

## Genetische Analyse der Feldresistenz von Kartoffeln gegenüber der Krautfäule im ökologischen Landbau

Forster G<sup>1</sup>, Sieber K, Schwarzfischer A & Kellermann A

Keywords: potatoes, late blight, resistance, genetics, association mapping.

### Abstract

Late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont de Bary) poses one of the most important risks in production of organic potatoes. Favourable late blight conditions result in substantial losses in yield and quality in susceptible genotypes. In a series of field experiments between 2012 and 2015 at three organic sites in northern and southern Germany 148 cultivars assessed the outcome of decades of German late blight resistance breeding. The phenotyping of this diversity panel under natural conditions showed significant differences in the level of resistance within and across all maturity classes. These results were then used for a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) assay on a 12k Infinium chip to locate QTLs for late blight resistance. Significant SNPs could be found for the traits late blight infection, maturity and maturity corrected late blight infection. These SNPs will be used for development of PCR markers for marker assisted selection in ongoing resistance breeding.

### Einleitung und Zielsetzung

Die Produktion von ökologisch erzeugten Speisekartoffeln gewinnt immer mehr an Bedeutung. Damit geht auch eine Professionalisierung des Anbausystems einher. Insbesondere in Jahren mit starkem Krautfäule-Infektionsdruck zeigt sich die Wichtigkeit der Kombination aller zur Auswahl stehenden Methoden zur Sicherung von Ertrag und Qualität. Der Anbau *Phytophthora infestans* (*Pi*)-resistenter Sorten als Kernpunkt bietet neben dem Aspekt der Vermeidung von Ertragsverlusten auch ein Potential zur Vermeidung von kritisch gesehenen Kupferapplikationen. In einem deutschlandweiten durch das Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) finanzierten mit den Beteiligten Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Julius-Kühn-Institut (JKI) und Leibniz-Institut für Kulturpflanzenforschung (IPK) werden in Kooperation mit Bio-Landwirten für den ökologischen Anbau *Pi*-resistentem Kartoffeln gezüchtet. Grundlage hierfür bilden vom JKI auf *Pi*-Resistenz gezüchtete Pre-Breeding Kartoffelgenotypen. Die genetische Basis der Resistenz gegenüber *Pi* soll durch eine Assoziationskartierung unter Verwendung dieser und weiterer Klone aufgedeckt werden. Daraus entwickelte genetische Marker sollen in der Züchtung helfen, aus Rückkreuzungsgenerationen die am besten geeigneten Kreuzungseltern zu identifizieren und Nachkommen mit reduzierten Aufwand auf Resistenz- und Qualitätsparameter zu selektieren.

---

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft; Am Gereuth 2; 85354 Freising; Deutschland; GeorgMichael.Forster@lfl.bayern.de; www.lfl.bayern.de

## Methoden

Zur Durchführung einer Assoziationsstudie wurde eine Population von 148 Kartoffelgenotypen bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber Krautfäule phänotypisiert. Diese setzte sich aus Sorten, Zuchtstämmen und Fusionshybriden aus dem Speise- und Wirtschaftssegment europäischer Züchterhäuser und der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, historischen Sorten der Genbank des Leibniz Instituts für Kulturpflanzenforschung und Pre-Breeding Material des Julius-Kühn-Instituts in Groß Lüsewitz zusammen. Dazu wurden in den Jahren 2012 bis 2015 an drei Standorten in den Landkreisen Landsberg am Lech, Neuburg-Schrobenhausen und Uelzen Feldversuche auf ökologisch bewirtschafteten Flächen angelegt. Die Prüfglieder wurden in zweifach wiederholten Parzellen bestehend aus einer Doppelreihe von fünf Pflanzen angebaut und keine Behandlung gegen Krautfäule vorgenommen. Die Befallserhebungen in Form von Noten zwischen eins und neun starteten mit dem Einsetzen erster Infektionssymptome und endeten meist zwei bis drei Wochen später nach dem vollständigen Absterben der meisten Prüfglieder. Die aufeinanderfolgenden Boniturnoten wurden zu einem Wert der relativen Fläche zwischen unter dem Befallsnotenverlauf (rAUDPC) zusammengefasst. In den Jahren 2013 bis 2015 wurden die Prüfglieder zusätzlich an einem konventionellen Versuchsstandort mit chemischen Pflanzenschutz und mineralischer Düngung angebaut und deren von Krautfäule unbeeinflusster Abreifezeitpunkt bonitiert. Die Varianzanalyse der erhobenen Daten erfolgte in einem gemischten Model mit Hilfe des Statistikprogram SAS 9.3 (SAS Institute GmbH, Heidelberg, Deutschland) in Proc mixed.

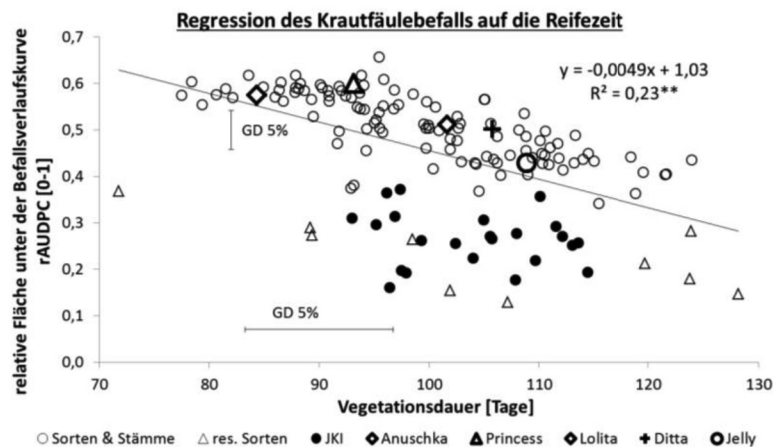
Die Genotypisierung erfolgte durch die Prozessierung der DNA der Prüfglieder mit dem GeneSeek GGP Potato Array (Illumina GmbH; München, Deutschland) durch die Firma TraitGenetics (TraitGenetics GmbH, Gatersleben, Deutschland). Nach einer Analyse der Arraydaten mit der Software GenomeStudio (Illumina GmbH; München, Deutschland) durch TraitGenetics wurde die Dosis der 12808 geprüften SNPs zurückgegeben.

Die phänotypischen und genotypischen Daten mit dem Programm TASSEL 5.2.29 (Bradbury et al. 2007) verrechnet. Es wurden solche SNP Marker verwendet, deren Frequenz  $>0,05$  war und deren Allelzusammensetzung angegeben. Zur Berechnung der Merkmal-Marker-Assoziationen in einem Generalisierten Linearen Model wurde zusätzlich die Populationsstruktur in Form des Ergebnisses für die ersten drei Achsen einer Hauptkomponentenanalyse verwendet. Die Berechnung der Marker-Merkmal-Assoziationen erfolgte mit 1000-facher Permutation.

## Ergebnisse und Diskussion

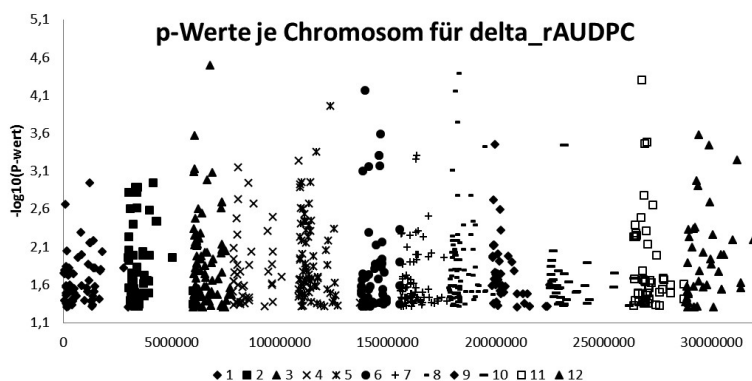
Erhebungen zur Anfälligkeit der Prüfglieder gegenüber Krautfäule waren witterungsbedingt in zehn von zwölf Experimenten möglich. Die Befallswerte für **Krautfäule** korrelierten über alle Einzelumwelten zwischen  $0,27 < R^2 < 0,86$ . Die Umwelt-, die Genotypeneffekte sowie deren Interaktion waren signifikant ( $\alpha < 0,5$ ;  $p < 0,0001$ ). In drei Versuchen zur Erhebung der natürlichen **Vegetationsdauer** zeigten sich signifikante Effekte für die Faktoren Genotyp, Jahr und deren Interaktion ( $\alpha < 0,5$ ;  $p < 0,0001$ ). **Abbildung 7** zeigt die Spannweite der Reifedauer der geprüften Klone. Sie reiften im Mittel innerhalb von 101 Tagen ab. Das früheste Versuchsglied benötigte mit 72 Tagen 46 weniger als das späteste Prüfglied mit 128 Tagen. Der durchschnittliche Krautfäulebefallswert lag bei 45 % (Minimum: 13 %; Maximum: 66 %). Eine höchstsignifikante Korrelation zeigt sich zwischen den beiden Merkmalen

indem eine spätere Abreife von 20 Tagen durchschnittlich einen geringeren Befall von 9,8% zur Folge hatte. Der Großteil der geprüften Sorten erhielt in der Anfälligkeitseinstufung eine unterdurchschnittliche Resistenzleistung. Die vom JKI gelieferten Pre-Breeding Klone zeigten durchweg überdurchschnittliche Noten und befanden sich innerhalb des frühen bis mittelspäten Reifesegments. Einen reifekorrigierten Wert für den Krautfäulebefall stellt das Residuum zur Regressionsgerade dar und wird als  $\Delta$ RAUDPC bezeichnet. Es ermöglicht eine Betrachtung der Resistenzausprägung über verschiedene Reifegruppen hinweg ohne spätreife Genotypen, welche per se eine geringere Befallsausprägung besitzen, in ihrer relativen Leistung zu überschätzen. Daher muss generell bei der Untersuchung der Krautfäuleresistenz von Kartoffelklonen eine geschützte Reifekontrolle stattfinden. Nach der Korrektur lagen die reifeunabhängigen Krautfäulebefallswerte zwischen -0,32 und 0,18 mit Mittelwert 0,00.



**Abbildung 7: Regression des Krautfäulebefalls auf die Reifezeit von 5 Standardarten und 143 Kartoffelklonen welche in Sorten und Stämme, resistente Sorten und Pre Breeding Klone des JKI eingeteilt sind.**

Für 148 Genotypen wurden 8555 SNP-Datenpunkte mit Frequenz  $f > 0,05$  den 12 Chromosomen zugeordnet. Für das Merkmal **reifekorrigierter Krautfäulebefall** ergaben sich für alle Chromosomen mit  $p < 0,05$  249 SNPs mit einem Effekt  $> 1\%$   $\Delta$ rAUDPC. Abbildung 8 zeigt den Manhattan Plot zur Verteilung signifikanter SNPs über die 12 Kartoffelchromosomen. In 23 Fällen erklärten zwei bis vier aufeinanderfolgend annotierte SNPs mit gleichem Verteilungsverhältnis einen Effekt in gleicher Höhe. Die Allel-Konstitutionen an den Loci erklärten je Chromosom maximal 0,06 bis 0,11  $\Delta$ rAUDPC.



**Abbildung 8: Manhattan Plot welcher die p-Werte der SNP über die 12 Chromosomen abbildet, welche signifikante Unterschiede in der reifeunabhängigen Krautfäuleanfälligkeit zeigen.**

Für das Merkmal **Vegetationsdauer** erklärten 281 SNPs auf 12 Chromosomen mit  $p < 0,05$  einen Reifeunterschied von mehr als einen Tag. Uitdewilligen (2013) zeigte in einer Assoziationsstudie die Lokalisierung des hauptsächlich für die Reifeausprägung verantwortlichen QTLs auf Chromosom fünf. Auch in dieser Studie zeigten sich für Chromosom fünf mit 63 SNPs die meisten signifikanten Loci. Jedoch verteilen sich die Effekte einzelner SNPs mit maximal 6,4 bis 10,6 Tagen auf alle Chromosomen.

### Schlussfolgerungen

Im bisherigen Projektzeitraum wurden die Krautfäulereaktion vieler Sorten und Zuchtstämme dokumentiert und deren Unterschiede in der Resistenz sichtbar. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von SNPs mögliche Resistenz- und Reifeunterschiede erklären. Diese sollten als PCR-Marker umgewandelt validiert werden, um zukünftig in einer Marker-gestützten Elternwahl und Nachkommenselektion den Zuchtfortschritt zu beschleunigen. Multiplexe Verfahren sind hier dem Array-Verfahren kosten- wie aufwandsmäßig überlegen und machen die markergestützte Selektion von Nachkommen wirtschaftlich interessant.

### Förderhinweis

Das Projekt wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft im „Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft“ (BÖLN) unter der Nummer 2810OE071 gefördert.

### Literatur

- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y & Buckler ES (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
- Uitdewilligen J, Wolters A-M, D'hoop B, Borm T, Visser R & van Eck H (2013) A Next-Generation Sequencing Method for Genotyping-by-Sequencing of Highly Heterozygous Autotetraploid Potato *PLoS One*, 8(5): e62355.