

# **Beitrag zur Bewertung der Widerstandsfähigkeit von Kartoffelpopulationen gegen Kartoffelkrebs durch Einsatz effizienter Testverfahren, hier am Beispiel markergestützter PCR-Analysen**

Forschungsvorhaben 06HS019

## **A B S C H L U S S B E R I C H T**

Laufzeit: 01.08.2007 – 31.12.2011

Berichtszeitraum: 01.08.2007 – 31.12.2011

**Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)  
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (IPZ)  
Arbeitsgruppe Biotechnologie Kartoffel (IPZ3b)  
Am Gereuth 2  
85354 Freising**

### **Zusammenarbeit:**

Dr. Peter Büttner, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz,  
Lange Point 10, 85354 Freising

**Das Forschungsvorhaben wurde vom Bundesministerium für Ernährung,  
Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für  
Landwirtschaft und Ernährung (BLE) und der Gemeinschaft zur Förderung der privaten  
deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) gefördert.**

## **1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens**

Kartoffelkrebs wird durch den Pilz *Synchytrium endobioticum* hervorgerufen, der in der Lage ist, hitze- und kälteresistente Dauerformen zu bilden, wodurch er bis zu 40 Jahren im Boden überleben kann. Der Quarantäne-Pilz ruft blumenkohllartige Wucherungen an Knollen, Stängeln und Stolonen hervor. Die Verbreitung erfolgt über Pflanzgut, Maschinen, Rückstände und Exkremate. Bei Krebsbefall besteht Meldepflicht und es erfolgt eine langfristige Flächensperrung für den Kartoffelanbau. Da es keine Bekämpfungsmöglichkeiten gibt, ist die erfolgversprechendste Gegenmaßnahme die Züchtung krebsresistenter Sorten. Bisher gibt es nur einen sehr geringen Anteil an krebsresistenten Sorten. Außerdem ist der Biotest zum Nachweis der Krebsresistenz sehr aufwendig und mit einigen Unsicherheiten behaftet. Hauptziele dieses Projektes waren deshalb die Identifizierung von Genomregionen, die mit der Krebsresistenz in Verbindung stehen sowie die Etablierung von PCR-gestützten Testverfahren zum Nachweis einer breiten Krebsresistenz gegenüber den Pathotypen 1, 2, 6 und 18. Somit könnte eine Selektion bereits im Sämlingsstadium erfolgen, wodurch die Entwicklung resistenter Sorten wesentlich beschleunigt werden könnte.

### **1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens**

Zu Projektbeginn sollte zunächst die Phänotypisierung der Populationen 1538 (Ulme x 2899/9B) und 1581 (Oktan x Ulme) mit Ulme als Donor für Vollresistenz durchgeführt werden, um anschließend eine Bulk Segregant Analyse (BSA) mit resistenten/anfälligen Genotypen durchführen zu können. Große Schwierigkeiten ergaben sich bereits bei der Ermittlung der phänotypischen Daten. Der Biotest ist mit vielen Unsicherheiten behaftet. Der Probenumfang für die Krebstestung musste im Laufe der ersten Jahre von 5 auf bis zu 20 Wiederholungen erhöht werden, um sichere Resistenzergebnisse zu erhalten. Damit vervierfachte sich der Aufwand für Feldanbau und Krebstestung. Besonders schwierig gestaltete sich die Resistenzprüfungen für die Pathotypen 2 und 6, da häufig nicht ausreichend lange infektiöse Wucherungen bereitgestellt werden konnten.

Markerkandidaten sollten über BSA ermittelt und in der gesamten Population und an Sorten überprüft werden, um letztendlich diejenigen zu identifizieren, die mit der Krebsresistenz gekoppelt sind (siehe ursprünglicher Balkenplan Tabelle 1). Wie dem Kapitel 3.1.1 zu entnehmen ist sowie bereits in diversen Zwischenberichten und dem Verlängerungsantrag erläutert wurde, erwies sich die BSA allerdings als ungeeignet für die Markerentwicklung. Bei der Krebsresistenz handelt es sich um ein zu komplex vererbtes Merkmal, um mit dieser Strategie zum Ziel zu gelangen. Im Rahmen einer Projektänderung und -verlängerung (vgl. Balkenplan Tabelle 2) wurde daher eine völlig andere Strategie zur Markerentwicklung nötig. Für die nun erforderliche QTL(quantitative trait locus)-Kartierung wurde eine weitere Population

(Saturna x Panda) zunächst intensiv phänotypisiert. Parallel dazu begann die Genotypisierung dieser Population mit verschiedenen Markersystemen, um eine genetische Karte zu erstellen und die QTL-Analyse durchzuführen. Diese Population wurde ausgewählt, da sie noch nicht vorselektiert war und um neben Ulme noch eine weitere vollresistente Sorte (Panda) molekulargenetisch untersuchen zu können. In Ergänzung dazu sollte auch die Population 1538 (Ulme x 2899/9B) einer QTL-Analyse unterzogen werden, um der Frage nachzugehen, ob die Resistenzen von Panda und Ulme auf denselben oder unterschiedlichen Genomregionen basieren. Zudem sollte überprüft werden, ob der bekannte Genort für Pathotyp 1-Resistenz (*Sen1*; Hehl et al. 1999) auf Chromosom XI einen Effekt in den hier bearbeiteten Populationen hat.

Tabelle 1. Ursprünglich vorgesehener Balkenplan laut Projektantrag.

		Projektbeginn																																										
Jahr	Monat	2007												2008												2009												2010						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	
<b>Feldanbau</b>																																												
<b>Krebsevaluierung</b>																																												
der Population 1581																																												
der Population 1538																																												
selektierter Linien																																												
<b>Bulked Segregant Analysis</b>																																												
der Population 1581																																												
der Population 1538																																												
<b>Markerverifizierung</b>																																												
den Populationen																																												
Klonierung und Sequenzierung																																												
<b>Kartierung</b>																																												
Verrechnung der Daten																																												
<b>Etablierung von Markern und Kandidatengenen</b>																																												
<b>Markerverifizierung</b>																																												
an Sorten und Zuchtstämmen																																												
<b>Publikation der Ergebnisse</b>																																												

Tabelle 2. Balkenplan laut Verlängerungsantrag.

Jahr	Monat	2010												2011											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Feldanbau und Krebsevaluierung</b>																									
Population 1538 Ulme x 2899/9B																									
Population 1581 Oktan x Ulme																									
Population 1528 Sjamero x 2899/9B																									
selektierte Linien 1538/1581/1528																									
Population Saturna x Panda																									
<b>Genetische Kartierung</b>																									
der Population Saturna x Panda																									
der Population 1538																									
<b>QTL-Analyse</b>																									
<b>Markerverifizierung</b>																									
in den Populationen und an Sorten																									
<b>Anreicherung von interessanten Genomregionen mit Markern und Markertablierung</b>																									
<b>Publikation der Ergebnisse</b>																									

## **1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Bisher lagen vor allem Berichte älteren Datums über die Vererbung der Kartoffelkrebsresistenz vor, die mit Hilfe von klassischen genetischen Ansätzen durchgeführt wurden (Salaman und Lesley 1923; Lunden und Jørstad 1934; Maris 1973; Scheidt und Hunnius 1981). Darin wurde beispielsweise angenommen, dass mindestens zwei Gene für die Resistenz gegenüber Pathotyp 1 verantwortlich sind. In neueren molekulargenetische Studien von Hehl et al. (1999) und Brugmans et al. (2006) wurde jedoch jeweils ein einzelnes dominantes Gen für Pathotyp 1-Resistenz identifiziert. Eines dieser Gene (*Sen1*) wurde auf Chromosom XI lokalisiert, während ein anderes auf Chromosom IV (*Sen1-4*) liegt.

Über die Vererbung der Resistenz gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 waren dagegen zu Projektbeginn keine Veröffentlichungen verfügbar, in denen moderne molekularbiologische Methoden verwendet wurden. Ein Blick in die Beschreibende Sortenliste (2010) läßt vermuten, dass die Resistenzen gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 möglicherweise gemeinsam vererbt werden, da diese in den Sorten oftmals in Kombination auftreten. In einer gegen Ende des Projektes erscheinenden Publikation wurde ein Genombereich für Pathotyp 18-Resistenz auf Chromosom IX (*Sen18*) identifiziert sowie ein weiterer auf Chromosom I für die Pathotypen 2, 6 und 18 (*Sen2/6/18*) (Ballvora et al. 2011). Desweiteren wurde in dieser Veröffentlichung der oben erwähnte *Sen1*-Resistenzlocus auf Chromosom XI bestätigt.

Die Phänotypisierung von Genotypen erfolgt auch heute noch nach dem von Glynne (1925) und Lemmerz (1930) entwickelten Verfahren, welches auch für die offiziellen Krebsprüfungen des Bundessortenamtes verwendet wird, und zwar für die Pathotypen 1, 2, 6 und 18.

Mit dem hier durchgeführten Projekt sollten nun zum einen weitere Erkenntnisse über die Vererbung der Kartoffelkrebsresistenz gewonnen werden, um diese für züchterische Arbeiten nutzen zu können. Zum anderen sollte versucht werden, molekulare Werkzeuge zu entwickeln, mit denen eine Selektion krebsresistenter Genotypen bereits im Sämlingsstadium möglich wäre.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Pflanzenmaterial und Phänotypisierung**

Für das Projekt standen insgesamt vier tetraploide Kartoffelpopulationen zur Verfügung (Tabelle 3), die teilweise mehrjährig phänotypisiert wurden. Da für die Population Saturna x Panda die recht aufwendige genetische Kartierung mit anschließender QTL-Analyse durchgeführt werden sollte, wurden aus dieser Population direkt zu Beginn der Bearbeitung

92 Genotypen zufällig ausgewählt, die sowohl für die Phänotypisierung als auch die Genotypisierung verwendet wurden.

*Tabelle 3. Übersicht über die im Projekt zur Verfügung stehenden tetraploiden Kartoffelpopulationen.*

Population	Kreuzungseltern		Bemerkungen
1538	Ulme (♀) resistent P1, 2, 6, 18	2899/9B (♂) anfällig P1, 2, 6, 18	225 Genotypen; z.T. 5-jährige Boniturdaten
1581	Oktan (♀) resistent P1; anfällig P2, 6, 18	Ulme (♂) resistent P1, 2, 6, 18	252 Genotypen; z.T. 3-jährige Boniturdaten
1528	Sjameró resistent P1; anfällig P2, 6, 18	2899/9B (♂) anfällig P1, 2, 6, 18	164 Genotypen; z.T. 3-jährige Boniturdaten
SZF1	Saturna (♀) resistent P1; anfällig P2, 6, 18	Panda (♂) resistent P1, 2, 6, 18	300 Genotypen; 2-jährige Boniturdaten von 92 Genotypen

Die Krebsstestung erfolgte für alle Populationen nach der Methode von Glynn (1925) und Lemmerz (1930). Zu Beginn der Projektlaufzeit wurden die Resistenztests mit den Pathotypen 1, 2 und 6 an fünf Augenstücken je Genotyp und Rasse durchgeführt. Seit der Saison 2008/09 wurde dann auch noch der züchterisch bedeutsame und aggressivere Pathotyp 18 hinzugenommen. Aufgrund der Unsicherheit des Biotests wurde außerdem die Zahl der Augenstücke auf zunächst 10 und dann auf 20 pro Genotyp und Rasse ausgedehnt, um zuverlässigere phänotypische Daten zu erhalten. Die Genotypen wurden zu Projektbeginn nur in die Kategorien anfällig bzw. resistent eingeteilt, ab 2008/09 wurden sie jedoch nach Langerfeld und Stachewicz (1994) auf einer Skala von 1 (frühe Abwehrnekrosen) bis 5 (starke Infektion) klassifiziert. Nachfolgend wurden dann die Mittelwerte über die 10 bis 20 Keimlinge für alle weitere Verrechnungen verwendet. Die Saturna x Panda-Population wurde für die Rassen 1 und 18 in den Jahren 2009/10 und 2010/11, und für die Rassen 2 und 6 aus technischen Gründen (es standen keine Krebswucherungen dieser Rassen zur Verfügung) nur im Winter 2009/10 getestet.

## 2.2 Molekulare Analysen

Mittels der CTAB-Methode (Saghai Maroof et al. 1984) wurde von allen Genotypen genomische DNA isoliert. Im Projekt wurden hauptsächlich AFLP- (amplified fragment length polymorphism) und SSR-Marker (single sequence repeat) angewandt. Die AFLP-Primerkombinationen stammten aus dem *Pst*I/*Mse*I- und dem *Sse*I/*Mse*I-System unter Verwendung der Standardliste für AFLPs (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/keygeneAFLPs.html>). Die Namen der AFLP-Marker bestanden aus der entsprechenden Primerkombination gefolgt von der geschätzten Fragmentgröße in Basenpaaren. Durchgeführt wurden die AFLP-Analysen wie bei Song et al. (2005) beschrieben.

Mit SSR-Markern wurden die Kreuzungseltern sowie die Genotypen der Populationen 1538 sowie Saturna x Panda basierend auf veröffentlichten Informationen analysiert (Milbourne et al. 1998; Feingold et al. 2005; Ghislain et al. 2009).

Alle *F*-Primer, die für die AFLP- und SSR-Analysen verwendet wurden, waren mit Cy3 markiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte auf denaturierenden Polyacrylamidgelen (5%) gefolgt von der Detektion der Fragmente mittels eines Fluoreszenzscanners (Typhoon 9200, Amersham, Braunschweig, Deutschland).

Außerdem wurde der PCR-Marker für den Pathotyp 1-spezifischen Resistenzlocus *Sen1* auf Chromosom XI (Hehl et al. 1999) auf die Kreuzungseltern sowie die Populationen analysiert.

### **2.3 Statistische Auswertungen**

Heritabilitäten im weiteren Sinn für die phänotypischen Daten der Rassen 1 und 18 wurden mit der Software Plabstat Version 2P berechnet (Utz 2001). Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen den Boniturdaten der Rassen 1, 2, 6 und 18 bzw. innerhalb der Rassen 1 und 18 zwischen den einzelnen Jahren wurden mit SAS (PROC CORR statement) Version 9.1. ermittelt (SAS Institute Inc., 2004).

Mit den Markerdaten der Populationen Saturna x Panda und 1538 wurde eine Einzelmarkerregression (PROC GLM;  $P < 0,01$ ) durchgeführt, um erste Marker-Merkmal-Assoziationen zu erhalten. In einem zweiten Schritt wurde dann eine multiple Regression angeschlossen (PROC REG; stepwise selection), bei der zunächst alle signifikanten ( $P < 0,01$ ) Marker aus der Einzelmarkerregression im Modell enthalten waren, aber nur diejenigen beibehalten wurden, die auch in der multiplen Regression signifikant blieben ( $P < 0,05$ ).

Kopplungsgruppen sowie QTL-Analysen wurden mit Hilfe des Programms TetraploidMap (Hackett et al. 2007) durchgeführt, das eigens für die Analyse von Tetraploiden entwickelt wurde. Für die Konstruktion der genetischen Karten wurden nur solche Marker verwendet, die nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test) von den erwarteten Spaltungsverhältnissen abwichen. Die Marker wurden mittels einer Cluster-Analyse in Kopplungsgruppen eingeteilt und anschließend geordnet (Hackett et al. 2003). Gezeichnet wurden die genetischen Karten mit MapChart Version 2.1 (Voorrips 2002). Im Anschluss daran erfolgte eine Intervallkartierung. Permutationstests (Churchill und Doerge 1994) mit 1000 Iterationen führten zur Annahme bzw. Ablehnung eines QTL. Das komplexe QTL-Modell besteht aus sechs QTL-Genotypen, da es sechs Möglichkeiten gibt, die beiden homologen Gruppen, die von einem Elter stammen zu kombinieren. Für dominante QTL-Effekte gibt es zehn einfachere Modelle, die ebenfalls analysiert wurden und mit dem komplexen Modell verglichen wurden. In den Fällen, in denen das einfachere Modell die Daten genauso gut repräsentierte wie das komplexe wurde das einfachere Modell berücksichtigt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse**

##### **3.1.1 Bulk Segregant Analysen**

Da die phänotypischen Daten der Populationen 1538 und 1581 zunächst auf eine einfache (dominante) Vererbung der Krebsresistenz schließen ließen, wurden zu Beginn des Projektes Bulk Segregant Analysen (BSA) durchgeführt, um Marker zu identifizieren, die mit der Krebsresistenz assoziiert sind. Dazu wurden verschiedene Pools aus resistenten und anfälligen Sorten sowie aus resistenten und anfälligen Genotypen der Populationen 1538, 1581 und 1528 zusammengestellt und mit einer hohen Anzahl (> 1000) an AFLP-Primerkombinationen untersucht. Insgesamt gab es vier unabhängige BSAs, bei denen die Pools aus jeweils unterschiedlichen Sorten/Genotypen zusammengesetzt waren. Dabei konnten zwar zahlreiche Markerkandidaten identifiziert werden, von denen sich allerdings nach Auflösen der Pools keiner auf die einzelnen Genotypen der Populationen bestätigte. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass (a) die Genotypen anfangs nur in resistent bzw. anfällig eingeteilt wurden ohne Boniturnoten zu vergeben, (b) aufgrund der Unsicherheiten des Biotest möglicherweise falsche Einteilungen in resistent bzw. anfällig vorgenommen wurden und (c) die Vererbung der Krebsresistenz doch komplexer ist als zunächst angenommen. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass die zu untersuchende Augenzahl in den nachfolgenden Testungen auf bis zu 20 pro Genotyp und Rasse erhöht wurden, dass Boniturnoten von 1 bis 5 vergeben wurden und dass mit der QTL-Kartierung ein grundsätzlich anderer Ansatz verfolgt wurde.

##### **3.1.2 Population Saturna x Panda**

###### Phänotypische Daten

Die phänotypischen Daten der 92 Genotypen aus der Saturna x Panda-Population folgten einer quantitativen Befallsverteilung für die Pathotypen 1, 2, 6 und 18 (Abbildung 1), was auf eine oligo- bis polygene Vererbung der Krebsresistenz schließen lässt. Bezüglich Pathotyp 1 lag ein hoher Anteil an Genotypen auf der resistenten Seite der Verteilung (Boniturnoten 1 und 2). Dies war aufgrund der Pathotyp 1-Resistenz beider Eltern auch zu erwarten. Die linksschiefe Verteilung deutete außerdem darauf hin, dass die Resistenz gegenüber Pathotyp 1 durch eher weniger Gene mit größeren Effekten kontrolliert wird.

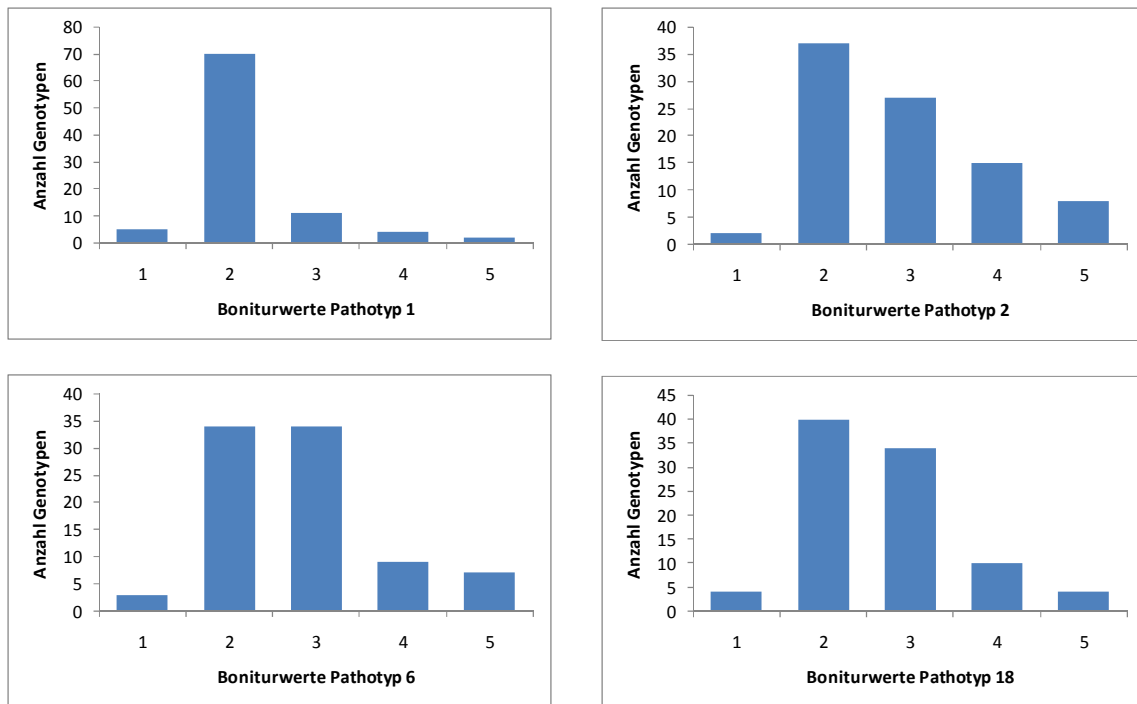


Abbildung 1. Befallsverteilungen der 92 Genotypen aus der Saturna x Panda-Population nach Inokulation mit den Pathotypen 1, 2, 6 und 18. Daten basieren auf den Mittelwerten von jeweils 10-20 inokulierten Augen pro Genotyp und Rasse aus den Jahren 2009/10 und 2010/11 (P1, P18) bzw. auf den Werten aus 2009/10 (P2, P6).

Korrelationskoeffizienten zwischen den Jahren lagen für Pathotyp 1 bei 0,67 und für Pathotyp 18 bei 0,47 ( $P < 0,0001$ ). Die Heritabilität im weiteren Sinn betrug 85% für Pathotyp 1 und 71% für Pathotyp 18, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der phänotypischen Daten hinweist. Korrelationskoeffizienten zwischen den Pathotypen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4. Korrelationskoeffizienten zwischen den Pathotypen 1, 2, 6 und 18. Daten basieren auf den Mittelwerten von jeweils 10-20 inokulierten Augen pro Genotyp und Rasse aus den Jahren 2009/10 und 2010/11 (P1, P18) bzw. auf den Werten aus 2009/10 (P2, P6).

	Pathotyp 1	Pathotyp 2	Pathotyp 6	Pathotyp 18
Pathotyp 1	-	0.22 (0.03)	0.29 (0.007)	0.20 (0.05)
Pathotyp 2		-	0.33 (0.002)	0.39 (0.0001)
Pathotyp 6			-	0.37 (0.0004)
Pathotyp 18				-

### Genetische Karte

Die genetische Karte des weiblichen Elters Saturna beinhaltetete 124 AFLP- und 25 SSR-Marker sowie den spezifischen Marker für den *Sen1*-Resistenzlocus. Sie bestand aus 18



Kopplungsgruppen und umfasste insgesamt 700 cM. Die Karte des männlichen Elters Panda beinhaltete 146 AFLP- und 24 SSR-Marker sowie ebenfalls den spezifischen Marker für den *Sen1*-Resistenzlocus. Sie bestand aus 23 Kopplungsgruppen und umfasste insgesamt 800 cM. Die Zuordnung der Kopplungsgruppen zu spezifischen Chromosomen erfolgte größtenteils mittels Mikrosatelliten-Markern. In den Karten beider Eltern wurden alle zwölf Chromosomen durch mindestens eine Kopplungsgruppe repräsentiert. Der Umfang der genetischen Karten entsprach mit 700 bzw. 800 cM in etwa den Werten aus anderen Veröffentlichungen (Van Os et al. 2006; Bradshaw et al. 2008; Khu et al. 2008; McCord et al. 2011).

#### Marker-Merkmals-Assoziationen und QTL-Analyse

In der Einzelmarkerregression konnten insgesamt 44 signifikante ( $P < 0,01$ ) Marker für Pathotyp 1 gefunden werden, davon kartierten 19 auf Chromosom XI inklusive dem *Sen1*-Marker. Der Anteil an der erklärten phänotypischen Varianz lag zwischen 6 und 47%. Den größten Anteil erklärten dabei *Sen1* sowie zwei zu *Sen1* eng gekoppelte AFLP-Marker. Für Pathotyp 2 konnten insgesamt 18 signifikante Marker identifiziert werden, die zwischen 6 und 19% der phänotypischen Varianz erklärten, für Pathotyp 6 waren es 16 Marker ( $R^2$  7-19%) und für Pathotyp 18 36 Marker ( $R^2$  6-16%). Die Anzahl und chromosomalen Verteilungen der Marker sind Tabelle 5 zu entnehmen.

*Tabelle 5. Anzahl und chromosomale Verteilungen der signifikanten ( $P < 0,01$ ) Marker für die Pathotypen (P) 1, 2, 6 und 18 aus der Einzelmarkerregression. Die Spannweiten der erklärten phänotypischen Varianzen ( $R^2$ ) sind angegeben.*

Chr.	P1	P2	P6	P18
I	1	3	1	3
II	1	1	1	1
III	2	-	-	-
IV	1	1	-	1
V	-	1	-	5
VII	1	-	-	1
VIII	3	1	3	4
IX	3	-	-	-
X	-	3	3	6
XI	19	4	5	5
XII	3	-	1	-
ungekoppelt /unbekannt	10	4	2	10

$R^2$ : 6-47%  $R^2$ : 6-19%  $R^2$ : 7-19%  $R^2$ : 6-16%

In der schrittweisen multiplen Regression blieben sieben Marker ( $P < 0,05$ ) im Modell für Pathotyp 1, das insgesamt 71% der phänotypischen Varianz erklärte. Für Pathotyp 2 blieben fünf Marker im Modell ( $R^2=38\%$ ), für Pathotyp 6 vier Marker ( $R^2=31\%$ ) und für Pathotyp 18 ebenfalls vier Marker ( $R^2=35\%$ ). Mit zunehmender Zahl an positiven Allelen erhöhte sich das Resistenzniveau kontinuierlich, was in Abbildung 2 beispielhaft für die Pathotypen 1 und 18 gezeigt ist.

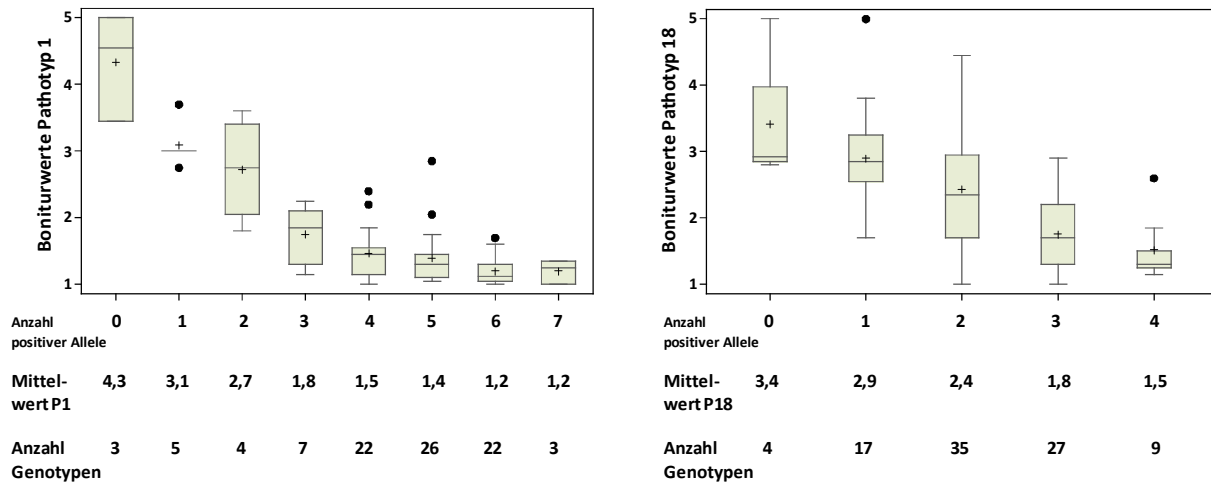


Abbildung 2. Boxplot-Verteilungen der Boniturmittelwerte für die Pathotypen 1 (links) und 18 (rechts) klassifiziert nach der Anzahl an kombinierten positiven Allelen. Die Mittelwerte für die Klassen 0 (kein positives Allel) bis 7 bzw. bis 4 (7 bzw. 4 positive Allele) sind jeweils unter den entsprechenden Boxplots angegeben. Je niedriger der Bonitурwert, desto niedriger der Befall. Die Daten basieren auf den Mittelwerten von jeweils 10-20 inokulierten Augen pro Genotyp und Rasse aus den Jahren 2009/10 und 2010/11. Berücksichtigt wurden alle signifikanten ( $P < 0,01$ ) Marker aus der Einzelmarkerregression, die in einer schrittweisen multiplen Regression signifikant blieben ( $P < 0,05$ ). Durchgezogene Linien: Median; +: Mittelwerte, 50% der Datenpunkte liegen innerhalb der grauen Boxen.

In der QTL-Analyse konnten für Pathotyp 1 Resistenz-QTL auf den Chromosomen VI, VIII und XI detektiert werden, für Pathotyp 2 auf den Chromosomen I, VI, VII, VIII, X und XI, und für die Pathotypen 6 und 18 wurden QTL auf den Chromosomen II, VI, VII, VIII, X und XI identifiziert (Tabelle 6). Die erklärte phänotypische Varianz lag für Pathotyp 1 zwischen 24% und 56%, für Pathotyp 2 zwischen 6% und 22%, für Pathotyp 6 zwischen 11% und 36%, und für Pathotyp 18 zwischen 5% und 36%. Die meisten Resistenz-QTL wurden durch das komplexe Modell am besten beschrieben.

Ein Haupt-QTL für Pathotyp 1-Resistenz lag am *Sen1*-Locus auf Chromosom XI und erklärte in Saturna 46% und in Panda 56% der phänotypischen Varianz (Abbildung 3). Damit wurde der Effekt des *Sen1*-Resistenzlocus (Hehl et al. 1999; Ballvora et al. 2011) sowohl in der Einzelmarkerregression als auch in der QTL-Analyse in der Saturna x Panda-Population bestätigt. Weitere QTL für Pathotyp 1-Resistenz wurden auf den Chromosomen VI und VIII

identifiziert, jedoch keiner auf Chromosom IV, auf dem Brugmans et al. (2006) ein dominantes Resistenzgen (*Sen 1-4*) für Pathotyp 1 fanden.

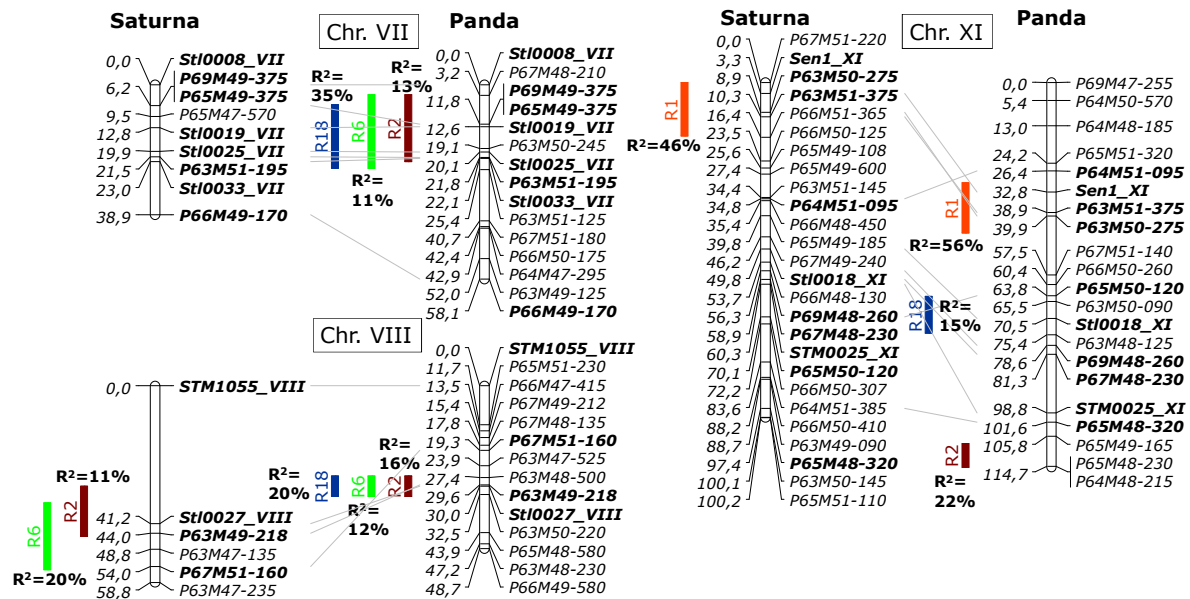


Abbildung 3. Genetische Karte der Kartoffelchromosomen VII, VIII und XI. Die jeweils linke Kopplungsgruppe basiert auf dem weiblichen Elter Saturna und die rechte auf dem männlichen Elter Panda. Marker, die bezüglich beider Eltern informativ waren, sind fett hervorgehoben und durch Linien miteinander verbunden. Die Balken entsprechen den QTL-Regionen der vier Pathotypen von *S. endobioticum*: rot = Pathotyp 1, braun = Pathotyp 2, grün = Pathotyp 6 und blau = Pathotyp 18. Die erklärten phänotypischen Varianzen ( $R^2$ ) sind angegeben.

Die Resistenz-QTL für die Pathotypen 2, 6 und 18 erklärten jeweils einen kleineren bis mittleren Anteil an der phänotypischen Varianz (Abbildung 3, Tabelle 6) und es wurde kein Haupt-QTL wie für Pathotyp 1 detektiert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Resistenz gegenüber diesen Rassen in der Saturna x Panda-Population eher oligo- bis polygen vererbt wird, während für die Pathotyp 1-Resistenz hauptsächlich *Sen1* verantwortlich zu sein scheint. Oftmals überlappten die QTL für die Pathotypen 2, 6, und 18 (Abbildung 3), so dass diese Resistenzen vermutlich gemeinsam vererbt werden, was sich bestätigt, wenn man in die Beschreibende Sortenliste (2010) schaut, da diese in den Sorten häufig in Kombination vorkommen. Es bestätigt außerdem die Beobachtungen von Ballvora et al. (2011), die einen Genombereich auf Chromosom I identifizierten, der mit Pathotyp 2, 6 und 18-Resistenz assoziiert war. In deren untersuchter Population ergaben sich außerdem Korrelationen zwischen den Pathotypen 2, 6 und 18, während die Resistenz gegenüber Pathotyp 1 unabhängig davon war. Die Genomregionen für die Krebsresistenz in der Saturna x Panda-Population unterschieden sich größtenteils von denen, die in der Studie von Ballvora et al. (2011) gefunden wurden, so dass davon auszugehen ist, dass die Krebsresistenz durch

unterschiedliche Loci verursacht wird in Abhängigkeit vom jeweiligen Kreuzungselter und vom genetischen Hintergrund. Allerdings wurden in der Einzelmarkerregression auf Chromosom I in der Saturna x Panda-Population ebenfalls signifikante Marker für die Pathotypen 2, 6 und 18 identifiziert (Tabelle 5) und bei der QTL-Analyse wurde ein QTL für Pathotyp 2-Resistenz detektiert (Tabelle 6). Aufgrund fehlender gemeinsamer Marker lässt sich nach derzeitigem Wissensstand jedoch nicht genau sagen, ob es sich dabei tatsächlich um dieselbe Genomregion handelt wie bei Ballvora et al. (2011).

Die meisten QTL folgten nicht dem einfachen dominanten Modell (Tabelle 6), was die Komplexität der genetischen Effekte von Polyploiden und insbesondere bezüglich Kartoffelkrebs zeigte. Es gab jedoch auch einzelne QTL, die dem einfacheren dominanten Modell folgten. Dies waren vor allem diejenigen mit größeren Effekten wie beispielsweise der Resistenz-QTL für Pathotyp 1 in der Nähe des *Sen1*-Locus auf Chromosom XI (Tabelle 6). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer anderen Studie mit einer tetraploiden Kartoffelpopulation gemacht, in der QTL mit größeren Effekten dem dominanten Modell folgten (McCord et al. 2010). Die chromosomale Verteilung der QTL stimmte größtenteils mit den Ergebnissen der Einzelmarkerregression überein. Es gab jedoch auch Genomregionen mit Resistenz-QTL für bestimmte Pathotypen, die ohne die Intervallkartierung nicht entdeckt worden wären, z.B. auf Chromosom VI (Tabellen 5 und 6). Es ist bekannt, dass die Intervallkartierung eine präzisere Methode ist, um QTL-Regionen zu identifizieren, insbesondere bei Kartoffeln mit dem Programm TetraploidMap für Polyploide (Hackett et al. 2007).

Tabelle 6. Resistenz-QTL für die Kartoffelkrebs-Pathotypen (P) 1, 2, 6 und 18. Die Daten basieren auf den Mittelwerten von jeweils 10-20 inokulierten Augen pro Genotyp und Rasse aus den Jahren 2009/10 und 2010/11 (P1, P18) bzw. auf den Werten aus 2009/10 (P2, P6). Die nächsten Marker am QTL-Peak, LOD-Werte, Anteile an der erklärten phänotypischen Varianz ( $R^2$ ) sowie das beste QTL-Modell sind angegeben. Q12, Q13, usw. bezieht sich auf die phänotypischen Werte der Klassen von F1-Genotypen, die die spezifischen homologen Chromosomen am entsprechenden QTL tragen.

Chr.	Merkmal	Elter	Nächster Marker	LOD-Wert	$R^2$	Modell	Q12	Q13	Q14	Q23	Q24	Q34
I	P2_09/10	Panda	P67M50-448	2.5	0.18	komplexe Effekte	2,4 (0,3)	4,0 (0,4)	2,5 (0,3)	2,4 (0,2)	1,8 (0,2)	2,5 (0,2)
II	P6_09/10	Panda	StI0029	2.7	0.16	komplexe Effekte	2,7 (0,2)	4,2 (0,6)	1,9 (0,5)	1,6 (0,4)	2,2 (0,1)	2,2 (0,3)
II	MW P18	Panda	StI0029	2.2	0.05	komplexe Effekte	2,4 (0,1)	3,8 (0,6)	0 (0)	1,0 (0,9)	2,1 (0,1)	2,4 (0,4)
VI	MW P1	Saturna	StI0015	8.4	0.49	duplex dominante Effekte		+Q23 4.0 (0.3); -Q23 1.5 (0.1)				
VI	P6_09/10	Saturna	StI0015	4.1	0.36	komplexe Effekte	2,7 (0,2)	2,2 (0,1)	2,1 (0,3)	4,2 (0,3)	1,8 (0,2)	2,4 (0,2)
VI	MW P18	Saturna	StI0015	3.5	0.33	komplexe Effekte	2,1 (0,3)	2,1 (0,1)	3,0 (0,3)	4,4 (0,3)	2,2 (0,2)	2,1 (0,1)
VI	MW P1	Panda	P69M49-110	3.1	0.24	duplex dominante Effekte		+Q34 3.4 (0.3); -Q34 1.6 (0.1)				
VI	P2_09/10	Panda	P69M49-110	2.5	0.13	simplex dominante Effekte		+Q3 2.0 (0.1); -Q4 2.7 (0.1)				
VI	MW P18	Panda	P69M49-110	5.3	0.36	komplexe Effekte	2,3 (0,2)	1,9 (0,2)	3,6 (0,2)	1,6 (0,2)	2,2 (0,2)	3,4 (0,3)
VII	P2_09/10	Panda	StI0019	2.9	0.13	komplexe Effekte	1,8 (0,2)	2,2 (0,6)	3,2 (0,3)	2,7 (0,3)	2,2 (0,2)	2,4 (0,2)
VII	P6_09/10	Panda	StI0019	2.3	0.11	komplexe Effekte	2,3 (0,2)	1,6 (0,3)	2,5 (0,2)	3,1 (0,3)	2,5 (0,2)	1,8 (0,3)
VII	MW P18	Panda	StI0019	4.3	0.35	komplexe Effekte	1,7 (0,2)	3,0 (0,3)	1,9 (0,2)	3,5 (0,2)	2,2 (0,1)	2,1 (0,2)
VIII	MW P1	Saturna	StI0027	4.8	0.29	komplexe Effekte	1,3 (0,2)	1,4 (0,5)	2,0 (0,3)	1,4 (0,2)	3,6 (0,3)	1,6 (0,1)
VIII	P2_09/10	Saturna	StI0027	2.2	0.11	komplexe Effekte	2,0 (0,2)	2,9 (0,7)	3,0 (0,4)	3,3 (0,3)	2,2 (0,4)	2,3 (0,1)
VIII	P6_09/10	Saturna	P63M47-135	2.7	0.20	komplexe Effekte	1,3 (0,7)	4,6 (0,7)	2,1 (0,2)	2,1 (0,2)	3,7 (0,4)	2,5 (0,1)
VIII	MW P1	Panda	STM1055	8.3	0.47	duplex dominante Effekte		+Q13 3.7 (0.2); -Q13 1.5 (0.1)				
VIII	P2_09/10	Panda	P63M49-218	1.8	0.16	komplexe Effekte	2,7 (0,2)	3,6 (0,5)	2,1 (0,2)	2,1 (0,2)	3,6 (0,5)	2,1 (0,2)
VIII	P6_09/10	Panda	P63M49-218	1.8	0.12	komplexe Effekte	2,7 (0,2)	3,1 (0,4)	2,1 (0,2)	2,1 (0,2)	3,1 (0,4)	2,0 (0,2)
VIII	MW P18	Panda	P63M49-218	2.1	0.20	simplex dominante Effekte		+Q1 2.8 (0.1); -Q1 1.8 (0.1)				
X	MW P18	Saturna	P66M48-210	3.9	0.30	duplex dominante Effekte		+Q23 3.4 (0.2); -Q23 2.1 (0.1)				
X	P2_09/10	Saturna	P66M47-160	2.5	0.08	komplexe Effekte	2,9 (0,2)	2,4 (0,2)	2,8 (0,4)	2,0 (0,2)	2,0 (0,2)	2,3 (0,5)
X	P6_09/10	Saturna	P66M47-160	3.4	0.13	komplexe Effekte	2,6 (0,2)	2,8 (0,2)	2,2 (0,4)	2,1 (0,2)	1,7 (0,2)	3,0 (0,5)
X	P2_09/10	Panda	P63M50-168	2.1	0.09	komplexe Effekte	2,2 (0,2)	3,2 (0,3)	2,1 (0,2)	2,3 (0,3)	2,4 (0,2)	3,0 (0,4)
X	MW P18	Panda	P63M50-168	2.5	0.12	komplexe Effekte	2,1 (0,1)	2,1 (0,3)	2,5 (0,2)	1,7 (0,3)	2,4 (0,2)	3,6 (0,4)
XI	MW P1	Saturna	Sen1	10.8	0.46	simplex dominante Effekte		+Q1 1.3 (0.1); -Q1 2.4 (0.1)				
XI	P6_09/10	Saturna	StI0018	4.6	0.32	komplexe Effekte	2,2 (0,1)	4,2 (0,4)	2,3 (0,3)	2,8 (0,2)	1,8 (0,2)	2,2 (0,4)
XI	P2_09/10	Saturna	P68M48-167	1.8	0.06	komplexe Effekte	2,5 (0,2)	2,1 (0,2)	2,2 (0,7)	2,7 (0,2)	1,3 (0,8)	2,8 (0,3)
XI	P6_09/10	Saturna	P64M48-215	1.8	0.05	komplexe Effekte	2,3 (0,2)	2,1 (0,2)	2,8 (0,6)	2,7 (0,2)	1,8 (0,8)	2,6 (0,3)
XI	MW P1	Panda	Sen1	11.4	0.56	komplexe Effekte	1,3 (0,1)	1,4 (0,2)	1,7 (0,2)	1,8 (0,2)	3,8 (0,2)	2,4 (0,3)
XI	P2_09/10	Panda	P65M49-168	4.3	0.22	simplex dominante Effekte		+Q4 3.2 (0.2); -Q4 2.2 (0.1)				
XI	MW P18	Panda	P63M50-085	3.3	0.15	komplexe Effekte	3,4 (0,3)	2,5 (0,3)	2,2 (0,3)	2,5 (0,4)	1,8 (0,2)	2,2 (0,1)
LG13	MW P18	Saturna	P63M47-185	2.9	0.09	komplexe Effekte	2,4 (0,2)	1,9 (0,2)	5,0 (0,9)	2,3 (0,2)	2,3 (0,2)	2,9 (0,9)

### 3.1.3 Population 1538

Die Population 1538 (Ulme x 2899/9B) sollte im Rahmen der Projektverlängerung vor allem dazu dienen, zu überprüfen, ob die Vollresistenz von Ulme und Panda auf denselben oder unterschiedlichen Genomregionen beruht sowie zur Validierung von bekannten Genomregionen für die Krebsresistenz. Hierzu wurde von 92 Genotypen dieser Population eine genetische Karte mittels AFLP- und SSR-Markern erstellt, gefolgt von weiteren statistischen Analysen.

#### Phänotypische Daten

Bei den 92 Genotypen, die verwendet wurden, handelt es sich um eine selektierte Fraktion aus der gesamten Population, von denen tatsächliche Boniturwerte von 1 bis 5 vorliegen und nicht nur Einteilungen in resistent bzw. anfällig. Da Pathotyp 18 erst später hinzugenommen wurde, liegen hier nur von 57 Genotypen entsprechende Boniturwerte vor. Die Genotypen waren ursprünglich für die Bulk Segregant Analyse vorgesehen, weshalb größtenteils resistente Genotypen (Boniturwerte 1 und 2) darunter waren und nur wenige anfällige (in Abbildung 4 exemplarisch zu sehen für die Pathotypen 1 und 6). Aus diesem Grund werden bei der Verrechnung der Bonitur- mit den Markerdaten auch nur diejenigen Genomregionen präsentiert, die in verschiedenen statistischen Verfahren (z.B. Einzelmarkerregression/multiple Regression und QTL-Analyse) signifikant miteinander assoziiert waren.

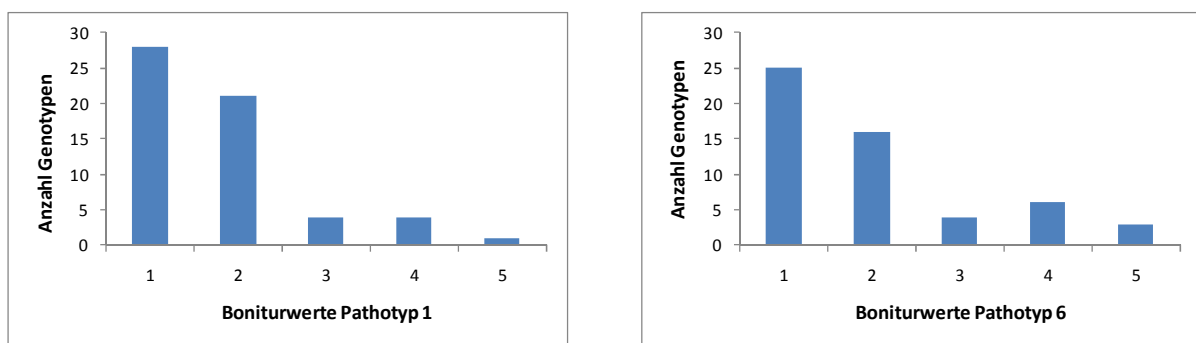


Abbildung 4. Befallsverteilungen der 92 Genotypen aus der Population 1538 (Ulme x 2899/9B) nach Inokulation mit den Pathotypen 1 (links) und 6 (rechts). Daten basieren auf den Mittelwerten von jeweils 10-20 inokulierten Augen pro Genotyp und Rasse.

#### Genetische Karte

Die genetische Karte des weiblichen Elters Ulme beinhaltete 131 AFLP- und 14 SSR-Marker. Sie bestand aus 23 Kopplungsgruppen und umfasste insgesamt 1000 cM. Die Karte des männlichen Elters 2899/9B beinhaltete 91 AFLP- und 13 SSR-Marker. Sie bestand aus 19 Kopplungsgruppen und umfasste insgesamt 800 cM. Die Zuordnung der Kopplungsgruppen zu spezifischen Chromosomen erfolgte größtenteils mittels Mikrosatelliten-Markern. In den

Karten beider Eltern wurden elf Chromosomen durch mindestens eine Kopplungsgruppe repräsentiert. Lediglich Chromosom X konnte mit den vorliegenden Markerdaten nicht identifiziert werden. Insgesamt sieben Kopplungsgruppen konnten keinem spezifischen Chromosom zugeordnet werden. Dies könnte allerdings sehr wahrscheinlich durch weitere Markeranalysen (v.a. SSR-Marker) erreicht werden.

### Marker-Merkmals-Assoziationen

Wie oben bereits erwähnt, werden im Folgenden ausschließlich Genomregionen/Marker aufgeführt, die in verschiedenen statistischen Verfahren signifikant waren, da es sich um eine vorselektierte Population mit dem Schwerpunkt resistente Genotypen handelt. Bezüglich Pathotyp 18 lagen nur von 57 Genotypen Boniturdaten vor, so dass hier nur Einzelmarker- und multiple Regressionen durchgeführt wurden. Es zeigte sich, dass in dieser Population bezüglich der Pathotypen 2, 6 und 18 grundsätzlich andere Genomregionen signifikant waren als in der Saturna x Panda-Population. Dagegen hatten Marker am *Sen1*-Locus auf Chromosom XI auch in dieser Population einen signifikanten Effekt auf die Pathotyp 1-Resistenz, wenn auch einen wesentlich geringeren als in den anderen im Projekt untersuchten Populationen ( $R^2 = 7-14\%$ ). Außerdem waren auf einer bisher unbekanntem Gruppe Marker mit Pathotyp 1-Resistenz gekoppelt ( $R^2 = 7-8\%$ ).

Für die Pathotypen 2, 6 und 18 ergaben sich in den verschiedenen statistischen Analysen (Einzelmarkerregression, multiple Regression, QTL-Analyse) auf den Chromosomen I, III und IX signifikante Marker-Merkmals-Assoziationen (Abbildung 5). Auch in der Saturna x Panda-Population konnten in der Einzelmarkerregression und der multiplen Regression signifikante Marker auf Chromosom I für die Resistenz gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 identifiziert werden. Diese lagen in einer ähnlichen Genomregion wie in der Population 1538. Interessanterweise konnten in einer Studie von Ballvora et al. (2011) ebenfalls Marker auf den Chromosomen I und IX gefunden werden, die mit der Resistenz gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 (Chromosom I) bzw. Pathotyp 18 (Chromosom IX) gekoppelt waren. Ob es sich hierbei tatsächlich um dieselben Loci wie in der Ulme-Population handelt, kann aufgrund fehlender gemeinsamer Marker zwischen den beiden Studien derzeit nicht genau gesagt werden, so dass hier zunächst weitere Markeranalysen durchgeführt werden müssten.

Wie in der Saturna x Panda-Population und bei Ballvora et al. (2011) wurden auch in der Population 1538 die Resistenzen gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 durch ähnliche Genombereiche bedingt, während die Pathotyp 1-Resistenz unabhängig davon vererbt wurde.

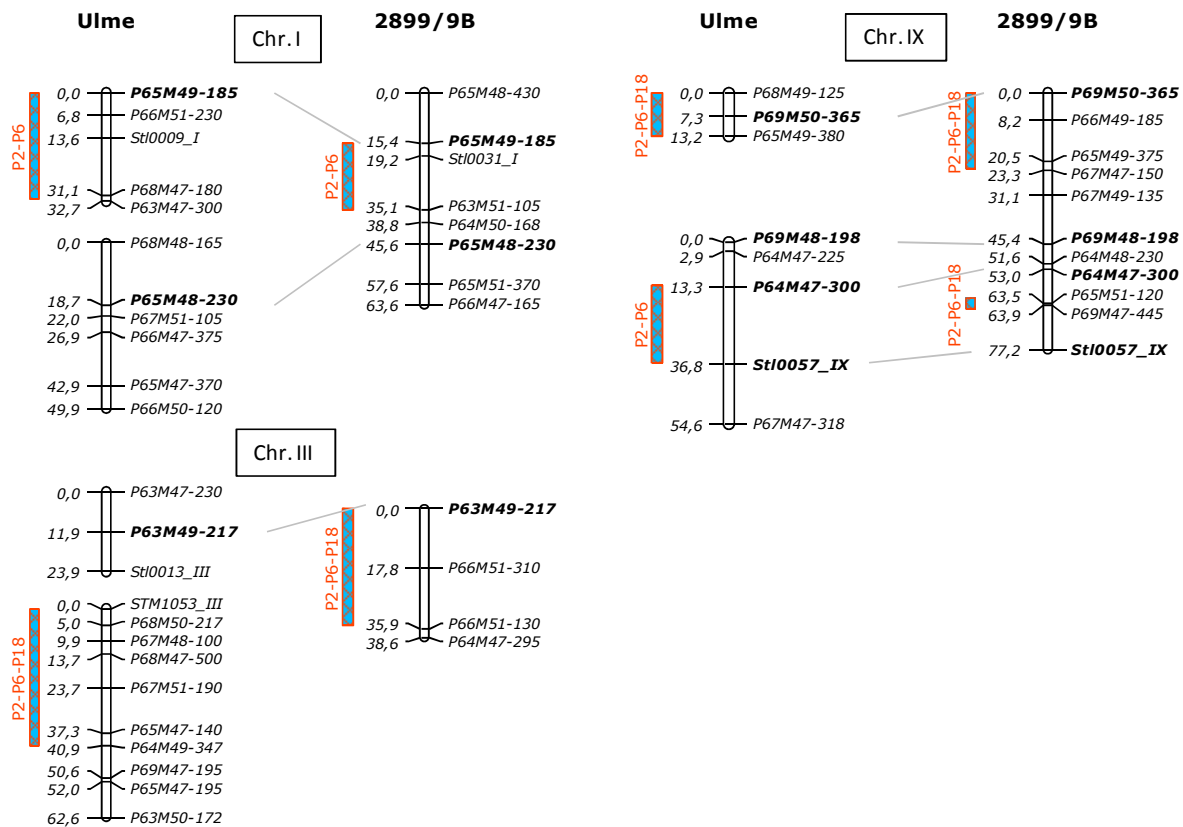


Abbildung 5. Genetische Karte der Kartoffelchromosomen I, III und IX. Die jeweils linke Kopplungsgruppe basiert auf dem weiblichen Elter Ulme und die rechte auf dem männlichen Elter 2899/9B. Marker, die bezüglich beider Eltern informativ waren, sind fett hervorgehoben und durch Linien miteinander verbunden. Die Balken entsprechen den Genomregionen, die in mindestens zwei von drei statistischen Verfahren (Einzelmarkerregression, multiple Regression, QTL-Analyse) einen signifikanten Einfluss auf die Kartoffelkrebsresistenz gegenüber den Pathotypen 2, 6 und/oder 18 hatten.

Die Anhäufung von positiven Allelen führte in der Population 1538 zu einer zunehmenden Resistenzsteigerung wie in Abbildung 6 beispielhaft für Pathotyp 18 gezeigt ist. Das Gesamtmodell aller in der multiplen Regression verbleibender Marker erklärte für Pathotyp 1 39% der phänotypischen Variation, für Pathotyp 2 40%, für Pathotyp 6 42% und für Pathotyp 18 52%.



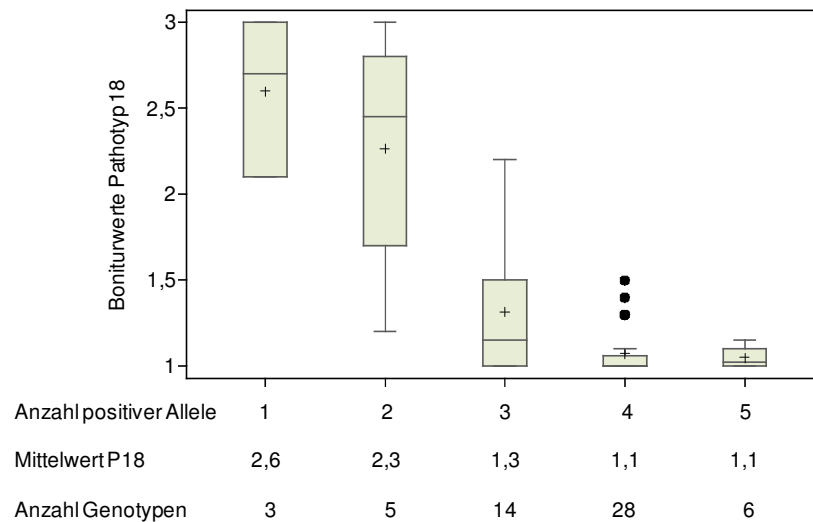


Abbildung 6. Boxplot-Verteilung der Boniturwerte für Pathotyp 18 klassifiziert nach der Anzahl an kombinierten positiven Allelen. Die Mittelwerte für die Klassen 1 (ein positives Allel) bis 5 (5 positive Allele) sind jeweils unter den entsprechenden Boxplots angegeben. Je niedriger der Boniturwert, desto niedriger der Befall. Die Daten basieren auf den Mittelwerten von jeweils 10-20 inokulierten Augen pro Genotyp und Rasse. Berücksichtigt wurden alle signifikanten ( $P < 0,01$ ) Marker aus der Einzelmarkerregression, die in einer schrittweisen multiplen Regression signifikant blieben ( $P < 0,05$ ). Durchgezogene Linien: Median; +: Mittelwerte, 50% der Datenpunkte liegen innerhalb der grauen Boxen.

### 3.1.4 Populationen 1528 und 1581

Bei der Population 1528 (Sjamero x 2899/9B) wurde aufgrund der Biotestergebnisse der Jahre 2008 und 2009 vermutet, dass der Stamm 2899/9B eventuell Komponenten enthalten könnte, die in Kombination mit weiteren Genen/Komponenten eine Resistenz gegenüber den Kartoffelkrebsrassen 2, 6 und 18 bedingen. Dies wurde außerdem unterstützt durch den hohen Anteil an vollresistenten Genotypen in der Population 1538 (Ulme x 2899/9B) im Vergleich zur Population 1581 (Oktan x Ulme). Eine intensive Prüfung von 22 Genotypen aus der Population 1528 mit jeweils 20 Augenstücken pro Genotyp und Rasse in der Saison 2009/10 konnte dies allerdings nicht weiter bestätigen, so dass in dieser Population lediglich Genotypen mit Pathotyp 1-Resistenz vorliegen. Der Elter Sjamero ist als resistent gegenüber Rasse 1 beschrieben, so dass Genotypen mit Pathotyp 1-Resistenz in dieser Population auch zu erwarten sind. In der Population 1528 erklärte der Marker *Sen1* ebenfalls einen großen Anteil an der phänotypischen Varianz ( $R^2 = 54\%$ ) für die Pathotyp 1-Resistenz.

Da es von der Population 1581 (Oktan x Ulme) nur von relativ wenigen Genotypen Boniturdaten gibt, die über die Jahre hinweg gut übereinstimmen, wurde diese Population, was die molekulargenetische Bearbeitung angeht, zugunsten der Populationen Saturna x Panda und der Ulme x 2899/9B zurückgestellt. Außerdem war in dieser Population der Anteil

an resistenten Genotypen recht gering, so dass die intensive Bearbeitung der anderen beiden Populationen lohnenswerter erschien. Untersucht wurden allerdings auch in dieser Population Marker am *Sen1*-Resistenzlocus, der hier ebenfalls einen signifikanten Einfluss ( $R^2 = 23\%$ ) auf die Pathotyp 1-Resistenz hatte.

### **3.1.5 Übertragbarkeit von Markern auf andere Sorten**

Da der Marker *Sen1* im Vergleich zu allen anderen signifikanten Markern den größten Anteil an der phänotypischen Varianz erklärte, wurde dieser auch besonders intensiv auf andere Kartoffelsorten getestet. Insgesamt wurden 400 Sorten mit diesem Marker analysiert. Es zeigte sich, dass der *Sen1*-Marker nicht diagnostisch im Sortenspektrum einzusetzen ist, da sich kein klarer Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des entsprechenden Markerfragments und der Einteilung in resistent und anfällig aus der Sortenliste ergab. Es scheint also von der jeweiligen Kreuzung abzuhängen, ob dieser Genort einen Einfluss auf die Pathotyp 1-Resistenz hat oder nicht.

Neben *Sen1* wurden auch 18 AFLP-Marker ausgewählt, die in QTL-Regionen kartierten, um diese auf eine kleinere Auswahl an Sorten zu testen, und zwar an den insgesamt sechs Kreuzungseltern aus diesem Projekt sowie an allen vollresistenten Sorten und neun anfälligen Kontrollen. Auch hier ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Markerfragments und der Resistenz bzw. Anfälligkeit der Sorten, so dass diese Marker aller Voraussicht nach ebenfalls nicht diagnostisch im Sortenspektrum einzusetzen sind und die entsprechenden Genorte vom jeweiligen Resistenzdonor sowie dem genetischen Hintergrund abhängen.

## **3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Die im Projekt erzielten Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse über die Vererbung der Kartoffelkrebsresistenz gegenüber den Pathotypen 1, 2, 6, und 18. Dabei hat sich gezeigt, dass die Resistenz gegenüber Pathotyp 1 größtenteils durch den bekannten Genort *Sen1* auf Chromosom XI bedingt war, während die Resistenz gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 auf mehreren Genomregionen mit kleinen bis mittleren Effekten beruhte. Die Resistenz-QTL für die Pathotypen 2, 6 und 18 kartierten außerdem oftmals in ähnlichen Bereichen. Die Übertragbarkeit der Marker aus QTL-Regionen in andere Populationen oder auf andere Sorten ist nur sehr eingeschränkt möglich, da je nach genetischem Hintergrund und beteiligten Kreuzungseltern andere Genombereiche in die Krebsresistenz involviert zu sein scheinen. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass für ein gutes Resistenzniveau mehrere positive Allele kombiniert vorliegen müssen, so dass eine wirtschaftliche Nutzung dieser Resistenzloci durch markergestützte Selektion mit den derzeit verfügbaren Techniken noch wenig effizient erscheint. Bei dem rasanten Tempo des technischen Fortschritts erscheint es

jedoch durchaus realistisch, dass sehr bald die Genotypisierung des Gesamtgenoms bei geringen Kosten auch für Kulturpflanzen möglich wird. So werden komplexe Selektionsstrategien wirtschaftlich sinnvoll, die die komplette genetische Information nutzen und auch kleinere QTL berücksichtigen.

Auch wenn aus diesem Projekt aus den genannten Gründen nun keine Marker hervorgegangen sind, die direkt für die markergestützte Selektion einsetzbar sind, so lieferten die Arbeiten doch wichtige Erkenntnisse über die Komplexität der Genetik der Krebsresistenz. Diese bilden eine entscheidende Grundlage für weitere Forschungsarbeiten im Bereich der Krebsresistenz und können auch in die praktische Züchtung einfließen. Ferner sind die Ergebnisse der Saturna x Panda-Population Grundlage für eine bereits eingereichte Publikation (Groth et al. 2011a. Teile des Projektes wurden zudem auf Tagungen präsentiert (Groth et al. 2010 und 2011b).

#### **4. Zusammenfassung**

In diesem Projekt wurden verschiedene tetraploide Kartoffelpopulationen mit den Resistenzdonoren Panda und Ulme genotypisch sowie mehrjährig phänotypisch untersucht, um diejenigen Marker/Genombereiche zu identifizieren, die für die Resistenz gegenüber den Kartoffelkrebs-Pathotypen 1, 2, 6 und 18 verantwortlich sind. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag dabei auf den Populationen Saturna (resistent P1) x Panda (resistent P1, 2, 6, 18) und Ulme (resistent P1, 2, 6, 18) x 2899/9B (anfällig). Von diesen beiden Populationen wurden mittels AFLP- und SSR-Markern genetische Karten erstellt. Verschiedene statistische Verfahren (Einzelmarkerregressionen, multiple Regressionen, QTL-Analysen) lieferten Marker, die mit der Krebsresistenz gekoppelt waren. Dabei zeigte sich, dass die Resistenz gegenüber Pathotyp 1 in den im Projekt untersuchten Populationen hauptsächlich durch den *Sen1*-Locus auf Chromosom XI (Hehl et al. 1999) bedingt war. Die Resistenzen gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 wurden oftmals durch ähnliche Genombereiche vermittelt und erklärten einen kleineren bis mittleren Anteil an der phänotypischen Varianz. Ferner stellte sich heraus, dass die Resistenz von Panda und Ulme bezüglich der Pathotypen 2, 6 und 18 auf größtenteils unterschiedlichen Genomregionen beruhte mit Ausnahme von Chromosom I, wo in beiden Populationen signifikante Marker-Merkmal-Assoziationen gefunden werden konnten. In der Population Saturna x Panda wurden außerdem auf den Chromosomen VI, VII, VIII und X Marker/QTL für die Pathotypen 2, 6 und/oder 18 identifiziert, während in der Ulme-Population neben Chromosom I auch Marker auf den Chromosomen III und IX einen Beitrag zur Resistenz leisteten. Interessanterweise konnten in einer Studie von Ballvora et al. (2011) ebenfalls Marker auf den Chromosomen I und IX gefunden werden, die mit der Resistenz

gegenüber den Pathotypen 2, 6 und 18 (Chromosom I) bzw. Pathotyp 18 (Chromosom IX) gekoppelt waren.

Insgesamt konnten in dem hier durchgeführten Projekt zuverlässig Genomregionen identifiziert werden, die mit der Kartoffelkrebsresistenz in Verbindung stehen und es leistete somit einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Vererbung der Krebsresistenz.

## **5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen**

Das Ziel molekulare Marker zu entwickeln, die für die markergestützte Selektion krebsresistenter Sorten geeignet waren, stellte sich aufgrund der quantitativen und komplexen Vererbung der Krebsresistenz als sehr schwierig dar. Jedoch konnten sehr nützliche Erkenntnisse über die Vererbung der Resistenz und der daran beteiligten Genomregionen gewonnen werden. Wie bereits mehrfach erwähnt (vgl. diverse Zwischenberichte, Verlängerungsantrag und Kapitel 3.1.1), gelang es mit der Strategie der Bulk Segregant Analysen nicht, Marker bzw. Genomregionen zu identifizieren, die mit der Kartoffelkrebsresistenz assoziiert waren. Daher musste die Vorgehensweise grundsätzlich verändert werden hin zur deutlich aufwendigeren QTL-Kartierung, wodurch eine Projektverlängerung um ein Jahr nötig wurde. Alle molekulargenetischen Analysen inklusive den entsprechenden statistischen Verrechnungen, die laut Verlängerungsantrag vorgesehen waren, konnten planmäßig durchgeführt werden. Es ist gelungen, mehrere Genomregionen auf verschiedenen Chromosomen zu identifizieren, die mit Krebsresistenz assoziiert sind.

Für die verschiedenen Krebspathotypen liegen unterschiedliche Resistenzloci vor. Dabei bestätigte sich der *Sen1*-Locus auf Chromosom XI als Hauptgen-assoziiert bei den Sorten Ulme und Panda. Allerdings sind die *Sen1*-Marker nicht diagnostisch einsetzbar und nur bedingt züchterisch nutzbar. Für die noch wesentlich interessanteren Resistenzen gegen die Pathotypen 2, 6 und 18 wurden in den Sorten Ulme und Panda vollkommen unterschiedliche Resistenzloci ermittelt. Gemeinsam ist allerdings in beiden Sorten die Tatsache, dass die Resistenzloci für die drei Pathotypen zum Teil auf den gleichen Regionen liegen, z.B. auf Chromosom VII und VIII bei Panda (Abb. 3) und Chromosom III und IX bei Ulme (Abb. 5). Mangels Haupt-QTL ist eine Anwendung in der Kartoffelzüchtung mittels markergestützter Selektion sehr schwierig. Auch erwiesen sich die in Panda ermittelten QTLs als nicht diagnostisch in anderen Sorten. Die Ulme QTLs wurden dagegen noch nicht in den anderen relevanten Sorten geprüft. Dies könnte in einem kleinen Folgeprojekt noch geprüft werden. Ebenso sollte noch untersucht werden, ob es sich bei den für die Sorte Ulme ermittelten QTLs um die gleichen wie die von Ballvora et al. (2011) publizierten Regionen handelt. Die

Lokalisierung auf teilweise gleichen Chromosomen wäre ein erstes Indiz hierfür. Auch diese Frage könnte in einem Folgeprojekt relativ kurzfristig durch Kartierung der publizierten Mikrosatellitenmarker in unserer Population geprüft werden. Zudem sollte abgeklärt werden, wie sich die Anwendbarkeit der publizierten Marker im Sortenspektrum vergleichend zu den Ulme QTLs darstellt. Auch eine Ausweitung der Untersuchungen auf Sorten mit Krebsvollresistenz außerhalb der Beschreibenden Sortenliste wäre dabei wichtig.

Schließlich eröffnen neue molekulargenetische Analysesysteme wie Fluidigm Arrays die Möglichkeit die DNA von beispielsweise 192 Individuen einer Population gleichzeitig mit 24 verschiedenen Markern zu vergleichen. Inwieweit sich dieses System, das 2012 an der LfL etabliert werden soll, für die Analyse auf Krebsresistenz züchterisch anwenden lässt, sollte unbedingt in einem dreijährigen Folgeprojekt geklärt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ballvora A, Flath K, Lübeck J, Strahwald J, Tacke E, Hofferbert HR, Gebhardt C (2011) Multiple alleles for resistance and susceptibility modulate the defense response in the interaction of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with *Synchytrium endobioticum* pathotypes 1, 2, 6 and 18. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122-011-1666-9
- Beschreibende Sortenliste (2010). Deutscher Landwirtschaftsverlag GmbH, Hannover
- Bradshaw JE, Hackett CA, Pande B, Waugh R, Bryan GJ (2008) QTL mapping of yield, agronomic and quality traits in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Theor Appl Genet* 116:193–211
- Brugmans B, Hutten RGB, Rookmaker ANO, Visser RGF, van Eck HJ (2006) Exploitation of a marker dense linkage map of potato for positional cloning of a wart disease resistance gene. *Theor Appl Genet* 112:269–277
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963–971
- Feingold S, Lloyd J, Norero N, Bonierbale M, Lorenzen J (2005) Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet* 111:456–466
- Ghislain M, Núñez J, del Rosario Herrera M, Pignataro J, Guzman F, Bonierbale M, Spooner DM (2009) Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol Breed* 23:377–388

- Glynn MD (1925) Infection experiments with wart disease of potatoes, *Synchytrium endobioticum* (Schilb.). *Perc Ann Appl Biol* 12:34–60
- Groth J, Song Y, Kellermann A, Schwarzfischer A (2010) Molecular characterization of resistance to potato wart in tetraploid potato. Poster 13, Tagung “Genomics-based breeding”, 26.-28. Oktober, Giessen, Deutschland
- Groth J, Song Y, Kellermann A, Schwarzfischer A (2011a) Molecular characterization of resistance against potato wart races 1, 2, 6 and 18 in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). *Theor Appl Genet* (eingereicht)
- Groth J, Song Y, Kellermann A, Schwarzfischer A (2011b) Molecular characterization of resistance to potato wart in a tetraploid potato population. Poster 56, 18<sup>th</sup> Triennial Conference of the European Association for Potato Research, 24.-29. Juli, Oulu, Finnland
- Hackett CA, Pande B, Bryan GJ (2003) Constructing linkage maps in autotetraploid species using simulated annealing. *Theor Appl Genet* 106:1107–1115
- Hackett CA, Milne I, Bradshaw JE, Luo Z (2007) TetraploidMap for Windows: linkage map construction and QTL mapping in autotetraploid species. *J Hered* 98:727–729
- Hehl R, Faurie E, Hesselbach J, Salamini F, Whitham S, Baker B, Gebhardt C (1999) TMV resistance gene N homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theor Appl Genet* 98:379–386
- Khu DM, Lorenzen J, Hackett CA, Love SL (2008) Interval mapping of quantitative trait loci for corky ringspot disease resistance in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Am J Potato Res* 85:129–139
- Langerfeld E, Stachewicz H (1994) Assessment of varietal reactions to potato wart (*Synchytrium endobioticum*) in Germany. *Bulletin OEPP/EPPO* 24:793–798
- Lemmerz J (1930) Neues vereinfachtes Infektionsverfahren zur Prüfung von Kartoffelsorten auf Krebsfestigkeit. *Züchter* 2:288–297
- Lunden AP, Jørstad J (1934) Investigations on the inheritance of immunity to wart disease (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.-Perc.) in the potato. *Genetics* 29:375–385
- Maris B (1973) Studies with potato dihaploids on the inheritance of resistance to wart disease. *Potato Res* 16:324
- McCord PH, Sosinski BR, Haynes KG, Clough ME, Yencho GC (2011) QTL mapping of internal heat necrosis in tetraploid potato. *Theor Appl Genet* 122:129–142

- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R (1998) Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet* 259:233–245
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:8014–8019
- Salaman RN, Lesley MA (1923) Genetic studies in potatoes; the inheritance of immunity to wart disease. *Genetics* 13:177–186
- SAS Institute Inc. (2004) SAS OnlineDoc® 9.1.2. SAS Institute Inc., Cary
- Scheidt M, Hunnius W (1981) Inheritance of resistance to pathotypes 2 and 6 of potato wart (*Synchytrium endobioticum*). *Z Pflanzenzüchtg* 86:158–173
- Song Y, Hepting L, Schweizer G, Hartl L, Wenzel G, Schwarzfischer A (2005) Mapping of extreme resistance to PVY ( $R_{Y_{sto}}$ ) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theor Appl Genet* 111:879–887
- Utz HF (2001) PLABSTAT: a computer programm for statistical analysis of plant breeding experiments. Version 2.P. Institute of Plant Breeding, Seed Science and Population Genetics. University of Hohenheim, Germany
- Van Os H, Andrzejewski S, Bakker E, Barrena I, Bryan GJ, Caromel B, Ghareeb B, Isidore E, De Jong W, van Koert P, Lefebvre V, Milbourne D, Ritter E, van der Voort JNAMR, Rousselle-Bourgeois F, van Vliet J, Waugh R, Visser RGF, Bakker J, van Eck HJ (2006) Construction of a 10,000-marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genome wide physical map. *Genetics* 173:1075–1087
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77–78