Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I - Kurzbericht

zum Verbundvorhaben

Thema:

Erstellung neuer und Verstärkung bestehender Abwehrebenen der Kartoffel gegen die Schaderreger M. chitwodii, PLRV, PVY und TRV (»ADLATUS«)

Zuwendungsempfänger:

Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME

Forckenbeckstraße 6

52074 Aachen

Förderkennzeichen:

28A8701D19

Laufzeit:

01.12.2020 bis 31.01.2024

Monat der Erstellung:

06/2024

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

ptble Projektträger Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

I.1 Aufgabenstellung und wissenschaftlicher Stand

Als Reaktion auf die Verbreitung neuer und/oder sich verändernder Schadorganismen bei gleichzeitigem Wegfall wichtiger Pflanzenschutzmittel wurden in »ADLATUS« bestehende Resistenzen gegenüber wichtigen Schaderregern mit rezessiven Wirtsresistenzen betrachtet. So können verschiedene Ebenen der pflanzlichen Immunabwehr gezielt in die Züchtung neuer Kartoffeln mit einer breiten Pathogenresistenz überführt werden. Im Fokus des Vorhabens standen folgende Schadorganismen: *Meloidogyne chitwoodi*, Kartoffelvirus Y (PVY), Kartoffelblattrollvirus (PLRV) und Tabak-Rattle-Virus (TRV), sowie *Myzus persicae* als bedeutender Virusvektor. Diese wurden gewählt, da sich im aktuellen Kartoffelsortiment nur unzureichende Resistenzen gegenüber *M. chitwoodi* und *Trichodorus/Paratrichodorus*, dem Überträger von TRV finden. Zudem führt der Wegfall insektizider Wirkstoffe zu einer Zunahme des Befalls durch PVY und PLRV. Daher wurde in »ADLATUS« nach neuen dominanten Resistenzen gegen die genannten Schaderreger gesucht, um diese mit rezessiven Wirtsresistenzen zu kombinieren.

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

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

Im Siebelement des Phloems höherer Pflanzen finden sich sogenannte Phloem- oder P-Proteine, die das Siebelement nach Verletzung verschließen. Vorarbeiten der Universität Münster und des Fraunhofer IME deuten darauf hin, dass durch das Herunterregulieren der P-Protein-Gene eine mögliche Resistenz gegen den Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* entwickelt werden kann.

Sowohl die Translations-Initiationsfaktoren als auch die P-Proteine stellen daher interessante rezessive Wirtsfaktoren dar, die als Zielgene sowohl für die gezielte Genomeditierung (Proof of Concept) als auch für die Suche nach Defektallelen für den Einsatz in der Züchtung per TILLING bzw. ÖkoTILLING verwendet wurden. Das Fraunhofer IME hat zusammen mit dem Projektpartner BNA in verschiedenen Projekten das Screening für TILLING-Populationen in Kartoffel mittels Next Generation Sequenzierung (NGS) etabliert.

I.2. Ablauf des Vorhabens

Zur Untersuchung der Sequenzvariabilität der P-Proteine (AP3.1) sowie des Translations-Initiationsfaktors eIF4E (AP4.1) wurde eine aus 382 verschiedene Sorten/Linien bestehende Kartoffel-Population zusammengestellt und mittels Next Generation Sequenzierung durchmustert (ÖkoTILLING). Für die Zielgene SEOa, SEOb, SEOc (AP3.1) und eIF4E (AP4.1) wurden dazu geeignete PCR-Amplikons aus den genomischen Kartoffelsequenzen abgeleitet, getestet und anschließend zur Erstellung der Sequenzier-Libraries genutzt. Die erzielten Sequenzdaten wurden dann bioinformatisch analysiert. Dabei wurden zunächst

Sequenzunterschiede (Polymorphismen, SNPs und InDels) identifiziert und deren Einfluss auf die Genfunktion analysiert. Anschließend wurden mithilfe der Polymorphismen Haploblocks definiert und mittels Assoziationsanalyse untersucht, ob bestimmte Allele mit gewünschten Eigenschaften kombiniert sind.

Zur Suche nach induzierten Mutationen in den Zielgene mittels TILLING (AP5) existierte zu Projektbeginn am Fraunhofer IME eine tetraploide TILLING-Population. Eine zweite Population wurde bei BNA erstellt, so dass insgesamt >3.000 Pflanzen gescreent werden konnten. Dazu wurden die Pflanzen gepoolt, die Pools mit Barcodes markiert und als Templates für die Amplifikation geeigneter PCR-Amplikons der Zielgene verwendet. Diese wurden dann per NGS sequenziert. Bei der Analyse der Sequenzdaten wurden induzierte Mutationen identifiziert und auf ihren Einfluss auf die Genfunktion hin analysiert. Erfolgversprechende Kandidaten wurden von Partner BNA in die Gewebekultur überführt.

Die Koordination der Arbeiten erfolgte in Videokonferenzen, in denen Ergebnisse vorgestellt und die weiteren Arbeiten diskutiert wurden. Die Videokonferenzen wurden durch jährliche Projekttreffen ergänzt, die während der Corona-Pandemie ebenfalls online stattfanden.

I.3 Wesentliche Ergebnisse

In AP3.1 wurde die Sequenzvariabilität der P-Proteine in Kartoffelsorten und in für *M. chitwoodi/M.persicae* anfälligen bzw. resistenten Wildarten mittels NGS analysiert. Aufgrund der hohen Homologie zwischen SEOb und SEOc und aufgrund der Tatsache, dass wahrscheinlich SEOa in der Kartoffel die größte Wirkung erzielt, wurde auf die Analyse der Sequenzvariabilität von SEOb und SEOc verzichtet. Bei der Analyse der erzielten Daten wurden 424 SNPs in dem untersuchten Bereich identifiziert. 348 davon haben keinen Effekt (189 in Introns; 159 stille Mutationen). 76 der Mutationen führen allerdings zu Aminosäureaustauschen und könnten die Genfunktion beeinflussen. Eine Mutation führt zu einem neuen Stopp-Codon an Aminosäure-Position 430 von 723 mit der Folge eines Funktionsverlustes. Nach Assoziation der identifizierten Haplotypen mit den bekannten Resistenzdaten für PLRV, PVY und TRV konnte für PVY und TRV keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden, während für PLRV verschiedene Haplotypen mit einer höheren oder niedrigeren Resistenzstärke assoziiert zu sein scheinen. Analog zum Vorgehen in AP3.1 wurde in AP4.1 die Sequenzvariabilität von eIF4E in der ÖkoTILLING Population untersucht. Es konnten 154 Polymorphismen (SNPs, Insertionen, Deletionen) identifiziert werden. Davon führen 54 Mutationen zu Aminosäureaustauschen, wovon eine Mutation ein Stopp-Codon erzeugt an AS-Position 115 von 211. Bei der Assoziationsanalyse mit den Resistenzdaten konnten für eIF4E X für keine der Viren signifikante Unterschiede festgestellt werden.

In AP5 wurden die TILLING Population auf Mutationen in den Zielgenen SEOa, SEOb, SEOc und eIF4E untersucht. Für das Zielgen eIF4E wurden 14 Mutationen, die zu Aminosäureaustauschen führen, identifiziert, davon 2 Stopp-Codons. Für SEOa 32 Mutationen, davon 1 Stopp-Codon. Für SEOb lediglich 3 Mutationen, jedoch davon auch 1 Stopp-Codon und für SEOc 9 Mutationen, mit ebenfalls einem Stopp-Codon. Es wurden somit für alle untersuchten Zielgene wertvolle Knock-Out Allele identifiziert, die Eingang in die Kartoffelzüchtung finden und mit bekannten und neuen Resistenzen kombiniert werden können.

Literatur

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

K. Eskelin, A. Hafre, K. I. Rantalainen, and K. Ma, “Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and Inhibits Reporter mRNA Translation In Planta,” vol. 85, no. 17, pp. 9210–9221, 2011.

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

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil II – Eingehende Darstellung

zum Verbundvorhaben

Thema:

Erstellung neuer und Verstärkung bestehender Abwehrebenen der Kartoffel gegen die Schaderreger M. chitwodii, PLRV, PVY und TRV (»ADLATUS«)

Zuwendungsempfänger:

Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME

Forckenbeckstraße 6

52074 Aachen

Förderkennzeichen:

28A8701D19

Laufzeit:

01.12.2020 bis 31.01.2024

Monat der Erstellung:

06/2024

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

ptble Projektträger Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

II.1. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

AP 3.1 Untersuchung der Sequenzvariabilität der P-Proteine in Kartoffelsorten und in für M. chitwoodi/M.persicae anfälligen bzw. resistenten Wildarten

Die Untersuchung der Sequenzvariabilität der P-Proteine erfolgte durch Next Generation Sequenzierung. Ursprünglich sollte dazu das „Ion Torrent“ PGM System eingesetzt werden. Aus technischen Gründen wurde aber auf das "Illumina MiSeq" System gewechselt. Dieses System erlaubt die sogenannte "Paired End" Sequenzierung, die im gegebenen Setting einige Vorteile bietet. Hierbei werden die zu amplifizierenden Fragmente zunächst von einer und anschließend von der anderen Seite ansequenziert. Je nach verwendetem Sequenziergerät kann die Leseweite zwischen 2 x 25 Basenpaare (Bp) und 2 x 300 Bp variiert werden, so dass das Design der Fragmente vereinfacht ist. Zudem können beide Enden mit Barcodes markiert werden. Durch verschiedene Kombinationen weniger Barcodes können so viele Proben individuell markiert werden. Im vorliegenden Fall wurden die 382 Pflanzen mittels 40 Barcodes individuell markiert. In den erzielten Sequenzdaten ist zudem hinterlegt, welche Forward Sequenz zu welcher Reverse Sequenz gehört, so dass auch die Haplotypen Analyse mit derartigen Daten leichter ist. Die zu untersuchenden Gene wurden in mehrere Fragmente aufgeteilt. Dazu wurden aus den bekannten Kartoffel P-Protein Sequenzen genspezifische Primer abgeleitet. Die resultierende Fragmentlänge betrug zwischen 350 und 650 Basenpaaren. In dem verwendeten zweistufigen PCR Verfahren wurden noch universelle Sequenzen an die 5‘ Enden der genspezifischen Primer angehängt, welche in der sekundären PCR als Primerbindungsstellen dienen. In dieser PCR werden dann die für die NGS Sequenzierung nötigen Sequenzen angehängt, so dass die Gesamtlänge der Fragmente dann ca. 450 - 750 Basenpaare beträgt. Für die 3 P-Proteine wurden genspezifische Primer für die Amplifikation 9 derartiger Fragmente abgeleitet, wobei SEOa in fünf Fragmente und SEOb und SEOc in vier Fragmente aufgeteilt wurden (siehe Abbildung 1).

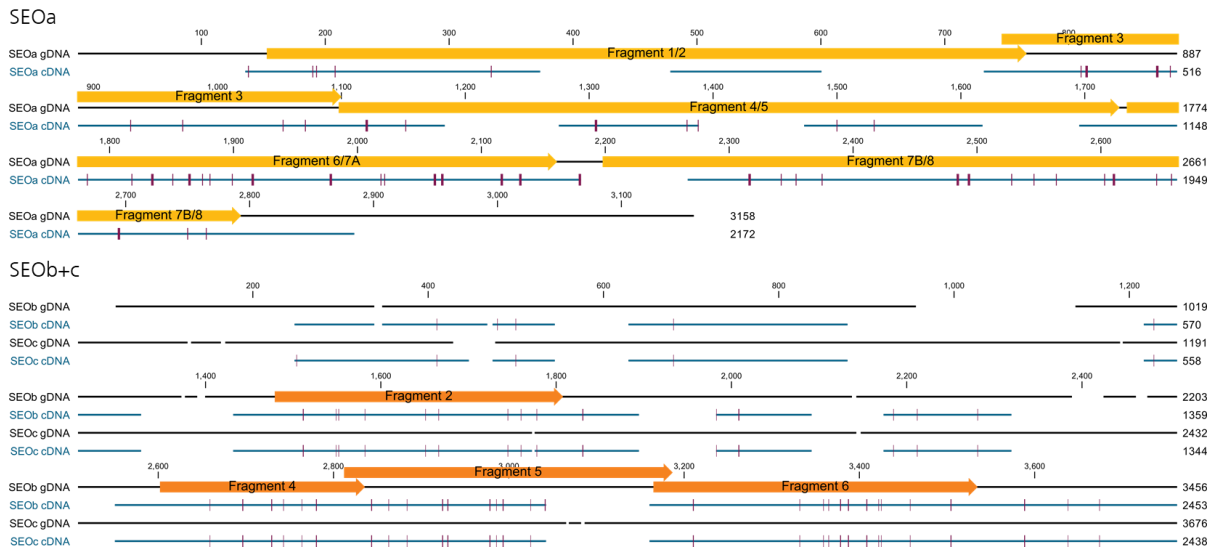

Abbildung 1: Abgeleitete Fragmente zur Bestimmung der Sequenzvariabilität der P-Proteingene. Schematisch dargestellt ist die Genstruktur der P-Proteingene. Die dünne schwarze Linie symbolisiert die genomische Sequenz und die dünne blaue Linie die Exons. Mit den kurzen senkrechten Strichen sind Positionen im Gen markiert, an denen Stopp-Codons durch die EMS Mutagenese generiert werden können.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen SEOb und SEOc welche die Ermittlung der Sequenzvariabilität in Kartoffelsorten und Wildarten stark erschwert und aufgrund der Tatsache, dass angenommen wird, dass SEOa in der Kartoffel die größte Wirkung erzielt, wurde auf die Analyse der Sequenzvariabilität von SEOb und SEOc verzichtet. Die Fragmente liegen aber vor und die Analyse wird durchgeführt, sollte sich bei der Analyse der Genom-editierten Pflanzen herausstellen, dass ihre Rolle in der Resistenzvermittlung doch größer als angenommen ist (AP3.3).

Aufgrund der erwarteten Datenmenge wurden 382 verschiedene Sorten/Linien und damit zum einen ein breiter Querschnitt durch die verfügbaren Sorten/Zuchtklone und zusätzlich für *M.chitwoodi/M.persicae* anfällige und resistente Wildarten analysiert. Dazu wurde die Population zusammengestellt und bei den Projektpartnern, das nötige Blattmaterial gesammelt aus welchem dann DNA präpariert und normalisiert wurde. Für die Erstellung der Sequenzier–Libraries kam ein zweistufiges PCR Verfahren zum Einsatz. In der initialen 1. PCR wurden zielgenspezifische Primer verwendet an deren 5‘ Enden universelle Sequenzen angehängt wurden. Diese dienten in der sekundären PCR als Primerbindungsstellen. In dieser PCR werden dann alle für die NGS Sequenzierung nötigen Sequenzen angehängt. Mit den für SEOa abgeleiteten Primern wurden primäre PCRs für die 5 Fragmente mit den 382 Pflanzen DNAs durchgeführt. Anschließend wurden die PCR Produkte 1:10 verdünnt und als Templates in die sekundären PCRs eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend normalisiert, equimolar gepoolt und nach Qualitätskontrolle mit dem Illumina MiSeq System zusammen mit den Fragmenten für elF4E (siehe AP4.1) analysiert. Die theoretisch erzielbare Leseweite betrug 2 x 300 Bp, die maximale Datenmenge 22 – 25 Mio. Reads. Die erzielte Datenmenge ist sehr groß. Die Sequenziertiefe beträgt ca. 30.000 bis 75.000-fach (siehe Abbildung 2).

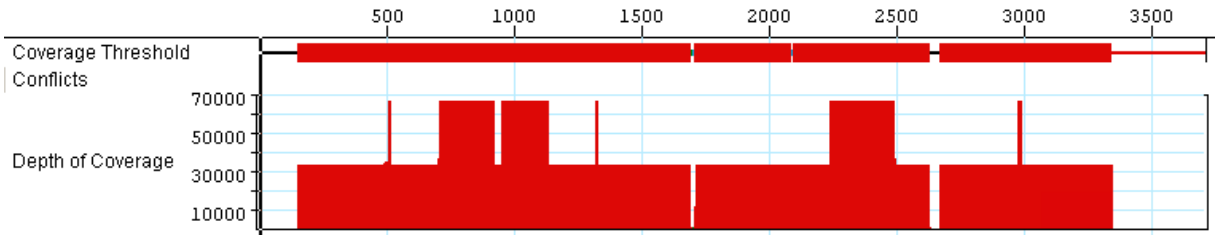

Abbildung 2: Plot der Sequenziertiefe im analysierten Bereich von SEOa. Es wurde die Sequenziertiefe (Depth of Coverage; Y-Achse) gegen die Position in der SEOa Referenzsequenz (X-Achse) aufgetragen.

Die Daten wurden mit Hilfe der Programmpakete Lasergene Genomics Suite und CLC Genomics Workbench analysiert. Dabei lag der Schwerpunkt zum einen darauf, Sequenzunterschiede (SNPs; InDels) zu identifizieren und deren Einfluss auf die Genfunktion abzuschätzen. Im Zuge dieser Analyse konnten 424 SNPs in dem untersuchten Bereich identifiziert werden. 348 davon haben keinen Effekt (189 in Introns; 159 stille Mutationen). 76 der Mutationen führen allerdings zu Aminosäureaustauschen und könnten die Genfunktion beeinflussen. Eine Mutation führt zu einem neuen Stopp-Codon an Aminosäure-Position 430 von 723, welches die Genfunktion ausschaltet (Abbildung 3B). Dieses tritt in der betroffenen Pflanze in 26% der Reads auf, so dass von einer simplex Gendosis auszugehen ist (3 WT/1 SNP). Alle relevanten Mutationen wurden mittels Sanger Sequenzierung verifiziert (Abbildung 3A).

Abbildung 3: Verifizierung und Position des identifizierten Stopp-Codons in SEOa. A. Elektropherogramme der Sanger Sequenzierungen zur Verifizierung des Stopp-Codons auf Position 1915. **B.** Position des Stopp-Codons im SEOa Protein (oben: AS-Sequenz, unten: Grüner Balken symbolisiert AS-Sequenz).

Neben der Beurteilung der SNPs auf ihre Wirkung auf die Proteinfunktion, wurde zusätzlich untersucht, ob bestimmte Allele mit gewünschten Eigenschaften kombiniert sind. Allele können durch Kombinationen von SNPs identifiziert werden. Diesen Vorgang nennt man Haplotypisierung. Dies ist bei polyploiden Organismen manuell durchgeführt sehr aufwendig. Daher wurde das Analyse Tool Whatshap Polyphase für die automatische Zuordnung heterozygoter SNPs zu Haploblocks verwendet (Schrinner et al., 2020). Als Haploblocks werden zusammenhängende Sequenzabschnitte bezeichnet, die nicht zwingend die gesamte Allelsequenz umfassen, sondern bei unserer Sequenzierstrategie mit den sequenzierten Fragmenten übereinstimmen. Für SEOa ergeben sich dadurch 5 nicht zusammenhängende Haploblocks, die fast die gesamte kodierende Sequenz umfassen.

Für SEOa wurden 235 Haplotypen in Haploblock 1, 150 Haplotypen in Haploblock 2, 318 Haplotypen in Haploblock 3, 153 Haplotypen und Haploblock 4 und 77 Haplotypen in Haploblock 5 identifiziert. Dies verdeutlich, dass SEOa in verschiedenen Genbereichen eine unterschiedliche Sequenzvariabilität zeigt. Der ursprüngliche Plan der näheren Untersuchung seltener Haplotypen konnte nicht durchgeführt werden, da sehr viele sehr seltene Haplotypen identifiziert wurden. Das Beispiel von SEOa Haploblock 1 zeigt, dass 57% der Haplotypen in der Population nur 1-mal vorkommen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Häufigkeit der identifizierten Allele für das Gen SEOa Haploblock 1.

Häufigkeit	Haplotypen	Prozent
1 (0.07%)	135	57%
< 5 (< 0.3%)	203	86%
< 15 (< 1%)	222	94%
< 100	232	99%

Im Gegensatz zu den seltenen Haplotypen gibt es wenige Haplotypen, die sehr häufig in der BNA Population vorkommen. In Haploblock 1 zum Beispiel gibt es einen Haplotypen (B1-H235), der 26% der Allele ausmacht, während in Block 5 Haplotyp B5-H077 fast die Hälfte der Allele repräsentiert und in 65% der Pflanzen der BNA-Population vorkommt (siehe Tabelle 2). Dies spiegelt für die BNA-Population eine größere Sequenzvariabilität im C-terminalen Bereich des Proteins wider, was bei den Populationen des JKI und der Wildarten aber nicht zu erkennen ist. Dennoch zeigen alle Populationen eine Anreichung ähnlicher Haplotypen.

Tabelle 2: Übersicht der häufigsten Haplotypen für das Gen SEOa in der BNA, JKI und Wildart Population. In den Spalten „Pflanzen“ ist die absolute Häufigkeit der Pflanzen mit dem jeweiligen Haplotyp dargestellt, in den Spalten „Allele“ die absolute Anzahl der Haplotypen in der Population.

		BNA				JKI				Wildart			
BNA	Haplotyp	Pflanzen	%	Allel	%	Pflanzen	%	Allel	%	Pflanzen	%	Allel	%
SEOa B1	B1-H235	160	63%	260	26%	9	23%	15	12%	23	26%	36	13%
	B1-H234	104	41%	179	18%	2	5%	3	2%	25	28%	35	13%
	B1-H233	71	28%	99	10%	2	5%	2	2%	12	13%	14	5%
SEOa B2	B2-H150	102	40%	290	29%	12	31%	29	23%	16	18%	36	13%
	B2-H149	93	37%	311	31%	3	8%	6	5%	11	12%	27	10%
SEOa B3	B3-H318	99	39%	161	16%	2	5%	3	2%	22	24%	33	12%
	B3-H314	69	27%	72	7%	1	3%	1	1%	6	7%	8	3%
	B3-H317	66	26%	96	10%	1	3%	1	1%	11	12%	13	5%
SEOa B4	B4-H153	164	65%	205	20%	11	28%	13	10%	17	19%	21	8%
	B4-H152	107	42%	186	19%	2	5%	2	2%	24	27%	36	13%
SEOa B5	B5-H077	165	65%	436	43%	6	15%	21	16%	30	33%	68	24%
	B5-H076	114	45%	240	24%	3	8%	7	5%	17	19%	39	14%
	B5-H074	58	23%	119	12%	-	-	-	-	2	2%	3	1%

Die Haplotypen wurden anschließend mit den Phänotypen (PVY, PLRV und TRV Resistenzen) der Pflanzen verglichen, um gewünschte Allele zu identifizieren. Eine derartige Analyse bezeichnet man als Assoziationsanalyse.

Für die BNA-Population lagen von 162 Pflanzen Resistenzdaten zu PLRV vor, von 172 Pflanzen für PVY und 122 Pflanzen für TRV. Die Resistenzstärke wurde auf einer Skala von 1-9 eingestuft, wobei 1 für anfällige Pflanzen und 9 für resistente steht. Für die JKI Population lagen für alle 43 Pflanzen Daten zur PVY-Resistenz vor, die in anfällig und resistent aufgeteilt wurden.

Um die unterschiedlichen Datensätze miteinander vergleich zu können, wurden die BNA-Resistenzdaten kategorisiert und in 3 Gruppen eingeteilt: anfällig (1-4), mittel (5-7) und resistent (8-9). Für den paarweisen Vergleich der mittleren Resistenzstärken (mRS) und der Haplotypen je Haploblock, wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet, da i. die Daten nicht normal verteilt sind, ii. die Haplotypen eine ordinale Variable sind und iii. mehr als zwei Gruppen verglichen werden. Anschließend wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen auf ihre Signifikanz mittels des post-hoc Dunn's Tests und der Bonferroni Anpassung für Mehrfachtestung überprüft.

Da 39 Pflanzen der 43 als anfällig eingestuft wurden und die Einteilung der Resistenzstärken im Gegensatz zu den Daten der BNA Population nur in anfällig und resistent eingeteilt wurden, war zu erwarten, dass die Aussagekraft einer gemeinsamen Assoziationsanalyse begrenzt ist. So konnten für PVY zahlreiche signifikante Unterschiede festgestellt werden. Bei genauerer Betrachtung der Daten stellte sich heraus, dass die Analyse der BNA- und JKI-Populationen wie erwartet stark durch die hohe Anzahl an anfälligen Pflanzen und einer geringen Anzahl an verschiedenen Haplotypen in der JKI Population beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden die Assoziationsanalysen auf die BNA-Population beschränkt und die Skala der BNA-Resistenzdaten (1-9) verwendet. Für PVY und TRV konnten in der BNA-Population keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Für PLRV wurden für Haploblock 2 und 5 je zwei Haplotypen identifiziert, zwischen denen ein signifikanter Unterschied (p 0,043 und p 0,024 respektive) im Bezug auf die Resistenzstärke besteht (siehe Abb. 4). Dies sind für Haploblock 2 B2-H140 mit einem mRS-Wert von 8,25 und B2-H150 mit mRS 5,95. Für Haploblock 5 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen B5-H071 (mRS 8,38) und B5-H073 (mRS 5,86).

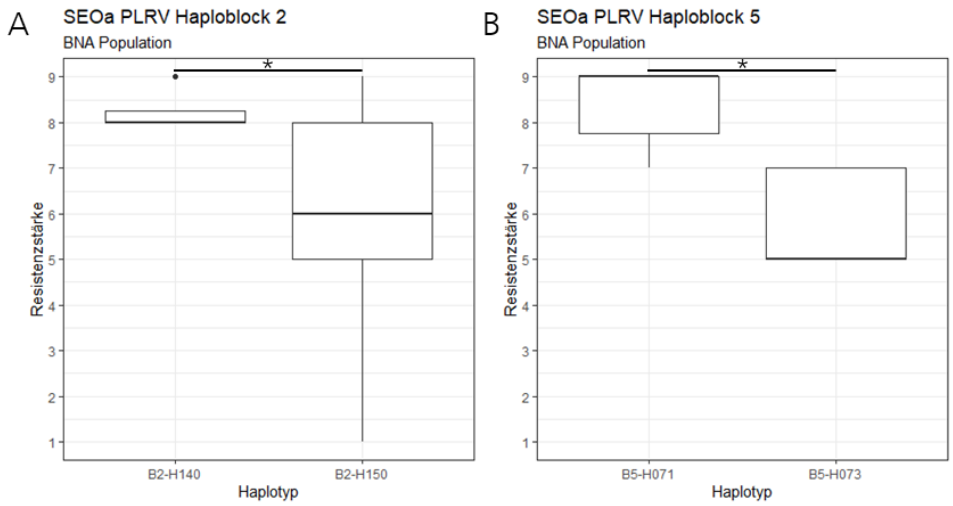

Abbildung 4: Vergleich der mittleren PLRV Virus Resistenzstärke (1 - gering, 9 – hoch) der verschiedenen Haplotypen der BNA-Population für SEOa Haploblock 2 (**A**) und Haploblock 5 (**B**), Stand Ende 2022. Paarweiser Vergleich mittels Kruskal Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test (Bonferroni Anpassung), * p < 0,05.

Nach Abschluss der Assoziationsanalysen wurden vom Partner BNA neue Resistenzdaten (Stand Ende 2023) zu weiteren Pflanzen zur Verfügung gestellt, mit denen die Auswertung wiederholt wurde. Bei der erneuten Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede mehr für SEOa Haploblock 2 im Bezug auf die PLRV Resistenz festgestellt werden, hingegen aber für Haploblock 3 (siehe Abb. 5A). Hier wurden mehrere

Haplotypen identifiziert, die im Vergleich zu Haplotyp B3-H307 (mRS 2,00) eine signifikant höhere Resistenzstärke zeigen. Dies sind die Haplotypen B3-H302 (mRS 7,57; p 0,016), B3-H309 (mRS 6,68; p 0,015), B3-H313 (mRS 6,67; p 0,004), B3-H317 (mRS 6,18; p 0,023) und B3-H318 (mRS 6,13; p 0,032). Diese Ergebnisse sollten in weiteren Analysen in zukünftigen Jahren bestätigt werden, da B3-H307 in lediglich 2 homozygoten Pflanzen vorkommt, sodass die Aussagekraft der Analyse begrenzt ist.

Für Haploblock 5 konnte der Haplotyp B5-H071 weiterhin mit einer hohen Resistenzstärke in Verbindung gebracht werden (mRS 8,33), allerdings nicht mehr im Vergleich zu B5-H073 sondern zu B5-H075 (mRS 5,56; p 0,049; Abb. 5B).

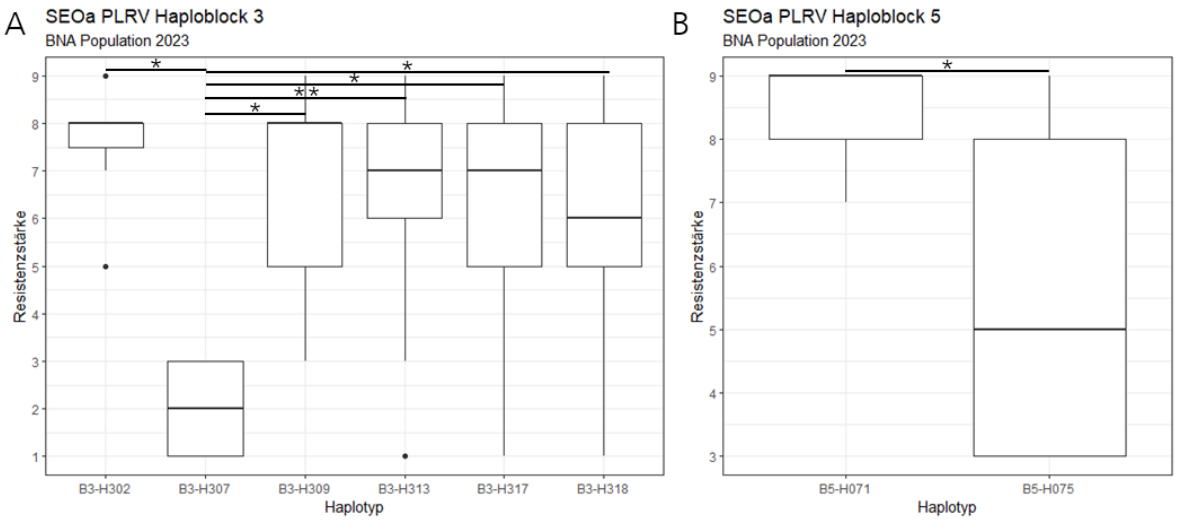

Abbildung 5: Vergleich der mittleren PLRV Virus Resistenzstärke (1 - gering, 9 – hoch) der verschiedenen Haplotypen der BNA-Population für SEOa Haploblock 3 (**A**) und Haploblock 5 (**B**) mit aktuellen Resistenzdaten (Stand Ende 2023). Paarweiser Vergleich mittels Kruskal Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test (Bonferroni Anpassung), * p < 0,05, ** p < 0,005.

Obwohl in der Gesamtpopulation einige Haplotypen mit einer höheren oder niedrigeren Resistenzstärke assoziiert schienen, konnten hier keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies liegt wahrscheinlich an der geringen Populationsgröße und Datenstreuung. Die Allelsequenzen der häufigsten Haplotypen und der signifikant unterschiedlichen werden an den Partner BNA übergeben.

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

AP 4.1 Untersuchung der eIF4E Sequenzvariabilität in für PVY, PLRV und TRV anfälligen bzw. resistenten Kartoffelsorten und Wildarten

Analog zum Vorgehen in AP 3.1 wurden auch für das eIF4E Gen genspezifische Primer *in silico* abgeleitet und getestet (Abbildung 6).

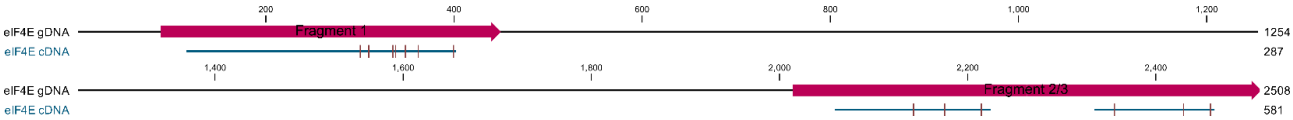

Abbildung 6: Abgeleitete Fragmente zur Bestimmung der Sequenzvariabilität eIF4E Gens. Schematisch dargestellt ist die Genstruktur des eIF4E Gens. Die dünne schwarze Linie symbolisiert die genomische Sequenz und die dünnen blauen Linien die Exons. Mit den kurzen senkrechten Strichen sind Positionen im Gen markiert, an denen Stopp-Codons durch die EMS Mutagenese generiert werden können.

Die resultierenden Fragmente umfassen alle Exons des Gens. Auch diese Primer dienten im Anschluss sowohl zur Ermittlung der Sequenzvariabilität der eIF4E Allele in Kartoffelsorten und Wildarten, als auch zum Screening der TILLING Populationen (AP 5.2). Analog zu AP 3.1 erlaubte auch hier die erwartete Datenmenge eine deutliche Erhöhung der Probenzahl, so dass auch in AP 4.1 382 Proben analysiert werden konnten. Es wurde neben *PVY*, *PLRV* und *TRV* anfälligen und resistenten Sorten und Wildarten ein breiter Querschnitt durch die verfügbaren Sorten/Zuchtklone analysiert. Nach der Ernte von Blattmaterial erfolgte eine DNA Extraktion, welche dann, analog zum Vorgehen in AP 3.1, für die Erstellung der Sequenzier-Librabries zur Illumina MiSeq Sequenzierung eingesetzt wurde.

Die erzielte Datenmenge ist auch hier sehr groß (Sequenziertiefe 35.000 – 65.000, siehe Abb. 7) und wurde analog zum Vorgehen in AP 3.1 analysiert.

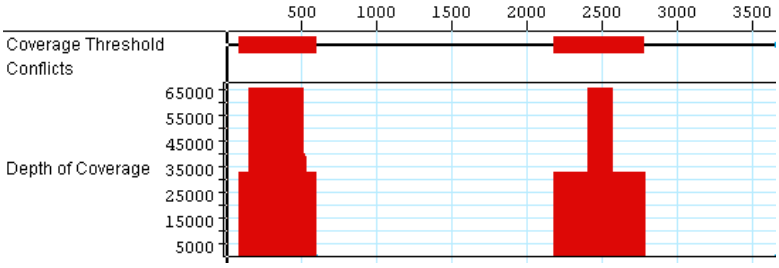

Abbildung 7: Plot der Sequenziertiefe im analysierten Bereich von eIF4E. Es wurde die Sequenziertiefe (Depth of Coverage; Y-Achse) gegen die Position in der eIF4E Referenzsequenz (X-Achse) aufgetragen.

Es konnten 154 Polymorphismen (SNPs, Insertionen, Deletionen) identifiziert werden. 64 liegen in Introns und 36 sind stille Mutationen. 54 Mutationen führen zu Aminosäureaustauschen, wovon eine Mutation ein Stopp-Codon erzeugt an AS-Position 115 von 211, also recht zentral (siehe Abbildung 8B). Diese wurde in zwei Pflanzen derselben Wildart identifiziert und kommt in 60% der Sequenz-Reads der betroffenen Pflanzen vor, so dass von einer in duplex vorliegenden Mutation auszugehen ist. Dafür spricht auch die annähernd gleich hohen G bzw. A Peaks bei der Resequenzierung mittels des Sanger Verfahrens (Abb. 8A).

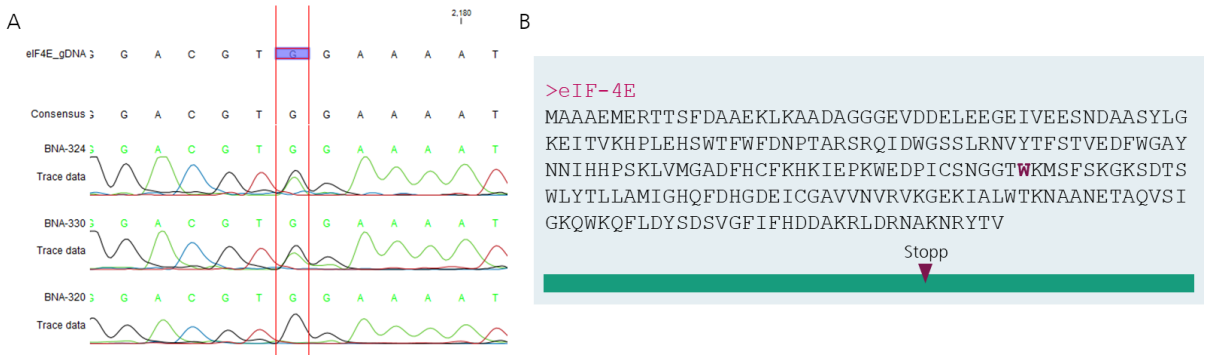

Abbildung 8: Verifizierung und Position der identifizierten Stopp-Codons in eIF4E. A. Elektropherogramme der Sanger Sequenzierungen zur Verifizierung des Stopp-Codons auf Position 2175. **B.** Position des Stopp-Codons im eIF4E Protein (oben: AS-Sequenz, unten: Grüner Balken symbolisiert AS-Sequenz).

Anschließend wurden analog zum Vorgehen in AP 3.1 Haplotypen identifiziert und deren Häufigkeit in den Populationen untersucht. Im Vergleich zu SEOa zeigt sich für eIF4E eine geringere Varianz der Haplotypen in der BNA-Population. Hier findet sich in beiden Haploblocks je ein Haplotyp, der über 40% der Allele ausmacht und in etwa 75% der Pflanzen vorkommt (B1-H162 und B2-H194, siehe Tab. 3). Für die JKI und Wildart Populationen zeigt sich ein ähnliches Bild, jedoch nicht ganz so stark ausgeprägt.

Tabelle 3: Übersicht der häufigsten Haplotypen für das Gen eIF4E in der BNA, JKI und Wildart Population. In den Spalten „Pflanzen“ ist die absolute Häufigkeit der Pflanzen mit dem jeweiligen Haplotyp dargestellt, in den Spalten „Allele“ die absolute Anzahl der Haplotypen in der Population.

		BNA				JKI				Wildart			
BNA	**Haplotyp**	**Pflanzen**	**%**	**Allel**	**%**	**Pflanzen**	**%**	**Allel**	**%**	**Pflanzen**	**%**	**Allel**	**%**
eIF4E B1	B1-H162	187	74%	422	42%	8	21%	13	10%	38	42%	75	27%
	B1-H160	104	41%	119	12%	7	18%	10	8%	12	13%	15	5%
	B1-H161	83	33%	123	12%	2	5%	3	2%	12	13%	19	7%
eIF4E B2	B2-H194	192	76%	435	43%	4	10%	16	13%	23	26%	37	13%
	B2-H192	81	32%	123	12%	1	3%	2	2%	5	6%	12	4%

Wie in AP 3.1 beschrieben wurden die identifizierten Haplotypen ebenfalls für eine Assoziationsanalyse mit PLRV, PVY und TRV Resistenzdaten verwendet. Für eIF4E konnten für keine der Viren signifikante Unterschiede festgestellt werden.

AP5 Screening der TILLING-Population nach Mutation in rezessiven Wirtsfaktoren

AP5.1 Isolierung der genomischen DNA der TILLING-Population, Normalisierung und 2D-Pooling

Bei Projektstart von ADLATUS lagen sowohl bei BNA als auch bei Fraunhofer IME je ca. 1500 umfassende TILLING Populationen vor. Da die TILLING Population am Fraunhofer IME aber bereits einige Zeit bei 4°C gelagert wurde, die Knollen bereits wieder zu keimen begannen und die DNAs bereits mehrfach aufgetaut wurden, wurde die gesamte Population erneut im Gewächshaus ausgepflanzt, Blattgewebe geerntet, frische DNA präpariert und die Knollen erneut bei 4°C eingelagert. Die DNAs der TILLING Populationen für das folgende NGS Screening gepoolt. Um je 768 Pflanzen pro Sequenzierungslauf untersuchen zu können, wurden die Klone in einer 2-dimensionalen Pooling-Strategie in 96 Pools mit je 16 Pflanzen gepoolt. Da die TILLING Populationen jeweils ca. 1500 Pflanzen umfassen, wurden 4 Gruppen von je 96 Pools mit je 16 Pflanzen erstellt. Jede Pflanze der Subpopulation kommt in zwei Pools vor. Die Proben sind dabei so angeordnet, dass im Fall der Identifikation einer Mutation in zwei korrespondierenden Pools nur genau

jeweils eine Pflanze in beiden Pools vorkommt und somit eindeutig zu identifizieren ist. Alle TILLING-Populationen werden weiter als Knollen erhalten und lagern bei 4°C bis zur weiteren Verwendung.

AP5.2 NGS der Kandidatengene

Für die Erstellung der Sequenzier–Libraries wurde analog zu AP 3.1 ein zweistufiges PCR Verfahren verwendet. Analog zum Vorgehen in AP 3.1 wurden die in Abbildung 1 (SEOb+c) und Abbildung 9 (eIF4E und SEOa) dargestellten Fragmente in primären PCRs mit den 384 erstellten 16er Pools (siehe AP 5.1) amplifiziert. Aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologien zwischen SEOb und SEOc wurden hier keine genspezifischen Primer erstellt. Vielmehr wurden Primer entworfen, die sowohl in SEOb als auch in SEOc binden, sodass alle Allele beider Gene damit amplifiziert werden können. Dazu war es teilweise nötig gemischte Basen, sogenannte „Wobbles“ einzuführen. Die Spezifizierung auf SEOb oder SEOc erfolgte dann bei der Analyse der erzielten Daten, durch den Vergleich mit der entsprechenden DNA Sequenz.

Abbildung 9: Abgeleitete Fragmente für das TILLING von eIF4E (oben) und SEOa (unten). Schematisch dargestellt ist die Genstruktur der Gene. Die dünne schwarze Linie symbolisiert die genomische Sequenz und die dünne blaue Linie die Exons. Mit den kurzen senkrechten Strichen sind Positionen im Gen markiert, an denen Stopp-Codons durch die EMS Mutagenese generiert werden können.

Anschließend wurden die PCR Produkte 1:500 verdünnt und als Templates in die sekundären PCRs eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend normalisiert. Aufgrund der benötigten Datenmenge und den zur Verfügung stehenden 96 Barcodes, wurden dann je 4 bzw. 3 Fragmente für jeden Pool vereint und für die NG-Sequenzierung vorbereitet. Zur Datenanalyse konnte dann anhand der Sequenz das Fragment und anhand des angehängten Barcodes der sequenzierte Pool erkannt werden. Für die vollständige Analyse der Zielgene in beiden Populationen waren daher 12 Sequenzierläufe mit dem Ion Torrent PGM System (Life Technologies) unter Verwendung des Sequencing 400 bp Kits (Life Technologies) und des 318v2 Chips (Life Technologies) notwendig. Die erzielte Datenmenge betrug pro Lauf zwischen 459 und 1.34 Megabasen, so dass eine ausreichende Abdeckung erzielt wurde. Zur Analyse der Daten wurden diese mithilfe des Programms "Lasergene Genomics Suite" (DNASTAR) mit der Originalsequenz des jeweiligen Zielgens verglichen und auf Sequenzabweichungen hin untersucht. Insgesamt konnten die in Tabelle 4 aufgeführten induzierten Mutationen identifiziert werden.

Tabelle 4: Übersicht der in den P-Protein-Genen sowie in eIF4E identifizierten EMS-induzierten Mutationen.

Gen	Kandidaten	Sanger Seq. positiv	Aminosäure Austausch	Stopp Codon	Stille Mutation /Intron
eIF4E	86	22	14	2	8
SEOa	164	41	32	1	9
SEOb	72	3	3	1	0
SEOc	151	13	9	1	4

Von den identifizierten Punktmutationen wurden diejenigen ausgesucht, die in zwei korrespondierenden Pools mit der erwarteten Frequenz (1 Pool = 16 Pflanzen = 64 Allele; Ein Allel trägt die Mutation daher sollte die Frequenz ca. 1/64 = 1,56% sein) vorkommen. Wenn die Mutation einen Effekt auf die Aminosäuresequenz des Zielgens hat wurden die Mutationen per Sanger Sequenzierung der Zielgene in den identifizierten Pflanzen verifiziert und *in silico* der Effekt der Mutation auf die Enzymfunktion geprüft.

Für das Zielgen eIF4E wurden 86 Mutationen nach dem obigen Schema ausgesucht und per Sanger Sequenzierung untersucht. 14 Mutationen konnten so bestätigt werden, darunter mit den G nach A Austauschen an den Positionen 2143 (Pflanze 1818) und 2175 (Pflanze 1820) Stopp-Codons (Abb. 10A). Diese betreffen die Aminosäuren 124 und 135 von insgesamt 231 (Abb. 10B).

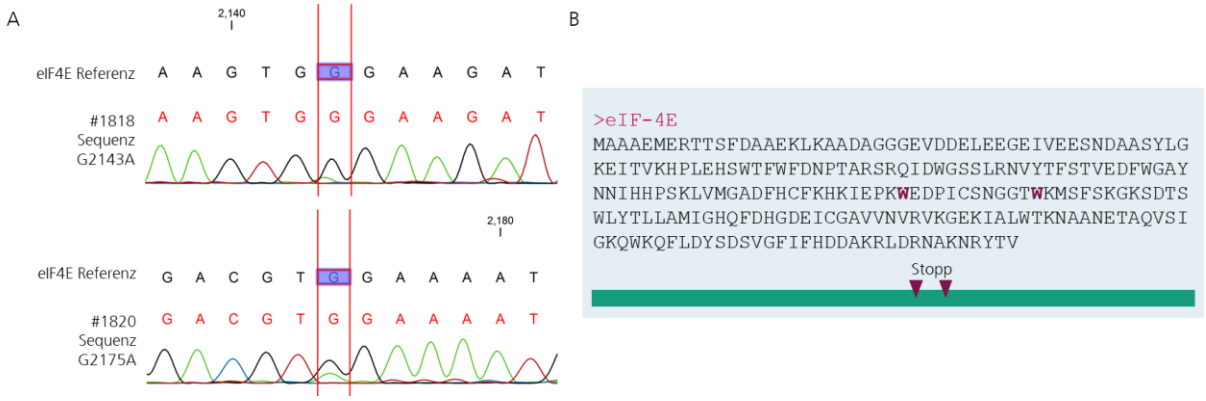

Abbildung 10. Verifizierung und Position der Stopp-Codons im eIF4E Gen. A. Elektropherogramme der Sanger Sequenzierungen zur Verifizierung der Stopp-Codons auf Positionen 2143 und 2175. **B.** Position der Stopp-Codons im eIF4E Protein (oben: AS-Sequenz, unten: Grüner Balken symbolisiert AS-Sequenz).

Für SEOa wurden 164 Mutationen ausgewählt und per Sanger Sequenzierung untersucht (Abbildung 11). Dabei wurde an den vermuteten Positionen nach entsprechenden Extrapeaks gesucht, die ca. 1/3 der Höhe des WT Peaks an dieser Position haben, da es sich um tetraploide Pflanzen handelt. Es konnten 32 dieser Mutationen bestätigt werden. Erfreulicherweise war eine dieser Mutationen ein Stopp-Codon an Position 479 von 723 Aminosäuren.

Abbildung 11. Verifizierung und Position des Stopp-Codons im SEOa Gen. A. Elektropherogramme der Sanger Sequenzierungen zur Verifizierung des Stopp-Codons auf Position 2063. **B.** Position der Stopp-Codons im SEOa Protein (oben: AS-Sequenz, unten: Grüner Balken symbolisiert AS-Sequenz).

Für SEOb wurden 78, für SEOc 148 Mutationen nach dem obigen Schema ausgewählt und per Sanger Sequenzierung untersucht (Abbildung 12 & 13). Unerwarteterweise konnten für SEOb lediglich 3 dieser Mutationen bestätigt werden. Erfreulicherweise war jedoch eine dieser Mutationen ein Stopp-Codon an Position 634 von 823 Aminosäuren. Für SEOc konnten 9 Mutationen bestätigt werden, darunter ebenfalls ein Stopp-Codon an Position 546 von 818.

Abbildung 12. Verifizierung und Position des Stopp-Codons im SEOb Gen. A. Elektropherogramme der Sanger Sequenzierungen zur Verifizierung des Stopp-Codons auf Position 2905. **B.** Position der Stopp-Codons im SEOb Protein (oben: AS-Sequenz, unten: Grüner Balken symbolisiert AS-Sequenz).

Abbildung 13. Verifizierung und Position des Stopp-Codons im SEOc Gen. A. Elektropherogramme der Sanger Sequenzierungen zur Verifizierung des Stopp-Codons auf Position 2767. **B.** Position der Stopp-Codons im SEOc Protein (oben: AS-Sequenz, unten: Grüner Balken symbolisiert AS-Sequenz).

Die übrigen Punktmutationen wurden mithilfe von Analysesoftware auf ihre Auswirkung auf die Genfunktion hin untersucht. Diese Analyse wurde für alle Zielgene durchgeführt (Tabelle 4), wobei für die SEO Gene keine Analyse mittels SIFT möglich war.

Für 7 Aminosäureaustausche bei eIF4E, 21 bei SEOa, 1 bei SEOb und 5 bei SEOc wird ein negativer Effekt auf die Enzymfunktion vorhergesagt, so dass diese Mutationen wie auch die Stopp-Codons, vielversprechende Kandidaten für Knock-Out Allele darstellen. Es konnten also für alle untersuchten Zielgene Knock-Out-Mutationen generiert und identifiziert werden. Diese wurden bei Partner BNA in die Sterilkultur überführt, vermehrt, so dass sie nun für Kreuzungsarbeiten zur Verfügung stehen. Damit wurde Meilenstein M13 erfolgreich erreicht.

Tabelle 4: Mutationen in den Zielgene eIF4E, SEOa, SEOb und SEOc. Es wurden nur Mutationen, die einen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben aufgeführt. In Spalte 3 ist der induzierte Basenaustausch mit Position in den Referenzsequenzen angegeben. Spalte 4 zeigt die Position der betroffenen Aminosäure und den Aminosäureaustausch. Die Spalten 5 und 6 zeigen die Ergebnisse einer in silico Analyse mit verschiedenen Vorhersageprogrammen zum Effekt der jeweiligen Aminosäure-Veränderungen auf die Enzymfunktion, wobei die angegebenen Werte wie folgt zu interpretieren sind: SIFT (Sim et al. 2012): <0,05 = damaging. PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2010) >0,9 = damaging. In Spalte 7 erfolgt eine Vorhersage des Effektes auf Basis dieser Analysen.

Gen	Pflanze	Mutation	AS-Tausch	SIFT	PolyPhen-2	Effekt
eIF4E	B793	A2127G	K119R	0,37	0,054	Neutral
	B1117	A2127G	K119R	0,37	0,054	Neutral
	B679	A2127G	K119R	0,37	0,054	Neutral
	B1752	C2150T	P127S	0,15	1	
	B317	C246T	T44M	0,13	0,993	Potentiell schädigend
			A44V	0,06	0,009	Neutral
	B613	G2099A	G110R	0,01	0,367	
	B1818	**G2143A**	**W124Stop**			
	B251	G2147A	D126N	0	0,999	Schädigend
	B1820	G2175A	W135Stop			
	B21	G2184A	S138N	0,28	0	Neutral
	B1112	G191A	G26R	0,03	0,87	Schädigend
SEOa	B233	G2535A	G608E	n.a.	0,953	Schädigend
	B417	G2723A	V671M	n.a.	0,665	Potentiell schädigend
	F543	G2468A	D586N	n.a.	0,389	Neutral
	F1042	C954T	H195Y	n.a.	0,006	Neutral
	B1217	C1932T	P436S	n.a.	1	Schädigend
	B1695	**G2063A**	**W479Stop**			
	B1362	C2730T	A673V	n.a.	0,954	Schädigend
	F1618	G1312A	M283I	n.a.	0,006	Neutral
	B594	C895T	T175I	n.a.	0,973	Schädigend
	B864	G2348A	V546M	n.a.	0,999	Schädigend
	B486	C993T	L208F	n.a.	1	Schädigend
	B543	C2001T	L459F	n.a.	1	Schädigend
SEOb	B386	G2659A	R591L	n.a.	0,999	Schädigend
	B61	G2403A	V506I	n.a.	0,858	Potentiell schädigend
	B498	**G2905A**	**W634Stop**			
SEOc	**B751**	**G2767A**	**T546Stop**			
	B1032	G2906A	E593K	n.a.	0,969	Schädigend
	B196	C1546T	S270F	n.a.	1	Schädigend
	B1169	G1665A	E310K	n.a.	0,915	Schädigend
	B1570	C1534T	P266L	n.a.	0,128	Neutral
	B143	C1684T	T316M	n.a.	0,884	Schädigend
	B988	G2831A	A568T	n.a.	1	Schädigend
	B410	G2894A	A589T	n.a.	0,739	Potentiell schädigend

II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die größte Kostenposition sind die Personalkosten. Die durchgeführten Arbeiten im Bereich der SNP-Detektion, in dem die identifizierten Mutationen per Sanger nachsequenziert werden mussten, sowie die Arbeiten zur Erstellung der mutierten tetraploiden TILLING/ÖkoTILLING Populationen waren personalintensiv. Zusätzlich wurde in ADLATUS erstmalig eine Haplotypisierung anhand der erstellten ÖkoTILLING Daten durchgeführt. Diese Methode musste neu etabliert werden, was sich als durchaus arbeitsintensiv darstellte.

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das vorliegende FuE-Vorhaben »ADLATUS« zielte auf die Erarbeitung der wissenschaftlich-technischen Grundlagen für die züchterische Entwicklung dauerhafter Virus- und Nematodenresistenzen in der Kartoffel zur Sicherung einer nachhaltigen Kartoffelproduktion. Die durchgeführten Arbeiten waren mit hohem wissenschaftlich-technischem Risiko behaftet, da es sich dabei um komplexe biologische Systeme und deren Nutzung handelt. Es wurden sowohl Resistenzgene aus Sorten und Wildartakzessionen untersucht werden, wie auch rezessive Wirtsfaktoren identifiziert, die eine breite Resistenz in der Pflanze vermitteln. Durch diesen parallelen Ansatz wurden mögliche Projektrisiken minimiert.

Durch die Zuwendung konnten in Zusammenarbeit mit dem JKI-QLB umfangreiche Sequenzdaten erhoben werden, die für die Allelbestimmung der Wirtsfaktoren notwendig sind. Zudem ist die künstliche Übertragung der untersuchten Viren teils schwierig, so dass die Untersuchung von Sorten und Akzessionen von Wildarten mit einem hohen Arbeitseinsatz verbunden war. Derart umfangreiche Projektergebnisse, wie sie für die Etablierung einer neuartigen Resistenzform notwendig sind, wären ansonsten nicht möglich. Ohne umfangreiche Vorarbeiten wäre unser Vorgehen nicht in die Praxis umsetzbar gewesen.

Außerdem war das Forschungs- und Entwicklungsvorhaben aus wissenschaftlicher, technischer und wirtschaftlicher Sicht risikoreich, da zunächst mittels EcoTILLING umfangreich überprüft werden musste, ob und inwieweit merkmalsinaktivierende Mutationen in Allelen aus Wildpopulationen der Kartoffel tatsächlich vorliegen. Ferner wurden mittels TILLING Defektallele induziert und identifiziert.

Für den Züchtungspartner ergeben sich aus Ergebnissen dieses Teils des »ADLATUS«-Projektes erst nach mehrjähriger Weiterentwicklung von Zuchtmaterial Einnahmen aus Saatkartoffelverkäufen. Da die Entwicklung von Zuchtmaterial und die spätere Kommerzialisierung zwar aussichtsreich, letztendlich aber ergebnisoffen und risikoreich sind, war eine Förderung der geleisteten Arbeiten gerechtfertigt.

II.4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschrittenen Verwertungsplanes

Für die im Projekt in den TILLING-Populationen identifizierten neuen, rezessiven Allele der P-Proteine und des Translations-Initiationsfaktor eIF4E können direkten Eingang in die Sortenzüchtung finden. Ein Schutzrecht wird nicht angestrebt. Ob mit Hilfe von TILLING neue Allele mit geeigneten Phänotypen identifiziert werden konnten, hängt von der funktionellen Redundanz der Zielgene im Genom der Kartoffel ab. Mit Hilfe der genomeditierten Pflanzen kann dies überprüft werden. Bei Erfolg, können die identifizierten neuen rezessiven Allele auf ihre Wirksamkeit gegen weitere Pathogene überprüft werden.

Eine erfolgreiche Identifizierung resistenzvermittelnder, rezessiver Allele der P-Proteine bzw. des Translations-Initiationsfaktors eIF4E bietet die Möglichkeit in Folgeprojekten in weiteren Kulturpflanzen natürliche/induzierte Allele dieser Gene zu identifizieren.

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

(Darstellung der aktuellen Informationsrecherchen nach Nr. 2.1 BNBest-BMBF 98 oder Nr. 1.2 NABF für AZA bzw. Nr. 6.1 NKBF 98 oder Nr. 1.2 NKFB 2017 für AZK).

EP4125339A1 PLANTS WITH IMPROVED NEMATODE RESISTANCE Syngenta Crop Protection (CH), INRA (FR), Univ Cote D'Azur (FR), Centre Nat Res Sci (FR); Plants with inactive SmD1 gene resulting in increased RKN resistance. Major claims lack novelty, all except last claims lack inventive step

Valencia-Ortiz M et al. „Biogenic VOCs Emission Profiles Associated with Plant-Pest Interaction for Phenotyping Applications“. Sensors (Basel). 2022 Jun 28;22(13):4870. doi: 10.3390/s22134870

Kuroiwa K et al. „An iterative gene-editing strategy broadens eIF4E1 genetic diversity in Solanum lycopersicum and generates resistance to multiple potyvirus isolates“, Plant Biotechnol J. 2023 Jan 30. doi: 10.1111/pbi.14003

Lucioli A et al; ”CRISPR-Cas9 Targeting of the eIF4E1 Gene Extends the Potato Virus Y Resistance Spectrum of the Solanum tuberosum L. cv. Desirée”, Front Microbiol. 2022 Jun 1;13:873930. doi: 10.3389/fmicb.2022.873930.

Cowan G et al, “A new simple and effective method for PLRV infection to screen for virus resistance in potato”, J Virol Methods. 2023 Feb 12;315:114691. doi: 10.1016/j.jviromet.2023.114691.

Filialuna O at al,”What is the Optimal Way to Assess Meloidogyne Spp. Reproduction in Greenhouse Pot Experiments?”, J Nematol. 2022 May 18;54(1):20220012. doi: 10.2478/jofnem-2022-0012

Clark C et al,”Did Myzus persicae (Sulzer) from potato reared on a novel host for 15 years retain its host-related properties?”, Bull Entomol Res. 2022 Oct;112(5):626-635. doi: 10.1017/S0007485321001218

Projekt LWV20047, Building blocks for solving the bottleneck Trichodorides and TRV in the system approach for arable farming on light soils

https://projecten.landbouwwatervoedsel.nl/project/strategische-kennis-voor-de-preventie-van-bacterieziekten-in-de-pootaardappelteelt/

Holland Innovative Potato; https://hollandinnovativepotato.nl/onderzoek/

Diese hatten keinen Einfluss auf den Erfolg des Projektes.

II.6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichung des Ergebnisses

Die im Projekt erzielten Ergebnisse sollen in Fachzeitschriften veröffentlicht, sowie auf Konferenzen vorgestellt werden. Die identifizierten neuen Allele aus den Öko-/TILLING Populationen sind weniger zur Präsentation, sondern vorrangig zum Einsatz in der praktischen Züchtung und für das Screening nach weiteren wertgebenden neuen Allelen im Kartoffelsortiment und in Wildkartoffelpopulationen geeignet.