgejahr liegt vor/Jahr 2; Daten der Leistungsprüfung liegen vor; Daten der Laboranalytik liegen vor	Q4/2022	Ziel erreicht
MIV.3-1 Pflanzgut der dihaploiden Zuchtklone liegt vor; Bonitur der dihaploiden Zuchtklone Feld & Labor 1.Jahr; Pflanzgut der dihaploiden Zuchtklone für das Folgejahr liegt vor	Q4/2021	Ziel erreicht
MIV.3-2 Konsumware von tetraploiden Leistungsklonen für GA-Analytik ist geerntet 1.Jahr; Pflanzgut von tetraploiden Leistungsklonen für das Folgejahr liegt vor; Feldbonituren tetraploiden Leistungsklonen liegen vor	Q4/2021	Ziel erreicht
MIV.3-3 Pflanzgut der dihaploiden Zuchtklone liegt vor; Bonitur der dihaploiden Zuchtklone Feld & Labor 2.Jahr; Pflanzgut von 12 selektierten	Q4/2022	Ziel erreicht

Meilensteine (M) **(lt. Planung im Antrag)**	**Fälligkeit** **(lt. Balkenplan im Antrag)**	**Zielerreichung**
dihaploiden Zuchtklonen für das Folgejahr liegt vor		
MIV.3-4 Konsumware von tetraploiden Leistungsklonen für GA-Analytik ist geerntet 2.Jahr; Pflanzgut von tetraploiden Leistungsklonen für das Folgejahr liegt vor; Feldbonituren von tetraploiden Leistungsklonen liegen vor	Q4/2022	Ziel erreicht
MV.1-1 Daten der Stärkeanalytik der dihaploiden HAP-Linien vom 2. Jahr liegen vor	Q2/2023	Ziel nicht erreicht (nur einjährige Prüfung möglich, siehe MIV.1-4)
MV.1-2 Daten der Stärkeanalytik der tetraploiden HAP-Linien vom 1. Jahr liegen vor	Q2/2022	Ziel erreicht
MV.1-3 Daten der Stärkeanalytik der tetraploiden HAP-Linien vom 2. Jahr liegen vor	Q2/2023	Ziel erreicht
MV.1-4 Daten der Stärkeanalytik der Leistungssorten vom 1. Jahr liegen vor	Q2/2022	Ziel erreicht
MV.1-5 Daten der Stärkeanalytik der Leistungssorten vom 2. Jahr liegen vor	Q2/2023	Ziel erreicht
MV.2-1 Neue Methode für die quantitative Proteinanalytik mittels HPLC wurde entwickelt	Q2/2022	Ziel erreicht
MV.2-2 Daten der Proteinanalytik der dihaploiden HAP-Linien vom 1. Jahr liegen vor	Q1/2022	Ziel erreicht
MV.2-3 Daten der Proteinanalytik der dihaploiden HAP-Linien vom 2. Jahr liegen vor	Q1/2023	Ziel nicht erreicht (nur einjährige Prüfung möglich, siehe MIV.1-4)
MV.2-4 Daten der Proteinanalytik der tetraploiden HAP-Linien vom 1. Jahr liegen vor	Q1/2022	Ziel erreicht
MV.2-5 Daten der Proteinanalytik der tetraploiden Linien vom 2. Jahr liegen vor	Q1/2023	Ziel erreicht
MV.2-6 Daten der Proteinanalytik der Leistungssorten vom 1. Jahr liegen vor	Q1/2022	Ziel erreicht
MV.2-7 Daten der Proteinanalytik der Leistungssorten vom 2. Jahr liegen vor	Q1/2023	Ziel erreicht

b) Zusammenfassung

Im Projekt »EDISON« wurde in 6 Arbeitspaketen die Etablierung einer diploiden Stärkekartoffelzüchtung sowie die Optimierung der Nutzung des Rohstoffes Kartoffelstärke bearbeitet.

Die Züchtung mit mehr als einem rezessiven Merkmal erfordert eine Reduktion des Arbeitsumfanges und des zeitlichen Züchtungshorizontes. Die Kreuzung tetraploider Klone mit geeigneten diploiden Induktor-Klonen der Wildart *Solanum phureja* ist ein etablierter Ansatz. Bei der Auswahl der tetraploiden Ausgangslinien für die Reduktionskreuzungen mit *S. phureja* wurden insbesondere solche Klone berücksichtigt die

- eine stabile Breitband-Resistenzen unter Berücksichtigung der aktuellen Resistenzproblematik aufwiesen.
- Allele zur Züchtung von Qualitätsstärken (HAP, HAP-PLUS, PLUS) enthielten.
- eine möglichst breite genetische Basis aufwiesen.

Dabei galt es für den weiteren Züchtungserfolg die gametophytische Selbstinkompatibilität zu überwinden. Für ein diploides Züchtungsprogramm ist es essenziell, dass (a) bekannt ist, welche Geniteure erfolgreich miteinander gekreuzt werden können. Idealerweise sollten (b) Techniken zur Verfügung stehen, um das GSI-System ganz, zeitlich begrenzt oder induziert (chemisch, physikalisch) zu inaktivieren. Da dies ein essenzieller Faktor für eine diploide Züchtung ist, wurden in »EDISON« verschiedene Ansätze evaluiert, um die GSI zu überwinden. Im Besonderen wurden hier die S-RNAsen sowie ein dominanter Inhibitor auf Chromosom 12 (Sli) charakterisiert und gezielt eingekreuzt.

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Arbeitspaket 1: Erstellung diploider Zuchtklone für Stärkequalitäten, Leistung und Resistenz

Die Züchtung mit mehr als einem rezessiven Merkmal erfordert eine Reduktion des Arbeitsumfanges und des zeitlichen Züchtungshorizontes, welches durch eine Diploid-Züchtung erreicht werden sollte. Die Kreuzung tetraploider Klone mit geeigneten diploiden Induktor-Klonen der Wildart *Solanum phureja* (z.B. Klon IVP35) ist ein etablierter Ansatz. Bei der Auswahl der tetraploiden Ausganglinien wurden insbesondere Klone mit einer stabilen Breitbandresistenz gegenüber aktuellen Schaderregern (z.B.: *G.pallida*-Population „Oberlangen“, Krebs) sowie solche mit inaktiven Allelen der Stärkesynthese zur Züchtung von Qualitätsstärken berücksichtigt. Ziel war es eine möglichst breite genetische Basis für ein diploides Zuchtprogramm zu etablieren.

AP 1.1: Auskreuzen von EMS-Erbgut von Chromosomen mit inaktiven Allelen

Neue Qualitätsstärken stellen rezessive Merkmale dar, für deren Züchtung inaktive Allele benötigt werden. Die Erstellung dieser Null-Allele erfolgte durch EMS-basierte Techniken. Wird durch Rückkreuzung deren Alleldosis erhöht, so gilt das gleiche für die Null-Allele anderer Gene, die auf dem physikalisch identischen Schwesterchromosom liegen. Dies kann zu stark verringerter Vitalität führen. Bei der Selektion von vitalen Pflanzen, die homozygot sind für die inaktiven ssIII- und gbssI-Allele, werden demnach Zuchtklone ausgewählt, in denen das EMS-behandelte Erbgut am Zielchromosom VIII (gbssI) bzw. Chromosom II (ssIII) durch Rekombination bereits deutlich reduziert wurde. Da das gbssI-Gen terminal auf Chromosom VIII liegt, wird hier das EMS-Mutations-belastete Erbgut effizient durch Rekombination entfernt.

Um dies auch für die ssIII-Allele B309 und R148 und das ssII-Allel B331 zu erreichen, wurden Kreuzungen mit aktuellen Zuchtklonen durchgeführt, um neben der Entfernung von EMS-Mutations-belastetem Erbgut gleichzeitig Resistenz- und Leistungsmerkmale einzukreuzen. Zur Analyse der jeweiligen Haplotypen auf Chromosom 2 wurden 47 SNPs (SSII (B331) und SSIII (R148, B309)) als KASP-Assays für die Rekombinationsanalysen bestellt sowie weitere 160 Genomweit verteilte SNPs für die Verwandtschaftsanalyse. Die KASP-Analyse wurde auf 96 Sorten bzw. Zuchtklone durchgeführt.

Aufgrund der terminalen Lage der beiden Gene SS2 und SS3 auf Chromosom 2 wird von einer guten Rekombinationsrate ausgegangen. Es werden weitere homozygote Klone (diploid bzw. tetraploid, >4 Klone/EMS-Allel) für B331, R148 und B309 erstellt, um die Haplotypen der EMS-Allele bestimmen zu können. Eine Rekombinationsanalyse wird im Nachgang zum Projekt bei BNA auf die Nachkommen der Kreuzungen erfolgen.

Im Verlauf des Projekts wurden insgesamt 119 Kreuzungen zur Reduktion des EMS-Hintergrunds durchgeführt (2021: 41 Kreuzungen, 2022: 51 Kreuzungen, 2023: 27 Kreuzungen). Die Samen wurden in den Folgejahren 2022 und 2023 im Gewächshaus ausgesät. Die 2022 im Gewächshaus selektierten Genotypen wurden 2023 als Feldsämlinge ausgepflanzt und bezüglich ihrer Ploidie sowie ihrer Blühfähigkeit bonitiert.

AP 1.2: Ploidie-Reduktion von Klonen mit inaktiven Allelen durch Kreuzung mit *S. phureja*

Für die Ploidiereduktion wurden die Klone BK15-02/98H und LS18/25 ausgewählt (siehe Tabelle 1). Aus den Kreuzungen resultierten jeweils 9 Samen ohne roten Samenpunkt, aus 4 (Krz. 963) bzw. 3 (965) Samen konnten Pflänzchen in der Gewebekultur angezogen werden.

Tabelle 1: Reduktionskreuzungen von Klonen mit inaktiven Allelen:

Krz.Nr	No. Mutter	Stamm Mutter	Fertilität Pollen Mutter	No. Vater	Stamm Vater	Samenanzahl 2021
965	444	BK15-02/98H	fertil	471	IVP 35	25

966	444	BK15-02/98H	fertil	472	IVP 101	7
963	455	LS18/25	fertil	471	IVP 35	29
964	455	LS18/25	fertil	472	IVP 101	0

Die Sämlinge wurden Marker-selektiert (Tabelle 2), in der Gewebekultur vermehrt und ins Gewächshaus zur Knollenanzucht gepflanzt. Im Gewächshaus wurde erneut eine Ploidiebestimmung vorgenommen, wobei zum einen die Anzahl der Chloroplasten in den Spaltöffungen gezählt und zum anderen die Länge der Spaltöffungen gemessen wurde. Der Klon 965-1 ist unter Umständen tetraploid (Tabelle 2). Die geernteten Knollen der Klone wurden 2023 im Feld vermehrt und stehen für weitere Kreuzungen zur Verfügung (siehe auch AP1.1).

Tabelle 2: Markeranalyse und Ploidiebestimmung Primärdihaploide mit neuen Allelen

Kreuzung	Linie	Mittelwert Messung Länge Spaltöffnung (µm)	Ploidie	HAP E1100 (H)	HAP E433 (H)	PLUS B309 (S)	PLUS² B331 (L)	
963	1	27,4	2	1	0	1	2	H1S1L2
	2	24,2	2	1	0	0	2	H1S0L2
	3	22,1	2	2	0	?1	2	H2S?1L2
	4	Pflanze verkümmert		1	0	1	2	H1S1L2
965	1	31	4?	1	1	1		H2S1
	2	25	2	1	1	1		H2S1
	3	20	2	2	0	2		H2S2

Im Jahr 2021 konnte mit dem im Projekt »HATZ« (FKZ 22010314) erstellten dihaploiden Klon 37a15 eine Kreuzung mit einem diploiden Pollenvater durchgeführt werden. Aus dieser Kreuzung (EB21/16) wurden 35 Sämlinge in der Gewebekultur angezogen (siehe 2. Zwischenbericht), Marker-selektiert und die Ploidie bestimmt. Die Ploidiebestimmung mittels Chloroplastenzählung in den Spaltöffnungen ergab, dass mindestens 34 der 35 Sämlinge tetraploid waren.

Die Ploidiebestimmung wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Neben einigen Nachkommen der Kreuzung EB21/12 wurden weitere primärdihaploide Klone überprüft. Auch der bei der Chloroplastenzählung vermeintlich dihaploide Klon EB 21/16/33 stellte sich in der Durchflusszytometrie als tetraploid heraus. Die Nachkommenschaft wurde daraufhin verworfen.

Der Ausgangsklon der Kreuzung, 37a15, wurde aus *in vitro* Pflanzen erneut im Gewächshaus zur Ploidiebestimmung angezogen. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Pflanzen tetraploid waren, wenn auch eine eindeutige Zuordnung nicht immer möglich war. Es hat vermutlich eine spontane Aufdopplung des Genoms in der Gewebekultur stattgefunden. Der Klon wurde verworfen.

AP 1.3: Ploidie-Reduktion von Leistungsklonen durch Kreuzung mit *S. phureja*, Verwandtschaftsanalyse

Die Sorten für die Ploidiereduktion wurden aufgrund von Leistung und Resistenz ausgewählt und als Steinkultur für die Kreuzungen im Gewächshaus angezogen. Im Mittel waren 2021:17,9%, 2022: 28,5% und 2023: 24% der Samen ohne Samenpunkt selektiert und damit möglicherweise diploid. Von den selektierten Samen sind ca. 20% aufgelaufen. Die Sämlinge wurden durch Zählen der Chloroplasten in den Schließzellen auf Ihre Ploidie untersucht und im Folgejahr (2022 bzw. 2023) als Einzelpflanzen bzw. als A-Klone (2023) im Feld bonitiert und erneut auf ihre Ploidie sowie auf Marker untersucht. Erste Kreuzungen zur Erstellung von sekundärdihaploiden Zuchtklonen werden 2024 durchgeführt.

Für die Verwandtschaftsanalyse sollen neben SNPs auch sogenannte Mikrosatelliten SSR-Marker (Simple Sequence Repeats) zum Einsatz kommen. Dies sind kurze, meist nichtcodierende DNA-Sequenzen von zwei bis sechs Basenpaaren Länge, die im Genom eines Organismus oft wiederholt vorkommen, zumeist konzentriert an bestimmten Loci. Die Anzahl an Wiederholungen unterscheidet sich dabei meist bei Individuen einer Art, so dass sie zur Verwandtschaftsanalyse geeignet sind. Dazu werden Primer welche die SSR-Marker flankieren für eine PCR-Amplifikation eingesetzt. Abhängig von der Anzahl der vorhandenen SSR-Wiederholungen werden so unterschiedlich lange Fragmente generiert. Für die Unterscheidung einzelner Individuen/Sorten werden mehrere solcher SSR-Marker kombiniert. Auch für die Kartoffel sind SSR-Marker beschrieben. Es wurden 18 verschiedene Primer für neun beschriebene SSR-Marker geordert und zur Etablierung von Multiplex-PCR-Reaktionen genutzt. Dabei wurden jeweils drei Primerpaare in einer Reaktion kombiniert, wie in Reid *et al.* (2011) beschrieben (SASA-Set 1-3). Die Primerpaare waren jeweils unterschiedlich fluoreszenzmarkiert (VIC; Atto 550; 6-FAM). Als Template diente dabei die von Projektpartner BNA zur Verfügung gestellte genomische DNA von 10 ausgewählten Sorten. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend als Fragmentlängenanalyse (FLA) auf dem ABI3730 Genetic Analyzers analysiert. Die

generierten Daten wurden mit dem Programm PeakScanner (ThermoFisher) zur Größenbestimmung und Quantifizierung der amplifizierten Fragmente verwendet. Die erhaltenen Größen eines jeden Primersets wurden mit den zu erwartenden Größen der SSRs abgeglichen und die entsprechenden Markerallele zugeordnet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der SSR-Analyse. Dargestellt sind die zugeordneten SSR-Allele einer SSR-Analyse mit den Markersets SASA1-3 von 10 verschiedenen Kartoffelsorten

	Marker Set 1			Marker Set 2			Marker Set 3		
Sorte	0019	3009	SSR1	2005	3012	3023	2028	5136	5148
ED01	BF	EILM	ADFI	BDF	BCDF	A	ABC	F	AI
ED02	BF	J	ADFI	BDF	BCDF	A	ABC	0	I
ED03	DF	C	ACF	ABF	BCF	A	ACG	F	BFO
ED04	BFG	F	DFI	ADF	BC	A	ABC	F	IJ
ED05	BDF	CF	DFGI	ABD	BCD	A	C	EF	BJO
ED06	BF	C	BFJ	AD	BD	A	BCD	EFH	BGIJ
ED07	BF	C	DFIJ	AD	BD	0	ACD	F	BIJM
ED08	BF	CKF	AFI	ABD	BC	D	AC	CDE	BJLO
ED09	BF	C	I	ABD	BCE	AD	AB	F	ABJK
ED10	BF	ELM	DF	ABD	B	A	AB	0	BIO

Aufgrund geringer Unterschiede in den Fragmentgrößenprofilen erfolgte die Zuordnung der Peaks zu den erwarteten Fragmenten nicht automatisch, sondern musste manuell durchgeführt werden (siehe Abb. 1).

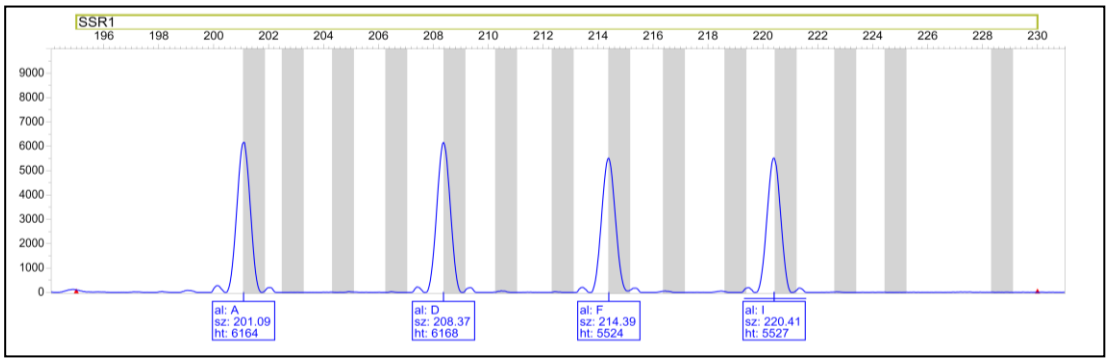

Abbildung 1: Ergebnisse einer SSR-Analyse mit dem Primerset SASA1, Primerkombination SSR1 für die Sorte ED01. Die grauen Balken markieren die zu erwartenden Größen der Fragmente für diese Primerkombination. X-Achse: Größe der Fragmente in Basenpaaren, Y-Achse: Intensität der Fluoreszenz in RFU. In den Kästen unter den Peaks ist jeweils das zugeordnete SSR-Allel, die Größe sowie die Intensität angegeben.

Dies ist normal und entsteht durch unterschiedliche technische Ausrüstung verschiedener Labore. Insbesondere der verwendete Kapillarsequenzierer und dabei wiederum die verwendeten Kapillaren sowie das verwendete Polymer haben hier einen besonderen Einfluss. Am IME werden 50 cm Kapillaren mit POP7 Polymer verwendet, während in Reid *et al.* (2011) POP6 Polymer benutzt wurde. Um die Zuordnung in Zukunft zu erleichtern, wurden vom Projektpartner BNA Referenzsorten mit bekannter SSR-Allel Zusammensetzung geliefert, welche nun zur Synchronisierung der erzielten Ergebnisse verwendet werden.

Für die SNP-basierte Verwandtschaftsanalyse wurden 143 Genomweit verteilte SNPs ausgewählt und bei Traitgenetics die zugehörigen KASP-Assays geordert. Für die Analyse wurden weiterhin die 47 SNPs auf Chromosom 2 sowie 17 Assays auf Chromosom 12 (SLI-Lokus) einbezogen. Es wurde Blattmaterial der Kreuzungseltern 2021 sowie von weiteren Stämmen/Sorten (insg. 94) isoliert und zu Traitgenetics zur KASP-Analyse verschickt.

Als Kontrolle wurde bei der KASP-Analyse ein Genotyp in vierfacher und ein weiterer Genotyp in zweifacher Wiederholung inkludiert. Wie erwartet liegen die Wiederholungen in der Verwandtschaftsanalyse sehr dicht beieinander. Allerdings können mit der verwendeten Markeranzahl nur wenige Verwandtschaftsmuster identifiziert werden. Um hier eine höhere Auflösung zu erreichen, sollten die Analysen um weitere SNP-Assays erweitert werden.

Arbeitspaket 2: Überwinden der Selbstinkompatibilität

AP 2.1 Identifizierung von S-RNasen und Bestimmung von Kompatibilitätsklassen

Es erfolgte ein Feldanbau sowie die Gewächshausanzucht von diploiden und tetraploiden Leistungssorten. Zur Blüte wurden jeweils 10 Pistille von gerade aufgegangenen Blüten geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der Gefriertrocknung wurde das Pflanzenmaterial auf Trockeneis an den Unterauftragnehmer Eurofins Genomics zur RNAseq-Analyse versendet.

Die Analyse konnte für insgesamt 22 Klone (davon 11 diploid) erfolgreich durchgeführt werden. Die Daten der RNA-Sequenzierung wurden vom Projektpartner BNA zur Analyse an den Partner Fraunhofer IME übertragen. Für die Identifizierung der exprimierten S-RNasen wurden die in Ma *et al.* 2021 publizierten Referenzsequenzen verwendet. Dazu wurden die RNA-Sequenzdaten gegen diese Referenzen gemapped. Dabei wurden die Programme SeqMan NGen und SeqMan Pro aus dem Programmpaket "Lasergene Genomics Suite" (DNASTAR) verwendet. Für die analysierten diploiden und tetraploiden Leistungssorten wurden so die exprimierten S-RNasen identifiziert (siehe Abbildung 2).

In einigen diploiden und tetraploiden Sorten wurden mehr als die erwarteten zwei bzw. vier S-RNasen detektiert. Außerdem wurden Varianten gefunden, die keine vollständige Übereinstimmung mit den Referenzsequenzen aufweisen und teilweise homolog zu Bereichen auf verschiedenen Referenzgenen sind. Zur Klärung wurden die Sequenzen der Referenzgene gegeneinander verglichen (Abbildung 3). Es ist zu erkennen, dass die Referenzgene 10, 11 und 12 sowie die Referenzen 7 und 1 einander sehr ähnlich sind (>90% Homologie).

Dies kann dazu führen, dass es Unschärfen in der Zuordnung der gefundenen exprimierten S-RNasen gibt und dass Teile einer exprimierten S-RNase der einen und andere Teile einer anderen Referenz zugeordnet werden. In Abbildung 3 wurde diesem Umstand Rechnung getragen, indem teilweise nicht eindeutig gekennzeichnet werden konnte, um welche S-RNase es sich handelt (Kennzeichnung dann z.B. S-RNase V1/7 und S-RNase V 10/12).

Abbildung 3: Aufstellung der in den untersuchten Proben exprimierten S-RNasen. Bei den Pflanzen D1 – D18 handelt es sich um diploide Klone, die Pflanzen F1 – F9 sowie T6 – T23 sind tetraploid.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
S-RNase 7	1		91.52	61.57	59.06	58.63	57.89	58.48	58.77	58.50	58.08	59.30	57.27	55.36	57.12
S-RNase 1	2	91.52		63.61	58.69	58.54	57.96	58.98	59.12	58.86	58.28	58.20	58.27	56.89	59.38
S-RNase 6	3	61.57	63.61		61.01	59.57	59.71	60.29	59.86	58.43	56.71	58.65	59.71	56.23	57.68
S-RNase 3	4	59.06	58.69	61.01		82.18	83.10	83.87	81.57	62.48	63.21	65.68	56.58	58.42	57.44
S-RNase 2	5	58.63	58.54	59.57	82.18		86.27	86.73	85.96	64.05	63.45	65.53	58.50	58.74	60.57
S-RNase 10	6	57.89	57.96	59.71	83.10	86.27		92.75	90.43	63.07	63.36	65.09	57.46	57.97	59.67
S-RNase 11	7	58.48	58.98	60.29	83.87	86.73	92.75		91.05	64.11	64.23	65.83	57.31	59.17	59.97
S-RNase 12	8	58.77	59.12	59.86	81.57	85.96	90.43	91.05		63.66	62.77	65.38	57.89	59.02	59.97
S-RNase 4	9	58.50	58.86	58.43	62.48	64.05	63.07	64.11	63.66		77.19	69.75	56.46	55.03	57.08
S-RNase 13	10	58.08	58.28	56.71	63.21	63.45	63.36	64.23	62.77	77.19		68.31	57.49	55.33	57.29
S-RNase 9	11	59.30	58.20	58.65	65.68	65.53	65.09	65.83	65.38	69.75	68.31		59.54	54.40	58.00
S-RNase 5	12	57.27	58.27	59.71	56.58	58.50	57.46	57.31	57.89	56.46	57.49	59.54		59.24	58.04
S-RNase 8	13	55.36	56.89	56.23	58.42	58.74	57.97	59.17	59.02	55.03	55.33	54.40	59.24		63.44
S-RNase 14	14	57.12	59.38	57.68	57.44	60.57	59.67	59.97	59.97	57.08	57.29	58.00	58.04	63.44	

Abbildung 4: Vergleich der Referenz S-RNasen. Es handelt sich um den Sequenzvergleich der verwendeten S-RNasen aus Ma et al. 2021. Dargestellt sind jeweils die Homologien in Prozent bei einem Sequenzvergleich der Referenzgene.

Derzeit wird versucht durch Amplifikation, Klonierung und Sequenzanalyse (per Sanger Sequenzierung) der exprimierten S-RNasen aufzuklären, um welche S-RNasen es sich handelt.

Im Jahr 2023 wurden aufgrund der Ergebnisse der S-RNase Bestimmung Versuchskreuzungen mit diploiden Klonen durchgeführt (siehe Tabelle 9), welche verschiedene Kombinationen von S-RNasen tragen (unterschiedlich bis gleich). Dadurch sollte überprüft werden, ob sich die erwarteten Kompatibilitätsklassen in der Praxis nachvollziehen lassen.

Tabelle 4: Versuchskreuzungen zur Ermittlung von Kompatibilitäten erwartetes Kreuzungsergebnis 0 (50% der Kombinationen erfolgreich); 1 (75% der Kombinationen erfolgreich); 2 (100% kombinierbar)

Mutter		Vater	Erwartung	Bemerkung
D1	*	D13	0	Triplett-Kombination testen
D1	*	D4	1	
D1	*	D16	2	
	*			
D4	*	D1	1	Kreuzungen von Mutter ohne S-RNAse 1
D4	*	D13	1	
D4	*	D6	1	
D4	*	D16	2	
D6	*	D4	1	reziproke Kreuzungen
D6	*	D16	2	
D13	*	D1	0	Triplett-Kombination testen
D13	*	D4	1	
D13	*	D16	2	
D16	*	D2	1	Kreuzungen von Mutter ohne S-RNAse 1
D16	*	D1	2	
D16	*	D6	2	
D16	*	D13	2	

Keine der angesetzten Kreuzungen war erfolgreich. Die Versuche werden wiederholt und weitergeführt, insbesondere da besonders hohe Temperaturen 2023 im Kreuzungsgewächshaus zu erheblichen Ausfällen auch bei den tetraploiden Kreuzungen geführt haben. Insofern lässt sich hier noch kein Rückschluss auf Kompatibilitätsklassen schließen.

Ma, L., Zhang, C., Zhang, B. *et al.* A *nonS-locus F-box* gene breaks self-incompatibility in diploid potatoes. *Nat Commun* 12, 4142 (2021). https://doi.org/10.1038/s41467-021-24266-7

AP 2.2 Einkreuzen von SLI aus *S. chacoense* bzw. homologer Gene aus *S. phureja*, *S. stenotomum* ssp. *goniocalyx*, 2n-Gameten

Die Kreuzungen mit einer für das SLI-Gen homozygoten Linie wurden 2021 durchgeführt. Im Jahr 2022 wurden die heterozygoten Samen im Gewächshaus angezogen und Knollen geerntet. Ausgewählte Klone wurden 2023 im Feld vermehrt und stehen für weitere Kreuzungen zur Verfügung.

Bei der Genbank wurde Pollen von Akzessionen von *S. phureja, S. stenotomum* ssp. *stenotomum* und *S. stenotomum* ssp. *goniocalyx* bestellt. Der Pollen wurde bei -20°C gelagert und zu Projektbeginn unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein von 2n-Gameten untersucht. Als Vergleich dienten diploide und tetraploide Pollen von Leistungssorten aus der Saison 2020.

Es zeigt sich, dass sowohl in der Wildart *S. stenotomum* ssp. *goniocalyx* als auch *S. stenotomum* ssp. *stenotomum* Akzessionen mit einem Anteil von >10% an 2n-Pollenkörnern zu finden sind.

Von diesen Akzessionen wurden Samen und von einzelnen Klonen Knollen bei der Genbank bestellt. Es wurde DNA aus den gelieferten Knollen isoliert und Kandidatengene amplifiziert und sequenziert. Die Analyse von Kandidatengenen für die Bildung von 2n-Gameten (StPS, parallel spindle) bei BNA hat keine eindeutige Korrelation der Allelzusammensetzung mit der beobachteten Pollengrößenverteilung ergeben. Um zu unterscheiden, ob es sich bei den beobachteten Größenverteilungen tatsächlich um eine erhöhte Anzahl von 2n-Gameten oder aber die natürliche Variationsbreite der 1n-Gameten handelt, müssen Kreuzungen mit tetraploiden Müttern durchgeführt werden. Die Knollen aus der Kartoffelgenbank in Groß Lüsewitz wurden aus phytosanitären Gründen verworfen. Die Samen wurden 2022 im Gewächshaus ausgesät und Knollen geerntet, welche 2023 als Einzelpflanzen im Feld vermehrt wurden. Diese stehen 2024 für erste Testkreuzungen zur Verfügung.

AP 2.3 Entwicklung diagnostischer Marker für das *Sli*-Gen und Gegenselektion *S.chacoense*-Erbgut

In einer Veröffentlichung von Clot *et al.* (2020) wurde ein bereits in amerikanischen Sorten vorhandener SLI-Haplotyp beschrieben und phänotypisch bzgl. Selbstkompatibilität analysiert. In einer weiterführenden Arbeit von Kaiser *et al.* (2021) wurden die von Clot etablierten KASP-Marker in diploidem, selbstkompatiblem, amerikanischem Zuchtmaterial untersucht. Der SLI-Lokus konnte in dieser Arbeit auf eine 80,8kb große Region auf Chromosom 12 eingegrenzt werden.

In einer internationalen Patentanmeldung WO2021109507A1, die zur gleichen Patentfamilie wie der im 1. Zwischenbericht beschriebenen Antrag CN110938120 gehört, wurde an diesem Genort das Gen StSCI lokalisiert. Die transgene Expression des Gens in selbstinkompatiblen Genotypen führt laut Patent zur Selbstkompatibilität.

Aufgrund dieser Veröffentlichung wurden die KASP-Assays aus Clot *et al.* bestellt und bei Traitgenetics verschiedene diploide und tetraploide Zuchtstämme und Sorten untersucht.

Es zeigt sich, dass auch im Zuchtmaterial von BNA der SLI-Haplotyp gefunden werden kann. Jedoch wird erst die phänotypische Analyse der diploiden Zuchtklone sowie die Reduktionskreuzungen der tetraploiden Zuchtstämme mit anschließender Geno- und Phänotypisierung bzgl. des SLI-Haplotyps eine Aussage über die Selbstkompatibilität und damit die weitere Zuchtstrategie zulassen. 2021 wurden Reduktionskreuzungen mit den entsprechenden Genotypen durchgeführt. Die Nachkommenschaften wurden 2022 im Gewächshaus angezogen und standen 2023 als Einzelpflanzen erstmals im Feld.

Parallel zu diesen Arbeiten wurde ein Marker für den Nachweis der Promotormutation im Gen StSCI (CN110938120A/WO2021109507A1, Eggers *et al.,* 2021) bei BNA etabliert und auf insgesamt 188 fortgeschrittene Zuchtklone und Sorten angewendet. Das mit der Selbstkompatibilität assoziierte Allel konnte in 93 Klonen identifiziert werden.

Mit diesem Marker wurden die Nachkommenschaften der Reduktionskreuzungen entweder im Sämlingsstadium oder als Einzelpflanze bzw. A-Stamm analysiert, wenn der Marker in der Mutterpflanze vorhanden war.

Arbeitspaket 3: Screening der tetraploiden TILLING-Populationen nach Mutationen in GAME4 und GAME9 und Untersuchung der natürlichen Variation

AP 3.1: Bestimmung der Sequenzvariabilität von GAME4 und GAME9

Die in AP 3.4 erstellten Zielfragmente der Zielgene GAME4 und GAME9 werden in AP 3.1 zur Untersuchung der natürlichen Sequenzvariabilität mittels NG-Sequenzierung eingesetzt. Da inzwischen einige Genome verschiedener Kartoffelsorten ganz oder teilweise sequenziert wurden, wurde zunächst die Sequenzvariabilität dieser Sorten *in silico* untersucht. Dazu wurden die Referenz-cDNA Sequenzen von GAME4 und GAME9 mit den in den Datenbanken der „*Solanaceae Genomics Resource*“ (http://spuddb.uga.edu/) mit Hilfe des BLASTn Tools verglichen. Es wurden Sequenzvergleiche mit den Sorten Colomba, Castle Russet, Atlantic, Altus, Spunta, Avenger und M6 durchgeführt. Dabei wurden sehr hohe Homologien festgestellt:

GAME4: 95 – 100% identisch

GAME9: 99 – 100% identisch

Es wurden keine Defektallele identifiziert.

Die bei einem NGS Sequenzierlauf erzielte Datenmenge ist viel größer als zur Ermittlung der Sequenzvariabilität in den ursprünglich angedachten 100 Linien/Sorten nötig. Zudem ist es sehr wahrscheinlich, das Defektallele der Zielgene einem rezessiven Erbgang folgen, so dass auch in Sorten/Linien, die phänotypisch in Bezug auf ihren TGA-Gehalt unauffällig sind, derartige Defektallele zu finden sein könnten. Daher soll eine größere Menge an Sorten/Linien analysiert werden. Aufgrund der erwarteten Datenmenge und durch die Beschränkung auf die verfügbare Anzahl von verschiedenen Barcodes zur Identifizierung der einzelnen Proben, sollen nun 384 verschiedene Sorten/Linien analysiert werden. Das nötige Blattmaterial wurde gesammelt und DNA präpariert (BNA), welche dann, analog zum Vorgehen in AP 3.4, für die Erstellung der Sequenzier-Librabries eingesetzt wurde, mit dem Unterschied, dass keine Pools, sondern Einzelpflanzen analysiert werden.

Ursprünglich sollte für die Analysen das „Ion Torrent“ PGM-System eingesetzt werden. Aus technischen Gründen wurde aber auf das "Illumina MiSeq" System gewechselt. Dieses System erlaubt die sogenannte "Paired End" Sequenzierung, die im gegebenen Setting einige Vorteile bietet. Hierbei werden die zu amplifizierenden Fragmente zunächst von einer und anschließend von der anderen Seite ansequenziert. Je nach verwendetem Sequenziergerät und -chemie kann die Leseweite zwischen 2 x 25 Bp und 2 x 300 Bp variiert werden, so dass das Design der Fragmente vereinfacht ist. Zudem können beide Enden mit Barcodes markiert werden. Durch verschiedene Kombinationen weniger Barcodes können so viele Proben individuell markiert werden. Im vorliegenden Fall wurden die 384 Pflanzen mittels 40 Barcodes individuell markiert. In den erzielten Sequenzdaten ist zudem hinterlegt, welche Forward Sequenz zu welcher Reverse Sequenz gehört, so dass auch die Haplotypen Bestimmung zur Korrelations- Analyse mit derartigen Daten leichter ist. Die zu untersuchenden Gene wurden in mehrere Fragmente aufgeteilt. Dazu wurden aus den bekannten Kartoffel GAME4- und GAME9-Sequenzen genspezifische Primer abgeleitet. Die resultierende Fragmentlänge betrug zwischen 350 und 650 Basenpaaren. In dem verwendeten zweistufigen PCR-Verfahren wurden noch universelle Sequenzen an die 5‘ Enden der genspezifischen Primer angehängt, welche in der sekundären PCR als Primerbindungsstellen dienen. In dieser PCR werden dann die für die NGS-Sequenzierung nötigen Sequenzen angehängt, so dass die Gesamtlänge der Fragmente ca. 450 - 750 Basenpaare beträgt (siehe Abbildung 5).

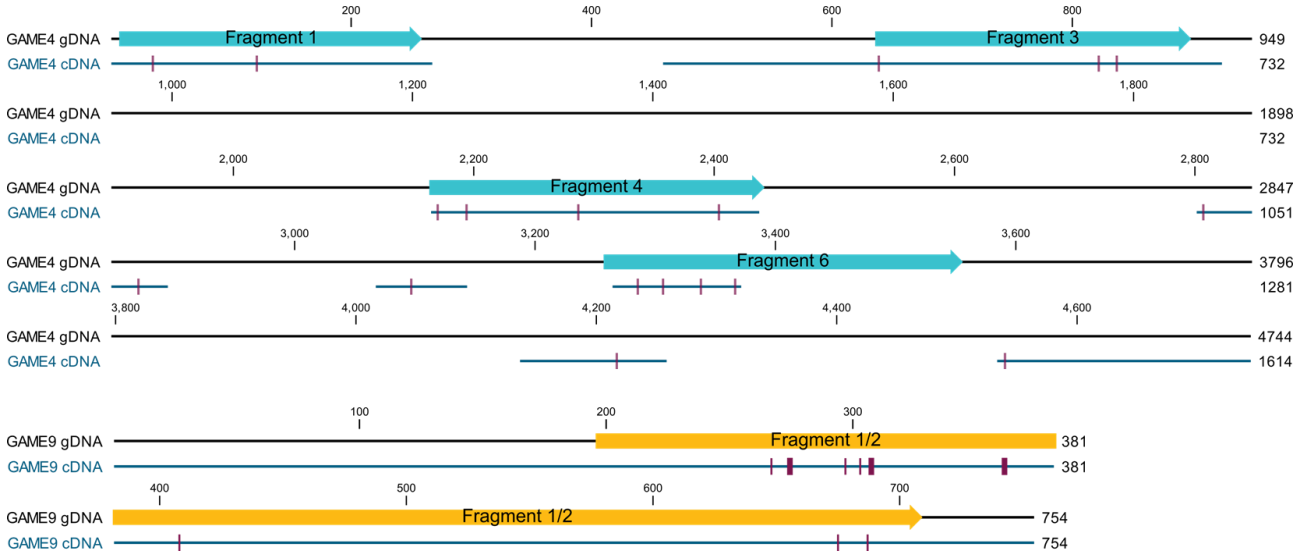

Abbildung 5: Abgeleitete Fragmente zur Bestimmung der Sequenzvariabilität von GAME4 und GAME9. Schematisch dargestellt ist die Genstruktur. Die dünne schwarze Linie symbolisiert die genomische Sequenz und die dünne blaue Linie die Exons. Mit den kurzen senkrechten Strichen sind Positionen im Gen markiert, an denen Stop-Codons durch Mutationen entstehen können.

Aufgrund der erwarteten Datenmenge wurden 384 verschiedene Sorten/Linien und damit zum einen ein breiter Querschnitt durch die verfügbaren Sorten/Zuchtklone/Wildarten und zusätzlich eine Auswahl von Linien mit hohem/niedrigem TGA-Gehalt analysiert. Dazu wurde die Population zusammengestellt und bei BNA das nötige Blattmaterial gesammelt, aus welchem dann DNA präpariert wurde. Diese wurde dann, analog zum Vorgehen in AP 3.2, für die Erstellung der Sequenzier-Libraries eingesetzt, mit dem Unterschied, dass keine Pools, sondern Einzelpflanzen analysiert wurden. Die erstellten Sequenzier-Libraries wurden mit dem Illumina MiSeq System analysiert. Die theoretisch erzielbare Leseweite betrug 2 x 300 Bp, die maximale Datenmenge 22 – 25 Mio. Reads. Die erzielte Datenmenge ist sehr groß. Durchschnittliche Abdeckung ca. 2500 reads (GAME9) bzw. 1600 reads (GAME4).

Die Daten wurden mit Hilfe der Programmpakete Lasergene Genomics Suite und CLC Genomics Workbench analysiert. Dabei liegt der Schwerpunkt zum einen darauf, Sequenzunterschiede (SNPs; InDels) zu identifizieren und deren Einfluss auf die Genfunktion abzuschätzen, analog zum Vorgehen bei der TILLING Population (siehe AP3.3). Im Zuge dieser Analyse konnten für GAME9 125 Mutationen (SNPs, Deletionen, Insertionen) in dem untersuchten Bereich identifiziert werden. 60 davon haben keinen Effekt (1 in Introns; 59 stille Mutationen). 65 der Mutationen führen allerdings zu Aminosäureaustauschen und könnten die Genfunktion beeinflussen. Für GAME4 wurden insgesamt 158 Mutationen identifiziert, davon 94 in Introns oder still. 64 Mutationen führen zu Aminosäureaustauschen oder sind Insertionen oder Deletionen. Eine Mutation führt zu einem neuen Stop-Codon an AA-Position 137 von 488, so dass die Genfunktion ausgeschaltet ist. Zwei weitere Mutationen sind 1 Bp Deletionen, die zu einem sogenannten „Frameshift“ also einem Wechsel des Leserasters führen, wodurch die Sequenz frühzeitig abbricht. Erstens an Position 217 von 488 in Pflanze BNA-280, zweitens an Position 150 von 480 in den Pflanzen BNA-276 und 277. Die betroffenen Pflanzen liegen beim Partner BNA als in vitro Pflanzen vor.

Neben der Beurteilung der SNPs auf ihre Wirkung auf die Proteinfunktion, wurde zusätzlich untersucht, ob bestimmte Allele mit gewünschten Eigenschaften kombiniert sind. Allele können durch Kombinationen von SNPs identifiziert werden. Diesen Vorgang nennt man Haplotypisierung. Dies ist bei polyploiden Organismen manuell durchgeführt sehr aufwendig. Daher wurde das Analyse Tool Whatshap Polyphase für die automatische Zuordnung heterozygoter SNPs zu Haploblocks verwendet. Als Haploblocks werden zusammenhängende Sequenzabschnitte bezeichnet, die nicht zwingend die gesamte Allelsequenz umfassen, sondern bei unserer Sequenzierstrategie mit den sequenzierten Fragmenten übereinstimmen. Für GAME4 ergeben sich dadurch 4 nicht zusammenhängende Haploblocks, für GAME9 ein Haploblock, der fast die gesamte kodierende Sequenz umfasst.

Für GAME9 wurden 120 verschiedene Haplotypen identifiziert, für GAME4 8 Haplotypen in Haploblock 1, 43 Haplotypen in Haploblock 2, 47 Haplotypen in Haploblock 3 und 294 Haplotypen in Haploblock 4. Dies verdeutlich, dass GAME4 in verschiedenen Genbereichen eine unterschiedliche Sequenzvariabilität zeigt. Der ursprüngliche Plan der näheren Untersuchung seltener Haplotypen konnte nicht durchgeführt werden, da sehr viele sehr seltene Haplotypen identifiziert wurden. Das Beispiel von GAME4 Haploblock 4 zeigt, dass 64% der Haplotypen in der Population nur 1-mal vorkommen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Häufigkeit der identifizierten Allele für das Gen GAME4 Haploblock 4.

Häufigkeit	Haplotypen	Prozent
1 (0,07%)	187	64%
< 5 (< 0,35%)	267	91%
< 15 (< 1,04%)	282	96%
< 100 (< 6,96%)	291	99%

Im Gegensatz zu den seltenen Haplotypen gibt es wenige Haplotypen, die sehr häufig in der Population vorkommen. In GAME4 Haploblock 4 zum Beispiel gibt es nur einen Haplotypen (B4-H109), der über 20% der Allele ausmacht, während in Block 1 Haplotyp B1-H001 fast die Hälfte der Allele repräsentiert und in knapp 90% der Pflanzen der BNA-Population vorkommt (siehe Tabelle 6). Dies spiegelt die größere Sequenzvariabilität im C-terminalen Bereich des Proteins wider. Beim Vergleich zwischen der BNA- (Elite-) und Wildart-Population zeigte sich, dass ähnliche Haplotypen in den Populationen angereichert sind.

Tabelle 6: Übersicht der häufigsten Haplotypen für die Gene GAME4 und GAME9 in der BNA und Wildart Population. In den Spalten „Pflanzen“ ist die absolute Häufigkeit der Pflanzen mit dem jeweiligen Haplotyp dargestellt, in den Spalten „Allele“ die absolute Anzahl der Haplotypen in der Population.

		BNA				Wildart			
Haploblock	Haplotyp	Pflanzen	%	Allele	%	Pflanzen	%	Allele	%
GAME4 B1	B1-H001	253	87%	540	47%	89	99%	154	55%
	B1-H006	230	79%	453	39%	78	87%	111	40%
	B1-H005	45	15%	83	7%	3	3%	4	1%
	B1-H003	44	15%	78	7%	3	3%	4	1%
GAME4 B2	B2-H027	240	82%	797	69%	73	81%	146	52%
	B2-H024	81	28%	182	16%	15	17%	24	9%
	B2-H034	41	14%	100	9%	6	7%	9	3%
GAME4 B3	B3-H036	235	81%	487	42%	59	66%	112	40%
	B3-H038	169	58%	256	22%	25	28%	39	14%
	B3-H028	146	50%	223	19%	42	47%	61	22%
GAME4 B4	B4-H109	167	57%	256	22%	37	41%	69	25%

	B4-H085	78	27%	126	11%	11	12%	18	6%
	B4-H038	70	24%	112	10%	18	20%	19	7%
	H099	253	87%	594	51%	38	43%	70	25%
GAME9	H084	211	72%	391	34%	18	20%	30	11%
	H081	46	16%	58	5%	3	3%	3	1%

Die Haplotypen können nun mit den Phänotypen (TGA-Gehalt) der Pflanzen verglichen werden, um gewünschte Allele zu identifizieren. Eine derartige Analyse bezeichnet man als Assoziationsanalyse. Für 66 Pflanzen lagen Daten zu mehreren Anbaustandorten und -jahren vor, aus denen der mittlere Gesamt-TGA-Gehalt ermittelt wurde. Für den paarweisen Vergleich des TGA-Gehalts und der Haplotypen je Haploblock, wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet, da i. die Daten nicht normal verteilt sind, ii. die Haplotypen eine ordinale Variable sind und iii. mehr als zwei Gruppen verglichen werden. Anschließend wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen auf ihre Signifikanz mittels des post-hoc Dunn's Tests und der Bonferroni Anpassung für Mehrfachtestung überprüft. Für GAME4 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Für GAME9 konnten zwei Haplotypen identifiziert werden, zwischen denen ein signifikanter Unterschied (p 0,025) im Bezug auf den mittleren TGA-Gehalt besteht (siehe Abb. 6). Dies sind H039 mit einem mittleren TGA-Gehalt von 2265 ppm und H081 mit 980 ppm. Obwohl in der Gesamtpopulation einige Haplotypen mit einem höheren oder niedrigeren TGA-Gehalt assoziiert schienen, konnten hier keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies liegt wahrscheinlich an der geringen Populationsgröße und Datenstreuung. Die Allelsequenz des häufigsten GAME9 Haplotypen (H099) und der beiden signifikant unterschiedlichen (H039, H081) wurde an den Partner BNA zur Markerentwicklung übergeben.

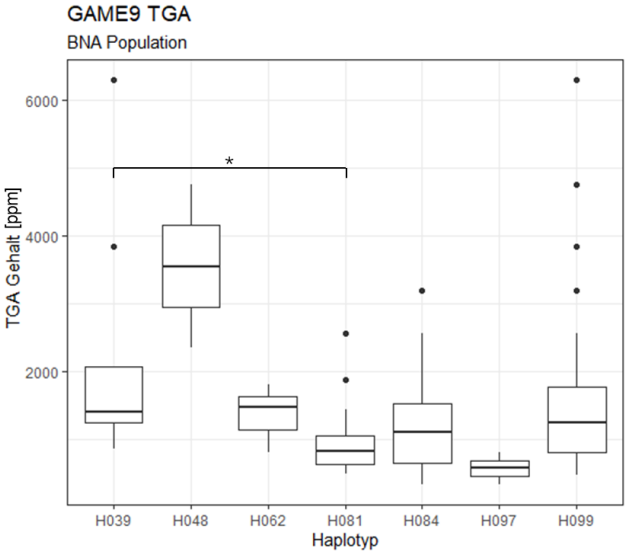

Abbildung 6: Vergleich der mittleren TGA-Gehalte [ppm] der verschiedenen Haplotypen der BNA-Population. Paarweiser Vergleich mittels Kruskal Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test (Bonferroni Anpassung), * p < 0,05.

Schrinner, S.D., Mari, R.S., Ebler, J. *et al.* Haplotype threading: accurate polyploid phasing from long reads. *Genome Biol* 21, 252 (2020). https://doi.org/10.1186/s13059-020-02158-1

AP 3.2 Anzucht der TILLING-Populationen aus Knollen und Blatternte zur DNA-Isolierung

Beim Projektpartner BNA wurden zwei tetraploide TILLING-Populationen erstellt. Zur Blatternte wurden Augenstecklinge von Knollen, die aus der ersten Feldgeneration stammen, nach Gibberellin-Behandlung zur Brechung der Keimruhe im Herbst ins Gewächshaus gepflanzt.

Die Blatternte erfolgte in 96er-Deepwell-Platten. Die gereinigte DNA von insgesamt 1798 Proben wurde dem Projektpartner IME für die weiteren Analysen geschickt.

Eine weitere TILLING-Population wird bei Fraunhofer IME erhalten. Diese lag bei Projektbeginn als DNA vor und konnte direkt für die Arbeiten unter AP 3.3 verwendet werden.

Da die TILLING Populationen im Verlauf des Projekts bereits einige Zeit bei 4°C gelagert wurden und die Knollen bereits wieder zu keimen begannen, wurden die Populationen erneut im Gewächshaus ausgepflanzt, Blattgewebe geerntet, frische DNA präpariert und die Knollen erneut bei 5°C eingelagert. Alle TILLING-Populationen wurden so weiter als Knollen erhalten und lagern bei 5°C bis zur weiteren Verwendung.

AP 3.3 Screening der TILLING-Population für GAME4- und GAME9-Defektmutanten

Insgesamt bestehen die TILLING Populationen aus ca. 3000 Pflanzen. Diese wurden in 4 Subpopulationen zu je 768 Pflanzen aufgeteilt. Vor dem Pooling wurde zunächst die Konzentration der Proben mit dem Quant-iT PicoGreen Kit (Invitrogen) bestimmt und anschließend auf 10 ng/µl normalisiert. Danach wurden die Proben in Gruppen zu 16 Proben gepoolt. Dabei kam eine zweidimensionale Pooling Strategie zum Einsatz. Für jede Subpopulation wurden 96 Pools erstellt, die aus je 16 Pflanzen bestehen. Jede Pflanze der Subpopulation kommt dabei in zwei Pools vor. Die Anordnung wurde dabei so gewählt, dass bei der Identifikation einer Mutation in zwei korrespondierenden Pools nur genau jeweils eine Pflanze in beiden Pools vorkommt und somit eindeutig zu identifizieren ist. Nachdem für die TILLING Population am IME frische DNA präpariert worden war, wurden nach oben angegebenem Protokoll neue Pools erstellt, um ein möglichst effizientes Screening zu gewährleisten.

AP 3.4 NGS der Kandidatengene

Für das Screening der TILLING Populationen durch NG-Sequenzierung mit dem „Ion Torrent“ PGM-System müssen die zu untersuchenden Gene in mehrere Fragmente aufgeteilt werden. Dazu wurden aus den genomischen GAME4 und GAME9 Sequenzen genspezifische Primer für ein zweistufiges PCR-Verfahren abgeleitet und getestet. In der initialen 1. PCR wurden universelle Sequenzen an die 5‘ Enden der genspezifischen Primer angehängt, welche in einer sekundären PCR als Primerbindungsstellen dienen. In dieser PCR werden dann alle für die NGS-Sequenzierung nötigen Sequenzen angehängt. Für GAME9, welches keine Introns enthält, wurden genspezifische Primer für die Amplifikation von 2 Fragmenten abgeleitet. Fragment 1 beinhaltet 7 Positionen, an denen eine EMS-Mutagenese ein Stop-Codon generieren kann, Fragment 2 enthält 3 derartige Positionen (siehe Tabelle 13B). Für das größere GAME4 Gen wurden 7 Fragmente abgeleitet. Aufgrund der geringen Anzahl an Positionen deren Mutagenese ein Stop-Codon generieren könnte, wurden 3 dieser Fragmente zunächst nicht berücksichtigt. Die 4 ausgewählten Fragmente 1; 3; 4 und 6 enthalten 3; 3; 4 und 9 derartige Positionen respektive.

Mit den ausgewählten Primern wurden primäre PCRs für alle 6 Fragmente mit allen 384 erstellten 16er Pools durchgeführt. Anschließend wurden die PCR Produkte 1:500 verdünnt und als Templates in die sekundären PCRs eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend normalisiert. Aufgrund der zu erwartenden Datenmenge, konnten anschließend je drei Fragmente für jeden Pool vereint und für die NG-Sequenzierung vorbereitet werden. Zur Datenanalyse konnte dann anhand der Sequenz das Fragment und anhand des angehängten Barcodes der sequenzierte Pool erkannt werden. Für die vollständige Analyse der beiden Zielgene in beiden Populationen waren daher 8 Sequenzierläufe mit dem Ion Torrent PGM-System (Life Technologies) unter Verwendung des Sequencing 400 bp Kits (Life Technologies) und des 318v2 Chips (Life Technologies) notwendig. Im Berichtszeitraum wurden vier Läufe durchgeführt und analysiert, so dass das Zielgen GAME9 vollständig und das Zielgen GAME4 teilweise analysiert wurde (Abb.7).

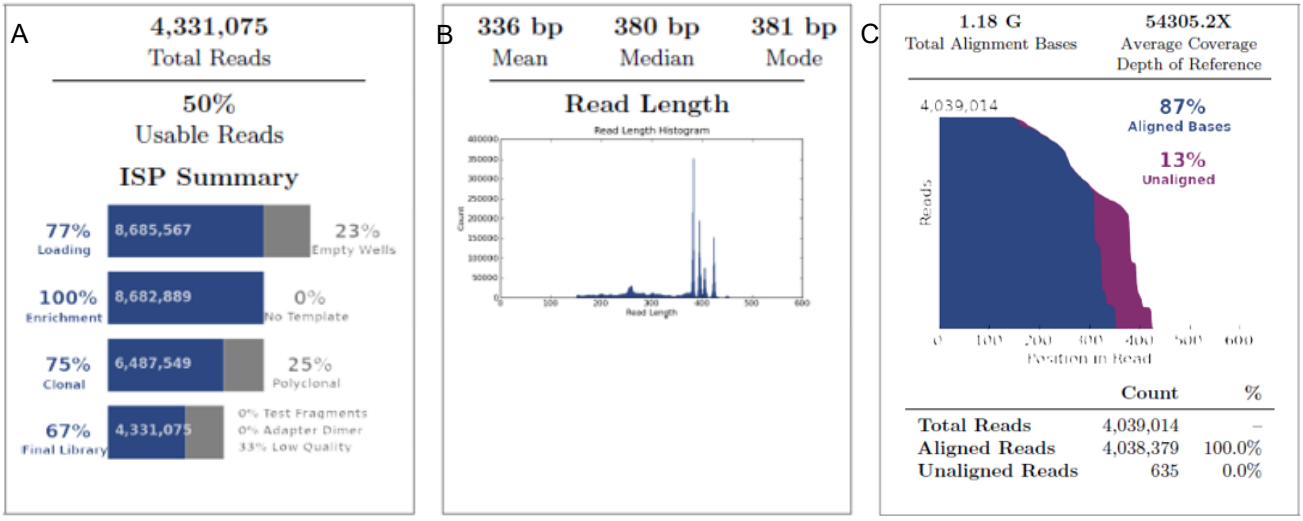

Abbildung 7: Ergebnisse der Ion Torrent Sequenzierung für die zweite Pflanzengruppe. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Sequenzreads (A), die erzielte Leseweite (B), die Anzahl der Reads welche sich mit der Referenz alignen lassen (C), die Gesamtzahl der zur Referenz passenden Basen (C) sowie die x-fache Abdeckung der Referenzsequenz (C)

Die erzielte Datenmenge betrug pro Lauf zwischen 1,15 und 1,37 Gigabasen, so dass eine zur Auswertung ausreichende Abdeckung gegeben war. Zur Identifizierung inaktiver Allele wurden die Sequenzdaten nun mithilfe des Programms "Lasergene Genomics Suite" (DNASTAR) mit der Originalsequenz des Gens verglichen und auf Sequenzabweichungen hin untersucht. Findet sich eine solche Abweichung in je einem „Row“ und einem „Column“ Pool, die eine gemeinsame Schnittmenge bilden, so kann die entsprechende Pflanze identifiziert werden. Das fragliche Fragment wird nun für diese Kandidatenpflanzen amplifiziert und per Sanger-Sequenzierung resequenziert, um die Mutation zu verifizieren und die Pflanze eindeutig zu identifizieren. Die Sequenzabweichung wird nun auf ihre Auswirkung auf die Genfunktion hin untersucht. Diese Analyse wurde für das Zielgen GAME9 und die identifizierten Mutationen durchgeführt. Es konnten zwei Stop-Codons sowie 28 Aminosäureaustausche identifiziert werden. Für 13 der Aminosäureaustasche wird ein Effekt auf die Enzymfunktion vorhergesagt.

Für GAME4 wurden 165 eventuelle Mutationen identifiziert, von denen 68 in Introns lagen oder keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirken (stille Mutationen). 75 Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch. 38 davon konnten durch Sanger-Sequenzierung verifiziert werden. Diese Punktmutationen wurden mithilfe von Analyseprogrammen *in silico* auf ihre Auswirkung auf die Genfunktion hin untersucht. Für 22 Aminosäureaustausche wird ein negativer Effekt auf die Enzymfunktion vorhergesagt, so dass diese Mutationen vielversprechende Kandidaten für Knock-Out Allele darstellen. Es konnten für beide untersuchten Zielgene putative Knock-Out-Mutationen generiert und identifiziert werden. Diese befinden sich nun bei Partner BNA und sind in die Sterilkultur überführt worden, so dass sie nun für Kreuzungsarbeiten zur Verfügung stehen.

AP 3.5 Aufnahme von Kandidatenlinien in die Gewebekultur

Die identifizierten EMS-Mutanten mit einem vorausgesagten Aminosäureaustausch für die Gene GAME4 (B21, B884, B267, B533, B1266, B360, B92, B679) und GAME9 (B23, B712, B1423, B25, B59, B1133, B1170, B1679) wurden in die Gewebekultur aufgenommen. Aufgrund der Mutationsanalyse, die keinen Effekt für den Aminosäureaustausch vorhersagt, wurden die Klone B720, B712, B25, B1423, B59, B1170, B1679, B267 und B342 später wieder verworfen. Für GAME4 wurde durch die Projektpartner auf Kosten von BNA ein weitere Sequenzierlauf durchgeführt, um im C-terminalen bis dahin nicht analysierten Bereich STOP-Mutationen zu identifizieren. Es konnten 5 weitere Mutationen gefunden und ebenfalls in die sterile Gewebekultur überführt werden (B378, B342, B1606, B357, B951).

Insbesondere die beiden GAME9-Kandidatenlinien mit STOP-Mutationen (B126 und B537) wurden vorrangig in die Sterilkultur aufgenommen. Alle Quarantänetestungen wurden für diese beiden Klone durchgeführt. Im Jahr 2023 konnten Knollen im Gewächshaus produziert werden, mit denen 2024 erste Kreuzungen durchgeführt werden sollen.

Arbeitspaket 4: Feldprüfungen

AP 4.1: Leistungsprüfung vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien

Von den aus HATZ vorhandenen 8 primärdihaploiden Klonen konnten nur von zwei Linien Knollen produziert werden (37a15; 37b5). 2021 wurde eine einortige Leistungsprüfung gepflanzt. Knollen wurden an den Partner Emsland-Stärke für die Analyse der Lagerstabilität und Klarheit der Gele versendet. Wie erwartet zeigte sich bei der homozygoten Linie 37a15 ein sehr niedriger Amylosegehalt im Vergleich zum HAP-Klon L125 sowie eine gute Klarheit der Stärkegele. Sowohl die Lagerstabilität als auch der Stärkeertrag blieben erwartungsgemäß hinter dem Vergleichsklon zurück. Für die heterozygote Linie 37b-5 konnten nur wenige Knollen geerntet werden, so dass die Messung des Stärkeertrags hier nicht möglich war. Die übrigen gemessenen Parameter (Amylosegehalt, Lagerstabilität, Klarheit) entsprechen den Erwartungen, da noch jeweils ein intaktes GBSSI- und SSIII-Allel vorhanden ist.

Die beiden primärdihaploiden Klone (37a15 und 37b5) konnten aufgrund der hohen Virusanfälligkeit und des reduzierten Knollenansatzes nicht für eine weitere Leistungsprüfung vermehrt werden. Zudem zeigte sich, dass der Klon 37a15 tetraploid ist. Die neu erzeugten primärdihaploiden Klone (siehe AP 1.2, Tabellen 1 und 2) werden 2023 als Einzelpflanzen im Feld vermehrt und stehen noch nicht in ausreichender Menge für eine Leistungsprüfung zur Verfügung. Wenn möglich soll mit diesen Klonen bereits gekreuzt werden zur Erstellung sekundärdihaploider Nachkommenschaften.

AP 4.2 Leistungsprüfungen tetraploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien und Linien mit neuen Allelkombinationen inaktiver Allele

2021 wurden von den insgesamt 26 HAP-Stämmen 6 Stämme 5-ortig und 20 Stämme 3-ortig angebaut. 10

HAP-PLUS-Stämmen wurden 3-ortig geprüft. 7 Stämme mit neuen Allelkombinationen (HAP-PLUS^2) wurden einortig in einer Leistungsprüfung angebaut.

Es wurden 2022 43 Stämme (HAP, HAP-PLUS, PLUS2) in Leistungsprüfungen gepflanzt und geerntet sowie neue HAP-Stämme aus Kreuzungen 2021 zur Reduktion des EMS-Gehalts selektiert, die 2023 als Einzelpflanzen ins Feld gepflanzt wurden. Einige Stämme wurden aufgrund erhöhter Virusanfälligkeit gestrichen.

Die Stärkeerträge lagen im Vergleich zu den Vorjahren unter denen der beiden Kontrollen (Kontrolle K und L125). Die anhaltende Trockenheit in der Feldsaison 2022 spiegelt sich hier in den Stärkeerträgen wider. Die Knollen aus den Leistungsprüfungen wurden an den Projektpartner Emsland-Stärke für die Stärke- und Proteinanalytik geliefert. Von den mehrjährig im Feld geprüften Stämmen wurden ausgewählte Genotypen für die Kreuzungsarbeiten zum Auskreuzen von EMS-Erbgut verwendet (siehe AP 1.1, 50 Kreuzungskombinationen).

Es zeigt sich, dass insbesondere mit Hinblick auf den Stärkeertrag aber auch auf die Resistenzausstattung und die Stärkequalität die neuen Zuchtklone den Standard L125 deutlich übertreffen.

Auch im Jahr 2023 wurden 27 Kreuzungen zur Reduktion des EMS-Hintergrunds durchgeführt, von denen jedoch nur bei 10 Kreuzungen Samen produziert werden konnten. Wie bei den Kreuzungen zur Analyse der diploiden S-RNAse Kompatibilitätsklassen (siehe AP2.1) können zu hohe Temperaturen während der Kreuzungssaison den geringen Kreuzungserfolg verursacht haben.

AP 4.3 Anbau von diploiden und tetraploiden Leistungssorten

Bei BNA zu Projektbeginn vorhandene diploide und tetraploide Zuchtstämme wurden in der Saison 2021 vermehrt und verschiedenen Leistungsprüfungen unterzogen. Für das AP 2.1 (S-RNAsen) wurden ausgewählte diploide und tetraploide Stämme für die RNA-Isolierung aus Pistillen zur RNAseq-Analyse verwendet. Gleichzeitig wurde von 75 Sorten/Zuchtstämmen die DNA für die Analyse der Zielgene GAME4 und GAME9 auf natürliche Variabilität gewonnen. Beim Projektpartner Emsland-Stärke wurde nach der Ernte der TGA-Gehalt im Reibsel sowie der Stärkegehalt und die Trockensubstanz untersucht (siehe AP5).

2022 wurden 32 Genotypen und 2023 36 Genotypen in Leistungsparzellen angebaut. Die Knollen wurden an den Projektpartner Emsland-Stärke für eine Stärke- und Proteinanalytik geliefert zur Bestimmung der Trockensubstanz, des Protein- und des Glykoalkaloidgehalts im hergestellten Reibsel.

Arbeitspaket 5: Stärke- und Proteinanalytik

AP 5.1.1 Stärkeanalyse vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien

Von den aus HATZ vorhandenen 8 primärdihaploiden Klonen konnten nur von zwei Linien Knollen produziert werden (37a15; 37b5). Von diesen beiden Genotypen konnte der Amylosegehalt (-132% und 867%, relativ zur HAP-Kontrolle), die Lagerstabilität (75% und 2950%, relativ zur HAP-Kontrolle) und die Klarheit (160% und 3%, relativ zur HAP-Kontrolle) der Stärkegele bestimmt werden. Beide Linien konnten aufgrund der hohen Virusanfälligkeit nicht für eine weitere Leistungsprüfung vermehrt werden. Das Ziel einer zweijährigen Prüfung wurde nicht erreicht.

AP 5.1.2 Stärkeanalyse tetraploider HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS^2-Linien

Tetraploide HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS^2-Linien wurden mehrjährig von zwei Standorten untersucht. Zudem wurden jedes Jahr Kontroll-Stämme mitgenommen.

Von diesen Stämmen wurde die Stärke gewonnen, um den Amylosegehalt, die Viskosität, die Lagerstabilität und die Klarheit der Stärkegele zu bestimmen. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse als Mittelwerte aus 2021 bis 2023 mit Standardabweichung vom Standort Böhlendorf dargestellt.

Der apparente Amylosegehalt wird durch die langen Seitenketten am Amylopektin messbar. Je kürzer die Seitenketten am Amylopektin, umso geringer der app. Amylosegehalt. Bei HAP-PLUS-Stärken kann dieser Wert auch ins Negative gehen. Bei den HAP-Stärken lagen die Amylosegehalte zwischen 0,3 und 3,0 %.

Von der gewonnenen Stärke wurde eine Stärkelösung im Brabender Viskograph aufgekocht. Von dem Stärkegel wurde direkt nach der Kochung mittels Photometer die Klarheit bei einer Wellenlänge von 655 nm bestimmt. Die Messung wurde nach 14 Tagen wiederholt (Lagerung bei 5°C). Nach der Kochung lagen alle Stämme bei ca. 80 % Transmission, gewünscht ist eine geringe Abnahme innerhalb der 14 Tage.

Durch die kürzeren Seitenketten am Amylopektin der HAP-PLUS Stärken ist die Retrogradation der Stärke gering, sodass bei diesen Stärkegelen die Transmission nach 14 Tagen zwischen 45 und 63 % lag. Im Vergleich dazu lag die Transmission bei den HAP-Stämmen im Schnitt bei 29 %.

Die Festigkeit von den gekochten Stärkegelen wurde mittels Rheometer direkt nach der Kochung und nach 3 Wochen Lagerung bei 5°C gemessen. Die Differenz von G‘ wird analysiert. Gewünscht ist eine möglichst geringe Veränderung der Festigkeit. Auch hier sind die langen Seitenketten am Amylopektin Grund für die Retrogradation der Stärke. In den HAP-PLUS-Stämmen fiel die Retrogradation wieder geringer aus oder blieb ganz aus, sodass die Lagerstabilität im Schnitt bei 1,7 Pa lag. Bei den HAP-Stärkegelen gab es eine Spannweite von 2 bis 21 Pa.

Anhand dieser Ergebnisse konnte zusammen mit den Erkenntnissen aus der Feldprüfung eine Auswahl von Kreuzungspartnern für die Dihaploidzüchtung sowie die Leistungsprüfungen im Rahmen von »EDISON« getroffen werden.

AP 5.1.3 Stärkeanalyse von tetraploiden Leistungssorten

Es wurden tetraploide Leistungssorten mehrjährig untersucht.

2021: 75 Stämme

2022: 32 Stämme

2023: 36 Stämme von zwei Standorten

Die Trockensubstanz (TS), der Stärkegehalt und der Proteingehalt wurden im hergestellten Reibsel gemessen und auf die Frischkartoffel berechnet. In der folgenden Abbildung 8 ist eine Korrelation zwischen Trockensubstanz und dem Stärkegehalt zu sehen. Es besteht jedoch keine Korrelation zwischen Trockensubstanz und Proteingehalt.

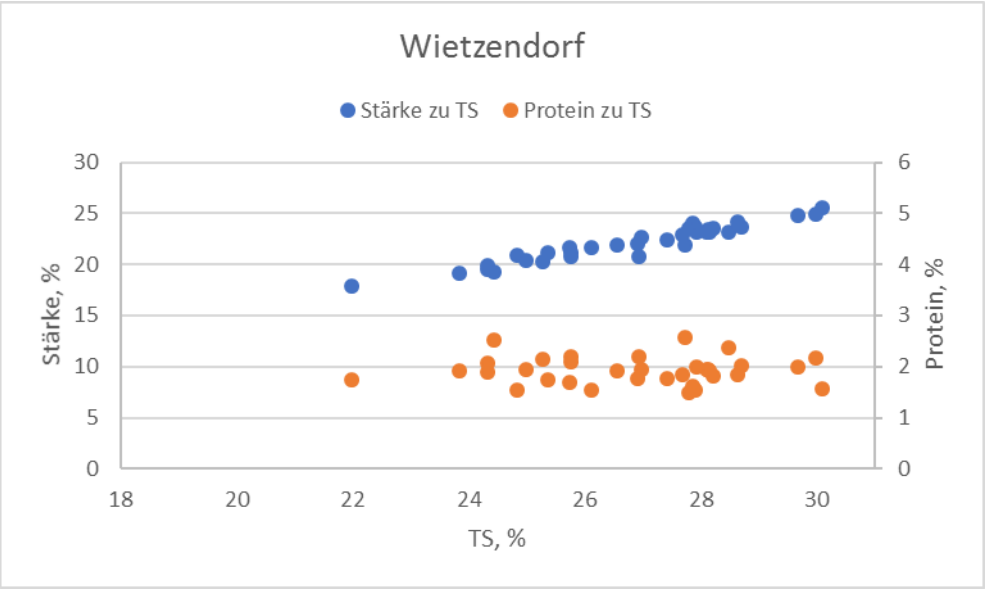

Abbildung 8: Stärke- und Proteingehalt in Korrelation zur Trockensubstanz. Kartoffelreibsel der tetraploiden Leistungssorten aus Wietzendorf Anbaujahr 2023.

Die Trockensubstanz (TS), der Stärkegehalt und der Proteingehalt waren am Standort Kaltenberg im Jahr 2023 insgesamt deutlich geringer im Vergleich zum Standort Wietzendorf (s. Abbildung 9). Der Stärkegehalt in Wietzendorf lag zwischen 17 und 26 %, in Kaltenberg zwischen 15 und 22 %. Der Proteingehalt lag in Wietzendorf zwischen 1,5 und 2,6 % und in Kaltenberg zwischen 1,2 und 1,7%. Das zeigt, dass nicht nur die Sorte, sondern auch die Boden- und Witterungsverhältnisse einen Einfluss auf die Qualität haben. 2023 war in Kaltenberg ein sehr schwieriges Anbaujahr mit Starkregen und nachfolgender Trockenheit.

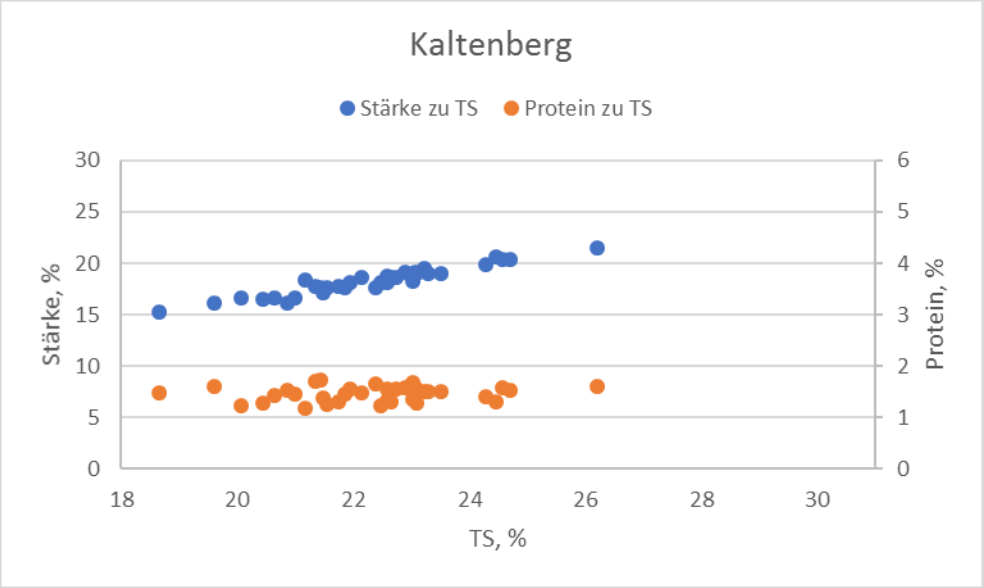

Abbildung 9: Stärke- und Proteingehalt in Korrelation zur Trockensubstanz. Kartoffelreibsel der tetraploiden Leistungssorten aus Kaltenberg Anbaujahr 2023.

AP 5.2.1 Etablierung neuer Techniken zur quantitativen Proteinanalytik

Für die Messung der löslichen Proteine mittels Gel-Permeations-Chromatografie wurde eine Methode entwickelt. Dabei wurde insbesondere die Probenvorbereitung untersucht. Einflussfaktoren wie Probenmenge, Pufferlösung, pH-Wert, Leitfähigkeit, Filtration etc. wurden analysiert und ausgewertet, um ideale Messbedingungen zu bekommen. Zudem wurden verschiedene Säulen getestet und Geräteeinstellungen optimiert.

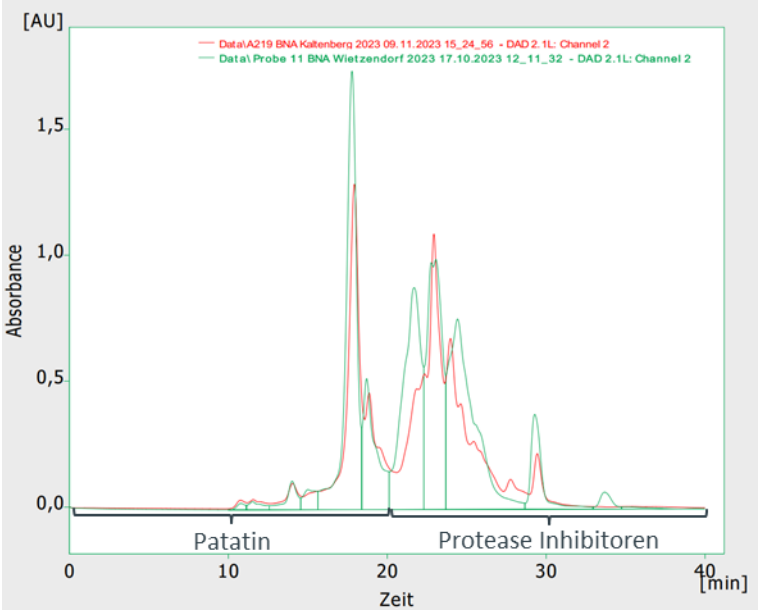

Abbildung 10: HPLC-GPC Kurvenverlauf von Kartoffelfruchtwasser einer tetraploiden Leistungssorte. Standort Kaltenberg in rot, Standort Wietzendorf in grün, Anbaujahr 2023.

Aus den gemessenen HPLC-GPC Kurven können Flächenintegrale bestimmt werden. Das Kartoffelfruchtwasser wurde in einen Patatin (PA) und Protease Inhibitoren (PI) Bereich eingeteilt (s. Abbildung 10). In der folgenden Abbildung 11 ist die prozentuale Verteilung der Flächenintegrale sowie der Proteingehalt im Reibsel, berechnet auf die Frischkartoffel, dargestellt. Es handelt sich um das Kartoffelfruchtwasser der tetraploiden Leistungssorten aus Kaltenberg Anbaujahr 2023. Der Anteil der PA-Fläche lag zwischen 28% und 45%, sodass der Anteil der PI-Fläche zwischen 55% und 72% lag. Es besteht eine leicht positive Korrelation zwischen dem Anteil PA Fläche und dem Proteingehalt.

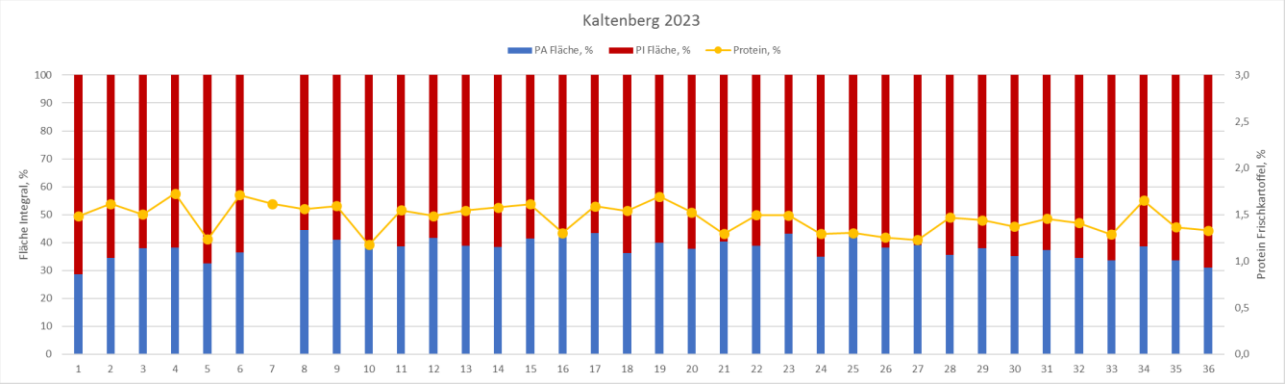

Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der HPLC-GPC Flächenintegrale vom Patatin- bzw. Protease Inhibitoren-Bereich im Kartoffelfruchtwasser sowie Proteingehalt im Kartoffelreibsel. Tetraploide Leistungsorten aus Kaltenberg Anbaujahr 2023. PA-Fläche in blau, PI Fläche in rot, Proteingehalt als gelbe Punkte.

AP 5.2.2 Proteinanalyse vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien

Siehe AP 5.1.1

AP 5.2.3 Proteinanalyse tetraploider HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS²-Linien

Für den Protein- und Gesamt Glykoalkaloidgehalt (total glycoalcaloid, TGA) der tetraploiden HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS²-Linien wurden die Glykoalkaloide (Chaconin + Solanin) im getrockneten Kartoffelreibsel mittels HPLC gemessen. Die Boden- und Witterungsverhältnisse haben Einfluss auf den Glykoalkaloidgehalt, jedoch ist auch der Genotyp und die Sorte ausschlaggebend. Bei den HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS²-Linien wurden im Rahmen von »EDISON« stets geringe Glykoalkaloidgehalte festgestellt, und zwar im Schnitt 182 ppm atro (ohne Kontrolle K, gemessen im Reibsel). Ein niedriger Glykoalkaloidgehalt ist Voraussetzung für die Verwendung von Kartoffelprotein im Futter- und Lebensmittelbereich.

AP 5.2.4 Proteinanalyse von tetraploiden Leistungssorten

Aus den 36 tetraploiden Leistungssorten aus Wietzendorf und Kaltenberg Anbaujahr 2023 wurde Fruchtwasser gewonnen. Die Proteine im Fruchtwasser wurden mit der HPLC-GPC untersucht (s. AP 5.2.1) und die Glykoalkaloide mittels HPLC bestimmt. In der folgenden Abbildung 12 sind die Glykoalkaloide (Chaconin + Solanin) an den Standorten Wietzendorf und Kaltenberg dargestellt. Die Boden- und Witterungsverhältnisse sind Grund für die Standortunterschiede. In Kaltenberg lag der Glykoalkaloidgehalt von 8 Stämmen unter 500 ppm atro. In Wietzendorf hingegen nur von 4 Stämmen. Ziel bei diesem Screening ist es, Stämme mit niedrigen Glykoalkaloiden zu ermitteln und diese als potenzielle Kreuzungspartner einzusetzen.

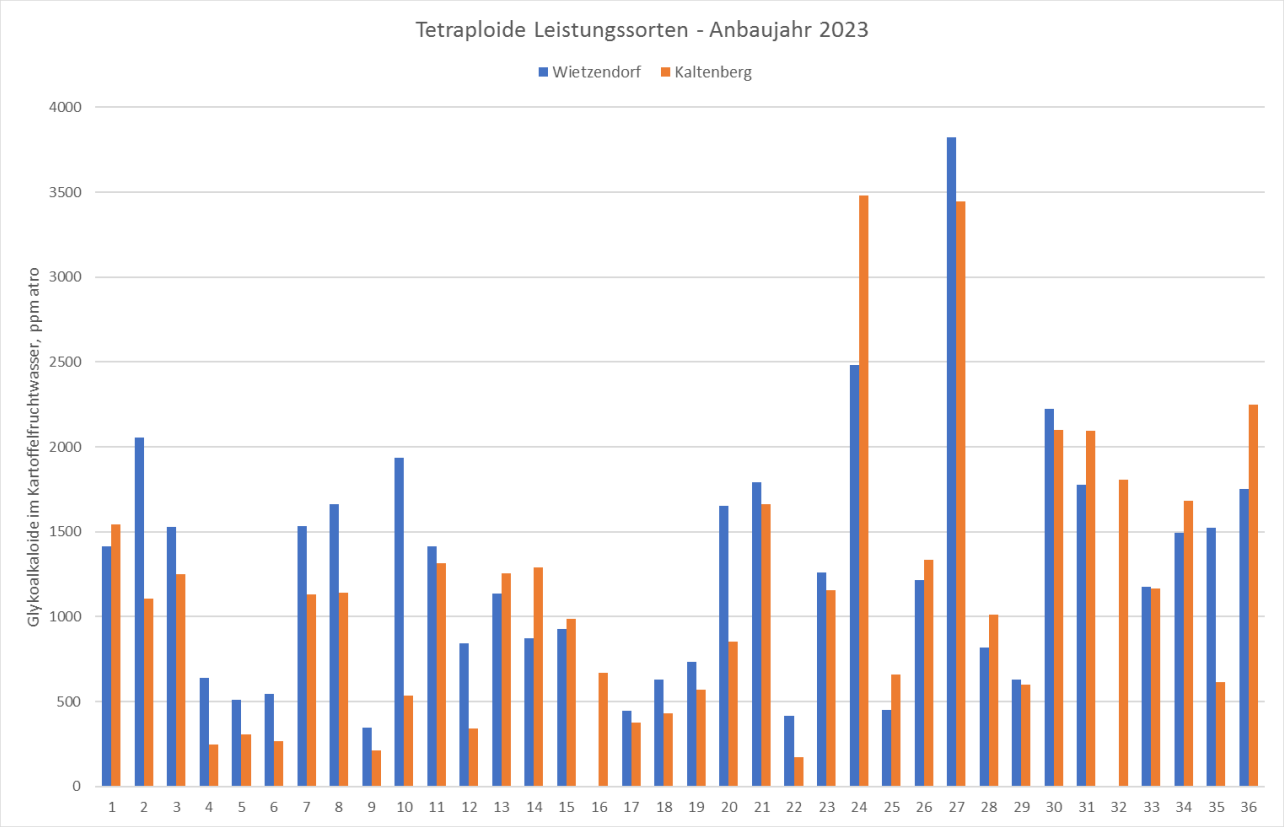

Abbildung 19: Glykoalkaloide (Chaconin + Solanin in ppm atro) im Kartoffelfruchtwasser der tetraploiden Leistungssorten aus Wietzendorf und Kaltenberg Anbaujahr 2023. Wietzendorf in blau, Kaltenberg in orange.

Die folgenden zwei Abbildungen zeigen die Chaconin- und Solaningehalte am Standort Wietzendorf bzw. Kaltenberg 2023. Am Standort Wietzendorf haben 88 % der Stämme einen höheren Chaconingehalt. In Kaltenberg hingegen haben 75 % der Stämme einen höheren Solaningehalt.

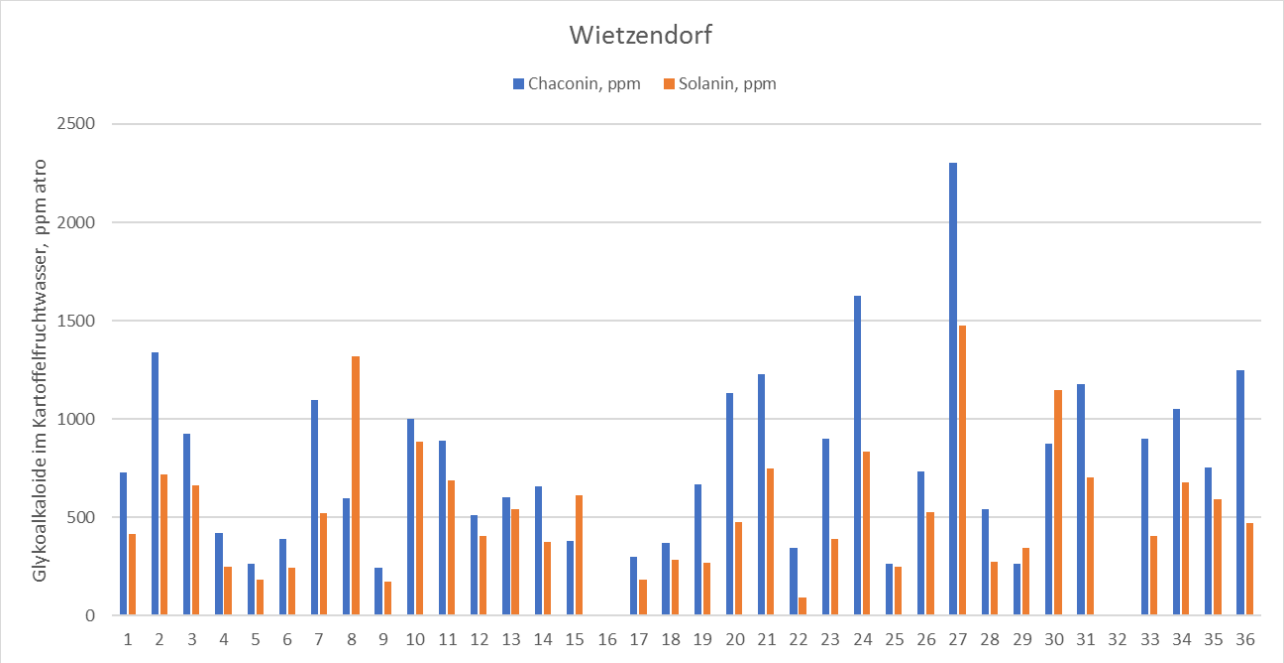

Abbildung 20: Chaconin- und Solaningehalte (in ppm atro) im Kartoffelfruchtwasser der tetraploiden Leistungssorten aus Wietzendorf Anbaujahr 2023. Chaconin in blau, Solanin in orange.

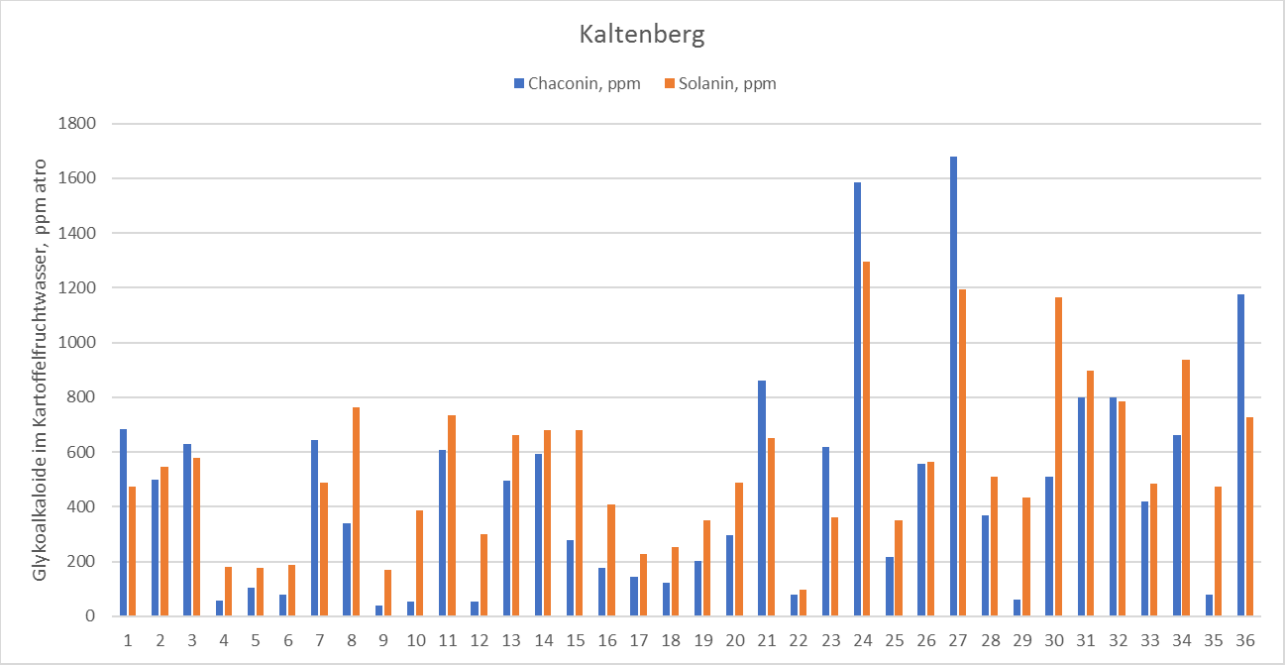

Abbildung 21: Chaconin- und Solaningehalte (in ppm atro) im Kartoffelfruchtwasser der tetraploiden Leistungssorten aus Kaltenberg Anbaujahr 2023. Chaconin in blau, Solanin in orange.

Arbeitspaket 6: Aufbau einer Datenbank für die diploide Sortenzüchtung

Auf der Grundlage der bei BNA in der tetraploiden Sortenzüchtung eingesetzten Datenbank eBrida wurde eine Testversion für eine Datenbank zur diploiden Sortenzüchtung aufgesetzt. Es sollte neben der Eingabe von genotypischen und phänotypischen Daten auch die Möglichkeit zur Erstellung von Stammbäumen sowie Kreuzungsplänen integriert werden. Die Datenbank befindet sich im Testbetrieb. Die Erstellung eines Kreuzungsprogramms in der Anwendung ist noch nicht zufriedenstellend möglich und wird weiter optimiert.

2. Verwertung

a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Die in „EDISON“ erstellten diploiden Kartoffellinien dienen als Ausgangsmaterial für eine Sortenzüchtung. Für die resultierenden Stämme wird ein Schutz (Patent- oder Sortenschutz) angestrebt. Die optimierten HAP-PLUS-Stärken wurden zum Patent angemeldet (Patent Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion WO2019/145544 A1).

Für die resultierenden Stämme mit einem reduzierten Glykoalkaloidgehalt wird ein Schutz (Patent- oder Sortenschutz) angestrebt.

Zeithorizont: >10 Jahre

b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Mit dem Projekt wird die Grundlage für eine diploide Stärkekartoffelzüchtung gelegt. Die diploide Züchtung eröffnet die Möglichkeit der Kombination rezessiver Merkmale mit händelbaren Pflanzenzahlen. Die Züchtung von Spezialstärken (HAP, HAP-PLUS, PLUS) mit weiteren wertgebenden Eigenschaften (Resistenzen, Ertrag, Proteinqualität etc.) soll zukünftig in diploidem Material erfolgen. Die Nutzung weiterer Inhaltsstoffe (Protein) macht den Anbau und die Verwertung der Stärkekartoffeln attraktiver.

Die Sequenzanalyse vorhandener Allele der GA-Synthese (Öko-TILLING) sowie das Erstellen neuer Allele (TILLING) ermöglicht eine gezielte Kombination dieser Allele bzw. die Einstellung einer optimalen Alleldosis der Defektallele.

Auf die sich ändernde klimatischen Bedingungen und die Reduktion von Wirkstoffen der Agrochemie kann mit einer Verbesserung der wertgebenden Eigenschaften wie z.B. Resistenzen und Ertrag reagiert werden.

Das bei der Stärkegewinnung anfallende Kartoffelprotein kann zu einer hochwertigen Proteinquelle aufgearbeitet werden. Durch einen reduzierten Glykoalkaloidgehalt (GA) kann das Kartoffelprotein effizienter und nachhaltiger vermarktet werden. Durch die steigende Wertschöpfung ist es möglich den Landwirten einen Proteinzuschlag zu bezahlen. Zurzeit wird die hohe Nachfrage von den wenigen Anbietern nicht gedeckt. Die Reduktion des GA-Gehaltes erfolgt bei Wettbewerbern mit aufwändigen und kostenintensiven Trennverfahren. Eine Reduktion im Rohstoff ist somit eine ressourcenschonende und vielversprechende Variante.

Zeithorizont: >10 Jahre

c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Überwindung/Voraussage der Selbstinkompatibilität (GSI) ist ein wichtiger Faktor, um ein diploides Zuchtprogramm erfolgreich zu etablieren und kompatible Kreuzungspartner zu bestimmen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden zur Überwindung der GSI in »EDISON« analysiert und anschließend für ihren Einsatz in der praktischen Diploidzüchtung ausgetestet.

Zeithorizont: >3 Jahre

Das Einkreuzen von Sli sowie weiterer dominanter Inhibitoren der GSI aus Wildarten wurde in »EDISON« begonnen und soll Eingang in die Diploidzüchtung bekommen.
Diploide Wildarten (Primitivformen) werden auf die Ausprägung von 2n-Gameten hin untersucht.

Zeithorizont: >10 Jahre

Die Entwicklung molekularer Marker zur Identifikation der neuen Allele (z. B. der Glykoalkaloidsynthese) aus den TILLING-Populationen, zur Identifikation der neuen Selbstinkompatibilitätsklassen sowie zukünftig u.U. für die 2n-Gametenbildung und das Sli-Gen erweitert die Möglichkeiten der Molekulardiagnostik und der Marker-gestützten Selektion in der Kartoffelzüchtung.
Eine mittels genomweit verteilter SNPs etablierte Verwandtschaftsanalyse erlaubt die Identifikation einer möglichst breiten genetischen Basis für die Dihaploidzüchtung.

Zeithorizont: >3-5 Jahre

Aufgrund der hohen Nachfrage nach hochwertigem Kartoffelprotein ist die Schaffung von Know-how zur Kompetenzerhaltung und Steigerung der wissenschaftlichen Konkurrenzfähigkeit unabdinglich.
Da die komplexe Züchtung von Kartoffeln mit niedrigem GA-Ausgangswert ein langfristiges Ziel darstellt, werden in diesem Projekt schon bestehende Sorten auf den GA-Gehalt getestet, um effiziente Kreuzungspartner zu identifizieren.
Eine sortenreine Verarbeitung ist somit ein kurzfristiges Ziel, um ein GA-reduziertes Kartoffelprotein zu gewinnen.

Zeithorizont: >1 Jahr

d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die in der TILLING-Population gefundenen neuen Allele für GAME4 und GAME9 sollen für die Sortenzüchtung verwendet werden, damit neben der Stärke auch ein hochwertiges Protein aus den Stärkekartoffeln isoliert werden kann.
Die diploide Züchtung wird zudem ein schnelleres Einkreuzen neuer Eigenschaften aus diploidem Wildmaterial ermöglichen und die Identifizierung der zu Grunde liegenden Gene vereinfachen.

Zeithorizont: >10 Jahr

Der Sli-Locus kann in einem Folgeprojekt gemappt werden.
Aufgrund neuer Veröffentlichung stehen jetzt Marker zur Verfügung (siehe AP 2.3), die den Sli-Locus nachweisen. Diese Marker konnten bereits in fortgeschrittenem Zuchtmaterial der BNA identifiziert werden. In diesem Material wurden jedoch noch keine phänotypischen Analysen der GSI durchgeführt, da zunächst Reduktionskreuzungen zur Erstellung diploider Klone durchgeführt werden müssen. Die Analyse der GSI dieser Klone kann in einem Folgeprojekt durchgeführt werden.

Zeithorizont: > 3 Jahre

Die Eigenschaft zur Ausprägung von 2n-Gameten soll in das Zuchtprogramm Marker-gestützt eingekreuzt werden.

Zeithorizont: >10 Jahre

Das Wissen um vorhandene Allele sowie um neue Defektallele der GA-Synthese kann für die Untersuchung und optimale Einstellung der Biosynthese unter Berücksichtigung der besonderen Anforderungen der Pathogenabwehr verwendet werden.
Die am IME etablierte und im Projekt optimierte Methode der Durchmusterung einer tetraploiden TILLING-Population wird für zukünftige Projekte von Bedeutung sein.

Zeithorizont: >10 Jahre

Das geschaffene Know-how soll in die großtechnische Produktion übertragen werden, um hochwertiges Kartoffelprotein in großen Mengen gewinnen zu können.
In der Anwendungstechnik wird dies in verschiedenen Bereichen getestet und bewertet. Durch eine enge Zusammenarbeit mit Kunden sollen die Anforderungen ermittelt und Rezepturen entwickelt werden.

Zeithorizont: >10 Jahre

3. Erkenntnisse von Dritten

Erteilte Patente:
EP3536146
HYBRID SEED POTATO BREEDING
Patent granted, under opposition. Oral proceedings planned in June 2024.

EP3580343
GLYCOALKALOID METABOLISM ENYZYMES (GAMES) AND USES THEREOF (GAME25)
Patent granted. Every GM plant (including these generated via TILLING) with altered expression/functional activity of GAME5 gene/protein may fall under the claims. this may affect free use of GAME4/GAME9 mutants for variety development.

Patentanmeldungen:
EP3452602
AMYLOPECTIN POTATO STARCH WITH IMPROVED STABILITY AGAINST RETROGRADATION AND IMPROVED FREEZE AND THAW STABILITY
Examination is ongoing.

EP3719132
METHOD FOR OVERCOMING SELF-INCOMPATIBILITY OF DIPLOID POTATOES
Examination is ongoing, reference to CRISRP/CAS9-mediated introduction of knockout of S-RNase gene resulting in self-compatibility.

EP4023665
STSCI PROTEIN FOR CHANGING SELF-CROSSLINKING INCOMPATIBILITY OF DIPLOID POTATO MATERIALS
Examination is ongoing, major claims excluded from patentability and lack unity. Unlikely to be proceeded without major restructuring.

EP3718396
SELF-COMPATIBILITY METHOD FOR POTATOES
Examination is ongoing. some major claims refer to essentially biological processes and are not allowable. Claim 1 lacks inventive step. Major rewriting may be required to progress.

EP3935181
OVERCOMING SELF-INCOMPATIBILITY IN DIPLOID PLANTS FOR BREEDING AND PRODUCTION OF HYBRIDS THROUGH MODULATION OF HT
Examination is ongoing.

EP4023771
METHOD FOR IDENTIFYING PRESENCE OR ABSENCE OF SELF-COMPATIBILITY OF DIPLOID POTATO.
Examination is ongoing. Some major claims lack inventive step and clarity, recent amendments result in some major claims go beyond the content of original application.

EP4198133
GLYCOALKALOID METABOLISM ENYZYMES (GAMES) AND USES THEREOF (GAME31)
Examination is ongoing. It is likely that the scope of protection will be narrower than of GAME25 patent.

Literatur:

Clot CR, Vexler L, de La O Leyva-Perez M, Bourke PM, Engelen CJM, Hutten RCB, van de Belt J, Wijnker E, Milbourne D, Visser RGF, Juranić M, van Eck HJ. Identification of two mutant JASON-RELATED genes associated with unreduced pollen production in potato. Theor Appl Genet. 2024 Mar 12;137(4):79. doi: 10.1007/s00122-024-04563-7. PMID: 38472376; PMCID: PMC10933213.
Identification of two QTLs with major effect on unreduced pollen production in potato. They show recessive inheritance, additive interaction and are co-localised with genes encoding putative JASON homologs of arabidopsis, which re key regulators of meiosis II spindle orientation in this model plant.

Clot CR, Klein D, Koopman J, Schuit C, Engelen CJM, Hutten RCB, Brouwer M, Visser RGF, Jurani M, van Eck HJ. Crossover shortage in potato is caused by StMSH4 mutant alleles and leads to either highly uniform unreduced pollen or sterility. Genetics. 2024 Jan 3;226(1):iyad194. doi: 10.1093/genetics/iyad194. PMID: 37943687; PMCID: PMC10763545.
Publication describes StMSH4 gene, which regulates the crossing-over frequency during meiosis. Modulation of StMSH activity can lead to much higher or lower recombination in gametes, both processes being useful in different aspects of potato breeding.

Li H, Brouwer M, Pup ED, van Lieshout N, Finkers R, Bachem CWB, Visser RGF. Allelic variation in the autotetraploid potato: genes involved in starch and steroidal glycoalkaloid metabolism as a case study. BMC Genomics. 2024 Mar 12;25(1):274. doi: 10.1186/s12864-024-10186-5. PMID: 38475714; PMCID: PMC10936075.
Identification of gene candidates for starch and glycoalkaloid biosynthesis, which can serve as additional target selection in potato breeding
Ma L et al, “A nonS-locus F-box gene breaks self-incompatibility in diploid potatoes”, Nat Commun. 2021 Jul 6;12(1):4142. doi: 10.1038/s41467-021-24266-7

Aboobucker SI et al, „Haploid male fertility is restored by parallel spindle genes in Arabidopsis thaliana“. Nat Plants. 2023 Feb;9(2):214-218. doi: 10.1038/s41477-022-01332-6

Vos, P.G et al, “GWAS in tetraploid potato: identification and validation of SNP markers associated with glycoalkaloid content“, Mol Breeding 42, 76 (2022). https://doi.org/10.1007/s11032-022-01344-2

Zhang J et al, „Construction of homozygous diploid potato through maternal haploid induction“, aBIOTECH. 2022 Sep 15;3(3):163-168. doi: 10.1007/s42994-022-00080-7

4. Veröffentlichungen

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Berichts sind keine Veröffentlichungen geplant.

ANHANG

Teilvorhaben 1: Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion GmbH & Co. OHG, FKZ 2220NR065A

1. **Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens**

Das Gesamtziel des Verbundvorhabens besteht darin, eine diploide Stärkekartoffelzüchtung zu etablieren, um die Züchtungszeiträume und den Umfang der Züchtungsarbeiten effizient zu gestalten.

Im Rahmen des Teilvorhabens 1 erfolgen alle im Verbundvorhaben notwendigen Züchtungsarbeiten.

2. **Bearbeitete Arbeitspakete** (Details siehe gemeinsamer Abschlussbericht)

TP I: Erstellung diploider Zuchtklone für Stärkequalitäten, Leistung und Resistenz

AP I.1 Auskreuzen von EMS-Erbgut von Chromosomen mit inaktiven Allelen

- Es wurden Kreuzungskombinationen mit HAP- und HAP-PLUS Stämmen durchgeführt

AP I.2 Ploidie-Reduktion von Klonen mit inaktiven Allelen durch Kreuzung mit *S. phureja*

- Sterile Anzucht von Samen in der Gewebekultur aus Reduktionskreuzungen, Ploidiebestimmung und Knollenproduktion
- Überprüfung der Ploidie der Nachkommenschaft EB21/16 sowie des vermeintlich diploiden Ausgangsklons 35a15

AP I.3 Ploidie-Reduktion von Leistungsklonen durch Kreuzung mit *S. phureja*, Verwandtschaftsanalyse

- Reduktionskreuzungen von insgesamt 46 Leistungsklonen
- Samenselektion (ohne roten Samenpunkt) und Aussaat von Samen aus Reduktionskreuzungen, Pflanzen von Einzelpflanzen bzw. A-Klonen im Feld, Ploidiebestimmung mittels Chloroplastenzählung in Schließzellen

TP II: Überwinden der Selbstinkompatibilität

AP II.1 Identifizierung von S-RNAsen und Bestimmung von Kompatibilitätsklassen

- Pistillernte, Gefriertrocknung und Versand des Pflanzenmaterials an Unterauftragnehmer für eine RNAseq-Analyse
- Übermittlung der Sequenzierergebnisse an den Partner Fraunhofer IME zur Analyse
- Testkreuzungen mit ausgewählten diploiden Klonen zur Bestimmung von Kompatibilitätsklassen

AP II.2 Einkreuzen von SLI aus S. chacoense bzw. homologer Gene aus *S. phureja*, *S. stenotomum* ssp. goniocalyx, *S. stenotomum* ssp. *stenotomum*, 2n-Gameten

- Anzucht von Sämlingen im Gewächshaus aus Kreuzungen mit einem für das SLI-Gen homozygoten Klon
- SLI-Markeranalyse in Sämlingen aus den Reduktionskreuzungen 2021, 2022 und 2023

AP II.3 Entwicklung diagnostischer Marker für das SLI-Gen und Gegenselektion gegen *S. chacoense*-Erbgut

- Ein diagnostischer Marker für SLI wurde entwickelt, die Markeranalyse wurde bereits in vorhandenen diploiden Sämlingen durchgeführt (siehe AP II.2)

TP III: Screening der tetraploiden TILLING-Populationen nach Mutationen in GAME4 und GAME9 und Untersuchung der natürlichen Variabilität

AP III.1 Bestimmung der Sequenzvariabilität von GAME4 und GAME9

- Zur Bestimmung der Sequenzvariabilität von GAME4 und GAME9 wurde Blattmaterial von 384 verschiedenen Sorten und Zuchtklonen geerntet, die DNA isoliert (BNA) und dem Partner IME zur Analyse zur Verfügung gestellt.

AP III.2 Anzucht der TILLING-Populationen aus Knollen und Blatternte zur DNA-Isolierung

- Die beiden TILLING-Populationen wurden zur Erhaltung im Gewächshaus aus Knollen angezogen und nach der Abreife geerntet. Die Populationen lagern bis zum Projektende bei 5°C.

AP III.5 Aufnahme von Kandidatenlinien in die Gewebekultur

- Insgesamt wurden 32 GAME9 und GAME4 Kandidatenlinien in die sterile Gewebekultur aufgenommen. Aufgrund der Mutationsanalyse wurden einige Genotypen verworfen, für die keine schädliche Aminosäuremutation vorhergesagt werden konnten.
- Es wurden phytosanitäre Analysen (Viren, Bakterien) aller Inkulturnahmen durchgeführt
- Die Mutationen in den Kandidatenlinien in der Gewebekultur wurden durch Sanger-Sequenzierung (IME) bestätigt. BNA isolierte hierfür die DNA und erstellte die Amplikons

TP IV: Feldprüfungen

AP IV.1 Leistungsprüfungen vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien

- Die primärdihaploiden Linien 37a15 und 37b5 konnten aufgrund der sehr hohen Virusanfälligkeit kein weiteres Jahr für eine Leistungsprüfung vermehrt werden, zudem stellte sich heraus, dass 37a15 tatsächlich tetraploid ist (siehe API.2).
- Neue primärdihaploide HAP-PLUS- und PLUS-Linien wurden erzeugt (siehe AP I.2), in der Gewebekultur angezogen und zur Knollenproduktion ins Gewächshaus gepflanzt. Die Marker-selektierten Pflanzen wurden in der Saison 2023 als Einzelpflanzen für eine Vermehrung ins Feld gepflanzt.

AP IV.2 Leistungsprüfungen tetraploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien und Linien mit neuen Kombinationen inaktiver Allele

- 2020: 26 HAP-Stämme (inkl. Duplexe/Triplexe), 11 HAP-PLUS-Stämme, 9 Stämme mit neuen Allelkombinationen
- 2021: 26 HAP-Stämme (inkl. Duplexe/Triplexe), 10 HAP-PLUS-Stämme, 7 Stämme mit neuen Allelkombinationen
- 2022: 43 HAP-Stämme (inkl. Duplexe/Triplexe) davon 6 HAP-PLUS-Stämme und 2 Stämme mit neuen Allelkombinationen
- 2023: 32 HAP-Stämme (inkl. Duplexe/Triplexe) davon 4 HAP-PLUS-Stämme und 2 Stämme mit neuen Allelkombinationen
- Erntegut wurde für die Stärke- und Proteinanalyse and den Projektpartner Emslandstärke geliefert

AP IV.3 Anbau von diploiden und tetraploiden Leistungssorten

- 2021: 75 Klone
- 2022: 32 Klone
- 2023: 36 Klone von 2 Orten
- Lieferung von Knollen an Emsland-Stärke, Blatternte für die DNA-Isolierung und Lieferung an Fraunhofer IME für Öko-TILLING.

TP VI: Aufbau einer Datenbank für die diploide Sortenzüchtung

- Auf der Grundlage der bei BNA in der tetraploiden Sortenzüchtung eingesetzten Datenbank eBrida wurde eine Testversion für eine Datenbank zur diploiden Sortenzüchtung aufgesetzt
- Daten aus dem aktuellen Projekt wurden eingegeben, um die Funktionalitäten der Datenbank zu prüfen.

3. **Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens** Details siehe gemeinsamer Abschlussbericht

TP I: Erstellung diploider Zuchtklone für Stärkequalitäten, Leistung und Resistenz

AP I.1 Auskreuzen von EMS-Erbgut von Chromosomen mit inaktiven Allelen

- Es wurden Kreuzungen zur Reduktion des EMS-Hintergrunds durchgeführt
- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP I.1

AP I.2: Ploidie-Reduktion von Klonen mit inaktiven Allelen durch Kreuzung mit *S. phureja*

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP I.2

AP I.3: Ploidie-Reduktion von Leistungsklonen durch Kreuzung mit *S. phureja,* Verwandtschaftsanalyse

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP I.3

TP II: Überwinden der Selbstinkompatibilität

AP II.2 Einkreuzen von SLI aus *S. chacoense* bzw. homologer Gene aus *S. phureja*, *S. stenotomum* ssp. goniocalyx, *S. stenotomum* ssp. *stenotomum*, 2n-Gameten

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP II.2

AP II.3 Entwicklung diagnostischer Marker für das SLI-Gen und Gegenselektion gegen *S. chacoense*-Erbgut

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP II.3

TP III: Screening der tetraploiden TILLING-Populationen nach Mutationen in GAME4 und GAME9 und Untersuchung der natürlichen Variabilität

AP III.1 Bestimmung der Sequenzvariabilität von GAME4 und GAME9

- Die Klone mit den GAME 4 Knockout-Allelen stammen aus dem Züchtungspool von BNA
- Die Kandidatenlinien wurden in der Gewebekultur vermehrt und 2023 zur Knollenproduktion ins Gewächshaus gepflanzt

AP III.2 Anzucht der TILLING-Populationen aus Knollen und Blatternte zur DNA-Isolierung

- Die TILLING-Populationen von BNA stehen bis zum Ende des Projekts zur Verfügung

AP III.5 Aufnahme von Kandidatengenen in die Gewebekultur

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP III.5

TP IV: Feldprüfungen

AP IV.1 Leistungsprüfungen vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP IV.1

AP IV.2 Leistungsprüfungen tetraploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien und Linien mit neuen Kombinationen inaktiver Allele

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP IV.2

AP IV.3 Anbau von diploiden und tetraploiden Leistungssorten

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht AP IV.3

TP VI: Aufbau einer Datenbank für die diploide Sortenzüchtung

- Siehe gemeinsamer Abschlussbericht TP VI

Teilvorhaben 2: Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Oekologie IME, FKZ2220NR065B

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Gesamtziel des Verbundvorhabens besteht darin, eine diploide Stärkekartoffelzüchtung zu etablieren, um die Züchtungszeiträume und den Umfang der Züchtungsarbeiten effizient zu gestalten.

Im Rahmen des Teilvorhabens 2 erfolgen die im Verbundvorhaben notwendigen Laboranalysen zur Identifizierung neuer Allele in den Zielgenen sowie der Etablierung von Marker Techniken.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

TP I: Erstellung diploider Zuchtklone für Stärkequalitäten, Leistung und Resistenz

AP I.3 Ploidie-Reduktion von Leistungsklonen durch Kreuzung mit *S. phureja*, Verwandtschaftsanalyse

- Arbeiten des IME: Etablierung der Verwandtschaftsananlyse.

TP II: Überwinden der Selbstinkompatibilität

AP II.1 Identifizierung von S-RNAsen und Bestimmung von Kompatibilitätsklassen

- Arbeiten des IME: Analyse der RNAseq Daten und Identifizierung exprimierter S-RNasen.

AP II.3 Entwicklung diagnostischer Marker für das SLI-Gen und Gegenselektion gegen *S. chacoense*-Erbgut

- Arbeiten des IME: Durchführung aller, für die Markerentwicklung nötigen Sequenzanalysen.

TP III: Screening der tetraploiden TILLING-Populationen nach Mutationen in GAME4 und GAME9 und Untersuchung der natürlichen Variabilität

AP III.1 Bestimmung der Sequenzvariabilität von GAME4 und GAME9

- Arbeiten des IME: Durchführung der Ermittlung der Sequenzvariabilität von GAME 9 und GAME4.

AP III.2 Anzucht der TILLING-Populationen aus Knollen und Blatternte zur DNA-Isolierung

- Arbeiten des IME: Die am IME vorhandene TILLING Population wurde zur Erhaltung erneut ausgepflanzt, Knollen und Blattgewebe geerntet und DNA präpariert.

AP III.3 Screening der TILLING-Population für GAME4- und GAME9-Defektmutanten

- Arbeiten des IME: Erstellung der Pools aus den ca. 3000 DNA-Proben der Populationen von BNA und IME zum folgenden NGS-Screening.

AP III.4 NGS der Kandidatengene

- Arbeiten des IME: Durchführung des TILLING-Screenings für beide Zielgene und beide TILLING Populationen.

AP III.5 Aufnahme von Kandidatengenen in die Gewebekultur

- Informationen zu den identifizierten Pflanzen mit neuen Allelen wurden dem Projektpartner BNA zwecks Aufnahme in die Gewebekultur übergeben.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens *(Details siehe gemeinsamer Abschlussbericht unter: II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse)*

TP I: Erstellung diploider Zuchtklone für Stärkequalitäten, Leistung und Resistenz

AP I.3 Ploidie-Reduktion von Leistungsklonen durch Kreuzung mit *S. phureja*, Verwandtschaftsanalyse

- Verwandtschaftsanalysen etabliert, getestet und angewendet.

TP II: Überwinden der Selbstinkompatibilität

AP II.1 Identifizierung von S-RNAsen und Bestimmung von Kompatibilitätsklassen

- RNAseq Daten wurden analysiert, exprimierte S-RNasen identifiziert und deren Expression quantifiziert.

AP II.3 Entwicklung diagnostischer Marker für das SLI-Gen und Gegenselektion gegen *S. chacoense*-Erbgut

- Es wurden die für die Identifizierung und Analyse des Markers für den Nachweis der Promotormutation im Gen StSCI nötigen Sequenzanalysen durchgeführt.

TP III: Screening der tetraploiden TILLING-Populationen nach Mutationen in GAME4 und GAME9 und Untersuchung der natürlichen Variabilität

AP III.1 Bestimmung der Sequenzvariabilität von GAME4 und GAME9

- Sequenzvarianten für GAME4 und GAME9 identifiziert, darunter drei Knock-Out Allele für das Gen GAME4. Vorkommende Haplotypen bestimmt und mit Phänotyp assoziiert, signifikante Unterschiede zwischen GAME9 Haplotypen und TGA-Gehalt identifiziert.

AP III.2 Anzucht der TILLING-Populationen aus Knollen und Blatternte zur DNA-Isolierung

- Da die TILLING Population am IME bereits einige Zeit bei 4°C gelagert wurde und die Knollen bereits wieder zu keimen begannen, wurde die gesamte Population erneut im Gewächshaus ausgepflanzt, Blattgewebe geerntet, frische DNA präpariert und die Knollen erneut bei 4°C eingelagert.

AP III.3 Screening der TILLING-Population für GAME4- und GAME9-Defektmutanten

- Die TILLING Populationen bestehen aus ca. 3000 Pflanzen die in 4 Subpopulationen zu je 768 Pflanzen aufgeteilt wurden. Nach Normalisierung der DNA-Konzentrationen wurden die Proben in Gruppen zu 16 Pflanzen gepoolt. Dabei kam eine zweidimensionale Pooling Strategie zum Einsatz. Für jede Subpopulation wurden 96 Pools erstellt, die aus je 16 Pflanzen bestehen. Jede Pflanze der Subpopulation kommt dabei in zwei Pools vor. Die Anordnung wurde so gewählt, dass bei der Identifikation einer Mutation in zwei korrespondierenden Pools nur genau jeweils eine Pflanze in beiden Pools vorkommt und somit eindeutig zu identifizieren ist.

AP III.4 NGS der Kandidatengene

- Zweistufige Amplifikation passender Fragmente der Zielgene GAME4 und GAME9 der TILLING Populationen
- Induzierte Mutationen für beide Zielgene mittels NGS identifiziert. Darunter für das Zielgen GAME9 zwei Stop-Codons und für beide Zielgene Basenaustausche die zu Aminosäureaustauschen führen, die die Genfunktion beeinflussen.

AP III.5 Aufnahme von Kandidatengenen in die Gewebekultur

- Informationen zu den identifizierten Pflanzen mit neuen Allelen wurden dem Projektpartner BNA zwecks Aufnahme in die Gewebekultur übergeben.

Teilvorhaben 3: Emsland-Stärke GmbH, FKZ2220NR065C

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Ziel des Teilvorhabens besteht darin, die Wertschöpfung der Kartoffel durch eine Qualitätssteigerung weiterer Inhaltsstoffe zu erhöhen. Um die Wertigkeit des Proteins zu verbessern, sollen unerwünschte Inhaltsstoffe wie Glykoalkaloide reduziert werden.

Im Rahmen des Teilvorhabens 3 erfolgte die Stärke- und Proteinanalytik im Verbundvorhaben zur Beurteilung primärdihaploider und tetraploider Linien bzw. Leistungssorten.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP 5: Stärke- und Proteinanalytik

AP 5.1 Stärkeanalytik

AP 5.1.1 Stärkeanalyse vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien

AP 5.1.2 Stärkeanalyse tetraploider HAP-, HAP-PLUS- und HAP-PLUS^2-Linien

AP 5.1.3 Stärkeanalyse von tetraploiden Leistungssorten

AP 5.2 Proteinanalytik

AP 5.2.1 Etablierung neuer Techniken zur quantitativen Proteinanalytik

AP 5.2.2 Proteinanalyse vorhandener primärdihaploider HAP-PLUS- und PLUS-Linien

AP 5.2.3 Proteinanalyse tetraploider HAP-, HAP-PLUS-, PLUS- und HAP-PLUS^2-Linien

AP 5.2.4 Proteinanalyse von tetraploiden Leistungssorten

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

(Details siehe gemeinsamer Abschlussbericht unter: II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse)

AP 5: Stärke- und Proteinanalytik

AP 5.1 Stärkeanalytik

Von den tetraploiden und primärdihaploiden HAP-, HAP-PLUS-, HAP-PLUS^2- und PLUS-Linien wurde die Stärke gewonnen und analysiert. Dazu wurde der Amylosegehalt, die Viskosität, die Partikelgrößenverteilung sowie die Klarheit und Lagerstabilität der Stärkegele gemessen, damit eine Auswahl von Kreuzungspartnern für die Dihaploidzüchtung sowie die Leistungsprüfungen im Rahmen von »EDISON« getroffen werden konnte (siehe AP4.2).

AP 5.2 Proteinanalytik

Von den tetraploiden und primärdihaploiden HAP-, HAP-PLUS-, HAP-PLUS^2- und PLUS-Kartoffeln sowie von den tetraploiden Leistungssorten wurde Reibsel und Fruchtwasser hergestellt und davon der Protein- und Glykoalkaloidgehalt bestimmt. Für die Molekülgrößen-Verteilung wurde das Fruchtwasser mittels Gel-Permeations-Chromatografie analysiert. Die Methodenentwicklung für die HPLC-GPC für Kartoffelfruchtwasser ist abgeschlossen.