Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I - Kurzbericht

zum Verbundvorhaben

Thema: **ADLATUS: ADding LAyers of protection to gain a resistant staTUS against *M. chitwoodi*, PLRV, PVY & TRV**

(Erstellung neuer und Verstärkung bestehender Abwehrebenen der Kartoffel gegen die Schaderreger *M. chitwoodi*, PLRV, PVY und TRV)

Zuwendungsempfänger:

Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion GmbH & Co. OHG (BNA)

Förderkennzeichen:

28A8701A19

Laufzeit:

01.12.2020 bis 31.01.2024

Monat der Erstellung:

07/2024

Gefördert durch

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Projektträger

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Als Reaktion auf die Verbreitung neuer und/oder sich verändernder Schadorganismen bei gleichzeitigem Wegfall wichtiger Pflanzenschutzmittel wurden in »ADLATUS« bestehende Resistenzen gegenüber wichtigen Quarantäne- und Nichtquarantäneschaderregern (*Meloidogyne chitwoodi*, Kartoffelvirus Y (Potato Virus Y, PVY), Kartoffelblattrollvirus (Potato Leafroll Virus, PLRV) und Tabak-Rattle-Virus (TRV), sowie *Myzus persicae* als bedeutender Virusvektor) sowie rezessive Wirtsresistenzen untersucht mit dem Ziel, die verschiedene Ebenen der pflanzlichen Immunabwehr gezielt in der Züchtung neuer Kartoffelsorten zu kombinieren.

Die wesentlichen Ziele von »ADLATUS« waren: i.) Analyse des Resistenzmechanismus von $R_{MC1\text{-}blb}$ gegen *M. chitwoodi*, einem bedeutenden Quarantäneschaderreger an Kartoffel, ii.) Identifizierung und Nutzbarmachung ungenutzter Resistenzen gegen PLRV, PVY sowie TRV und deren Vektoren wie die Blattlausart *Myzus persicae* sowie *Trichodorus/Paratrichodorus.* iii.) Screening von TILLING-Populationen nach rezessiven Wirtsfaktoren, die z.B. die Translation der Virus-RNA verhindern bzw. das Überleben der Nematoden in den Wurzeln unterbinden (Kallosedeposition in Siebröhren), iv.) Untersuchung vorhandener resistenter und anfälliger Sorten/Linien auf die Variabilität dieser Wirtsfaktoren, v.) Kombination neuer rezessiver Wirtsresistenzen mit vorhandenen Mechanismen der Pathogenabwehr.

Zu Projektbeginn waren aus gemeinsamen Vorläuferprojekten (BNA, JKI-Bs) spaltende Population aus Kreuzungen *M. chitwoodi*-resistenter Wildarten und TRV-resistenter Zuchtklone mit anfälligen Eltern vorhanden, die für weitere Rückkreuzungsarbeiten zur Verfügung standen. Für die Detektion von TRV-infizierten Kartoffeln wurde in einem gemeinsamen Projekt vom Fraunhofer IME und BNA ein auf LAMP-Technologie basierender Schnelltest entwickelt.

Zudem konnte das JKI-QLB in Vorversuchen PVY und PLRV-resistente Zuchtstämme (*Solanum tuberosum*) identifizieren, welche nach Untersuchung der publizierten Marker keine bekannten PVY/PLRV-Resistenzen tragen. Zu Projektbeginn lag bereits eine spaltende Population aus den beiden Zuchtstämmen vor, die im Projekt zur Resistenztestung und -kartierung verwendet wurden.

Bei vielen pflanzenpathogenen Viren findet sich ein kleines Protein am 5‘-Ende (VPg, Virus Protein, genome linked), welches sowohl mit dem Translations-Initiationsfaktor eIF4E als auch mit dessen Isoform eIF(iso)4E interagiert (Leonard et al., 2002; Eskelin et al., 2011). Die spezifische Interaktion pflanzlicher Translations-Initiationsfaktoren mit der viralen RNA ist ein wichtiger Schritt im Infektionszyklus, dessen Unterbrechung eine Virus- bzw. Virusisolat-spezifische Resistenz bewirken kann. Eine Variante von elF4E konnte in PVY-resistenten Kartoffeln nachgewiesen werden (Duan et al., 2012).

Im Siebelement des Phloems höherer Pflanzen finden sich sogenannte Phloem- oder P-Proteine, die das Siebelement je nach Verletzung zunächst vorübergehend oder auch dauerhaft verschließen. Vorarbeiten des WWU und Fraunhofer IME zeigten, dass die Herunterregulierung der Expression der P-Proteingene stets den direkten Verschluss des betroffenen Siebelementes mit Kallose zur Folge hatte, woraus eine hohe Resistenz gegenüber dem Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* resultierte.

Sowohl die Translations-Initiationsfaktoren als auch die P-Proteine stellen daher interessante rezessive Wirtsfaktoren dar, die als Zielgene sowohl für die gezielte Genomeditierung als auch für die Suche nach Defektallelen per TILLING bzw. ÖkoTILLING verwendet wurden. Das Fraunhofer IME hat zusammen mit dem Projektpartner BNA in verschiedenen Projekten das Screening für diploide und tetraploide TILLING-Populationen in Kartoffel etabliert und eine Methode zum Screening dieser Populationen mittels Next Generation Sequenzierung entwickelt.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

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

In insgesamt 15 Phänotypisierungsexperimenten wurden verschiedene Wildarten, eine ausgewählte spaltende Population sowie verschiedene Rückkreuzungspopulationen bzgl. einer *M. chitwoodi*-Resistenz in Zusammenarbeit mit dem JKI-Bs charakterisiert. Es zeigten sich in den untersuchten Wildarten und deren Nachkommenschaften sehr gute Resistenzen gegenüber der Prüfpopulation „Borken“ aber auch gegenüber der aggressiveren Population „P3“. Alle Resistenzquellen werden in Nachfolgeprojekten sowie im Vorzuchtprogramm von BNA weiterbearbeitet.

Für die Etablierungsarbeiten zur Resistenztestung gegenüber dem durch freilebende Nematoden übertragbaren Tobacco Rattle Virus (TRV) lieferte BNA das Pflanzenmaterial sowie eine im Feld geprüfte spaltende Population an die Projektpartner WU Münster sowie Fraunhofer IME. Es stellte sich heraus, dass weder die tritrophische noch die ditrophische Infektion von verschiedenen Kartoffelzuchtklonen stabil erzielt werden konnte. Pfropfungsversuche der spaltenden Population auf infizierte Tomatenunterlagen zeigten zwar einen Virustransport in den Reiser, es konnte jedoch keine Korrelation zu den Felddaten gefunden werden. Es zeigte sich aber, dass einzelne Sorten und Zuchtklone das TRV deutlich besser transportieren und vermehren als andere.

Die Wildarten, welche gegenüber *M. chitwoodi* charakterisiert wurden, wurden ebenfalls bzgl. der PVY-Resistenz beim Projektpartner JKI-QLB untersucht. Es konnten Genotypen identifiziert werden, die gegenüber beiden Schaderregern resistent sind und sich besonders für die weitere züchterische Bearbeitung eignen. In beiden Fällen können zukünftig identifizierte und bereits vorhandene molekulare Marker für die schnelle Integration der untersuchten Merkmale im Rahmen der Vorzüchtung und anschließenden konventionellen Züchtung sorgen.

BNA lieferte gDNA an den Partner Fraunhofer IME für ein Screening der TILLING-Population auf Defektmutationen in den rezessiven Wirtsfaktoren SEORa bis c sowie eIF4E. Die Population wurde im Rahmen des Projekts weiter erhalten. Für alle untersuchten Gene konnten STOP-Mutationen gefunden werden. Die identifizierte Defektmutanten wurden in die Sterilkultur überführt, phytosanitär untersucht und die Mutation durch eine Sanger-Sequenzierung bestätigt. Die Klone stehen für die weitere züchterische Bearbeitung zur Verfügung.

Für einen Öko-TILLING Ansatz, bei dem dieselben Gene wie in der TILLING-Population analysiert wurden, lieferte BNA gDNA verschiedener Wildartklone sowie von fortgeschrittenem Zuchtmaterial. Es konnten Defektmutationen von eIF4E sowie für SEORa in Wildarten gefunden werden. Die Klone stehen für die weitere züchtersiche Bearbeitung zur Verfügung.

Literatur

H. Duan, C. Richael, and C. M. Rommens, “Overexpression of the wild potato eIF4E-1 variant Eva1 elicits Potato virus Y resistance in plants silenced for native eIF4E-1,” Transgenic Res., vol. 21, no. 5, pp. 929–938, 2012.

K. Eskelin, A. Hafre, K. I. Rantalainen, and K. Ma, “Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and Inhibits Reporter mRNA

Translation In Planta,” vol. 85, no. 17, pp. 9210–9221, 2011.

S. Leonard, D. Plante, S. Wittmann, N. Daigneault, M. G. Fortin, and J.-F. Laliberte, “Complex Formation between Potyvirus VPg and Translation Eukaryotic Initiation Factor 4E Correlates with Virus Infectivity,” J. Virol., vol. 74, no. 17, pp. 7730–7737, 2002.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil II – Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

zum Verbundvorhaben

Thema: **ADLATUS: ADding LAyers of protection to gain a resistant staTUS against *M. chitwoodi*, PLRV, PVY & TRV**

Erstellung neuer und Verstärkung bestehender Abwehrebenen der Kartoffel gegen die Schaderreger *M. chitwoodi*, PLRV, PVY und TRV

Zuwendungsempfänger:

Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion GmbH & Co. OHG (BNA)

Förderkennzeichen:

28A8701A19

Laufzeit:

01.12.2020 bis 31.01.2024

Monat der Erstellung:

07/2024

Gefördert durch

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Projektträger

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Inhaltsverzeichnis

I. Kurzbericht 1

1. Aufgabenstellung 1

2. Planung und Ablauf des Vorhabens 2

3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse 2

Literatur 3

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse 4

1. Erzielte Ergebnisse 4

Arbeitspaket 1: Nematodenresistenz (*M. chitwoodi*): Identifikation und Charakterisierung von dominanten Resistenzen und Resistenzloci 4

Arbeitspaket 2: Virusresistenz (TRV, PVY, PLRV): Identifikation und Charakterisierung von dominanten Resistenzen und Resistenzloci 13

Arbeitspaket 3: Rezessive Wirtsfaktoren in Kartoffel: Etablierung einer neuartigen Resistenzform gegenüber *M. chitwoodi/M. persicae* durch gezielte Herunterregulierung/Ausschaltung der P-Proteine mittels Genom-Editierung bzw. RNA-Interferenz 21

Arbeitspaket 4: Rezessive Wirtsfaktoren in Kartoffel: Etablierung einer neuartigen Resistenzform gegenüber PVY, PLRV und TRV durch gezielte Herunterregulierung/Ausschaltung des eIF4E-Proteine mittels Genom-Editierung bzw. RNA-Interferenz 22

Arbeitspaket 5: Screening der TILLING-Population nach Mutationen in rezessiven Wirtsfaktoren 22

2. Verwertung 23

3. Erkenntnisse von Dritten 23

4. Veröffentlichungen 24

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Als Reaktion auf die Verbreitung neuer und/oder sich verändernder Schadorganismen bei gleichzeitigem Wegfall wichtiger Pflanzenschutzmittel wurden in »ADLATUS« bestehende Resistenzen gegenüber wichtigen Quarantäne- und Nichtquarantäneschaderregern und rezessive Wirtsresistenzen betrachtet. Auf diese Weise können verschiedene Ebenen der pflanzlichen Immunabwehr gezielt in die Züchtung neuer Kartoffelsorten mit einer breiten Pathogenresistenz überführt werden.

Im Fokus des Vorhabens standen folgende Schadorganismen: *Meloidogyne chitwoodi*, Kartoffelvirus Y (Potato Virus Y, PVY), Kartoffelblattrollvirus (Potato Leafroll Virus, PLRV) und Tabak-Rattle-Virus (TRV), sowie *Myzus persicae* als bedeutender Virusvektor. Diese werden adressiert, da sich im aktuellen Kartoffelsortiment nur unzureichende Resistenzen gegenüber *M. chitwoodi* und *Trichodorus/Paratrichodorus*, dem Überträger von TRV finden. Zudem führt der Wegfall insektizider Wirkstoffe zu einer Zunahme des Virusbefalls durch PVY und PLRV, sodass ein dringender Forschungsbedarf besteht. Daher wurde in »ADLATUS« nach neuen dominanten Resistenzen gegen die genannten Schaderreger gesucht, um diese mit rezessiven Wirtsresistenzen zu kombinieren.

Die wesentlichen Ziele von »ADLATUS« waren: i.) Analyse des Resistenzmechanismus von $R_{MC1\text{-}blb}$ gegen *M. chitwoodi*, einem bedeutenden Quarantäneschaderreger an Kartoffel, ii.) Identifizierung und Nutzbarmachung ungenutzter Resistenzen gegen PLRV, PVY sowie TRV und deren Vektoren wie die Blattlausart *Myzus persicae* sowie *Trichodorus/Paratrichodorus.* iii.) Screening von TILLING-Populationen nach rezessiven Wirtsfaktoren, die z.B. die Translation der Virus-RNA verhindern bzw. das Überleben der Nematoden in den Wurzeln unterbinden (Kallosedeposition in Siebröhren), iv.) Untersuchung vorhandener resistenter und anfälliger Sorten/Linien auf die Variabilität dieser Wirtsfaktoren, v.) Kombination neuer rezessiver Wirtsresistenzen mit vorhandenen Mechanismen der Pathogenabwehr.

Zu Projektbeginn waren spaltende Population aus Kreuzungen gegen *M. chitwoodi*-resistenter Wildarten vorhanden, mit denen weitere Kreuzungen durchgeführt wurden und die auf bekannte und neue Resistenzquellen untersucht wurden.

In einem vorhergehenden Projekt der BNA mit dem JKI Münster, dem JKI-EP und weiteren Partnern wurden spaltende Populationen erzeugt. Für die Detektion von TRV-infizierten Kartoffeln wurde in einem gemeinsamen Projekt vom Fraunhofer IME und BNA ein auf LAMP-Technologie basierender Schnelltest entwickelt.

Zudem konnte das JKI-RS in Vorversuchen PVY und PLRV-resistente Zuchtstämme (*S. tuberosum*) identifizieren, welche nach Untersuchung der publizierten Marker keine bekannten PVY/PLRV-Resistenzen tragen. Zu Projektbeginn lag bereits eine spaltende Population aus den beiden Zuchtstämmen vor, die im Projekt zur Resistenztestung und -kartierung verwendet wurden.

Bei vielen pflanzenpathogenen Viren findet sich ein kleines Protein am 5‘-Ende (VPg, Virus Protein, genome linked), welches sowohl mit dem Translations-Initiationsfaktor eIF4E als auch mit dessen Isoform eIF(iso)4E interagiert (Leonard et al., 2002; Eskelin et al., 2011). Die spezifische Interaktion pflanzlicher Translations-Initiationsfaktoren mit der viralen RNA ist ein wichtiger Schritt im Infektionszyklus, dessen Unterbrechung eine Virus- bzw. Virusisolat-spezifische Resistenz bewirken kann. Eine Variante von eIF4E konnte in PVY-resistenten Kartoffeln nachgewiesen werden (Duan et al., 2012).

Im Siebelement des Phloems höherer Pflanzen finden sich sogenannte Phloem- oder P-Proteine, die das Siebelement je nach Verletzung zunächst vorübergehend oder auch dauerhaft verschließen. Vorarbeiten des WWU und Fraunhofer IME zeigten, dass die Herunterregulierung der Expression der P-Proteingene stets den direkten Verschluss des betroffenen Siebelementes mit Kallose zur Folge hatte, woraus eine hohe Resistenz gegenüber dem Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* resultierte.

Sowohl die Translations-Initiationsfaktoren als auch die P-Proteine stellen daher interessante rezessive Wirtsfaktoren dar, die als Zielgene sowohl für die gezielte Genomeditierung als auch für die Suche nach Defektallelen per TILLING bzw. ÖkoTILLING verwendet wurden. Das Fraunhofer IME hat zusammen mit dem Projektpartner Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion GmbH & Co. OHG (BNA) in verschiedenen Projekten das Screening für diploide und tetraploide TILLING-Populationen in Kartoffel etabliert und eine Methode zum Screening dieser Populationen mittels Next Generation Sequenzierung entwickelt. Derzeit existiert am Fraunhofer IME eine tetraploide TILLING-Population, die zweite Population wurde bei BNA erstellt.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

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

In insgesamt 14 Phänotypisierungsansätzen wurden sowohl verschiedene Wildarten als auch eine aus diesem Vorscreening resultierende spaltende Population sowie verschiedene Rückkreuzungspopulationen bzgl. einer *M. chitwoodi*-Resistenz charakterisiert.

In beiden Fällen können identifizierte molekulare Marker für die Introgression der untersuchten Merkmale im Rahmen der konventionellen Züchtung in zukünftige Sorten verwendet werden. Identifizierte resistente Wildformen werden im Rahmen zukünftiger Projekte weiterbearbeitet, um nach Möglichkeit auch deren Potential für die Züchtung zu nutzen.

Außerdem wurden in den untersuchten ÖkoTILLING- bzw. TILLING-Populationen rezessive Wirtsfakoren identifiziert, die, nach Analyse des Phänotyps Eingang in die Kartoffelzüchtung finden und mit bekannten und neuen Resistenzen kombiniert werden können.

Literatur

H. Duan, C. Richael, and C. M. Rommens, “Overexpression of the wild potato eIF4E-1 variant Eva1 elicits Potato virus Y resistance in plants silenced for native eIF4E-1,” Transgenic Res., vol. 21, no. 5, pp. 929–938, 2012.

K. Eskelin, A. Hafre, K. I. Rantalainen, and K. Ma, “Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and Inhibits Reporter mRNA

Translation In Planta,” vol. 85, no. 17, pp. 9210–9221, 2011.

S. Leonard, D. Plante, S. Wittmann, N. Daigneault, M. G. Fortin, and J.-F. Laliberte, “Complex Formation between Potyvirus VPg and Translation Eukaryotic Initiation Factor 4E Correlates with Virus Infectivity,” J. Virol., vol. 74, no. 17, pp. 7730–7737, 2002.

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Der fortschreitende Klimawandel, der Wegfall wichtiger Pflanzenschutzmittel und die Gefahr der weltweiten Verschleppung von Schaderregern stellen große Herausforderungen an die aktuelle Kartoffelzüchtung dar. Sowohl die Belastung durch abiotische Faktoren als auch die Koinfektion mit mehr als nur einem Pathogen kann die Anfälligkeit der Wirtspflanzen drastisch beeinflussen.

Im vorliegenden Projekt »ADLATUS« sollte für die Nutzpflanze Kartoffel ein ganzheitlicher Ansatz verfolgt werden, der durch die züchterische Kombination rezessiver Wirtsfaktoren mit bestehenden Abwehrmechanismen eine unmittelbare Reaktion der Pflanze auf neue und/oder sich verändernde Schadorganismen ermöglicht.

Im Fokus des Vorhabens standen mit *Meloidogyne chitwoodi*, Kartoffelvirus Y (Potato Virus Y, PVY), Kartoffelblattrollvirus (Potato Leafroll Virus, PLRV) und Tabakrasselvirus (Tobacco Rattle Virus, TRV) mehrere besonders gefährliche Quarantäne- und Nichtquarantäneschaderreger, die weltweit signifikante Verluste in Kartoffelkulturen verursachen und somit eine hohe praktische Relevanz besitzen. Die Virus-übertragenden Vektoren *Myzus persicae* (PLRV und PVY) sowie freilebende Nematoden der Gattung *Trichodorus/Paratrichodorus* wurden für die Nutzbarmachung von bisher ungenutzten Resistenzen ebenfalls untersucht.

Das Teilvorhaben A übernahm hierbei neben der Gesamtkoordination alle züchterischen Arbeiten (Kreuzungen und Phänotypisierungen), die Marker-gestützte Selektion spaltender Populationen für die TRV- und *M. chitwoodi*-Resistenz sowie die weitere Markerentwicklung durch CoSSA-Analysen. Des Weiteren leistet BNA seinen Beitrag durch die Auswahl, Anzucht und Bereitstellung resistenter bzw. anfälliger Sorten für die Virustestungen bzw. geeigneter Sorten für die Transformationen. BNA stellte eine TILLING-Population für die Identifizierung rezessiver Wirtsfaktoren zur Verfügung und hat die identifizierten Klone in die Gewebekultur aufgenommen.

Die Aufgaben wurden in fünf Arbeitspaketen gebündelt und sind im Folgenden aufgeführt.

Arbeitspaket 1: Nematodenresistenz (*M. chitwoodi*): Identifikation und Charakterisierung von dominanten Resistenzen und Resistenzloci

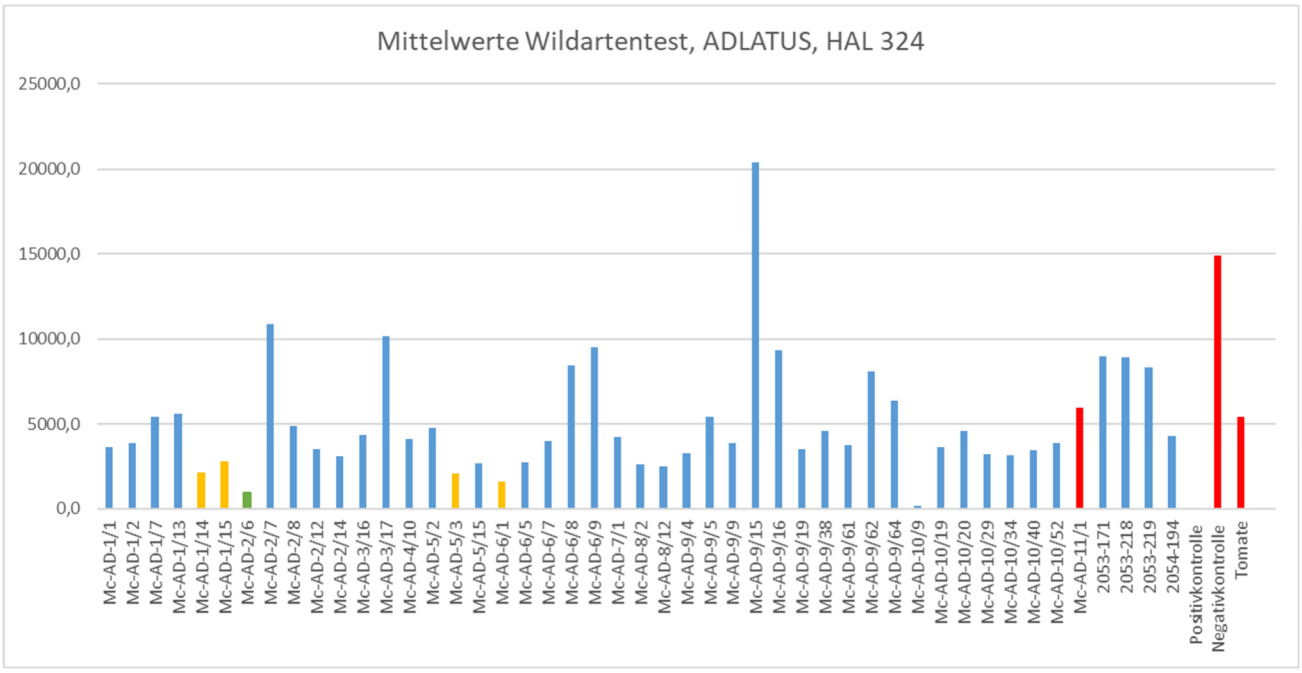
In insgesamt 14 Phänotypisierungsansätzen wurden sowohl verschiedene Wildarten als auch eine aus diesem Vorscreening resultierende spaltende Population sowie verschiedene Rückkreuzungspopulationen charakterisiert.

<u>AP1.1 Untersuchung von Resistenzmechanismen</u>

<u>AP1.3 Phänotypisierung und Kreuzung von Wildarten mit Teilresistenz zur Erstellung einer spaltenden Population und Phänotypisierung/Kartierung der Resistenz</u>

In ADLATUS 1 wurden 49 Genotypen mit jeweils 12 Pflänzchen/Genotyp aus verschiedenen Wildartakzessionen in der Gewebekultur vermehrt und an den Partner JKI-EP für die Phänotypisierung in Faltschachteln geliefert. Alle 12 Pflänzchen wurden gepflanzt und mit *M. chitwoodi* „Borken“ inokuliert

(200 J2/Faltschachtel). Eine Auswertung erfolgte in drei Pools/Genotyp mit 4 Pflänzchen/Pool (siehe Abbildung 1A und Bericht JKI-EP). Die besten Genotypen aus dem Wildart-Versuch ADLATUS 1 wurden in einem weiteren Experiment in Einzeltöpfen wiederholt inokuliert (Versuch ADLATUS 2.2, siehe Abbildung 1B). Hierfür wurden 20 *in vitro*-Pflänzchen der Genotypen Mc-AD-1/14, Mc-AD-5/3, Mc-AD-6/1, Mc-AD-10/9, Mc-AD-11/1 sowie der Kontrollen produziert und nach JKI-EP in Braunschweig geliefert.



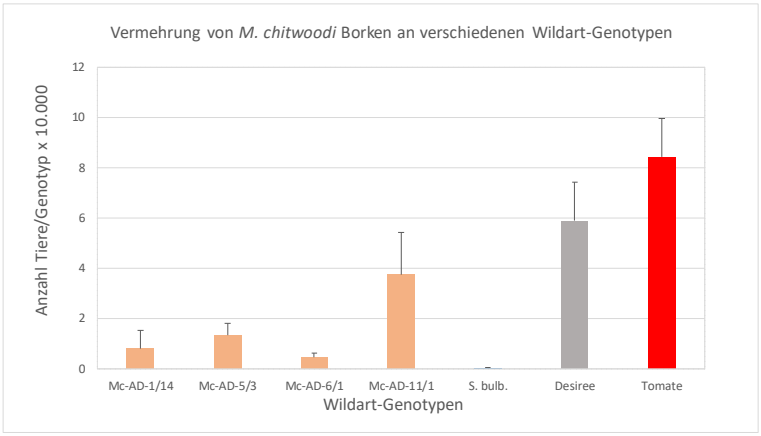


Abbildung 1: Anzahl der Eier/J2 in verschiedenen Wildartgenotypen nach der Inokulation mit *M. chitwoodi* „Borken“, Versuch ADLATUS 1. A: Es wurden jeweils 12 Pflanzen/Genotyp mit jeweils 200 J2-Juvenilen/Faltschachtel inokuliert. Die Auswertung erfolgte in 3 Pools mit jeweils 4 Pflanzen/Pool. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den drei Pools. Die Genotypen mit deutlich reduzierten Zystenzahl sind in gelb bzw. grün markiert. B: Wiederholung der Phänotypisierung ausgewählter Klone in 11er Töpfen. Es wurden jeweils 10 Pflanzen/Genotyp mit jeweils 400 J2-Juvenilen inokuliert. Die Auswertung erfolgte pro Einzelpflanze. Dargestellt sind die Mittewerte.

Die Anzucht erfolgte in 11er Plastiktöpfen, inokuliert wurde mit 400 J2-Juvenilen/Topf. Die Ergebnisse der Faltschachtelversuche haben sich im Topftest bestätigt. Der Klon Mc-AD-6/1 wies ein sehr geringes Wurzelwachstum auf, der Klon Mc-AD-10/9 ist in der Phänotypisierung komplett ausgefallen, beide Klone eignen sich deshalb nicht für die weitere züchterische Bearbeitung. Der Klon Mc-AD-1/14 hat im Gewächshaus nicht geblüht.

Der Klon Mc-AD-2/6 konnte erfolgreich als Vater in Kreuzungen eingesetzt werden. Die resultierenden Samen wurden oberflächensterilisiert, in der Gewebekultur angezogen und die keimenden Genotypen für einen ersten phänotypischen Test auf 9 Pflänzchen vermehrt und an den Projektpartner JKI-EP geliefert (ADLATUS 4, siehe Bericht JKI-EP und Abbildung 2). Die Anzucht und Inokulation erfolgten in Faltschachteln, für die Auswertung wurden jeweils 3 Pflänzchen gepoolt analysiert.

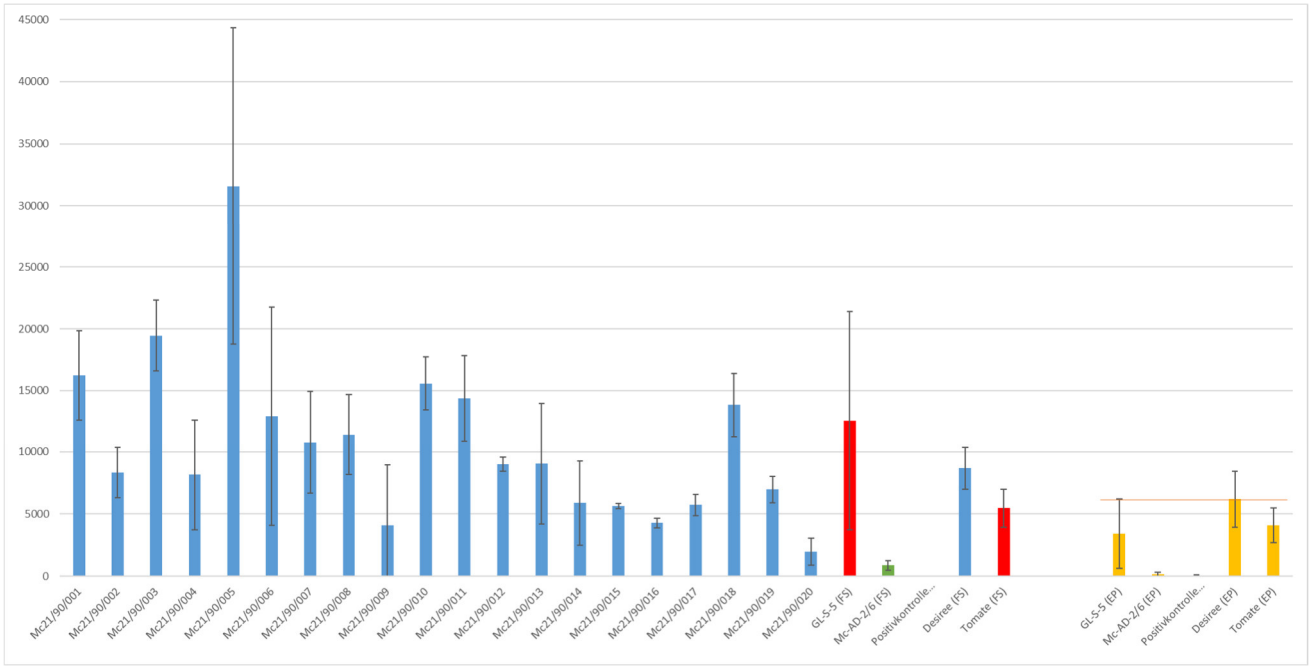


Abbildung 2: Anzahl der Eier/J2 in Nachkommen der Population Mc21/90 (*S. tuberosum* (2x) x Mc-AD-2/6 (2x)) nach der Inokulation mit *M. chitwoodi* „Borken“ Faltschachteln (blau) bzw. Töpfen (gelb).

Die Kontrollen des Versuchs ADLATUS 4 wurden sowohl in Faltschachteln als auch in größeren Einzeltöpfen (siehe gelbe Säulen in Abbildung 2) angezogen. In beiden Systemen zeigte sich für den resistenten Elter Mc-AD-2/6 eine deutliche Reduktion von Eiern und Juvenilen (J2) im Vergleich zum anfälligen Elter GL-S-5 und den anfälligen Kontrollen Tomate. Weitere 58 Genotypen der Kreuzung Mc21/90 wurden in den Experimenten ADLATUS 6, 8 und 9 in Faltschachteln phänotypisiert (siehe Abbildung 3).

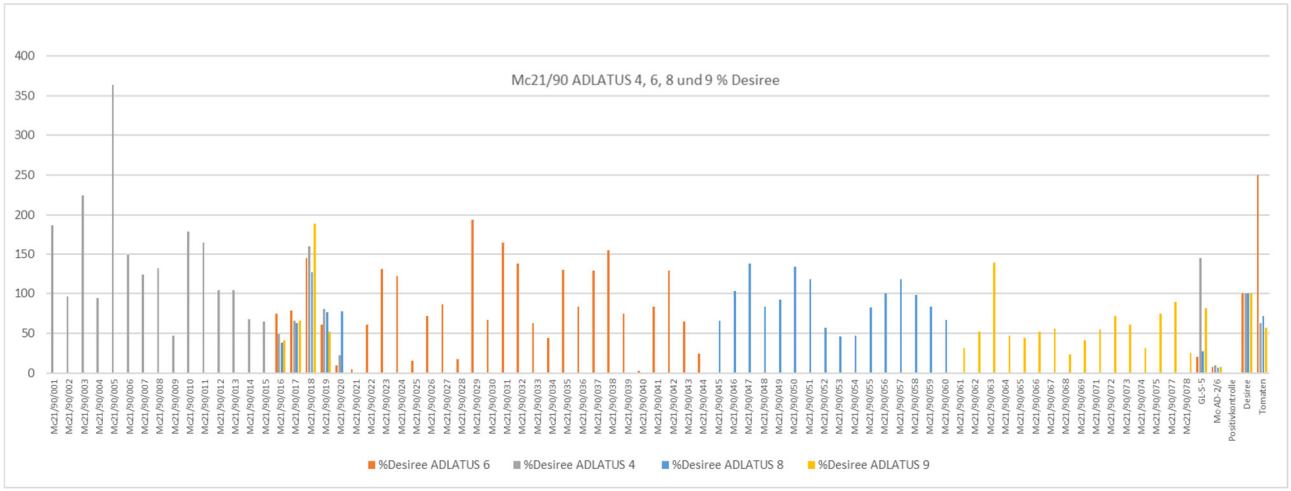


Abbildung 3: Anzahl der Eier/J2 in Nachkommen der Population Mc21/90 (*S. tuberosum* (2x) x Mc-AD-2/6 (2x)) nach der Inokulation mit *M. chitwoodi* „Borken“ im Faltschachtel-Versuch. Jeweils 9 Pflanzen/Genotyp wurden angezogen, die Auswertung erfolgte in Pools zu jeweils 3 Pflanzen.

Die Genotypen Mc21/90/015 bis 020 wurden in allen Phänotypsierungsversuchen als Kontrollen wiederholt. Aus den 4 Experimenten wurden jeweils 17 anfällige und 17 resistente Genotypen für eine weitere Phänotypisierung ausgewählt (ADLATUS 11, siehe Tabelle 1) und an den Partner JKI-EP geliefert. Es wurden jeweils 3 Pflanzen pro Klon in 11er-Töpfe gepflanzt und mit 400 J2 Juvenilen *M. chitwoodi* „Borken“ inokuliert. Die Auswertung erfolgte topfweise.

Tabelle 1: Auswahl von jeweils 17 anfälligen und 17 resistenten Genotypen für die Phänotypisierung (ADLATUS 11) und anschließende Sequenzierung:

anfälliger Pool:	%Desiree	resistenter Pool:	%Desiree
Mc21/90/001	187	Mc21/90/009	47
Mc21/90/003	224	Mc21/90/016	75; 49; 39; 41
Mc21/90/010	179	Mc21/90/020	10; 23; 78
Mc21/90/011	165	Mc21/90/021	4
Mc21/90/018	144; 160; 127; 189	Mc21/90/025	15
Mc21/90/029	194	Mc21/90/028	17
Mc21/90/031	165	Mc21/90/034	44
Mc21/90/032	137	Mc21/90/040	3
Mc21/90/035	130	Mc21/90/044	24
Mc21/90/038	154	Mc21/90/053	46
Mc21/90/042	129	Mc21/90/054	47
Mc21/90/047	137	Mc21/90/061	31
Mc21/90/050	135	Mc21/90/066	52
Mc21/90/051	118	Mc21/90/068	23
Mc21/90/056	100	Mc21/90/069	41
Mc21/90/057	118	Mc21/90/074	31
Mc21/90/063	139	Mc21/90/078	25

Die Auswertung des Experiments ADLATUS 11 (siehe Abbildung 4, blaue Balken) zeigt keinen eindeutigen Trend in den vorausgewählten vermeintlich resistenten bzw. anfälligen Pools (Abbildung 4, grüne Balken). Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Ergebnissen um einen Versuchsfehler aufgrund des größeren Topfvolumens im Vergleich zum Faltschachteltest handelt, wurde der Versuch in Faltschachteln mit insgesamt 9 Pflanzen pro Klon und einer Inokulation mit 200 J2 Juvenilen *M.*

chitwoodi „Borken“ pro Topf wiederholt (siehe Abbildung 4, orange Balken). Die Auswertung erfolgte in drei Pools mit jeweils 3 Pflanzen pro Pool.

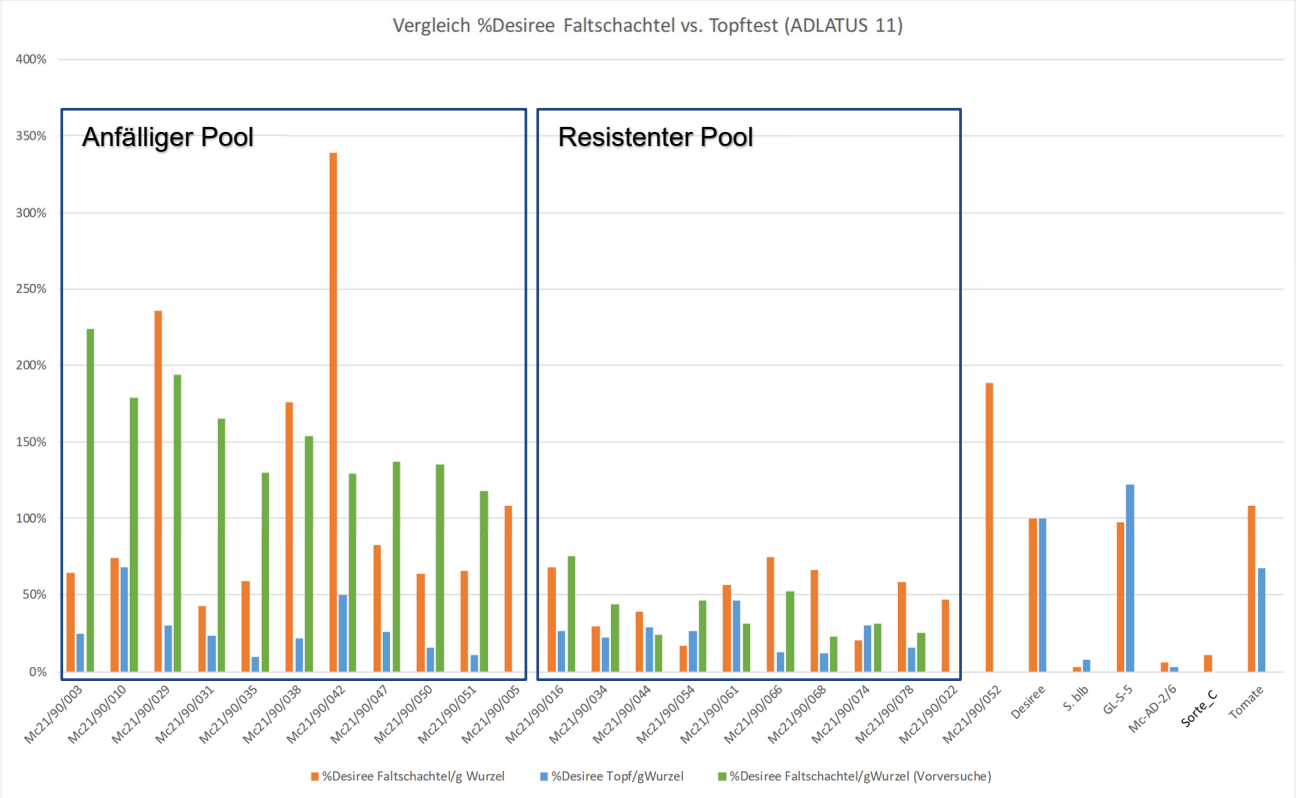


Abbildung 4: Anzahl der Eier/J2 in Nachkommen der Population Mc21/90 (*S. tuberosum* (2x) x Mc-AD-2/6 (2x)) nach der Inokulation mit *M. chitwoodi* „Borken“ im Faltschachtel-Versuch im Vergleich zum Topfversuch. Orange: Jeweils 9 Pflanzen/Genotyp wurden in Faltschachteln angezogen, mit 200 J2 Juvenilen der Population „Borken“ inokuliert und in drei Pools mit jeweils 3 Pflanzen ausgewertet. Blau: Jeweils 3 Pflanzen/Genotyp wurden in 11er Töpfen angezogen, mit 400 J2 Juvenilen der Population „Borken“ inokuliert und topfweise ausgewertet. Grün: Jeweils 9 Pflanzen/Genotyp von 20 Genotypen/Experiment wurden in insgesamt 4 aufeinanderfolgenden Experimenten in Faltschachteln angezogen, mit 200 J2 Juvenilen der Population „Borken“ inokuliert und in drei Pools mit jeweils 3 Pflanzen ausgewertet.

Es zeigt sich, dass die Versuche in Faltschachteln offenbar einen höheren Pathogendruck und damit einhergehend einen höheren Endbesatz/g Wurzelfrischmasse insbesondere im anfälligen Pool verursachen (vergleiche orange und grüne Balken mit blauen Balken). Im resistenten Pool ist dieser Trend ebenfalls zu beobachten, wenn auch nicht ganz so ausgeprägt. Die Analyse der Vermehrung der Nematoden in den beiden Testsystemen (siehe Abbildung 5) bestätigt diese Einschätzung. Auch hier kann in den Faltschachteln an den meisten Klonen eine höhere Vermehrungsrate festgestellt werden als in den Töpfen ($Vermehrungsrate = \frac{MW_{Endbesatz}}{Inokulum}$). Möglicherweise bildet sich in dem kleineren Topfvolumen schneller eine dichte Wurzelmasse aus, die den Nematoden als Nahrungsquelle dient als in den größeren Töpfen, in denen weitere Wege von den Nematoden zu den Wurzeln zurückgelegt werden müssen.

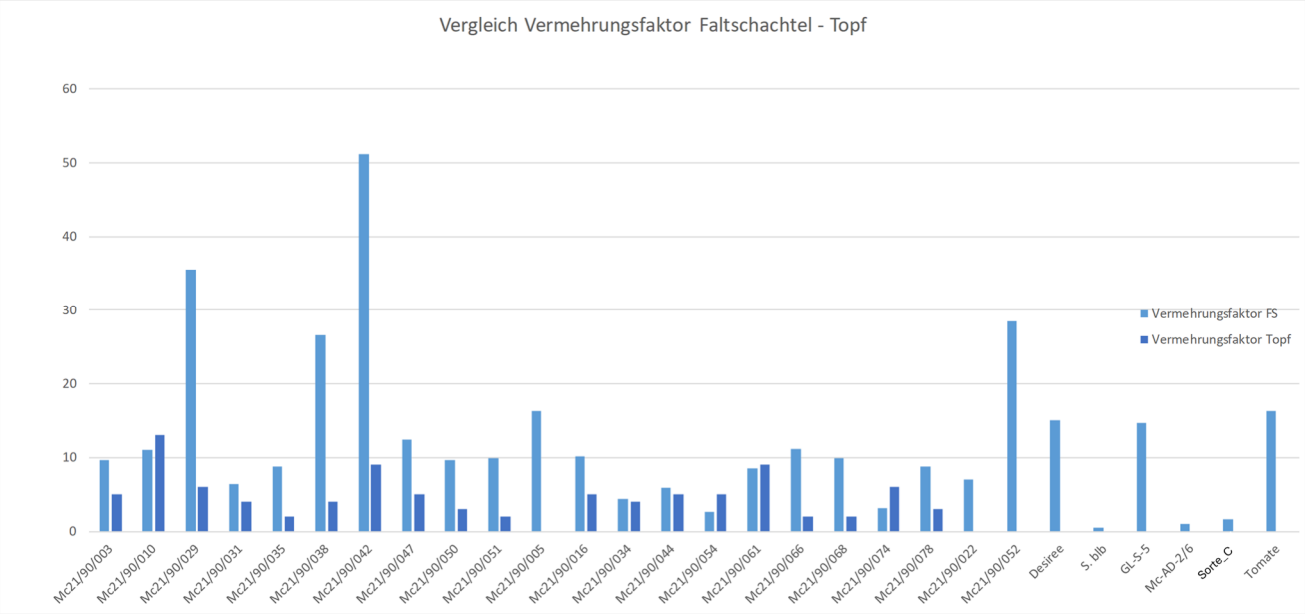


Abbildung 5: Vermehrungsfaktor in der Population Mc21/90 (*S. tuberosum* (2x) x Mc-AD-2/6 (2x)) nach der Inokulation mit *M. chitwoodi* „Borken“ im Faltschachtel-Versuch im Vergleich zum Topfversuch Hellblau: Vermehrungsfaktor im Faltschachtelversuch. Dunkelblau: Vermehrungsfaktor im Topfversuch.

Für die Markerentwicklung wurde gereinigte, hochmolekulare DNA aller 34 Klone der Population Mc21/90 (siehe Tabelle 1) sowie des anfälligen und resistenten Elters zur Sequenzierung an den Unterauftragnehmer BGI geschickt. Eine Zusammenfassung der Sequenzierstatistik ist in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2: Statistik der Sequenzierung der anfälligen und resistenten Klone der Population Mc21/90 sowie des resistenten und anfälligen Elters

Sample ID	Raw reads	Properly paired mapped reads	GC (%)	Metadata
GL_S_5	80,094,793	57,081,795	36.82	Anfälliger Elter
Mc21_90_003	80,065,232	51,162,890	37.11	Anfällig
Mc21_90_005	80,080,231	50,465,159	38.86	Anfällig
Mc21_90_016	80,000,257	52,729,891	37.68	Resistent
Mc21_90_022	80,056,431	52,052,494	37.48	Resistent
Mc21_90_031	80,083,218	51,097,237	37.29	Anfällig
Mc21_90_034	80,037,457	54,827,123	37.07	Resistent
Mc21_90_035	80,126,009	53,679,157	36.72	Anfällig
Mc21_90_038	80,097,068	54,335,258	36.98	Anfällig
Mc21_90_042	80,011,630	51,973,839	37.05	Anfällig
Mc21_90_044	80,114,424	53,678,415	37.06	Resistent
Mc21_90_047	80,081,723	53,286,419	36.93	Anfällig
Mc21_90_050	80,064,399	52,741,417	36.85	Anfällig

Mc21_90_051	80,048,177	55,458,133	36.65	Anfällig
Mc21_90_052	80,103,965	54,623,373	36.98	Resistent
Mc21_90_054	80,132,088	53,941,759	36.77	Resistent
Mc21_90_061	80,099,414	52,990,202	37.03	Resistent
Mc21_90_066	80,108,290	52,739,468	37.02	Resistent
Mc21_90_068	80,056,829	53,898,332	36.66	Resistent
Mc21_90_074	80,083,787	54,985,178	36.33	Resistent
Mc21_90_078	80,085,221	51,170,344	37.13	Resistent
Mc_AD_2_6	80,026,334	49,674,077	36.75	Resistenter Elter

Zur mechanistischen Untersuchung der $R_{MC\text{-}blb}$- im Vergleich zur $R_{MC\text{-}hou}$-Resistenz wurden für den Versuch ADLATUS 3 jeweils 40 *in vitro*-Pflänzchen der Genotypen *S. hougassii*-3 (S. hou), S.hou-5, S.hou-8, S.blb und Desiree produziert und an den Partner JKI-EP geliefert. Die Inokulation erfolgte in 11er Einzeltöpfen mit den *M. chitwoodi*-Populationen „Borken“ und „P9“ mit jeweils 5000 J2-Juvenilen/Topf, also einer deutlich höheren Besatzdichte als in den übrigen Topfversuchen (siehe Bericht JKI-EP und Abbildung 6).

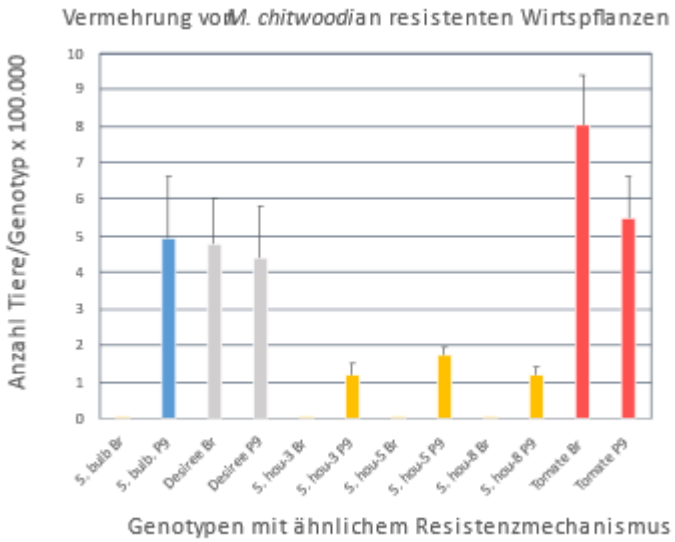


Abbildung 6: Testung von *S. hougassii*-Genotypen im Vergleich zu *S. bulbocastanum* mit den *M. chitwoodi*-Populationen „Borken“ und „P9“. Es wurden jeweils 10 Pflanzen/Genotyp und Nematodenpopulation in Einzeltöpfe gepflanzt und mit 5000 J2-Juvenilen inokuliert. Die Auswertung erfolgte auf Einzeltöpfe, dargestellt sind die Mittelwerte.

Im Vergleich zur Resistenz aus *S. bulbocastanum* scheint die Resistenz aus *S. hougassii* nicht vollständig von der aggressiveren *M. chitwoodi*-Population „P9“ überwunden zu werden. Während *S. bulbocastanum* mit „P9“ eine ähnliche Anzahl an Eiern und Juvenilen (J2) aufweist wie die anfällige Kontrolle Desiree sind in allen drei untersuchten *S. hougassii*-Genotypen deutlich weniger Eier und Juvenile detektierbar. Zudem konnten an den *S. hougassii*-Klonen nur J2-Juvenile detektiert werden

und keine Eier. Unter Umständen schlüpfen die Nematoden an diesen Genotypen früher, so dass keine Eier mehr auffindbar sind.

Dieser Versuch wurde mit einer weiteren *M. chitwoodi*-Population „P3“ sowie einer weiteren Wildart (*S. fendleri* (S.fen) in 11er Einzeltöpfen wiederholt (Versuch ADLATUS 5). Hierfür wurden jeweils 60 *in vitro*-Pflänzchen der Genotypen Desiree, S.blb, S.hou-8, S.fen-41 und S.fen-46 ausgeliefert.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die vermeintlich aggressivere Population „P9“ deutlich weniger Tiere aufweist als die ebenfalls auf *S. bulbocastanum* selektierte *M. chitwoodi*-Population „P3“.

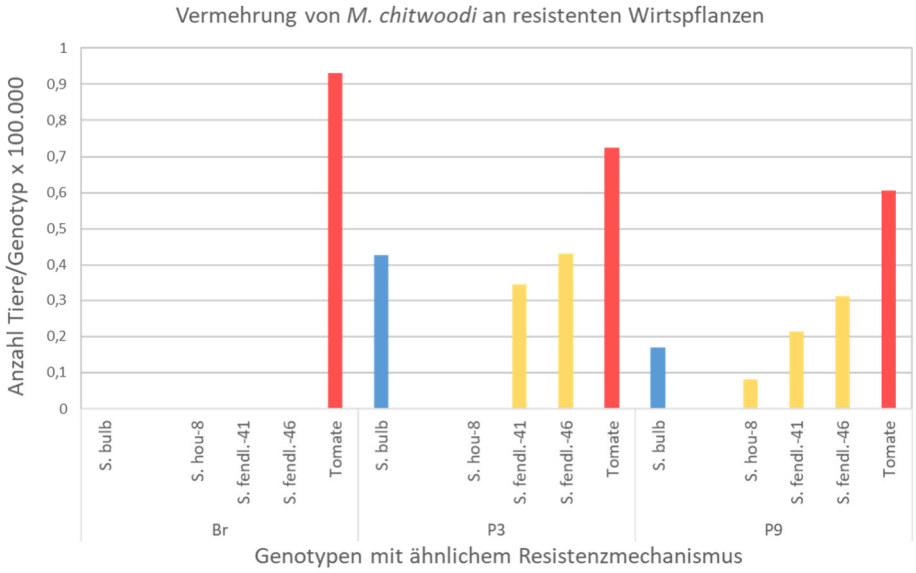


Abbildung 7: Testung von *S. hougassii, S. fendleri* und *S. bulbocastanum*-Genotypen mit den *M. chitwoodi*-Populationen „Borken“, „P3“ und „P9“. Es wurden jeweils 10 Pflanzen/Genotyp und Nematodenpopulation in Einzeltöpfe gepflanzt und mit 400 J2-Juvenilen inokuliert. Die Auswertung erfolgte auf Einzeltöpfe, dargestellt sind die Mittelwerte. Zur besseren Ergebnisdarstellung ist die Negativkontrolle Desiree nicht gezeigt.

Dieses Experiment zeigt die herausragende Resistenz von S.hou-8 gegenüber den 3 getesteten Populationen.

Es sollte in einem weiteren Arbeitspaket untersucht werden, inwieweit es zu einer Selektion agressiverer *M. chitwoodi*-Populationen kommt, wenn diese auf den Resistenzquellen *S. bulbocastanum* und *S. hougasii*-8 vermehrt werden. Hierfür wurden mehrfach *in vitro* Pflänzchen produziert und an den Partner JKI-EP geliefert. Die auf *S. bulbocastanum* selektierte Population P3 sollte weiter auf dieser Resistenzquelle vermehrt werden. Inwieweit eine Vermehrung der Population „Borken“ auf *S. hougasii* erfolgt, wurde ebenfalls in einem größeren Ansatz untersucht werden (siehe Berichte JKI-EP).

Für die Transkriptomanalyse (Versuch MACE 6) wurden jeweils 80 *in vitro* Pflänzchen der Genotypen S.blb, S.hou-8 und Desiree an das JKI-EP geliefert. Die Anzucht der Pflänzchen, die Inokulation sowie

die Ernte der Pflanzengewebe für die MACE-Analyse erfolgte durch das JKI-EP sowie JKI-RS (siehe Bericht JKI-EP und JKI-RS).

AP1.4 Kreuzungen für *S. brachistotrichum* und/oder *S. ehrenbergi*

Für die Resistenzprüfung weiterer Wildarten wurde neben den bereits erwähnten *S. hougassii* und *S. fendleri*-Klonen auch Klone von *S. brachistotrichum* und *S. ehrenbergi* in die Gewebekultur aufgenommen. Für sämtliche Inkulturnahmen wurden umfängliche phytosanitäre Untersuchung vorgenommen, bevor die Pflänzchen für die entsprechenden Versuche vermehrt wurden.

Im Projektzeitraum wurden Kreuzungen mit den resistenten Wildartklonen *S. hougasii*-3, *S. hougasii*-8, *S. fendleri*-41 und *S. fendleri*-46 durchgeführt. Die Samen wurden isoliert und steril in der Gewebekultur ausgelegt. Die Sämlinge wurden in der Gewebekultur für eine Resistenzprüfung vermehrt und an den Projektpartner JKI-EP geliefert.

Tabelle 3: Kreuzungssamen aus insg. 6 Kreuzungen mit *S. hougassii* und *S. fendleri* (F1)

Name Population	Anzahl Klone	Kreuzungspartner
AD 22/001	2	S.fendleri-46 x ETB-2
AD 22/002	3	S.hougassii-3 x 508
AD 22/003	3	S.fendleri-46 x ETB-1
AD 22/004	15	S. hougassii-8 x 263
AD 22/005	2	S. fendleri-41 x ETB-1
AD 22/006	28	S. fendleri-41 x ETB-2

Die Ergebnisse der Phänotypisierung sind in Tabelle 4 dargestellt. Insbesondere die Nachkommen der Kreuzung mit *S. fendleri*-41 und *S. hougassii*-8 zeigen weiterhin keine Nematodenvermehrung.

Tabelle 4: Phänotypisierung der F1 Kreuzungsnachkommen mit *M. chitwoodi* „Borken“ in Falschachteln Es wurden drei Wiederholungen pro Genotyp gepflanzt und einzeln ausgewertet. Die Inokulation erfolgte mit 200 J2 Juvenilen/Faltschachtel.

Prüfglied	res. Elter	MW	STABW	MW Eier+J2/g WurzelFG	STABW	Vermehrungs-faktor
AD 22/001/001	S.fendleri-46	113	85,58	6,4	4,8	0,6
AD 22/001/002		22	31,21	2,1	2,9	0,1
AD 22/002/001	S.hougasii-3	19	27,25	3,1	4,4	0,1
AD 22/002/002		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/002/003		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/003/001	S.fendleri-46	119	77,64	7,8	5,2	0,6
AD 22/003/002		40	28,58	2,6	2,0	0,2
AD 22/003/003		19	26,78	1,2	1,7	0,1
AD 22/004/002	S. hougassii-8	0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/004/003		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/004/004		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/004/005		16	22,63	1,9	2,7	0,1
AD 22/005/001	S. fendleri-41	0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/005/002		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/006/001	S. fendleri-41	0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/006/002		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/006/003		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/006/004		0	0,00	0,0	0,0	0,0
AD 22/006/005		0	0,00	0,0	0,0	0,0
Desiree		30955	6691,93	5770,3	1030,0	154,8
S. fendleri-41		0	0,00	0,0	0,0	0,0
S. fendleri-46		0	0,00	0,0	0,0	0,0
S. hougassii-3		0	0,00	0,0	0,0	0,0
S. hougassii-8		0	0,00	0,0	0,0	0,0
S.blb		183	150,67	42,5	43,9	0,9
Tomate		32247	1350,47	2899,8	707,0	161,2

Mit ausgewählten resistenten Nachkommen konnte in der Projektlaufzeit weiter gekreuzt werden zur Erstellung von BC1-Populationen.

Arbeitspaket 2: Virusresistenz (TRV, PVY, PLRV): Identifikation und Charakterisierung von dominanten Resistenzen und Resistenzloci

In diesem Arbeitspaket war BNA mit der Erstellung und Lieferung von Pflanzematerial involviert sowie insbesondere in AP2.1 für die Erstellung, Erhaltung und Charakterisierung einer spaltenden Population sowie die Markerentwicklung verantwortlich.

AP2.1: TRV

AP2.1.1 Etablierung einer Resistenzprüfung mittels Agroinfektion und Virusnachweis in infizierten Pflanzen an einem Panel resistenter und anfälliger Sorten

Zur Etablierung eines ditrophischen Resistenztest gegen das TRV mittels Agroinfiltration wurde ein Panel von insgesamt 26 resistenten und anfälligen Zuchtklonen/Sorten ausgewählt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 5: Lieferung von Knollen resistenter/anfälliger Genotypen an die Projektpartner Es wurden jeweils 5 Knollen pro Sorte/Genotyp an die Partner IME und WWU zur Etablierung eines ditrophischen Resistenztests verschickt. Die Anfälligkeit für Eisenfleckigkeit wurde mit eine Boniturnote (1 anfällig bis 9 resistent) angegeben. Die Boniturnote 9 bedeutet, dass der entsprechende Genotyp keine Neigung zur Eisenfleckigkeit zeigt.

Codierung	WWU Münster	Fraunhofer IME	Bonitur
TRV-AD-1	5 Kn	5 Kn	
TRV-AD-2	5 Kn	5 Kn	
TRV-AD-3	5 Kn	5 Kn	3
TRV-AD-4	5 Kn	5 Kn	2
TRV-AD-5	5 Kn	5 Kn	1
TRV-AD-6	5 Kn	5 Kn	1
TRV-AD-7	5 Kn	5 Kn	5
TRV-AD-8	5 Kn	5 Kn	2
TRV-AD-9	5 Kn	5 Kn	
TRV-AD-10	5 Kn	5 Kn	
TRV-AD-11	5 Kn	5 Kn	6
TRV-AD-12	5 Kn	5 Kn	3
TRV-AD-13	5 Kn	5 Kn	5
TRV-AD-14	5 Kn	5 Kn	7
TRV-AD-15	5 Kn	5 Kn	8
TRV-AD-16	5 Kn	5 Kn	6
TRV-AD-17	5 Kn	5 Kn	9
TRV-AD-18	5 Kn	5 Kn	9
TRV-AD-19	5 Kn	5 Kn	7
TRV-AD-20	5 Kn	5 Kn	8
TRV-AD-21	5 Kn	5 Kn	8
TRV-AD-22	5 Kn	5 Kn	9
TRV-AD-23	5 Kn	5 Kn	9
TRV-AD-24	5 Kn	5 Kn	9
TRV-AD-25	5 Kn	5 Kn	9
TRV-AD-26	5 Kn	5 Kn	7

Da die ersten Versuche zur ditrophischen Interaktion (Virus – Wirt) mittels Agrobakterien-gestützter Infektion nicht wie erhofft verliefen (siehe Bericht WWU) wurden im Oktober infizierte Knollen des Genotyps TRV-AD-14 an den Partner WWU verschickt, von welchen zuvor, zum Methodenabgleich, bei BNA Proben für die TRV-Analytik genommen wurden.

In eigenen Versuchen wurden aus den infizierten Knollen des Genotyps TRV-AD-14 Zylinder mit einem Korkbohrer (Durchmesser 0,4 cm) ausgestochen und in symptomfreie Knollen der Genotypen TRV-AD-4, -5, -14, 24 und -27 gepfropft, in die mit einem Korkbohrer (Durchmesser 0,4 cm) zuvor quer zum Nabel- und Kronenende Zylinder ausgestochen und entfernt wurden. Die Pfropfstellen wurden mit Vaseline verschlossen und die Knollen bei 22°C gelagert.

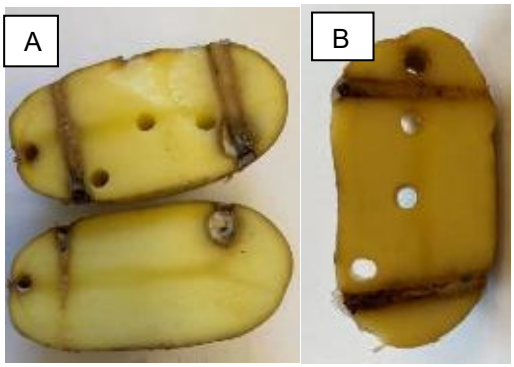


Abbildung 8: TRV-Infektionsversuche mittels Knollenzylinderpfropfung Infizierte symptomatische Knollenzylinder der Sorte TRV-AD-14 wurden in symptomfreie Knollen der Sorte TRV-AD-4 gepfropft und nach 14 (A) bzw. 29 (B) Tagen Proben für die molekulare Analyse entnommen.

In einem weiteren Versuch wurde statt eines ausgestochenen Pfropfens zerkleinertes symptomatisches Gewebe in den ausgestochenen Zylinder der symptomfreien Knollen gefüllt. Auch diese Knollen wurden bei 22°C gelagert.

Nach 2 und 4 Wochen (14 und 29 dpi) wurden die Knollen aufgeschnitten und jeweils 3 Proben/Knolle für eine TRV-Analyse mittels LAMP-PCR entnommen. In diesen Versuchen konnte das Virus in den Knollen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch zur Knolleninfektion wurden infizierte Knollen der Sorte TRV-AD-27 zur Isolierung einer infektiösen TRV-Lösung verwendet.

Als Kontrolle wurden parallel zu den symptomatischen Knollen auch symptomfreie Knollen der Sorte TRV-AD-24 aufgearbeitet. Die gewonnenen Lysate wurden mittels TRV-LAMP untersucht. Wie erwartet konnte TRV in den Proben aus TRV-AD-27 nicht jedoch in TRV-AD-24 nachgewiesen werden (siehe Abb. 9).

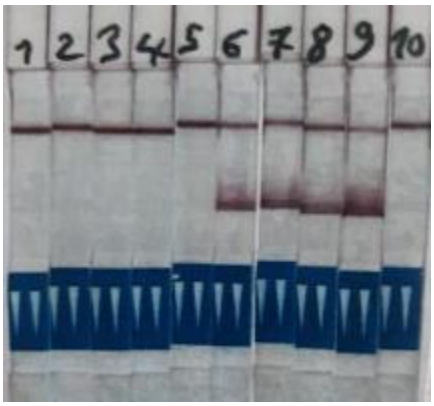


Abbildung 9: TRV-Nachweis in Knollenlysaten der Sorten TRV-AD-24 (Spur 1 und 2) und TRV-AD-27 (Spur 6-8) Spur 3-5: weitere Knollenlysate aus symptomfreien Knollen, Spur 9: Positivkontrolle, Spur 10: Wasserkontrolle

Zur Vorbereitung der Infektionsversuche wurde die Keimruhe in jeweils 20 Knollen (5 Zeitpunkte, jeweils 2 Knollen mit positivem und 2 Knollen mit negativem Lysat) der Sorten TRV-AD-24, -4 und -18 mittels Gibberellin-Behandlung gebrochen. Am Folgetag wurden mit einer 1000µl Filterspitze jeweils 3 Löcher (Nabelende, Knollenmitte, Kronenende) in die Knollen gestochen. Dabei wurde die Filterspitze

bis zur ersten Markierung eingestochen und dreimal gedreht. In jedes Loch wurden 80µl des jeweiligen Lysats (jeweils 2 Knollen mit dem positiven Lysat aus TRV-AD-27 und 2 Knollen mit dem negativen Lysat aus TRV-AD-24) gefüllt. Die Knollen wurden anschließend aufrecht in eine Plastikbox gestellt, so dass das Lysat eindringen konnte (ca. 2 Stunden). Die Löcher wurden nicht verschlossen. Anschließend wurden die Knollen bei 22°C bis zur Probennahme gelagert.

Die Probennahmen und TRV-Analysen erfolgten 15, 22, 36, 50 und 64 Tage nach der Infektion (dpi) an drei Stellen in der Knolle (siehe Abbildung 10A). In der Sorte TRV-AD-18 konnte an drei der insgesamt 5 untersuchten Probennahmetermine eine TRV-Infektion mittels LAMP nachgewiesen werden. In der Sorte TRV-AD-24 war nur an einem Zeitpunkt ein positives Signal sichtbar (siehe Abbildung 10B).

Die positiv getesteten Restknollen der Sorte TRV-AD-18 wurden für weitere Analysen ins Gewächshaus gepflanzt.

A

B

Zeit-punkt	TRV-AD-18 positiv	TRV-AD-18 negativ	TRV-AD-24 positiv	TRV-AD-24 negativ
T1				
T2				
T3				
T4				
T5				

Abbildung 10: TRV-Infektionsversuch mit TRV-positivem und TRV-negativem Lysat in den Sorten TRV-AD-18 und TRV-AD-24 A: Stellen der Probennahme für molekulare Untersuchungen B: Zeitpunkte der Probennahme T1: 15dpi, T2: 22dpi, T3: 36dpi, T4: 50dpi, T5: 64dpi, die TRV-positiv getesteten Proben sind grün hinterlegt.

Zur Untersuchung, ob sich das Virus in den positiv getesteten Proben aktiv repliziert, wird eine RT-PCR auf die (-)-Strang-RNA durchgeführt. Dafür wurden die TRV-positiv getesteten RNA-Proben mit einem entsprechenden Primer revers transkribiert und die resultierende cDNA als Template in eine PCR eingesetzt. Zwischen reverser Transkription und anschließender PCR wurde die reverse Transkriptase 15 Minuten bei 70°C inaktiviert.

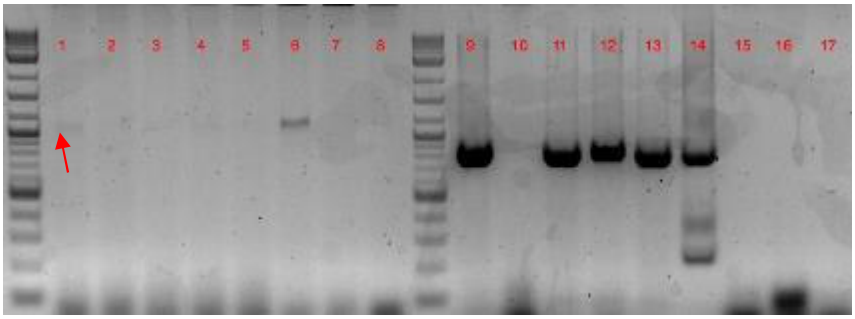


Abbildung 11: Nachweis der Virusreplikation im TRV-Infektionsversuch In den Bahnen 1-8 ist die RT-PCR aufgetragen, Bahn 1-5: positiv getestete Proben der infizierten Sorte TRD-AD-18, Bahn 6: Positivkontrolle, Bahn 7 + 8: Negativkontrollen; In den Bahnen 9-17 ist eine nested PCR aufgetragen, Bahn 9-13: positiv getestete Proben der infizierten Sorte TRD-AD-18, Bahn 14: Positivkontrolle, Bahn 15-17: Negativkontrollen

In Abbildung 11 ist eindeutig gezeigt, dass TRV in den positiv getesteten Proben aus den Infektionsversuchen aktiv repliziert wird. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde ein nestedPCR-Ansatz gewählt. Die Knollen der Sorte TRV-AD-18 aus diesen Infektionsversuchen wurden ins Gewächshaus gepflanzt, um zu prüfen, ob das Virus sich systemisch in der Pflanze ausbreiten kann. Nach ca. 6 Wochen wurden Stängel und Blattproben genommen und auf TRV untersucht. In keiner der untersuchten Proben konnte TRV nachgewiesen werden.

Da sich die Etablierung eines ditrophischen Resistenztests mittels Agroinfiltration als schwierig herausgestellt hat, wurden weitere Versuche zur Pfropfung mit Tabak und auf infizierte Tomatenunterlagen beim Projektpartner WU Münster durchgeführt (Bericht WU). Für diese Versuche lieferte BNA Knollen von verschiedenen Genotypen.

AP2.1.2 Phänotypisierung einer spaltenden Population

Im Arbeitspaket 2.1.2 wurde eine für die Eisenfleckigkeit spaltende Population zur Knollenproduktion ins Gewächshaus gepflanzt. Die Knollen wurden geerntet und im Feldversuch sowie Einzelknollen in einem ersten ditrophischen Phänotypisierungsexperiment charakterisiert. Nicht von allen Genotypen der ca. 250 Klone umfassenden Population konnten genug Knollen für beide Versuche erzeugt werden. In diesem Fall wurde der Feldversuch vorgezogen. Beruhend auf den Ergebnissen der Phänotypisierungen im Freiland wurden jeweils 20 anfällige (Symptome in den Knollen sichtbar) und

20 resistente Klone (keine Symptome in den Knollen sichtbar) ausgewählt, die restliche Population wurde verworfen. Die 40 Klone der Population sowie die Eltern wurden für alle weiteren Experimente im Gewächshaus erhalten und vermehrt, um phytosanitär einwandfreies Material für die weiteren Testungen zur Verfügung stellen zu können. Von diesen Vermehrungen wurden Knollen an den Partner WU Münster für die Pfropfungsexperimente auf infizierte Tomatenunterlagen geliefert. Für die Markerentwicklung wurde hochmolekulare DNA aller 40 Klone sowie der Eltern isoliert und an den Unterauftragnehmer BGI für eine Einzeklonsequenzierung verschickt. Eine Zusammenfassung der Sequenzierstatistik ist in Tabelle 6 gegeben.

Tabelle 6: Statistik der Sequenzierung der anfälligen und resistenten Klone der Population RC sowie des anfälligen und resistenten Elters

Sample ID	Raw reads	Properly paired mapped reads	GC (%)	Metadata
RC_001	80,038,189	57,327,483	36.45	Resistent
RC_002	80,121,777	59,148,439	36.31	Resistent
RC_003	80,041,793	59,579,148	36.46	Resistent
RC_004	80,002,631	58,566,825	36.16	Resistent
RC_005	80,081,165	59,631,577	36.47	Resistent
RC_006	80,009,416	58,110,112	36.21	Resistent
RC_007	801,022,751	59,355,204	36.25	Resistent
RC_008	80,149,515	59,696,901	36.09	Resistent
RC_009	80,011,891	57,935,664	36.61	Resistent
RC_010	80,053,280	58,815,701	35.98	Resistent
RC_011	80,048,445	58,042,459	36.17	Resistent
RC_012	80,119,752	57,846,601	36.17	Resistent
RC_013	80,026,784	58,625,697	36.18	Resistent
RC_014	80,085,717	60,088,906	35.95	Resistent
RC_015	80,021,513	59,229,720	36.17	Resistent
RC_016	80,152,084	59,265,559	35.87	Resistent
RC_017	80,150,011	59,117,130	36.22	Resistent
RC_018	80,127,390	60,888,984	36.27	Resistent
RC_019	80,111,667	58,781,038	36.02	Resistent
RC_020	80,060,494	59,222,031	36.06	Resistent
RC_101	80,151,791	59,542,181	36.43	Anfällig
RC_102	77,685,615	57,572,904	36.52	Anfällig
RC_103	80,005,064	59,923,386	36.06	Anfällig
RC_104	80,066,552	58,915,269	36.36	Anfällig

RC_105	80,070,402	60,720,259	36.17	Anfällig
RC_106	80,114,597	59,084,668	36.22	Anfällig
RC_107	80,078,778	59,091,453	36.07	Anfällig
RC_108	80,099,024	59,798,563	36.23	Anfällig
RC_109	80,139,515	58,403,145	36.34	Anfällig
RC_110	80,132,988	58,809,372	36.08	Anfällig
RC_111	80,142,327	58,593,473	36.51	Anfällig
RC_112	80,040,550	58,405,035	35.87	Anfällig
RC_113	80,056,942	58,248,499	36.05	Anfällig
RC_114	80,145,847	59,590,519	35.94	Anfällig
RC_115	80,047,581	58,860,285	36.12	Anfällig
RC_116	80,100,796	59,207,417	36.26	Anfällig
RC_117	80,010,888	59,800,213	36.17	Anfällig
RC_118	80,066,466	58,518,077	36.17	Anfällig
RC_119	80,143,131	60,918,875	35.93	Anfällig
RC_120	80,021,020	57,357,675	36.19	Anfällig
RC_RP	74,853,266	54,448,657	36.36	Resistenter Elter
RC_SP	80,030,678	61,120,910	36.07	Anfälliger Elter

AP2.1.3 Anzucht und Resistenzprüfung von Sorten für eine spätere Untersuchung der Resistenzvariabilität rezessiver Wirtsfaktoren (P-Proteine, eIF4E)

Eine Resistenzprüfung bzgl. TRV von verschiedenen Sorten und Zuchtklonen wurde im Feldversuch durchgeführt. Zudem wurde Blattmaterial verschiedener (343) Genotypen zur Untersuchung der Sequenzvariabilität geerntet, DNA isoliert und an den Partner Fraunhofer IME zur Genotypisierung geschickt (siehe AP 3.1 und 4.1).

AP2.2: PVY

Die Wildart-Klone *S. bulbocastanum*, *S. hougassii*-3, *S. hougassii*-5, *S. hougassii*-8 sowie *S. fendleri-41* und *S. fendleri*-46 zeigten eine sehr gute Resistenz gegenüber *M. chitwoodii* „Borken“ (siehe AP1.1). Da die Introgression von Wildartresistenzen in den Elitezuchtpool ein sehr langwieriger und aufwändiger Prozess ist, ist es vorteilhaft, wenn die ausgewählten Geniteure Mehrfachresistenzen gegenüber verschiedenen Schaderregern aufweisen. Aus diesem Grund wurden die Wildartklone beim Partner JKI-RS mit verschiedenen PVY-Virusisolaten untersucht. BNA produzierte und lieferte hierfür jeweils 25 *in vitro* Pflänzchen/Genotyp. Es zeigte sich, dass keiner der untersuchten Genotypen eine Immunität gegenüber den untersuchten Virusisolaten aufwies.

AP2.3: PLRV

Für die Versuche zur PLRV-Resistenz wurden an die Projektpartner Knollen von insgesamt 18 Sorten/Zuchtklonen geliefert.

Tabelle 7: Lieferung von Knollen resistenter/anfälliger Genotypen an die Projektpartner. Es wurden jeweils 10 Knollen pro Sorte/Genotyp an den Partner IME sowie 60 Knollen/Genotyp an den Partner JKI-RS zur Etablierung eines ditrophischen Resistenztests verschickt. Die PLRV-Anfälligkeit wurde mit eine Boniturnote (1 anfällig bis 9 resistent) angegeben.

Codierung	**Bonitur**	**JKI-RS**	**IME**		**Codierung**	**Bonitur**	**IME**
PLRV-AD-1	2	60 Kn	10 Kn		PLRV-AD-8		10 Kn
PLRV-AD-2	2	60 Kn	10 Kn		PLRV-AD-9	8	10 Kn
PLRV-AD-3	2	60 Kn	10 Kn		PLRV-AD-10	8	10 Kn
PLRV-AD-4	2	60 Kn	10 Kn		PLRV-AD-11	8	10 Kn
PLRV-AD-5	2	60 Kn	10 Kn		PLRV-AD-12	8	10 Kn
PLRV-AD-6	2	60 Kn	10 Kn		PLRV-AD-13	8	10 Kn
PLRV-AD-7	2	60 Kn	10 Kn		PLRV-AD-14	8	10 Kn
					PLRV-AD-15	9	10 Kn
					PLRV-AD-16	9	10 Kn
					PLRV-AD-17	9	10 Kn
					PLRV-AD-18	9	10 Kn

Weiterhin erfolgte eine Lieferung von nachgewiesen (ELISA am Augensteckling) PLRV-infizierten Knollen an JKI-RS zur Aufladung verschiedener Läusepopulationen sowie erneut von jeweils 20 Knollen der Genotypen PLRV-AD-2, PLRV-AD-15, PLRV-AD-17, PLRV-AD-19, PLRV-AD-20, PLRV-AD-21 und PLRV-AD-22 für die Etablierung der ditrophischen Resistenztestungen.

Arbeitspaket 3: Rezessive Wirtsfaktoren in Kartoffel: Etablierung einer neuartigen Resistenzform gegenüber *M. chitwoodi/M. persicae* durch gezielte Herunterregulierung/Ausschaltung der P-Proteine mittels Genom-Editierung bzw. RNA-Interferenz

AP3.1: Untersuchung der Sequenzvariabilität in Kartoffelsorten und in für *M. chitwoodi/M. persicae* anfälligen bzw. resistenten Wildarten:

Insgesamt konnten 384 Sorten/Zuchtstämme/Wildartklone bzgl. der 3 SEO-Gene (eIF4E, AP 4.1) genotypisiert werden. Da es sich bei den P-Proteinen (und eIF4E) aller Wahrscheinlichkeit nach um rezessive Wirtsfaktoren handelt, wird die Eigenschaft einer Defektmutation erst bei einer vierfachen Alleldosis ausgeprägt. Insofern wird bei der Auswahl der für die Sequenzanalysen vorgesehenen Klone eine möglichst hohe Diversität berücksichtigt.

Bei BNA wurde DNA von insgesamt 343 Genotypen isoliert (davon 253 Elitesorten und tetraploide Zuchtklone sowie 90 Wildarten). Die gereinigte DNA wurde an den Projektpartner Fraunhofer IME für die Sequenzanalyse verschickt.

Beim Partner Fraunhofer IME erfolgte eine Korrelationsanalyse der identifizierten Haploblöcke der Zielgene SEOa-c mit den bekannten Resistenzen. Für PLRV konnten hierbei zwei Haploblöcke in SEOa identifiziert werden (Haploblock 2 und 5), in denen zwei jeweils signifikant ($p<0,05$) unterschiedliche Haplotypen vorliegen.

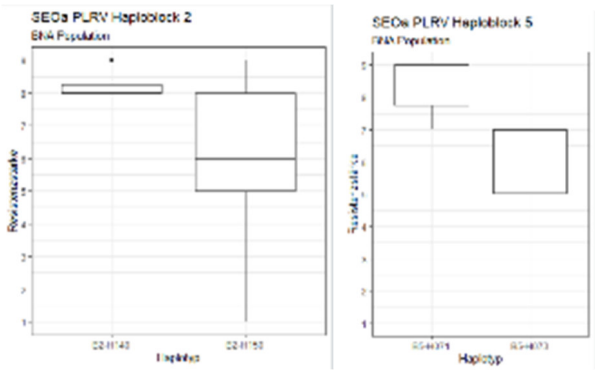


Abbildung 12: PLRV-Resistenz in Klonen mit verschiedenen SEOa-Haplotypen Es wird die Resistenz von 9 (resistent) bis 1 (anfällig) bonitiert.

Eine Analyse der Allelhäufigkeiten für SEOa im Elitezuchtpool von BNA zeigt, dass der häufigste Haplotyp der B5-H077 ist, der in 165 Pflanzen (65%) und insgesamt 436 Mal (Anzahl der Allele im untersuchten Pool, 43%) vorhanden ist. Dieser Haplotyp liegt also vielfach in einer höheren Alleldosis in den Klonen vor (siehe Tabelle 11). Der häufigste Haplotyp in den Wildarten von JKI-RS und BNA war hingegen der B05-H075 in 33% bzw. 56% der Pflanzen (Wildarten bei BNA bzw. JKI-RS) und mit 34% bzw. 53% der Allele insgesamt (nicht gezeigt). Der B5-H077 findet sich nur in 16% bzw. 24% der Wildartallele wieder. Demnach scheint es im Elitezuchtpool eine Anreicherung dieses Haplotyps gegeben zu haben.

Korrelationen mit weiteren Resistenzen konnten bis jetzt nicht identifiziert werden.

Tabelle 8: Analyse der Allelhäufigkeiten in den untersuchten Klonen. BNA: tetraploides und diploides Elitezuchtmaterial, JKI: Wildarten aus JKI-RS, Wildarten: Wildartklone von BNA

		BNA				JKI				Wildart				Gesamt			
BNA	Haplotype	Pflanze	%	Allel	%	Pflanze	%	Allel	%	Pflanze	%	Allel	%	Pflanze	%	Allel	%
SEOa B1	B1-H235	160	63%	260	26%	9	23%	15	12%	23	26%	36	13%	192	50%	311	22%
	B1-H234	104	41%	179	18%	2	5%	3	2%	25	28%	35	13%	131	34%	217	15%
	B1-H233	71	28%	99	10%	2	5%	2	2%	12	13%	14	5%	85	22%	115	8%
SEOa B2	B2-H150	102	40%	290	29%	12	31%	29	23%	16	18%	36	13%	130	34%	355	25%
	B2-H149	93	37%	311	31%	3	8%	6	5%	11	12%	27	10%	107	28%	344	24%
SEOa B3	B3-H318	99	39%	161	16%	2	5%	3	2%	22	24%	33	12%	123	32%	197	14%
	B3-H314	69	27%	72	7%	1	3%	1	1%	6	7%	8	3%	76	20%	81	6%
	B3-H317	66	26%	96	10%	1	3%	1	1%	11	12%	13	5%	78	20%	110	8%
SEOa B4	B4-H153	164	65%	205	20%	11	28%	13	10%	17	19%	21	8%	192	50%	239	17%
	B4-H152	107	42%	186	19%	2	5%	2	2%	24	27%	36	13%	133	35%	224	16%
SEOa B5	B5-H077	165	65%	436	43%	6	15%	21	16%	30	33%	68	24%	201	53%	525	37%
	B5-H076	114	45%	240	24%	3	8%	7	5%	17	19%	39	14%	134	35%	286	20%
	B5-H074	58	23%	119	12%					2	2%	3	1%	60	16%	122	9%

AP3.2 Erstellung P-Protein defizienter Kartoffelpflanzen

Für die Genomeditierung der SEO-Gene sowie von eIF4E (siehe AP 4.2) wurden 5 Sorten/Zuchtklone ausgewählt (CRC-AD-1, -2, -3, Agria, Desiree) mit Anfälligkeit bzgl. *M. chitwoodi*, PVY, PLRV und viröser Eisenfleckigkeit. Es wurden *in vitro*-Pflänzchen produziert und an den Projektpartner WWU verschickt (siehe auch AP 4.2).

Beim Projektpartner WWU wurden Klone mit defekten Allelen für SEOa-c sowie eIF4E in der Sorte Desiree erstellt. Zwei SEOa-Knock-Out-(KO)-Linien (TP148#5, TP157#2) sowie zwei Linien in denen sowohl SEOb als auch SEOc (TP158#8, TP170#4) ausgeschaltet sind wurden an BNA zur Vermehrung für die anstehenden Phänotypsierungsexperimente geschickt. Die Klone wurden bei BNA vermehrt und für die Prüfungen an die Partner JKI-EP und JKI-RS geliefert.

Arbeitspaket 4: Rezessive Wirtsfaktoren in Kartoffel: Etablierung einer neuartigen Resistenzform gegenüber PVY, PLRV und TRV durch gezielte Herunterregulierung/Ausschaltung des eIF4E-Proteine mittels Genom-Editierung bzw. RNA-Interferenz

AP4.1: Untersuchung der Sequenzvariabilität in für PVY, PLRV und TRV anfälligen/resistenten Kartoffelsorten und Wildarten

Für den Translations-Initiationsfaktor eIF4E konnten zwei Haploblöcke identifiziert werden (siehe auch Bericht Fraunhofer IME). Es konnte jedoch mit keinem der Haplotypen eine signifikante Korrelation zu einer Virusresistenz nachgewiesen werden (siehe auch Abschlussbericht Fraunhofer IME).

AP4.2: Erstellung eIF4E defizienter Kartoffelpflanzen

Siehe AP 3.2

Arbeitspaket 5: Screening der TILLING-Population nach Mutationen in rezessiven Wirtsfaktoren

In den beiden TILLING Populationen von BNA konnten für alle untersuchten Gene Stopp-Mutationen gefunden werden (siehe Bericht Projektpartner Fraunhofer IME). Alle Kandidatenlinien wurden in die

Gewebekultur aufgenommen und die Mutationen durch entsprechende Sanger-Sequenzierungen überprüft. Alle Klone wurden phytohygienisch auf Pathogene untersucht und die fünf Defektmutanten zur Knollenproduktion und für erste Rückkreuzungen ins Gewächshaus gepflanzt. Sämtliche Klone mit Defektmutationen werden bei BNA in der Sterilkultur weiter erhalten.

2. Verwertung

Die in ADLATUS gewonnenen Ergebnisse sollen in Folgeprojekten sowie im Vorzuchtprogramm von BNA weiterbearbeitet werden. Insbesondere die Aufnahme der M. chitwoodi-resistenten Wildarten in das Vorzuchtprogramm sowie die weiteren Kreuzungen mit den identifizierten Defektmutanten für eIF4E und SEORa bis c stellen wichtige Ressourcen für die Resistenzzüchtung bei BNA dar. Auch die resistenten Stämme der spaltenden Population für PLRV/PVY des JKI sollen in das Zuchtprogramm integriert werden. Die Klone der für TRV-Resistenz spaltenden Population werden weiter erhalten und stehen für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung. Die Überführung dieses Materials in den Elitezuchtpool wird insbesondere für die Wildarten viele Rückkreuzungsschritte (>BC6) benötigen, es wird in der Zukunft ein Sortenschutz der angestrebt.

3. Erkenntnisse von Dritten

Patente:

CN116640196A Application of associated protein VAP1 of vesicle associated membrane protein in resisting potato virus Y.

US2023272413A1 Methods to block aphid transmission of poleroviruses and to develop virus management tools.

Veröffentlichungen:

Paluchowska P, Lim Rossmann S, Lysøe E, Janiszewska M, Michalak K, Heydarnajad Giglou R, Torabi Giglou M, Brurberg MB, Śliwka J, Yin Z. Diversity of the Rysto gene conferring resistance to potato virus Y in wild relatives of potato. BMC Plant Biol. 2024 May 8;24(1):375. doi: 10.1186/s12870-024-05089-2. PMID: 38714928; PMCID: PMC11077776.

Lebedeva M, Nikonova E, Babakov A, Kolesnikova V, Razhina O, Zlobin N, Taranov V, Nikonov O. Interaction of Solanum tuberosum L. translation initiation factors eIF4E with potato virus Y VPg: Apprehend and avoid. Biochimie. 2024 Apr;219:1-11. doi: 10.1016/j.biochi.2023.08.005. Epub 2023 Aug 9. PMID: 37562705.

Xu L, Zhang W, Liu S, Gao Y, Huang Y, Nie X, Bai Y. Transcriptome analysis of the synergistic mechanisms between two strains of potato virus Y in Solanum tuberosum L. Virology. 2024 Jun;594:110032. doi: 10.1016/j.virol.2024.110032. Epub 2024 Mar 6. PMID: 38467094.

Li X, Tao N, Xu B, Xu J, Yang Z, Jiang C, Zhou Y, Deng M, Lv J, Zhao K. Establishment and application of a root wounding-immersion method for efficient virus-induced gene silencing in plants. Front Plant Sci. 2024 Apr 19;15:1336726. doi: 10.3389/fpls.2024.1336726. PMID: 38708388; PMCID: PMC11066161.

4. Veröffentlichungen

Von Seiten der Böhm-Nordkartoffel Agrarproduktion GmbH & Co. OHG sind keine Veröffentlichungen geplant.