Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Entwicklung innovativer Nachweisverfahren für den Kartoffelkrebs als Grundlage für die nachhaltige Sicherung der Kartoffelproduktion in Deutschland

-Teilprojekt 1-

Zuwendungsempfänger:

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

(JKI)

Förderkennzeichen:

2819112519

Laufzeit:

09.09.2019 bis 08.11.2022, Verlängerung bis 31.07.2023

Monat der Erstellung:

Januar 2024

Gefördert durch

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Projektträger

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Schlussbericht

I. Ziele

1. Aufgabenstellung, Voraussetzungen

Kartoffelkrebs ist eine der bedeutendsten Quarantäneerkrankungen im Kartoffelanbau in Deutschland und wird durch den pilzlichen Erreger *Synchytrium endobioticum* verursacht. Das Projekt INNOKA hatte es zum Ziel, die Aufarbeitung von Bodenproben sowie die Diagnostik des Erregers zu optimieren und die Nutzung schwach anfälliger Kartoffelsorten in befallsgefährdeten Regionen zu prüfen.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt gliederte sich in die nachfolgenden Arbeitsziele:

1. Verfahren zur Entnahme und Aufarbeitung von Bodenproben zum Nachweis der Dauersori des Kartoffelkrebses
2. Verfahren zur Analyse der Identität und Vitalität der Dauersori des Kartoffelkrebses
3. Verfahren zur Identifikation der Krebspathotypen
4. Untersuchungen zur Eignung von Sorten mit verminderter Krebsanfälligkeit für befallsgefährdete Regionen

Im Rahmen des Verbundprojektes wurde zwischen allen Stellen äußert erfolgreich zusammengearbeitet. Diese hervorragende Zusammenarbeit erstreckte sich über die Gebiete der Pflanzenzüchtung, Grundlagenforschung und angewandte Forschung. Die Forschungseinrichtungen JKI (Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Kleinmachnow; Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Braunschweig) und LUH (Abteilung molekulare Pflanzenzüchtung) haben intensiv mit den beteiligten Züchtern der GFPi zusammengearbeitet. Zusätzlich wurde wie vereinbart mit den Unterauftragnehmern des JKI, der Landwirtschaftskammer Niedersachsen sowie der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, kooperiert. Die Absprachen, die diese erfolgreiche Zusammenarbeit ermöglicht haben, fanden im Rahmen von regelmäßigen Videokonferenzen sowie Projekttreffen statt.

3. Wissenschaftlicher und Technischer Stand

3.1 *Synchytrium endobioticum* – Der Erreger des Kartoffelkrebses

Synchytrium endobioticum, der Erreger des Kartoffelkrebses, ist ein obligat biotropher, bodenbürtiger Pilz. Eine Infektion führt zur Ausbildung undifferenzierter Wucherungen aus meristematischen Geweben der Knollen und des Sprosses, welche die typischen Krankheitssymptome darstellen. Eine Infektion von Wurzeln wurde in der Regel nicht

beobachtet. Über die biochemischen und molekularbiologischen Grundlagen des Infektionsprozesses ist wenig bekannt.

Der Pilz bildet keine Hyphen und kein Myzel, sondert nutzt zur Überdauerung Dauersporangien (Sori), die gegenüber äußeren Einflüssen (physikalische, chemische und biologische Prozesse) extrem widerstandsfähig sind. Sie können unter den hiesigen Klimabedingungen über 20 Jahre im Boden überdauern und weiterhin Infektionen hervorrufen; sie stellen damit eine Langzeitkontamination des Bodens dar (Stachewicz & Enzian, 1998a, 1998b). Ein Befall mit Kartoffelkrebs ist meldepflichtig und hat weitreichende Einschränkungen für die Flächen zur Folge. Da eine chemische Bekämpfung von Kartoffelkrebs nicht möglich ist, sind phytosanitäre Maßnahmen in Kombination mit dem Anbau resistenter Kartoffelsorten, die einzigen Möglichkeiten gegen den Erreger vorzugehen. Es besteht auf befallenen Flächen ein langjähriges Anbauverbot bis zur amtlichen Freigabe der Flächen. Zusätzlich werden Sicherheits- bzw. Pufferzonen um die Befallsflächen eingerichtet, in denen über den Zeitraum der Flächensperrung nur ein Anbau resistenter Kartoffelsorten erlaubt ist. Dazu ist es besonders wichtig den jeweiligen Pathotyp auf der Befallsfläche zu bestimmen. Kann der Pathotyp nicht bestimmt werden, steht die Anbaufläche in der Sicherheitszone nur für den Anbau voll resistenter Sorten zur Verfügung, welche allerdings nur in geringer Anzahl vorhanden sind. Die Pathotypenidentifikation ist bisher nur mit Hilfe eines Differentialsortiments und des zeitaufwändigen und anfälligen Biotests nach der Glynne-Lemmerzahl-Methode möglich. Alternativen zu diesem Verfahren sind bisher nicht vorhanden.

3.2 Nachweis von Kartoffelkrebs in Boden und in Pflanzengeweben

Die Durchführung eines Biotests oder die mikroskopische Untersuchung des Pflanzengewebes auf das Vorhandensein von Dauersporangien, sind die gängigen Möglichkeiten zum Nachweis von *Synchytrium endobioticum* (Pratt, 1976; Hampson & Thompson, 1977; Laidlaw, 1985). Beide Verfahren sind zeitaufwändig und benötigen ein hohes Maß an Erfahrungen im Umgang mit diesem Pathogen. Der Biotest ist ein sehr störanfälliges Testverfahren, welches stark auf äußere Einflüsse reagiert, sodass die Qualität der Ergebnisse von verschiedenen Faktoren wie den Umgebungsbedingungen und besonders der Knollenqualität während der Prüfjahre abhängt.

Zur mikroskopischen Bewertung von Dauersporangien werden diese nach einer Methode, wie sie im EPPO-Standard PM 7/28 (2) (European and Mediterranean Plant Protection Organisation, 2017) beschrieben ist, aus Böden extrahiert. Die Aufbereitung der Proben basiert auf einem Nasssiebverfahren, bei dem die zu untersuchenden Böden erst nach definierter Größe und anschließend nach spezifischer Dichte getrennt werden. Das Nasssiebverfahren ist sehr zeitintensiv, sodass nur ein sehr geringer Probendurchsatz pro Tag

möglich ist. Auch die Reinigung der Siebe stellt eine besondere Herausforderung dar und benötigt ebenfalls viel Zeit. Für die mikroskopische Bestimmung der Sporangien anhand morphologischer Merkmale (Zellwandbeschaffenheit, Form, Größe, Farbe) ist ein hohes Maß an Erfahrung erforderlich. Häufig sind Partikel gleicher Größe in den Proben enthalten, die zu Verwechslungen mit den Sporangien des Kartoffelkrebses führen können.

Seit einigen Jahren sind auch molekularbiologische Methoden für den Nachweis von Kartoffelkrebs verfügbar, deren Sensitivität allerdings noch nicht zufriedenstellend ist (van Gent-Pelzer et al., 2010; Bonants et al., 2015). Im Jahr 2016 wurden erste Mikrosatellitenmarker zur Charakterisierung von Pathotypen publiziert, die allerdings noch keine Unterscheidung aller Pathotypen ermöglichen (Gagnon et al., 2016).

Zum Nachweis von *S. endobioticum* in Pflanzengeweben werden Wucherungen bzw. Quetschpräparate von dünnen Gewebeschnitten auf das Vorhandensein von Dauersporangien mikroskopisch untersucht. Eine Differenzierung von Pathotypen ist auf diese Weise nicht möglich.

3.3 Beurteilung der Widerstandsfähigkeit von Kartoffelsorten gegenüber Kartoffelkrebs

In Deutschland werden Kartoffelsorten vom JKI auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen die derzeit in Deutschland relevanten Pathotypen 1, 2, 6 und 18 von *S. endobioticum* im Rahmen der Hauptprüfung für das Bundessortenamt getestet. Die Testung dieser Kartoffelsorten erfolgt über einen Biotest nach der Glynne-Lemmerzahl-Methode wie im EPPO PM3/88 (1) (European and Mediterranean Plant Protection Organisation, 2020) beschrieben. Diese Methode wird in der Mehrzahl der Prüflabore in der EU genutzt, allerdings unterscheiden sich die Testbedingungen und die Boniturmethoden z.T. erheblich, sodass in der Vergangenheit unterschiedliche Bewertungsergebnisse erzielt wurden (Flath et al., 2014). Die Testkapazität mit dieser Methode ist begrenzt. Der Biotest wird mit 30-45 Augenplatten pro Sorte durchgeführt und muss unter Umständen im nächsten Prüfjahr wiederholt werden. Der Platzbedarf und der Zeitaufwand sind sehr groß. Die Herstellung des nötigen Inokulums ist ebenfalls sehr zeitintensiv und stark abhängig von der Knollenqualität der Vermehrungssorten, was die Zahl der zu untersuchenden Sorten zusätzlich minimiert. Zudem kann die Prüfung nur während der Zeit von Oktober bis April zuverlässig durchgeführt werden, da sich in diesem Zeitraum die Kartoffeln in einem geeigneten physiologischen Zustand befinden. Eine DNA-Analytik hätte den entscheidenden Vorteil, dass kostengünstigere Hochdurchsatz-Techniken für die Nukleinsäure-Analytik zur Verfügung stehen, die Saison-unabhängig durchgeführt werden könnten.

Die molekulare Genetik der Resistenz gegen *S. endobioticum* steckt weiterhin in den Anfängen, obwohl die Krebsresistenz zu den ersten genetisch untersuchten Merkmalen bei Pflanzen gehörte (Salaman & Lesley, 1923). Eine große Schwierigkeit ist es, die Resistenz zuverlässig phänotypisch zu bestimmen. Es wurde z.B. der Resistenzlokus Sen1, der gegen *S. endobioticum* Pathotyp 1 wirksam ist, unter Einsatz molekularer Marker auf dem Kartoffelchromosom XI identifiziert (Hehl et al., 1999). Sen 1 liegt in einer Region des Chromosom XI, die als Hotspot von Resistenzgenen bekannt ist (Gebhardt & Valkonen, 2001). Dieser Bereich des Genoms enthält eine Vielzahl unbekannter Gene, die dem Resistenzgen-typischen NBS-LRR-Gentyp angehören. Gene dieses Typs stellen potentielle Kandidatengene für eine Resistenz gegen Kartoffelkrebs dar.

3.4 Eigene Vorarbeiten

In den Vorgängerprojekten DiRK (FNR FKZ: 22036311) und DIANA (BLE FKZ: 2814903215) konnten wichtige Vorarbeiten für das Projekt INNOKA geleistet werden. Im Projekt DiRK wurden Sequenzanalysen basierend auf verschiedenen Omics-Daten durchgeführt (Busse et al., 2017). Die hier generierten Daten des Pathotyp 18 wurden im Rahmen des Projekts DIANA genutzt und können weiterführend für die Markerentwicklung zur Pathotypenbestimmung im Projekt INNOKA verarbeitet werden. Die Erfahrungen im Bereich der verschiedenen Biotests können zur Etablierung und Weiterentwicklung dieser genutzt werden, besonders mit Blick auf die Vitalitätsbestimmung von Dauersporangien. Im Rahmen des Projekts DIANA wurde eine Strategie zur nachhaltigen Bekämpfung von Kartoffelkrebs entwickelt, welche in dem Projekt INNOKA praktisch beurteilt und überprüft werden sollte.

4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das JKI Kleinmachnow hat im Rahmen des Projekts INNOKA nicht mit anderen als denen im Antrag erwähnten Stellen zusammengearbeitet.

II. Ergebnisse

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Tabelle 1: Arbeitspakete und deren Bearbeitungsstand zu Projektende.

Arbeitspakete (AP)	beteiligte Projektpartner	Bearbeitungsstand
AP 1.1: Optimierung der Probennahme	JKI-AG; PSD NI, BY	Die Probennahme erfolgte nach einem erarbeiteten Schema. Es wurden Einzel- und Mischproben hergestellt. Die Beprobung und Untersuchung der Proben konnte Corona-bedingt nicht wie geplant erfolgen.
AP 1.2: Optimierung der Probenaufarbeitung	JKI-AK; JKI-AG; PSD NI, BY	Die Optimierung der Probenaufbereitung mittels Hendrickx-Zentrifuge wurde begonnen, allerdings haben technische Probleme mit dem Gerät sowie die Corona-Pandemie die Arbeiten erheblich verzögert.
AP 1.3: Gewinnung von Dauersori für weitere Analysen	JKI-AK; PSD NI, BY	Die Abläufe des Nasssiebverfahren konnten für die Gewinnung großer Mengen Dauersori im Rahmen des Projekts optimiert werden. Die Gewinnung von Sori aus Geweben konnte optimiert werden, um eine größere Ausbeute zu erhalten.
AP 2.1: Mikroskopische Analyse	JKI-AK; LUH; PSD NI, BY JKI-AG	Es konnten wichtige Einblicke in die Biologie des Erregers erlangt werden und grundlegende Prozesse zur Entstehung von Dauersori geklärt werden. Es wurde eine Referenzbildsammlung als Entscheidungshilfe in der Diagnose erstellt und veröffentlicht.
AP 2.2: Biotests (SASA-Methode, Tubentest B)	JKI-AK; LUH; PSD NI, BY	Die SASA-Methode konnte etabliert und zuverlässig zur Beurteilung der Vitalität von Dauersori genutzt werden. Die essentiellen Umweltfaktoren zur Induktion der Keimung wurden identifiziert.
AP 2.3: Optimierung der DNA- und RNA-Isolierung	JKI-AK; LUH; PSD NI, BY	Es wurden verschiedene Kits zur Extraktion von DNA aus Dauersori getestet und erfolgreich Parameter bestimmt, die eine Nutzung der DNA für PCR-Anwendungen ermöglichen.
AP 2.4: Molekulargenetische Analysen (PCR, qPCR, Mikrosatteliten, SNPs)	JKI-AK; LUH; PSD NI, BY	Das Material des Erregers wurde für molekulargenetische Untersuchungen nach Bedarf an die LUH versendet.
AP 3.1: Biotests (SASA-Methode, Tubentest B)	JKI-AK; LUH	Testung Dauersporangien-basierter Biotests für den Einsatz in der Pathotypenidentifikation erfolgte.
AP 4.1: Biotest der Sorten mit unterschiedlich stark kontaminierten Böden	JKI-AK; GFPi	Es wurden Topftests unter Einsatz schwach anfälliger Sorten mit Inokulum verschiedener Pathotypen durchgeführt und bewertet. Es wurde eine sehr Genotyp-spezifische Reaktion der Sorten festgestellt.

AP 4.1: Biotest teilresistenter Sorten mit unterschiedlichen Pathotypen	JKI-AK; GFPi	Es wurde die Virulenzveränderung von Pathotypen nach Kultur auf schwach anfälligen Sorten mit Hilfe verschiedener Biotests untersucht. Dies konnte aufgrund der geringen Symptomausprägung an den getesteten Sorten nur in wenigen Vermehrungsgenerationen getestet werden.

Die wichtigsten Ergebnisse sind im Folgenden getrennt nach Arbeitspaketen aufgeführt.

AP 1 Verfahren zur Entnahme und Aufarbeitung von Bodenproben zum Nachweis des Kartoffelkrebses

AP1.1. Optimierung der Probennahme

Corona-bedingt konnte keine intensive Beprobung von kontaminierten Feldern in dem geplanten Ausmaß erfolgen. Es wurden aber im Rahmen der Möglichkeiten Beprobungen durchgeführt. Die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) ermöglichte den Zugang zu fünf Feldern im Raum Augsburg im Mai 2021. Auf diesen Feldern wurden in drei verschiedenen Bodentiefen (0-5 cm, 5-20 cm, 20-30 cm) Proben genommen, um die vertikale Verteilung vitaler Dauersori zu bestimmen. Von drei dieser Felder wurden die Bodenproben (deren Einstichstellen jeweils 5m auseinanderlagen) durch das Nasssiebverfahren aufgereinigt und mikroskopisch identifiziert (Abbildung 1).

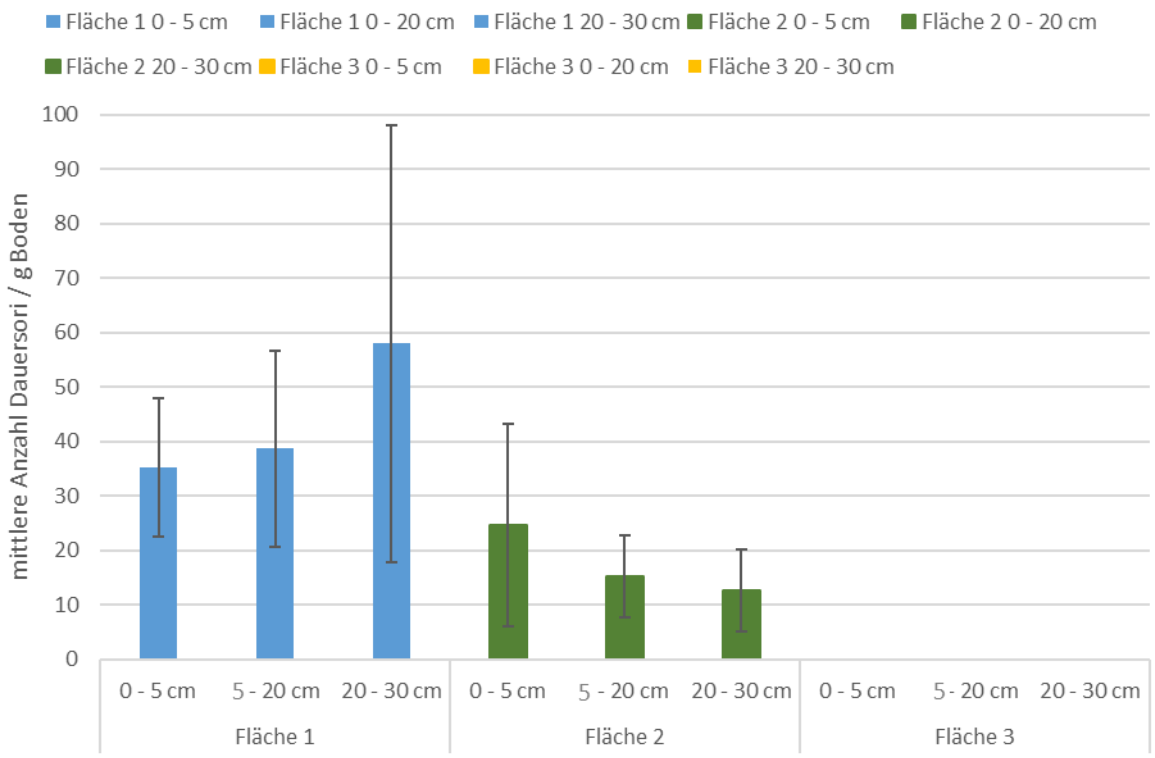

Abbildung 1: Mittlere Anzahl gefundener Dauersori bei Probung dreier Befallsflächen zur Beurteilung der vertikalen Verteilung von Dauersori. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Probenpunkten je Tiefe mit Standardabweichung.

Die drei ausgewählten Felder galten als stark kontaminiert. Es musste jedoch festgestellt werden, dass auf Fläche 3 ein Abschnitt beprobt wurde, in dem keine Dauersori nachgewiesen werden konnten (Abbildung 1). Dies verdeutlicht nochmal die Wichtigkeit der Erarbeitung eines Beprobungsschemas, das eine gute horizontale Abdeckung der Fläche gewährleistet. Auf den beiden anderen Flächen konnten in allen Bodentiefen Sori nachgewiesen werden. Die Anzahlen schwanken stark in den Bodentiefen, was die Standardabweichung verdeutlicht (Abbildung 1). Um einen geringen Arbeitsaufwand zu haben, ist eine Beprobung der oberen Erdschicht (analog zur Nematodentestung) ausreichend.

Ebenfalls wurde ein stark kontaminiertes Feld in Niedersachsen beprobt, um die horizontale Verteilung der Dauersori auf dem Feld zu untersuchen. Das Feld wurde in 5m x 5m große Kleinquadrate unterteilt. Es wurden Bodenproben an insgesamt 400 Einstichstellen in zwei verschiedenen Tiefen pro Einstich (oben: 0-5 cm, unten: 0-20 cm) entnommen. Es wurden aus jeweils 21 Proben einer Reihe eine Mischprobe hergestellt. Da für jede Einstichstelle Proben aus 2 Bodentiefen vorliegen, sind auf diese Weise 38 Mischproben aus 19 Reihen erstellt worden. Die Bearbeitung der Proben findet durch die Landwirtschaftskammer Niedersachsen als Unterauftragnehmer statt. Zum Zeitpunkt der Berichterstellung wurden noch keine Daten übermittelt. Diese können nachgereicht werden.

AP 1.2. Optimierung der Probenaufbereitung

Die Probenaufarbeitung sollte durch die im Projekt angeschaffte Hendrickx-Zentrifuge erfolgen, um eine teilautomatisierte Aufreinigung der Sori aus Böden zu ermöglichen. Die Optimierung wurde durch technische Probleme stark beeinträchtigt. Es kam unter anderem zu Ablagerungen des für die Aufreinigung benötigten Kaolins in der Zentrifuge, wodurch kein regulärer Proben-Output möglich war. Die Anschaffung von Kaolin in pharmazeutischer Qualität sollte dieses Problem lösen. Durch das veränderte Lösungsverhalten dieses Kaolins mussten die zuvor etablierten Protokolle erneut angepasst werden. Nach verlängerter Betriebszeit des Gerätes kam es erneut zu Ablagerungen des Kaolins im Zentrifugenbecher. Auch die Reinigungsdüsen scheinen nicht einwandfrei zu funktionieren. Es wird gemeinsam mit dem Hersteller nach Lösungen für die Probleme bei der Aufarbeitung der Proben gesucht. Durch die Zugabe eines Detergenz (Triton X100) zu den Proben wird zudem die Oberflächenspannung reduziert. Auf diese Weise konnte die Aufbereitung der Proben weiter optimiert werden. Generell ist eine Aufreinigung der Sori durch die Hendrickx-Zentrifuge möglich, wie die ersten Versuche zeigen. Allerdings muss die Ausbeute gesteigert werden. Je mehr Material eingewogen wird, desto geringer ist die Wiederfindungsrate der Sori. Es wird je Lauf nur die Hälfte des eingewogenen Materials bearbeitet (Einwaage 50 g: 128 Sori/ g Boden, Einwaage 100 g: 72 Sori/ g Boden, Einwaage 200 g: 52 Sori/ g Boden). Im Vergleich dazu wurden über die Siebung bei einer Einwaage von 100 g, 504 Sori/ g Boden aufgereinigt. (vollständige Aufreinigung des Probenvolumens). Die Wiederfindungsrate der Sori bei Aufreinigung über die Zentrifuge muss verbessert werden.

AP 1.3. Gewinnung von Dauersori für weitere Analysen

Das Verfahren zur Gewinnung von Dauersori aus Böden, aber auch besonders aus getrockneten Wucherungen konnte optimiert werden, sodass Sori in besserer Qualität und Menge zur Verfügung standen. Die Aufreinigung aus Böden wurde so optimiert, dass mehr Probenmenge zeitgleich in der Dichteauftrennung bearbeitet wird und somit ein höherer Probendurchsatz geschafft werden kann. Die Extraktion von Dauersori aus getrockneten Wucherungen ist besonders für molekulare oder mikroskopische Analysen interessant, da wenig kontaminierende Partikel (Bodenbestandteile) enthalten sind. Zur Extraktion werden die Wucherungen zwei Tage in Wasser eingelegt, zerhackt und anschließend über das Nasssiebverfahren aufgereinigt. Auf diese Weise konnte den Projektpartnern ausreichend Material in guter Qualität zur Verfügung gestellt werden.

AP 2 Verfahren zur Analyse der Identität und Vitalität der Dauersori des Kartoffelkrebses

AP 2.1 Mikroskopische Analyse

Im Rahmen des Projekts war es möglich ein Verfahren zur Visualisierung von endophytischen Pilzen im Konfokalen (Engl. Confocal) Laser Scanning Mikroskop (CLSM) (Becker et al., 2016;

Becker et al., 2018) erfolgreich auf *Synchytrium endobioticum* zu übertragen. Für die Diagnose eines endophytischen Pilzes relevante Strukturen/Makromoleküle (von Pilz und Pflanze) wurden wie folgt gefärbt: Chitin (pilzlich): Alexa Fluor (AF)-Farbstoff gekoppelt an Wheat Germ Agglutinin (WGA) für die spezifische Bindung an N-Acetylglucosamin, einer Chitin-Seitenkette (blaue Pseudofarbe), Glucane (pilzlich) und Kallose (pflanzlich): Anilinblau; (orange Pseudofarbe), DNA in Zellkernen (pilzlich und pflanzlich): Propidiumiodid; (grüne Pseudofarbe), Cutin/Cuticula (pflanzlich): Autofluoreszenz, (gelbe Pseudofarbe).

Die kombinierte Anwendung von Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) ist eine bewährte Methode zum Vitalitätsnachweis pro- und eukaryotischer Zellen. Die PI/FDA-Färbung wurde schon zuvor als Vitalitätsnachweis von *S. endobioticum*-Dauersori verwendet, aber erstmals wurde die Färbung mit einem hochauflösenden CLSM kombiniert genutzt.

Theoretisch lässt sich aus dem Verhältnis von farblosen zu rot und grün leuchtenden Zellinhalten, der Anteil von (i) schon lange toten, (2) erst kürzlich abgestorbenen und (3) noch vitalen Dauersori einer Kartoffelkrebs-Bodenprobe bestimmen. In der Praxis sieht es leider anders aus: einige Teilinhalte können rot leuchten, andere grün (Abbildung 2).

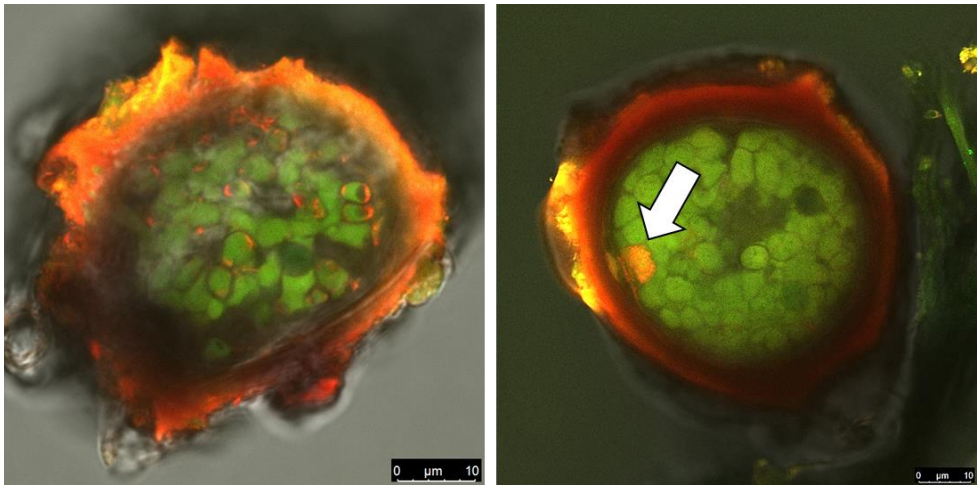

Abbildung 2: Kartoffelkrebs-Dauersori visualisiert im Konfokalen Laser Scanning-Mikroskop nach vorheriger Färbung mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat. Grünfärbung deutet auf vitale Zoosporen und Rotfärbung auf abgestorbene Zoosporen hin; Links: Beginnendes Absterben mehrerer Zoosporen, rechts: eine einzelne abgestorbene Zoospore (Pfeil) neben vielen vitalen Zoosporen.

Ein Eindringen von FDA in das Innere eines Kartoffelkrebs-Dauersorus ist zwar ein notwendiges, aber kein hinreichendes Kriterium für die Beurteilung der Vitalität. Ein lebender Parasit im Inneren eines Dauersorus wird im PI/FDA-Test grün leuchten, obwohl er keinen *S. endobioticum* mehr enthält. Erst kürzlich abgestorbene Dauersori können beide Farben aufweisen, was zu Problemen in der Beurteilung führt.

Es wurden Dauersori in Kartoffelkrebswucherungen untersucht, da der Anteil anderer Pilze in lebendem Pflanzengewebe vermutlich deutlich geringer ist als in Bodenproben - dennoch sind auch hier andere Pilze vorhanden. Wie konfokale Laser-Scanning-mikroskopische (CLSM)

Aufnahmen zeigen (Abbildung 3), handelt es sich hierbei nicht um Ausnahmeerscheinungen, sondern um regelmäßige Ereignisse. Während ein Sommersorus spätestens nach dem Entlassen der Zoosporen von anderen, oft filamentösen Pilzen besiedelt wird, trifft das auf einen Dauersorus nur dann zu, wenn der filamentöse Pilz bereits in einem frühen Stadium der Dauersorus-Entwicklung bis zu seiner äußeren Hülle vorgedrungen ist (Abbildung 3) oder wenn er über die nötigen Mittel verfügt, um auch dicke, ggf. chitinisierte, Dauersorus-Hüllen zu durchdringen.

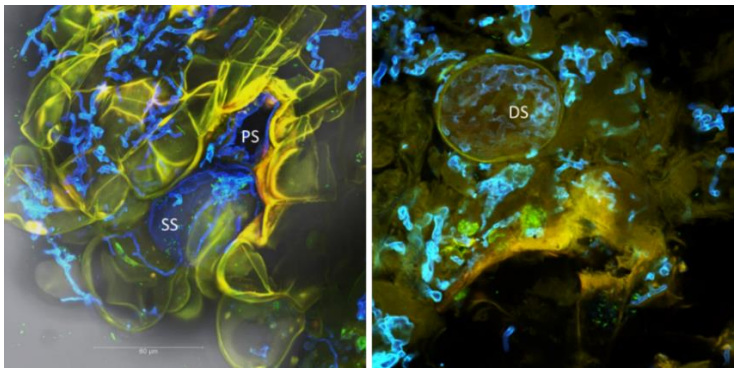

Abbildung 3: Konfokale Laser-Scanning-mikroskopische Aufnahme von Kartoffelkrebswucherungen (*S. endobioticum* Pathotyp 18 in Kartoffelsorte Tomensa). Links: Sommersorus, rechts: Dauersorus. Blaue Pseudofarbe zeigt chitinisierte Strukturen. Sommersorus (SS) und dazugehörender Prosorus (PS) sind mit Chitin ausgekleidet, alle anderen blau gefärbten Strukturen sind Hyphen eines filamentösen Pilzes; der Dauersorus (DS) besitzt noch kein eigenes Chitin, enthält aber chitinisierte Hyphen des filamentösen Pilzes.

Von welchen filamentösen Pilzen die Dauersori besiedelt werden, ist zurzeit noch nicht klar. Im CLSM lassen sich mehrere optische Schnitte zu einem Gesamtbild von größerer optischer Tiefe vereinen, so dass die Form der vermeintlich granulären Strukturen innerhalb eines Sorus dargestellt werden kann, sodass der Befall eines Sorus mit einem filamentösen Pilz im CLSM gut zu erkennen ist. Viele Standard-Lichtmikroskope verfügen aber nicht über die Funktion mehrere optische Ebenen zu vereinen, so dass der Inhalt eines Sorus auf einem Foto granulär erscheint, obwohl es sich möglicherweise um einen filamentösen Pilz handelt. Darüber hinaus kann solch ein filamentöser Pilz den ganzen Inhalt des Sorus ausfüllen. Dies hat zur Folge, dass entsprechende Aufnahmen fehlinterpretiert werden könnten. Die strukturelle Variabilität des Sorusinhalts trifft auf Sommer- und Dauersori zu. Je nach Entwicklungsstadium ist der Inhalt eines Sorus fein granulär, grob granulär oder mit wenigen kleinen oder großen Vesikeln bestückt. Es ist davon auszugehen, dass ein reifer Dauersorus kurz vor der Keimung einen besonders fein granulären Inhalt hat, da dann die einzelnen Zoosporen als kleine Kügelchen erkennbar werden.

Im Rahmen des Projektes entstand eine Bachelorarbeit mit dem Titel „Microscopic examination of the structure, function and developmental stages of the fungus *Synchytrium endobioticum* and an approach to trigger the induced systemic resistance (ISR) of plants by chitin priming" (Leuphana Universität Lüneburg).

Die Referenzbildsammlung, welche als Entscheidungshilfe bei der Diagnose dienen soll, wurde fertiggestellt und den Pflanzenschutzdiensten verfügbar gemacht. In der Einleitung wurden die Kriterien, die für eine positive Bewertung als *Synchytrium endobioticum* notwendig sind, definiert und ausführlich anhand von Abbildungen beschrieben. Im Hauptteil der Referenzbildsammlung sind Beispielbilder verschiedener Sporangien gezeigt, bei denen die typischen Merkmale kategorisiert abgefragt werden und auf Besonderheiten hingewiesen werden. Die Bilder sind in folgende Kriterien untergliedert: typische Dauersporangien (lebensfähig), Dauersporangien im Verbund, teilentleerte Dauersporangien (fragliche Lebensfähigkeit), vollständig entleerte Dauersporangien (nicht lebensfähig), untypische Sporangien, keimende Sporangien und Sporangien anderer Pilze. Das Dokument ist im Login-Bereich der Homepage des Nationalen Referenzlabors des JKI zur Verfügung gestellt. In einem begleitenden Artikel wurde die Referenzbildsammlung vorgestellt (Chilla et al., 2023). Zusätzlich wurde ein zusammenfassendes Poster veröffentlicht, welches online abrufbar ist (https://doi.org/10.5073/20221110-131659).

AP2.2 Biotests (SASA-Methode, Tubentest B)

Es konnte gezeigt werden, dass die SASA-Methode zum Nachweis der Vitalität von Dauersori genutzt werden kann. Es konnten Umgebungsbedingungen etabliert werden, die eine zuverlässige Beobachtung der Keimung durch Austritt des Keimungsvesikels, als ersten Schritt der Vitalitätsbeurteilung, ermöglichen. Die anschließende Inokulation der vorgekeimten Dauersori an Knollen ermöglicht eine zuverlässige Beurteilung der Vitalität von Dauersori. Die in der Literatur beschriebene Notwendigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit konnte bestätigt werden. Außerdem zeigte sich, dass eine Temperatur von 16 °C zur Keimungsinduktion im Vergleich zu 20 °C des Standardprotokolls nachfolgend eine verbesserte Infektion der Knollen zeigte. Es konnte ebenfalls eine höhere Infektionsrate erzielt werden, wenn die Dauersorisuspension bis zum Verdunsten bzw. maximal 10 Tage auf der Knolle verblieb und nicht nach 4 Tage entfernt wurde, wie im EPPO PM 7/28 (2) (European and Mediterranean Plant Protection Organisation, 2017) beschrieben. Die SASA-Methode konnte für die Diagnose der Lebensfähigkeit von Dauersori in den Laboratorien des JKI im Rahmen des Projekts maßgeblich verbessert werden.

Die Tubenmethode B konnte weiterhin nicht zufriedenstellend im Labor etabliert werden. Es wurden verschiedene Sandtypen wie Quarzsand und Seesand getestet, da die Vermutung bestand, dass die Körnung Einfluss auf die Sauerstoffverfügbarkeit hat, welche für die Keimung der Dauersori essentiell ist. Es konnten nur minimale Infektionsraten erzielt werden,

wodurch diese Methode zur Bestimmung der Vitalität von Sori, besonders bei geringem Infektionsdruck, unter den gegebenen Bedingungen nicht anwendbar ist.

Es konnten gute Ergebnisse erzielt werden, wenn getrocknete Dauersori mit gedämpfter Erde gemischt (4 mg Sporangien/ 200 g Erde) und in einen Topftest eingesetzt wurden. Hier konnten nach 3 Monaten Kultur ebenfalls Wucherungen/ Symptome beobachtet werden, sodass auch diese Variante zum Vitalitätsnachweis von Dauersori genutzt werden kann. Der Topftest ist eine sehr robuste Methode, der, wenn dringend nötig, auch über die Sommermonate genutzt werden kann. Optimaler Weise ist der Topftest zwischen Oktober und April durchzuführen. Der Topftest liefert im Vergleich zu der SASA-Methode in den Monaten etwas bessere Ergebnisse.

Um umfänglich die Möglichkeit der Beurteilung der Vitalität von Dauersori klären zu können, wurden auch die Möglichkeiten der Bewertung der Vitalität von befallenen Bodenproben untersucht. Dazu wurden die Boden-basierten Biotests nach Spieckermann und der Topftest untersucht. Beide sind im EPPO Standard PM 7/28 (2) (European and Mediterranean Plant Protection Organisation, 2017) beschrieben. Da aus der Literatur die Wichtigkeit der Sauerstoffzufuhr und Feuchtigkeit für die Keimung der Sori und damit dem Infektionserfolg bekannt ist, wurden Versuche zur Probenvorbehandlung – nachfolgend Reaktivierung genannt – gemacht. Es sollte geprüft werden, ob die Reaktivierung von Böden zu einem verbesserten Vitalitätsnachweis führen kann. Dafür wurden drei verschiedene Komposte von Pathotyp 2(G1) mit 54 vitalen Sori/ g Boden, Pathotyp 6(O1) mit 639 vitalen Sori/ g Boden und Pathotyp 18(T1) mit 56 vitalen Sori/ g Boden genutzt. Diese Komposte wurden in Vortests als wenig (P18) bis gar nicht infektiös (P2 und P6) eingestuft. Es wurden drei verschiedene Vorbehandlungen untersucht, die eine bestimme Abfolge von befeuchten und belüften der Komposte vor dem Einsatz im Biotest beinhalten. Am erfolgreichsten war die Reaktivierung über einen Zeitraum von 3 Monaten im Vergleich zu einer zweimonatigen und viermonatigen Reaktivierung. Die Proben wurden im ersten Monat 1 Mal pro Woche befeuchtet und gerührt, im zweiten und dritten Monat 3 Mal pro Woche. Anschließend wurde ein Biotest nach Spieckermann durchgeführt und die Symptomausprägung wurde nach ca. 7 Wochen ausgewertet. Exemplarisch sind Augenplatten gezeigt, die mit unbehandeltem Kompost P 2 und reaktiviertem Kompost P2 infiziert wurden (Abbildung 4).

Abbildung 4: Exemplarischer Vergleich der unbehandelten Kontrolle P 2 mit reaktiviertem Kompost P 2 nach Inkubation mit dem Spieckermann-Test. Kompost der unbehandelten Kontrolle P 2 und nach der dreimonatigen Reaktivierung wurden zur Infektion der voll anfälligen Kartoffelsorten Tomensa und Tessa genutzt. Bei Infektion mit dem reaktivierten Kompost sind deutliche Wucherungen zu erkennen, wohingegen bei der Kontrolle keine Symptome gezeigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktivierung von Erden/Komposten zur Steigerung der Infektiosität führen kann. Dies wurde für die Komposte von Pathotyp 2 (Abbildung 4) und Pathotyp 18 gezeigt werden. Für Pathotyp 6 war keine Reaktivierung möglich. Es scheint somit so, dass sich Dauersori in einer Dormanz befinden können, die in einigen Fällen durch eine zusätzliche Abfolge von befeuchten und belüften gebrochen werden kann. Es wurde geprüft, ob eine Keimungsinduktion in Wasser (wie bei der SASA-Methode) diese Dormanz brechen kann. Dies war allerdings nicht der Fall. Es wurden Dauersori aus den unbehandelten Komposten isoliert und mikroskopisch hinsichtlich der Bestimmung der Lebensfähigkeit untersucht. In allen Proben wurden Sori visuell dokumentiert, die nach den gängigen Methoden als lebensfähig eingestuft werden müssen, aber sie zeigten keine Infektion im Biotest, was die Grenzen der mikroskopischen Bestimmung der Vitalität von Dauersori aufzeigt und die Notwendigkeit der Forschung auf diesem Gebiet unterstreicht.

AP2.3 Optimierung der DNA- und RNA- Isolierung

Die Extraktion von DNA aus Dauersori des Kartoffelkrebses ist ein entscheidender Punkt beim molekularen Nachweis des Erregers. Um diesen Prozess zu optimieren, konnte im Rahmen des Projektes ein Bead-basierter Homogenisator (Precellys Evolution, Firma: Bertin Technologies) angeschafft werden, der genutzt wurde um verschiedene Extraktionskits auf ihre Effizienz zur DNA-Extraktion zu untersuchen. Es wurden Kits verschiedener Hersteller geprüft, die entweder eine Anwendungsempfehlung für den Aufschluss aus Pflanzenmaterial oder für den Aufschluss aus Bodenproben aufwiesen. Es wurden sechs DNA-Aufschlusskits bezüglich der Menge und Qualität der extrahierten DNA verglichen. Hierfür wurden in allen Versuchen die gleiche Menge an Dauersori für den Aufschluss eingesetzt.

Tabelle 2: Erprobte Kits für Zellaufschluss und DNA-Extraktion von Dauersori. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels Fluorometer (Quantus, Firma: Promega).

Verwendetes Kit	Bezeichnung	DNA-Konzentration (ng/µl)
InnuSpeed Bacteria/Fungi Kit (Analytic Jena)	A1	14
	A2	17
NucleoSpin Soil Kit (Macherey Nagel)	B1	15
	B2	13
EZNA Soil DNA Isolation Kit (Omega)	C1	12
	C2	10
Zymo BIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Biomics)	D1	11
	D2	9.3
DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	E1	13
	E2	15
InnuSpeed DNA Soil Kit (Analytic Jena)	F1	0.0162
	F2	0.011

Obwohl fünf der getesteten Kits laut DNA-Konzentrationsbestimmung vergleichbare Ergebnisse lieferten (Tabelle 2), zeigte eine anschließende Überprüfung mittels PCR für das Kit der Firma Zymo Biomics die besten Resultate. Mit diesem Kit wurden die Aufschlussparameter weiter optimiert und abschließend ein Aufschluss für 12 x 20 sec mit je 30 sec Pause bei 5000 x *g* festgelegt.

AP2.4 Molekulargenetische Analysen (PCR, q-PCR, Mikrosatelliten, SNPs)

Im Rahmen des Projektes wurden die im EPPO-Standard beschriebenen PCR-Protokolle nach van den Boogert et al. (2005), van Gent-Pelzer et al. (2010) und Smith et al. (2014) mit aus verschiedenen Pathotypen extrahierter DNA sowohl aus Wucherungen als auch aus Dauersori überprüft. Hierbei kamen der im Projekt angeschaffte PCR-Cycler (XT96, Firma: VWR) und Real-time Cycler (qTower3G, Firma: Analytic Jena GmbH) zum Einsatz. Für die PCR nach von den Boogert *et al.* (2005) zeigte sich hierbei, dass mit dem im EPPO-Standard angegebenen Temperaturparameter nicht jeder Pathotyp nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 5, rote Pfeile). Mit Hilfe eines Temperaturgradienten konnte die optimale Annealing Temperatur, bei der für DNA aller Pathotypen ein Signal festgestellt werden konnte, festgelegt werden (siehe Abbildung 5, grüne Pfeile).

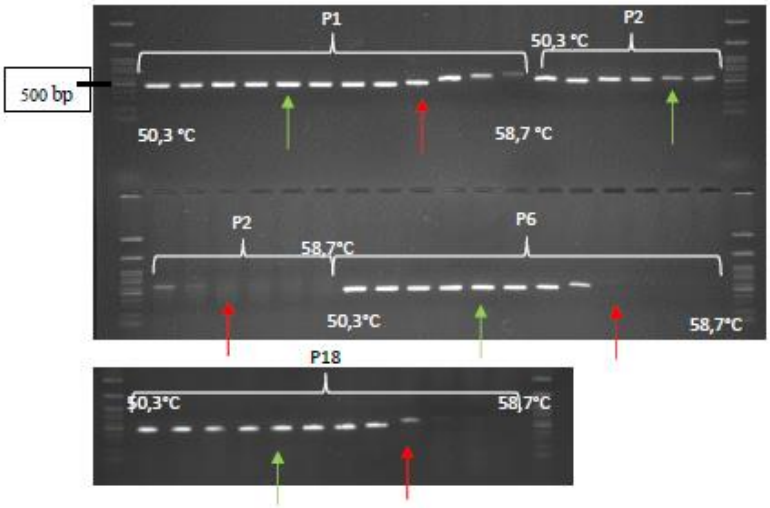

Abbildung 5: PCR-Temperaturgradient der PCR nach Van den Boogert *et al.* (2005) mit DNAs der verschiedenen Pathotypen extrahiert aus Dauersori. Temperaturspanne von 50,3°C bis 58,7°C. roter Pfeil: Annealing-Temperatur des EPPO-Protokolls (57°C); grüner Pfeil: neu festgelegte Annealing-Temperatur (53°C).

Für die Real-time PCR-Verfahren nach Van Gent-Pelzer *et al.* (2010) und Smith *et al.* (2014) ergab die Überprüfung, dass eine Anpassung der Parameter nicht notwendig ist.

Für alle geprüften PCR-Verfahren wurden anschließend Versuche zur Bestimmung der Nachweisgrenze durchgeführt. Die DNA extrahiert aus 100 mg frischen Krebswucherungen der Pathotypen 1, 2, 6 und 18 wurde hierfür sowohl unverdünnt als auch in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 eingesetzt. Der Nachweis aller Verdünnungsstufen war in allen getesteten PCR-Verfahren problemlos möglich. Für die Real-time PCR-Verfahren zeigte sich, wie im EPPO-Standard PM 7/28 (2) beschrieben, dass auch DNA extrahiert aus nicht infiziertem Kartoffelmaterial zu einem positiven Signal führt. Aus diesem Grund wurde für diese PCR-Verfahren ein Cut-off Wert bei einem Ct von 30 festgelegt. Nur Proben mit einem Ct-Wert < 30 werden als positiv bewertet.

Für die DNA-Extraktion aus Dauersori ohne umgebende Bodenmatrix wurden Verdünnungsreihen mit 5000, 500, 50 und 5 Dauersori für alle Pathotypen hergestellt. Als Kontrolle diente DNA aufgeschlossen aus nicht-kontaminierter Erde. Für die PCR nach Van den Boogert *et al.* (2005) wurde die Nachweisgrenze von 5000 Dauersori festgestellt. Bei den Real-time PCRs nach Van Gent-Pelzer *et al*. (2010) und Smith *et al.* (2014) zeigte sich, dass auch für DNA extrahiert aus nicht-kontaminiertem Boden, frei von Sporen des Erregers, teilweise (falsch-) positive Signale festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde für die PCR-Verfahren ein Cut-off bei einem Ct-Wert von 35 festgelegt. Mit diesem Cut-off-Wert ergibt sich für beide Verfahren, dass 500 Dauersori sicher nachgewiesen werden können. Abhängig von der Qualität der Dauersori in der Probe konnte für einzelne Proben jedoch auch bei 50 Dauersori ein positives Signal festgestellt werden. Bei diesen Sori handelte es sich um visuell intakte Sori, die vollständig mit Plasma gefüllt waren. Diese Nachweisgrenzen entsprechen nicht denen, die im EPPO-Standard PM 7/28 (2) für die Real-time PCRs angegeben sind. Hier

ist eine Grenze von 20 Sporen angegeben. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die dort angegebenen Nachweisgrenzen mit DNA aus Dauersori extrahiert aus frischen Wucherungen festgelegt wurden. Um den Einfluss der Sporenherkunft auf das PCR-Ergebnis zu prüfen, wurden Real-time PCR-Versuche durchgeführt, bei denen vergleichend DNA von Dauersori aus Bodenproben und frischen Wucherungen eingesetzt wurden.

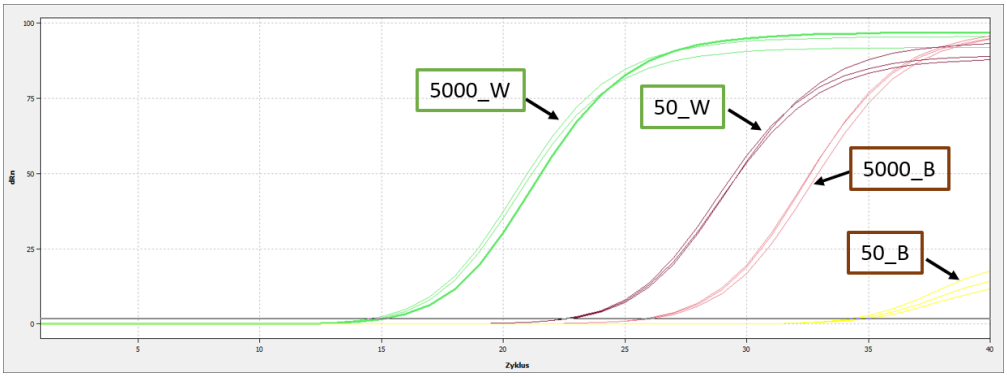

Abbildung 6: Real-time PCR nach Smith *et al.* (2014) vergleichend mit DNA extrahiert aus Dauersori aus frischen Wucherungen und Boden. Gezeigt ist beispielhaft das Ergebnis der PCR mit DNA extrahiert aus jeweils 5000 und 50 Dauersori des Pathotypen 18 aus frischen Wucherungen (5000_W und 50_W) und Boden (5000_B und 50_B).

Abbildung 6 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Real-time PCR nach Smith *et al.* (2014) durchgeführt mit DNA extrahiert aus jeweils 5000 und 50 Dauersori aus frischen Wucherungen bzw. aus einer Bodenprobe. Es ist deutlich zu sehen, dass für die DNA extrahiert aus Dauersori aus frischen Wucherungen im Vergleich zu solchen, die aus Dauersori einer Bodenprobe extrahiert wurden, deutlich früher Signale zu beobachten sind. Der Unterschied beträgt bei den verschiedenen Proben ca. 10 Ct-Werte, was einem Faktor von 1000 hinsichtlich der Menge verfügbarer Templates entspricht. Dies zeigt, dass die Herkunft der Dauersori einen Einfluss auf den Erfolg der DNA-Extraktion hat und damit auch deutlich die Nachweisgrenze beeinflusst.

Die Herstellung von Zoosporensuspensionen durch Inkubation von Wucherungen in Wasser (1,5 Stunden) bei Raumtemperatur liefert Material für DNA-Extraktionen, welches vermutlich wenig kontaminierende Partikel enthält. Erste Versuche zeigten, dass die Zoosporensuspension bei 2000 *x g* und 4000 *x g* abzentrifugiert und das Pellet für DNA-Extraktionen genutzt werden kann, aber auch weiterhin im Biotest infektiös ist. Auf diese Weise kann man hochwertige DNA in großen Mengen für Sequenzierungen oder ähnliche Ansätze erhalten, ohne Pflanzenmaterial von Wucherungen mit in der Probe zu haben. Untersuchungen zur Lebensfähigkeitsbewertung auf Grundlage von RNA des Erregers erfolgen gegenwärtig im Projekt SYNergie (FKZ: 28A8705A19).

AP3: Verfahren zur Identifikation der Krebspathotypen

AP3.1 Biotests

Es sollte untersucht werden, ob die SASA-Methode zur Pathotypenidentifikation genutzt werden kann. Hierfür wurden Dauersporangien der Pathotypen 1 und 2 verwendet. Nach der Keimungsperiode wurden die Sporangiensuspensionen zur Infektion der Kartoffelknollen von Differentialsorten verwendet, mit denen sich diese Pathotypen identifizieren lassen. Als vollanfällige Kontrolle wurden Knollen der Sorte Tomensa mitgeführt.
Die Sorte Combi dient als Differentialsorte für Pathotyp 1, da sie nur gegen diesen resistent ist. Für den Nachweis von Pathotyp 2 wurden Knollen der Sorte Saphir verwendet, die nur gegen diesen Pathotypen eine Anfälligkeit aufweist, während sie gegen die anderen Pathotypen resistent ist. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die SASA-Methode für die Identifikation der Pathotypen eignet. Man muss allerdings beachten, dass die Symptomausprägungen bei dieser Methode nicht so deutlich sind wie bei der Glynne-Lemmerzahl-Methode, sodass eine korrekte Bonitur viel Erfahrung benötigt. Versuche haben aber gezeigt, dass eine Abdeckung der Knollen, welche mit vorgekeimten Sori aus der SASA-Methode inokuliert wurden, nach einer ersten Bonitur nach drei Wochen für weitere drei Wochen zu einer Verstärkung der Symptome führt, sodass dies eine Möglichkeit wäre die Bonitur zu erleichtern.
Eine Literaturrecherche hat ergeben, dass bereits im Jahr 1962 eine Infektion von Kartoffeln anhand von Zoosporensuspensionen beschrieben wurde (Stenz, 1962). Dieses Protokoll war allerdings im Material- und Methodenteil lückenhaft, sodass einige Parameter neu bestimmt werden mussten. Die Hauptarbeitsschritte der Methode sind der Abbildung 7 zu entnehmen.

Abbildung 7: Übersicht der Schritte der Zoosporeninfektion von Kartoffelknollen. Frische Wucherungen werden in Wasser inkubiert, um Zoosporen aus Sommersori zu entlassen. Diese Zoosporensuspension wird auf Augenplatten inokuliert und bei 16 °C kultiviert. Optional kann eine Abdeckung der Augenplatten mit Erde erfolgen, um eine stärkere Symptomausprägung zu erhalten.

Bei dieser Methode werden frische Wucherungen für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in Wasser eingelegt, sodass die Zoosporen aus den Sommersori entlassen werden. Mit Hilfe dieser Zoosporensuspension können Augenplatten inokuliert werden. Analog zur SASA-Methode werden die Augenplatten mit der Suspension für 4 Tage bei 10 °C inkubiert.

Anschließend kann nach einer dreiwöchigen Kultur bei 16 °C eine erste Bonitur auf Symptome stattfinden. Danach besteht die Möglichkeit die Augenplatten abzudecken, damit eine Ausbildung von Wucherungen erfolgen kann. Vorteil dieser Methode ist es, dass viele Augenplatten mit einem sehr homogenen Inokulum infiziert werden können. Besonders die Produktion von frischen Wucherungen aus geringen Mengen Startmaterial ist sehr nützlich an dieser Methode. Dies kann besonders für die Pathotypenidentifikation über die Glynne-Lemmerzahl-Methode genutzt werden, wenn nur wenig Wucherungen von Befallsflächen vorhanden sind. Erste Versuche dazu unter Nutzung des Differentialsortiments waren sehr vielversprechend.

Ebenfalls können aus getrockneten Wucherungen Infektionen hervorgerufen werden. Durch das Einlegen der getrockneten Wucherungen in Wasser für zwei Tage (4°C) und anschließender Zerkleinerung kann ein Inokulum hergestellt werden, das mit gedämpfter Erde vor dem Einsatz im Topftest gemischt wird. Auf diese Weise können Wucherungen von Befallsflächen, die nicht mehr für eine Inokulation durch die Glynne-Lemmerzahl-Methode genutzt werden können, für die Pathotypenbestimmung erhalten bleiben. Durch die Verfügbarkeit dieser beiden Methoden konnte die Effizienz der Pathotypenidentifikation enorm gesteigert werden.

AP4: Untersuchungen zur Eignung von Sorten mit verminderter Krebsanfälligkeit für befallsgefährdete Regionen

AP 4.1 Biotests der Sorten mit unterschiedlich stark kontaminierten Böden

Im Jahr 2021 war es möglich auf einer Befallsfläche im Emsland ausgewählte schwach anfällige Sorten direkt im Feld anzubauen und damit die Reaktionen dieser Sorten unter realen Feldbedingungen zu beurteilen. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Fläche konnten sechs Sorten, die gegen die Pathotypen 2, 6 und 18 schwach anfällig sind, angebaut werden. Jede Sorte wurde in fünf Wiederholungen mit jeweils fünf Knollen an verschiedenen Stellen der Befallsfläche angebaut. Für die Sorten Gunda, Caprice und Bavatop konnten an einigen Pflanzen Wucherungen einer Größe bis 10 mm nachgewiesen werden. Die Sorten Annegret, Bonus und Rodriga zeigten keine Wucherungen. Da Kartoffelkrebs in Nestern auf dem Feld vorkommen kann, kann der nicht homogene Fall der Knollen durch diese ungleichmäßige Verteilung der Dauersori auf dem Feld erklärt werden.

Parallel zu den Versuchen auf der Befallsfläche konnte Erde der Fläche für Topftests (Abbildung 8) in der Klimakammer genutzt werden.

Abbildung 8: Übersicht der Arbeitsschritte des Topftests zur Inokulation von Kartoffelknollen mit *Synchytrium endobioticum*. Der Topf wird mit drei Schichten Erde/ Sand befüllt, um möglichst wenig Inokulum pro Topf einzusetzen. Die Knollen werden vollständig von Inokulum bedeckt und bei 18 °C (16 h Licht) kultiviert. Die Pflanzen werden regelmäßig zurückgeschnitten. Die Bonitur kann nach etwa zwölf Wochen Kultur erfolgen.

Die Erde wurde nach Erhalt durchmischt, um eine möglichst homogene Verteilung der Dauersori zu erzielen. Die Dauersorikonzentration wurde mittels Nasssiebverfahren mit 10 Dauersori/g Erde bestimmt und in dieser Konzentration für den Topftest eingesetzt. Neben den auf dem Feld getesteten Sorten konnten im Topftest weitere Sorten getestet werden: Gunda, Annegret, Caprice, Bavatop, Bonus, Rodriga, Alanis, Ikarus, Rambo und Simonetta. Es wurden Sorten ausgewählt, die eine schwache Anfälligkeit gegenüber Pathotyp 18 aufweisen, da durch das JKI dieser Pathotyp in der befallenen Erde identifiziert wurde. Je Sorte wurden drei Knollen für den Topftest eingesetzt. Die Auswertung fand nach 13 Wochen statt. Es wurden an zwei von drei Knollen der Sorte Simonetta und an einer von drei Knollen der Sorte Rodriga Wucherungen bonitiert. Ein Vergleich zeigt, dass es sich hier nicht um die gleichen Sorten handelt, die auch auf dem Feld Wucherungen gezeigt haben. Der Unterschiedliche Befall zwischen Feld und Klimazelle lässt sich vermutlich durch die unterschiedlichen Bedingungen der Versuchsorte erklären. Während die Licht-, Temperatur- und Bewässerungsmengen in der Klimazelle kontrolliert werden, ist dies auf dem Feld nicht der Fall. Ebenfalls kann der Befall und Infektionsdruck auf der Fläche im Gegensatz zu den Klimakammerversuchen variieren, da Kartoffelkrebs in Nestern auftritt.

Es wurden weitere Versuche mit Komposten verschiedener Pathotypen im Gewächshaus/ Klimakammer durchgeführt. Diese Versuche wurden mit Komposten aus der Sammlung des JKI von Pathotyp 2 und 6 durchgeführt. Auf Grund der verfügbaren Gewächshausfläche wurden insgesamt 28 Sorten mit jeweils zwei Knollen getestet, die eine verminderte Anfälligkeit gegen Pathotyp 2 aufweisen. Dies waren die Sorten: Annegret, Bavatop, Eurostarch, Finka, Omega, Pirol, Posaidon, Satina und Simonetta. Für das Inokulum wurden die Komposte auf eine Sporangienkonzentration von 10 Sporangien je g Boden eingestellt. Als Kontrollen wurden zwei voll anfällige Sorten (Tomensa und Tessa) und zwei resistente Sorten (Triton und Kuba) mitgeführt. Bei den schwach anfälligen Sorten konnten bei 9 Sorten eindeutige Symptome nach einer Infektion mit Pathotyp 2 festgestellt werden, die in ihrer Ausprägung bei den verschiedenen Sorten jedoch sehr unterschiedliche ausfielen. Die Sorten Annegret, Omega, Pirol und Posaidon zeigten Wucherungen. Die Sorten Bavatop, Eurostarch,

Finka, Satina und Simonetta zeigten Dauersori im Gewebe und Verformungen des Gewebes (Abbildung 9).

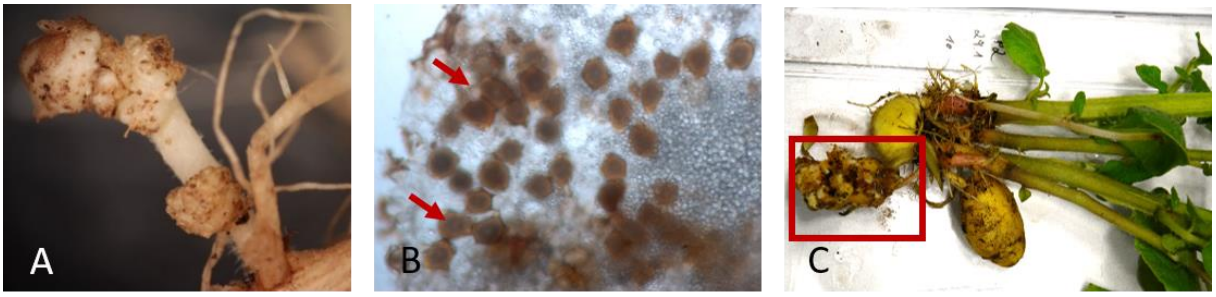

Abbildung 9: Symptomausprägung an den schwach anfälligen Sorten Bavatop und Simonetta. (A) verformtes Gewebe mit Dauersori an Bavatop, (B) Gewebeschnitt von Bavatop mit Dauersori (exemplarisch durch rote Pfeile gekennzeichnet), (C) Wucherungen an Simonetta.

Die Größe der Wucherungen variierte je nach Sorte von einigen Millimetern bis hin zu mehreren Zentimetern.

Für die Inokulation im ersten Testjahr mit Pathotyp 6 wurden 32 schwach anfällige Sorten getestet, von denen 13 eine Symptomausprägung in verschiedenen Abstufungen zeigten. Dies waren die Sorten: Afra, Austin, Eurostarch, Exempla, Ikarus, Lenz, Liora, Maruscha, Montis, Papageno, Pirol, Rodriga und Satina. Die Infektion mit Pathotyp 6 führte bei den getesteten Sorten zu einer stärkeren Symptomausprägung mit Ausbildung von Wucherungen (einige Millimeter bis mehrere Zentimeter) als nach Infektion mit Pathotyp 2. An allen Sorten wurde bei mindestens einer Knolle eine Wucherung dokumentiert, an acht von diesen Sorten sogar an beiden Knollen. Im zweiten Testjahr wurden von einigen schwach anfälligen Sorten (Bonus, Caprice, Gunda, Alanis, Annegret, Leyla, Eurostarch, Ikarus und Rodriga) je zehn Knollen erneut mit Pathotyp 6 inokuliert. Es konnte an drei Sorten eine Symptomausprägung beobachtet werden. In diesen Testjahr war der Infektionserfolg allgemein für diesen Pathotypen nicht so hoch. Vergleicht man dennoch die Daten mit denen des vorherigen Testjahres, konnten die Ergebnisse für die Sorten Bonus, Caprice, Ikarus und Eurostarch bestätigt werden, wohingegen bei Rodriga kein Befall festgestellt werden konnte.

Es wurden außerdem elf Sorten mit schwacher Anfälligkeit (Alanis, Annegret, Bavatop, Bonus, Caprice, Gunda, Ikarus, Kuba, Rambo, Rodriga und Simonetta) mit jeweils fünf Knollen gegen Pathotyp 18 getestet. Auch hier wies das Inokulum eine Sporangiendichte von 10 Sori/ g Boden auf. Bei vier der untersuchten Sorten wurden Wucherungen bonitiert.

Anhand der Versuche konnte festgestellt werden, dass die Reaktionen sehr genotypspezifisch ausfallen können und dass die Boniturnote 4 (schwache Anfälligkeit) eine breite Spannbreite an Symptomausprägungen hat: von einzelnen Sori im Gewebe bis hin zu Deformationen mit Sorifeldern. Eine generelle Anbaufähigkeit in befallsgefährdeten Regionen kann nicht

abschließend beurteilt werden, aber generell sind schwach anfällige Sorten voll anfälligen Sorten vorzuziehen, da die schwache Anfälligkeit nur in wenigen Fällen zu einer vollen Anfälligkeit hin durchbrochen wurde und damit die Vermehrung der Erregerpopulation an den Standorten bewirken kann.

AP 4.2 Biotest teilresistenter Sorten mit unterschiedlichen Pathotypen

Es sollte untersucht werden, ob die Kultur von *S. endobioticum* auf schwach anfälligen Sorten zu einer Veränderung des Pathotypen nach einer gewissen Anzahl an Vermehrungsgenerationen führen kann. Die Vermutung war, dass auf diese Weise stärker virulente *Synchytrium*-Genotypen selektiert und der Befall je Vermehrungsrunde zunehmen würde oder, dass Gemische auf diese Weise genetisch eingeengt würden. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch mit der Glynne-Lemmerzahl-Methode eine Veränderung des Pathotypen beobachtet werden konnte (van de Vossenberg et al., 2022a). Es wurde auf diese Methode umgestiegen, da hier eine deutlichere Symptomausprägung erwartet wurde als nach einer Inokulation mit Dauersori. Es wurden die Sorten Liora, Finka und Exempla mit P1 inokuliert. Allerdings konnten nicht mehr als zwei Vermehrungsrunden durchgeführt werden und es stand nicht ausreichend Material für eine Überprüfung mittels Differentialsortiment oder molekularer Marker zur Verfügung. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Infektion mit Hilfe der Zoosporensuspension vorgenommen, um auch aus wenig infiziertem Material möglichst neue Infektionen hervorrufen zu können und auf diese Weise weitere Vermehrungsrunden zu schaffen. Aufgrund der Knollenverfügbarkeit wurde die Sorte Talent gewählt und mit Pathotyp 2 inokuliert. Nachteil ist, dass hier keine molekularen Marker zur Identifikation von P2 zur Verfügung stehen. Es zeigte sich bereits in der ersten Vermehrungsrunde, dass lediglich eine sehr geringe Symptomausprägung an der Sorte Talent zu erkennen war. Es wurden alle inokulierten Sprosse zur Herstellung der Zoosporensuspension für die zweite Infektionsrunde genutzt. Die zweite Vermehrungsrunde zeigte wider Erwarten keine Infektionen, sodass keine weitere Inokulation möglich war und der Versuch eingestellt werden musste. Es konnte mit den gewählten Sorten keine Analyse durchgeführt werden, ob eine Veränderung des Pathotypen durch eine wiederholte Vermehrung auf einer schwach anfälligen Sorte stattfindet.

2. Eingehende Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Gesamtkosten des Teilvorhabens (inkl. der 15 %igen Beteiligung der GFPi) beliefen sich auf 951.137,44 €. Den zahlenmäßig größten Anteil hatten die Positionen Personalkosten (638.821,71 €) und Gegenstände und andere Investitionen (>800 €) (166.961,24 €). Die Ausgaben haben die geplanten Zuwendungen der Projektphase und Verlängerung nicht

überschritten. Differenzen zur ursprünglichen Planung bewegten sich stets im Deckungsrahmen zwischen den Positionen.

3. Eingehende Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die hier dargestellten Arbeiten wären ohne die Einstellung von zusätzlichem wissenschaftlichen und technischen Personal nicht realisierbar gewesen. Eine Einstellung von Personal sowie die Anschaffung der benötigten Großgeräte für die Optimierung der Aufarbeitung von Proben wären aus der Grundfinanzierung des Instituts nicht möglich gewesen. Um die Etablierung und Optimierung der verschiedenen Biotests, der molekularbiologischen Methoden sowie der Methoden zur Aufarbeitung von Dauersori aus dem Boden leisten zu können, war eine Finanzierung notwendig. Die geleistete Arbeit war zur Beantwortung der Forschungsfragen angemessen.

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

Das Projekt schaffte die Basis zur zuverlässigen Vitalitätsbestimmung von Dauersori mit Hilfe von Biotests. Es wurden verschiedene Biotests sowie eine Probenvorbehandlung optimiert, sodass den Pflanzenschutzdiensten Empfehlungen gegeben werden können, wie eine zuverlässige Vitalitätsbestimmung erfolgen kann. Durch die Etablierung der Infektion mit Zoosporensuspensionen und getrockneten Wucherungen konnte die Pathotypenidentifikation wesentlich verbessert werden. Die benötigte Zeit zur Bestimmung des Pathotypen wurde reduziert und eine Bestimmung aus geringen Mengen Ausgangsmaterial ist möglich. Die Referenzbildsammlung soll als Entscheidungshilfe und Schulungsmaterial für die Pflanzenschutzdienste dienen und die Qualität der Diagnose verbessern und vereinheitlichen. Die Referenzbildsammlung wurde den Pflanzenschutzdiensten zur Verfügung gestellt. Die Anbaueignung der schwach anfälligen Sorten wurde geprüft und es wurde deutlich, dass genotypspezifische Reaktionen vorliegen und die phänotypische Bandbreite der schwachen Anfälligkeit weit gefasst ist. Man kann aber direkt festhalten, dass besonders bei gut abgesicherten Testergebnissen der Resistenzeinstufung, die schwache Anfälligkeit selten durchbrochen wird und der Anbau in befallsgefährdeten Regionen dem Anbau voll anfälliger Sorten vorgezogen werden sollte. Den Anbauern liegt somit direkt nach Projektende ein breiteres Sortenspektrum für befallsgefährdete Regionen vor.

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

Es wurden die Mitochondriengenome verschiedener Isolate verglichen, um die genetische Diversität des Pathogens besser zu verstehen (van de Vossenberg et al., 2023). Ebenfalls wurde die Verwendbarkeit der real-time PCR Verfahren zur Detektion von *S. endobioticum* in Böden und ihr Potential zur Flächenfreitestung verglichen (van de Vossenberg et al., 2022b).

6. Eingehende Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Es wurde über das Projekt in der praxisorientierten Fachzeitschrift der Kartoffelbau berichtet, sodass die Nutzer direkt über das Projekt informiert wurden (Chilla et al., 2021).

Die erstellte Referenzbildsammlung für eine verbesserte Diagnose von Dauersori aus dem Boden wurde den Pflanzenschutzdiensten der Länder im Log-In-Bereich der Internetseite des Nationalen Referenzlabors zur Verfügung gestellt. Begleitend hierzu wurde ein Artikel im Journal für Kulturpflanzen veröffentlicht, in dem die Referenzbildsammlung vorgestellt wird (Chilla *et al*., 2023).

Geplant ist die Veröffentlichung der Ergebnisse zur Vorbehandlung/ Reaktivierung von Bodenproben zur verbesserten Bewertung der Vitalität/ Infektiosität befallener Böden im EPPO Bulletin (eingereicht Januar 2024).

Geplant ist ebenfalls die Veröffentlichung der mikroskopischen Untersuchungen an Sommer- und Dauersori zum verbesserten Verständnis der Biologie des Erregers.

IV Literaturverzeichnis

Becker, M., **Y. Becker**, **K. Green**, **B. Scott**, **2016:** The endophytic symbiont Epichloë festucae establishes an epiphyllous net on the surface of Lolium perenne leaves by development of an expressorium, an appressorium-like leaf exit structure. The New phytologist **211** (1), 240–254, DOI: 10.1111/nph.13931.

Becker, Y., **K.A. Green**, **B. Scott**, **A.M. Becker**, **2018:** Artificial Inoculation of Epichloë festucae into Lolium perenne, and Visualisation of Endophytic and Epiphyllous Fungal Growth. Bio-protocol **8** (17), e2990, DOI: 10.21769/BioProtoc.2990.

Bonants, P.J.M., **M.P.E. van Gent-Pelzer**, **G.C.M. van Leeuwen**, **T.A.J. van der Lee**, **2015:** A real-time TaqMan PCR assay to discriminate between pathotype 1 (D1) and non-pathotype 1 (D1) isolates of Synchytrium endobioticum. European journal of plant pathology **143** (3), 495–506, DOI: 10.1007/s10658-015-0702-z.

Busse, F., **A. Bartkiewicz**, **D. Terefe-Ayana**, **F. Niepold**, **Y. Schleusner**, **K. Flath**, **N. Sommerfeldt-Impe**, **J. Lubeck**, **J. Strahwald**, **E. Tacke**, **H.R. Hofferbert**, **M. Linde**, **J. Przetakiewicz**, **T. Debener**, **2017:** Genomic and Transcriptomic Resources for Marker Development in Synchytrium endobioticum, an Elusive but Severe Potato Pathogen. Phytopathology **107** (3), 322–328, DOI: 10.1094/Phyto-05-16-0197-R.

Chilla, F., **H. Tlapák**, **A. Pucher**, **K. Flath**, **M. Becker**, **T. Debener**, **2021:** Kartoffelkrebs diagnostizieren und analysieren. Kartoffelbau **72** (9 & 10), 1–3.

Chilla, F., **H. Tlapák**, **A. Pucher**, **K. Flath**, **M. Becker**, **H. Hanekamp**, **2023:** Diagnose Kartoffelkrebs - Dauersporangien von Synchytrium endobioticum sicher erkennen und beurteilen. Journal für Kulturpflanzen **75** (03-04), 117–120, DOI: 10.5073/JFK.2023.03.04.01.

European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO), **2017:** PM 7/28 (2) Synchytrium endobioticum. EPPO Bulletin **47** (3), 420–440, DOI: 10.1111/epp.12441.

European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO), **2020:** PM 3/88 (1) Testing of potato varieties to assess resistance to Synchytrium endobioticum. EPPO Bulletin **50** (3), 364–371, DOI: 10.1111/epp.12688.

Flath, K., **J. Przetakiewicz**, **P.C.J. van Rijswick**, **V. Ristau**, **G.C.M. van Leeuwen**, **2014:** Interlaboratory tests for resistance to Synchytrium endobioticum in potato by the Glynne-Lemmerzahl method. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **44** (3), 510–517.

Gagnon, M.C., **T.A.J. van der Lee**, **P.J.M. Bonants**, **D.S. Smith**, **X. Li**, **C.A. Levesque**, **G.J. Bilodeau**, **2016:** Development of polymorphic microsatellite loci for potato wart from next-generation sequence data. Phytopathology **106** (6), 636–644, DOI: 10.1094/PHYTO-12-15-0317-R.

Gebhardt, C., **J.P. Valkonen**, **2001:** Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. Annual review of phytopathology **39**, 79–102, DOI: 10.1146/annurev.phyto.39.1.79.

Hampson, M.C., **P.R. Thompson**, **1977:** A quantitative method to examine large numbers of soil samples for Synchytrium endobioticum, the cause of potato wart disease. Plant and Soil **46** (3), 659–664.

Hehl, R., **E. Faurie**, **S. Whitham**, **B. Baker**, **J. Hesselbach**, **F. Salamini**, **C. Gebhardt**, **1999:** TMV resistance gene N homologues are linked to Synchytrium endobioticum resistance in potato. Theoretical and Applied Genetics; TAG **98** (3-4), 379–386.

Laidlaw, W.M.R., **1985:** A method for the detection of the resting sporangia of potato wart disease (Synchytrium endobioticum) in the soil of old outbreak sites. Potato Research **28** (2), 223–232.

Pratt, M., **1976:** A quantitative method to examine large numbers of soil samples for Synchytrium endobioticum, the cause of potato wart disease. Ann Appl Biol (82), 21–29.

Salaman, R.N., **J.W. Lesley**, **1923:** Genetic studies in potatoes: The inheritance of immunity to wart disease. Journal of Genetics **8** (2), 177–186.

Smith, D.S., **H. Rocheleau**, **J.T. Chapados**, **C. Abbott**, **S. Ribero**, **S.A. Redhead**, **C.A. Lévesque**, **S.H. de Boer**, **2014:** Phylogeny of the genus Synchytrium and the development of TaqMan PCR assay for sensitive detection of Synchytrium endobioticum in soil. Phytopathology **104** (4), 422–432, DOI: 10.1094/PHYTO-05-13-0144-R.

Stachewicz, H., **S. Enzian**, **1998a:** Bedeutung und Bekämpfung des Kartoffelkrebses (*Synchytrium endobioticum*) in der Bundesrepublick Deutschland . [Significance and control of potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) in Germany]. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fuer Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem **357**.

Stachewicz, H., **S. Enzian**, **1998b:** Sind Temperatur und Niederschlagsmenge begrenzende Faktoren fuer das Auftreten von Kartoffelkrebs in der Bundesrepublik Deutschland?: Do temperature and rainfall limit the occurrence of potato wart in Germany? Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes (Germany) **50** (5), 105–111.

Stenz, G., **1962:** Über die Verwendbarkeit von Zoosporensuspensionen als Infektionsmaterial für Resistenzprüfungen gegen den kartoffelkrebs (Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc.). Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes (Berlin, Germany) **16** (10), 206–211.

van de Vossenberg, B.T., **M. van Gent**, **J.P. Meffert**, **H.D. Nguyen**, **D. Smith**, **T. van Kempen**, **C.M. Helderman**, **K.C. Rosendahl-Peters**, **N.t. Braak**, **K. Flath**, **J. Przetakiewicz**, **W. Perez**, **E. Çakir**, **Z.V. Sikharulidze**, **G.C. van Leeuwen**, **T.A. van der Lee**, **2023:** Molecular characterization and comparisons of potato wart (Synchytrium endobioticum) in historic collections to recent findings in Canada and the Netherlands. Journal of Plant Pathology, DOI: 10.1007/s42161-022-01299-5.

van de Vossenberg, B.T.L.H., **C. Prodhomme**, **J.H. Vossen**, **T.A.J. Lee**, **2022a:** Synchytrium endobioticum, the potato wart disease pathogen. Molecular Plant Pathology **23** (4), 461–474, DOI: 10.1111/mpp.13183.

van de Vossenberg, B.T.L.H., **N. te Braak**, **T. Warbroek**, **J.P. Meffert**, **K.H.M. Rosendahl-Peters**, **M.P.E. Gent-Pelzer**, **P.C.J. Rijswick**, **2022b:** Comparison of real-time PCR tests for the detection of Synchytrium endobioticum resting spores in soil and their potential application in descheduling of previously infested plots. EPPO Bulletin **52** (1), 154–163, DOI: 10.1111/epp.12813.

van den Boogert, P.H.J.F., **M.P.E. van Gent-Pelzer**, **P.J.M. Bonants**, **S.H. de Boer**, **J.G.N. Wander**, **C.A. Levesque**, **G.C.M. van Leeuwen**, **R.P. Baayen**, **2005:** Development of PCR-based detection methods for the quarantine phytopathogen Synchytrium endobioticum, causal agent of potato wart disease. European journal of plant pathology **113** (1), 47–57, DOI: 10.1007/s10658-005-0297-x.

van Gent-Pelzer, M.P.E., **M. Krijger**, **P.J. Bonants**, **2010:** Improved real-time PCR assay for detection of the quarantine potato pathogen, Synchytrium endobioticum, in zonal centrifuge extracts from soil and in plants. European journal of plant pathology **126** (1), 129–133, DOI: 10.1007/s10658-009-9522-3.