

Genetische Diversität für die Widerstandsfähigkeit gegen Schaderreger bei Kartoffel

Improvements in the genetic diversity of potato associated with resistance to diseases and pests

Ramona Thieme*, Thilo Hammann & Marion Nachtigall

Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Erwin-Baur-Str. 27, D-06484 Quedlinburg,

Rudolf-Schick-Platz 3a, OT Groß Lüsewitz, D-18190 Sanitz, zl@jki.bund.de

* Korrespondierender Autor, ramona.thieme@jki.bund.de, +49(0)38209 45205

In Kooperation mit Kollegen aus:

Deutschland, Russland, Rumänien, China, Polen, Finnland, Kanada, Vietnam

DOI: 10.5073/jka.2012.436.023

Zusammenfassung

Zur Erweiterung der genetischen Diversität der Kulturkartoffel wurde ein umfangreicher Wildkartoffel-Genpool auf bislang züchterisch noch ungenutzte wertvolle Genvarianten für Krankheitsresistenz evaluiert. Verschiedene mögliche Resistenndonoren wurden hinsichtlich ihrer züchterischen Nutzung analysiert. Durch den Einsatz der somatischen Hybridisierung können auch Wildkartoffelarten, die bisher aufgrund ihrer Kreuzungsbarrieren nur schwer für die Züchtung zugänglich waren, in Züchtungsprogramme integriert werden. Somit kann der Genpool der Kulturkartoffel stetig erweitert und die genetische Diversität für Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten (Virosen, Bakterien) und Schädlinge (Blattläuse, Kartoffelkäfer) nachhaltig verbessert werden. Gegenwärtig sind Zuchtstämme mit geringerer Anfälligkeit für die Kraut- und Braunfäule verfügbar.

Stichwörter: Pflanzengenetische Ressourcen, Wildkartoffelarten, Protoplastenfusion, Kartoffelvirus Y, Kraut- und Braunfäule, Kartoffelzuchtprogramm

Abstract

In order to increase the genetic diversity of common potato, *Solanum tuberosum*, wild diploid tuber-bearing Mexican potato species were screened for genetic variants that could be used in breeding programmes to improve the resistance of potato to diseases and pests. Genebank accessions of *Solanum cardiophyllum*, *S. pinnatisectum* and *S. tarnii* are extremely resistant to potato virus Y, late blight and Colorado potato beetle, and those of *S. bulbocastanum* and *S. demissum* to late blight and nematodes. Somatic hybridization by protoplast fusion or inter-specific crosses can be used to combine the genomes of these wild species with that of cultivated potato. Methods, like *in situ* hybridization techniques (GISH), flow cytometry, molecular markers and phytopathological analysis are used to select plant material with these important characters. Recently, breeding lines with improved resistance to pathogens and pests and acceptable agronomic traits have been developed and are being integrated into pre-breeding material in potato breeding programmes. This plant material is also of interest for fundamental research on the genetics of resistance in plants to pests and diseases.

Keywords: Plant genetic resources, wild potato species, protoplast fusion, Potato virus Y, late blight, potato breeding programme

Einleitung

Der Begriff der biologischen Vielfalt umfasst unterschiedliche Aggregationsebenen, nämlich die Vielfalt der Lebensgemeinschaften (Biozönosen) von Tieren, Pflanzen, Mikroorganismen und Viren, die Vielfalt der Arten und die genetische Vielfalt innerhalb der Arten. Diese biologischen Komponenten stehen sowohl untereinander als auch mit den abiotischen Komponenten ihres Lebensraumes in Wechselwirkung (OTT *et al.*, 2007). Die innerartliche Vielfalt ist dem unmittelbaren menschlichen Erfahrungshorizont weitgehend verborgen und wird daher in der Diskussion um die

biologische Vielfalt in Agrarlandschaften nicht selten verkürzt behandelt. Dabei hat sie grundlegende Bedeutung für die Bemessung des Spielraumes, der uns für die Anpassung unserer Kulturpflanzen an sich wandelnde Umwelt- und Produktionsbedingungen und Anforderungen des Marktes zur Verfügung steht. Im Hinblick auf die Gesundheit unserer Kulturpflanzen ist das Auftreten von Krankheitserregern mit neuen Virulenzen, welche die vorhandenen Krankheitsresistenzen überwinden können, ein Thema von fortdauernder Aktualität und Dringlichkeit. Darüber hinaus ist mit vom Klimawandel bewirkten Änderungen in der Abundanz und im Artenspektrum von Schaderregern zu rechnen. Vor diesem Hintergrund sind adaptierte, widerstandsfähige Kulturpflanzen als Teil landwirtschaftlich geprägter Lebensgemeinschaften (Äcker, Wiesen, Obstplantagen etc.) und als Komponente des nachhaltigen Resistenzmanagements im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes unentbehrlich. Widerstandsfähige Kulturpflanzen ermöglichen es, den Aufwand an chemischem Pflanzenschutz zu vermindern. Sie tragen hierdurch zur Förderung einer insgesamt artenreichen Agrarlandschaft bei.

Die Widerstandsfähigkeit unserer Kulturpflanzen gegenüber Schaderregern kann nur aufrechterhalten und verbessert werden, wenn mit Hilfe geeigneter Züchtungsmethoden ein breites Spektrum genetischer Ressourcen für die Resistenzzüchtung erschlossen wird. Das Ausgangsmaterial, welches für die Resistenzzüchtung bei der Kartoffel zur Verfügung steht, und Züchtungsmethoden zur Erschließung der genetischen Diversität dieses Materials für die Züchtung gesunder Kartoffeln werden im vorliegenden Beitrag exemplarisch beschrieben.

Bewertung pflanzengenetischer Ressourcen (PGR)

Bisher sind etwa 18 Wildkartoffelarten der Gattung *Solanum*, darunter *S. demissum* (*dms*), als PGR für Resistenzgenen gegen *Phytophthora infestans* (*P.i.*) und andere Pathogene bekannt und in die Sortenentwicklung in Europa und Nordamerika einbezogen worden. Züchterisch bislang nicht genutzte PGR aus dem Wildkartoffel-Genpool stehen in Genbanken zur Verfügung. Von besonderem Interesse sind die in der Andenregion vorkommenden Wildarten, die für ihre Resistenz gegen verschiedene Schaderreger bekannt sind und bislang in der Sortenzüchtung weitgehend unbeachtet geblieben sind. Unsere Arbeiten sind auf die Verbesserung der Widerstandsfähigkeit gegen das Kartoffelvirus Y (PVY) und die Kraut- und Braunfäule (*P.i.*) fokussiert. Weiterhin werden Akzessionen von Wildarten sowie Zuchtklone auch auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Virusvektoren, Kartoffelkäfer und Kartoffelnematoden untersucht.

Erschließung genetischer Diversität für die Resistenzzüchtung

In Kooperation mit internationalen Partnern aus Forschung und Praxis werden am JKI divergente Kreuzungseltern mit verbesserter Anpassungsfähigkeit an neue Schaderregerpopulationen unter sich verändernden Klimabedingungen selektiert. Die daraus resultierenden neuen, wertvollen Genvarianten werden unter Anwendung von Züchtungsmethoden, die sich sowohl genomanalytischer Ansätze als auch fortgeschrittener Reproduktionsmethoden (SMART¹ Breeding) bedienen, in adaptiertes Zuchtmaterial eingekreuzt.

Es werden verschiedene Ansätze verfolgt:

- Erzeugung interspezifischer somatischer Hybriden (Wildart + Kartoffelsorte) durch Protoplastenfusion (Abb. 1) und ihre Identifizierung durch genomische In-situ-Hybridisierung (Abb. 2), Flowzytometrie und molekulare Marker (Abb. 3, THIEME *et al.*, 2008)
- Erzeugung interspezifischer Hybriden durch Artkreuzung

In beiden Fällen schließen sich Rückkreuzungen der Hybriden mit der Kulturkartoffel und die Auslese von Rückkreuzungsnachkommen auf züchterisch relevante Eigenschaften wie Widerstandsfähigkeit gegen Schaderreger (Abb. 4–7), Qualität, Ertrag und Veredlungseignung an.

¹ Selection with Markers and Advanced Reproductive Technologies

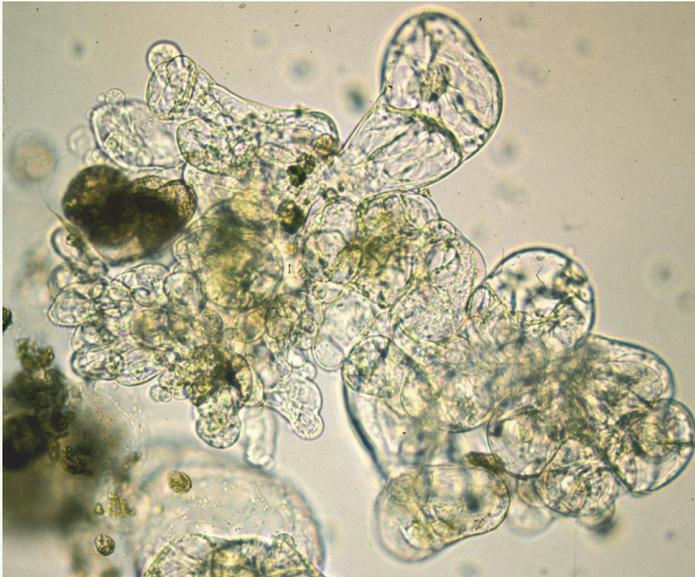


Abb. 1 Bildung von Zellaggregaten nach Protoplastenfusion als Voraussetzung für die Regeneration von Sprossen zur Erzeugung somatischer Hybriden

Fig. 1 *Production of somatic hybrids by protoplast fusion, the induction of cell aggregates and regeneration of plants*

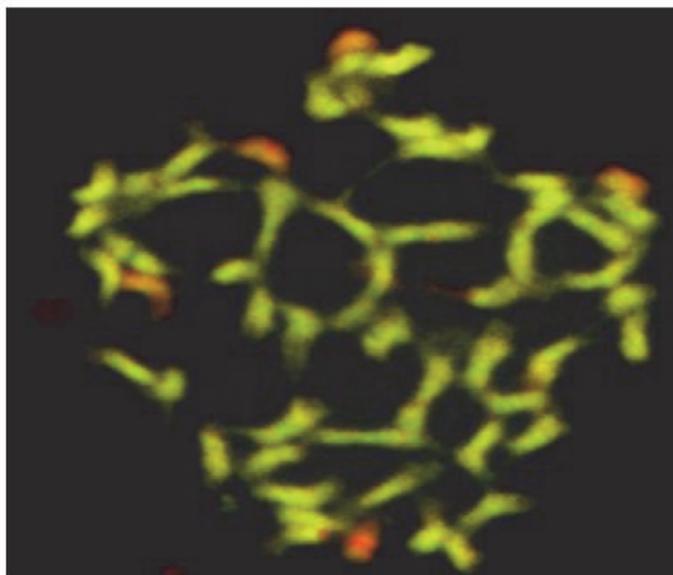


Abb. 2 Charakterisierung der Hybriden und Nachkommen durch In-situ-Hybridisierung: Zelle einer Pflanze der zweiten Rückkreuzungsgeneration mit verbliebenen fünf Chromosomen der Wildart *S. tarnii* (rot) und 48 Chromosomen der Kulturkartoffel (gelb)

Fig. 2 *Characterization of the hybrids and progenies by in-situ hybridization: a cell of a second backcross generation plant carrying five chromosomes of the wild potato species *S. tarnii* (red) and 48 chromosomes of cultivated potato (yellow)*

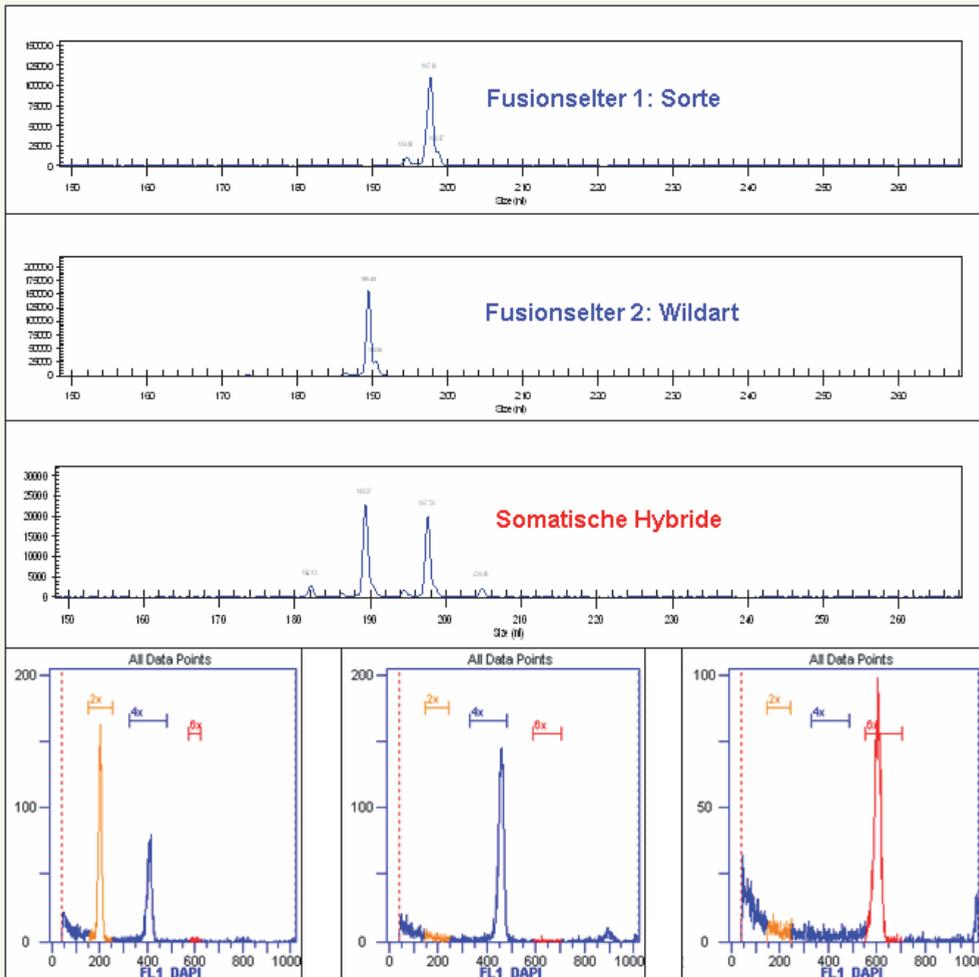


Abb. 3 Identifizierung einer somatischen Hybride durch molekulare Marker (oben) und Bestimmung der Ploidiestufe durch Flowzytometrie: diploide Wildart ($2n=2x=24$), tetraploide Kulturkartoffel ($2n=4x=48$) und hexaploide Hybride ($2n=6x=72$)

Fig. 3 Identification of a somatic hybrid using molecular markers (above) and flow cytometry for estimating ploidy level: diploid wild species ($2n=2x=24$), tetraploid potato ($2n=4x=48$) and hexaploid hybrid ($2n=6x=72$)

Ergebnisse und Diskussion

Nach umfangreichen Untersuchungen mit für Pathogene und Schaderreger spezifischen Nachweistests im Labor, Gewächshaus bzw. Feld wurde in Genbankherkünften der mexikanischen Wildarten *S. cardiophyllum* (*cph*), *S. pinnatisectum* (*pnt*) und *S. tarnii* (*trn*) extreme PVY-Resistenz, Resistenz gegen *P.i.* sowie Kartoffelkäfer nachgewiesen. Akzessionen von *S. bulbocastanum* (*blb*) zeigen hohe *P.i.*-Resistenz und die von *dms* hohe *P.i.*- und Nematodenresistenz. Es wurden zahlreiche Artbastarde und mehr als 1600 somatische Hybriden zwischen den genetisch weit entfernten Kreuzungspartnern der Kulturkartoffel und Wildkartoffelarten erzeugt. Basierend auf Kombinationen von ausgewählten fertilen Hybridpflanzen mit der Kulturkartoffel sind u. a. Nachkommen aus *cph*-, *pnt*- und *trn*-Hybriden mit extremer PVY-Resistenz und agronomisch verbesserten Merkmalen

entstanden (Abb. 4, THIEME *et al.*, 2008; 2010). Da es durch Einsatz der genomischen In-situ-Hybridisierung möglich ist, die elterlichen Genome in den Hybridpflanzen oder auch einzelne Chromosomen oder Chromosomenabschnitte von Wildart- und Kulturart-Elter optisch voneinander zu differenzieren, ist die im Laufe mehrerer Rückkreuzungen erfolgende, schrittweise Reduzierung der Wildart-Chromosomen in den Nachkommen direkt zu verfolgen (Abb. 2). Mittlerweile liegen Stämme mit extremer Widerstandsfähigkeit gegen PVY aus der 4. Rückkreuzungsgeneration vor. Diese Stämme tragen nur noch 1–3 Chromosomen aus *trn*. Weitere Kreuzungen dieses Materials mit Kulturkartoffeln unter Selektion auf PVY-Resistenz werden schließlich zu resistenten und agronomisch akzeptablen Kartoffelzuchtklonen führen.

In weiteren Untersuchungen zum Befall durch Virusvektoren wurden eine hohe Mortalität und eine verringerte Gewichtszunahme bei Blattläusen an *trn* sowie Hybriden mit *trn*-Genomanteilen ermittelt. Einige Rückkreuzungsnachkommen erwiesen sich als Wirtspflanzen mit verminderter Nahrungsqualität für die Kartoffel besiedelnde Grüne Pflirsichblattlaus (*Myzus persicae*).

Durch die Verwendung von molekularen Markern für bereits gefundene *Rpi-blb*-Gene konnten (*blb* + Delikat)-Hybriden und Nachkommen mit verbesserter Krautfäuleresistenz ausgelesen werden (Abb. 5). Unter besonderer Beachtung des Zuchtziels der horizontalen Resistenz gegen Kraut- und Braunfäule wurden durch kontinuierliche Selektion Kartoffelstämme erzeugt, die hohe *P.i.*-Resistenz mit günstigen agronomischen Merkmalen, guter Speiseeignung und Verarbeitungseigenschaften vereinen (Abb. 7, HAMMANN *et al.*, 2009). In einigen Zuchtklonen höherer Rückkreuzungsgenerationen ist es uns gelungen, die Abhängigkeit zwischen *P.i.*-Resistenz und später Abreife zu durchbrechen (Abb. 6). In einem dreijährigen Forschungsprojekt konnten in diesem Zusammenhang zwei QTL (erklärte genetische Varianz: 47 % bzw. 7 %) für reifekorrigierte *P.i.*-Resistenz auf Chromosom IV bzw. XI identifiziert werden (TRUBERG *et al.*, 2009).

Die Hybriden, welche im Zuge der genetisch-züchterischen Erschließung von Wildkartoffeln erzeugt worden sind, bieten ein wertvolles Ausgangsmaterial für die Verbreiterung der genetischen Diversität innerhalb des Kulturkartoffelgenpools. Als züchterisch adaptiertes Basismaterial kann es nicht nur in die Sortenentwicklung einfließen, sondern ist darüber hinaus auch für grundlagenorientierte Fragestellungen in der Resistenzforschung von Interesse.

Die in unseren Untersuchungen verwendeten Wildkartoffelarten stammen aus Süd- bzw. Mittelamerika, wo sie in ihren natürlichen Lebensräumen für die Kartoffelzüchtung wichtige Eigenschaften entwickelten. Den Modellrechnungen von JARVIS *et al.*, (2008) zufolge könnte der Klimawandel in den kommenden 30 Jahren die Lebensräume dieser Wildarten nachteilig beeinflussen und ihre Verbreitungsareale verkleinern oder verändern. Auch die Auslöschung einzelner Arten ist nach JARVIS *et al.*, (2008) zu erwarten, was den Verlust züchterischer Optionen nach sich ziehen wird. Unsere Untersuchungen an Wildarten zur Widerstandsfähigkeit gegenüber Schaderregern unterstreichen die Bedeutung, die der In-situ-Schutz pflanzengenetischer Ressourcen hat. Durch den Aufbau genetischer Schutzareale (FRESE *et al.*, 2012) in Süd- und Mittelamerika würden nicht nur wertvolle Ausgangsressourcen der Pflanzenzüchtung erhalten, sondern auch evolutionäre Prozesse von Mutation, Rekombination und Selektion aufrecht erhalten, die in der Vergangenheit züchterisch wertvolle Merkmalsgene hervorbrachten und auch in Zukunft hervorbringen könnten.

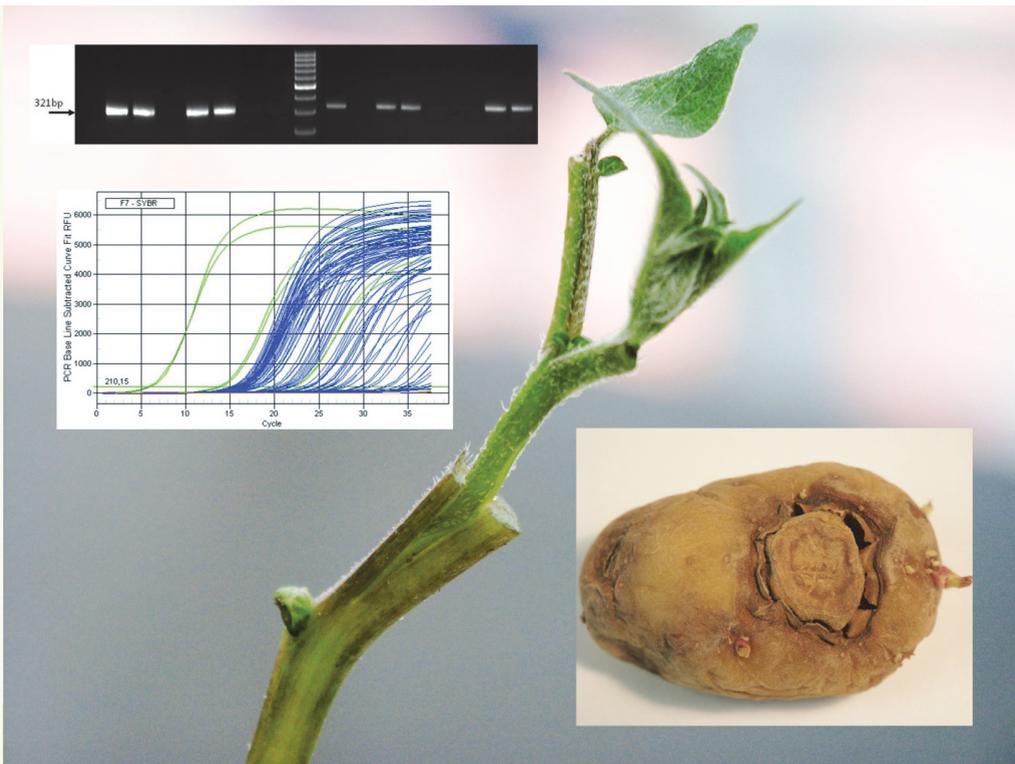


Abb. 4 Prüfung der Widerstandsfähigkeit gegen das Kartoffelvirus Y durch Pfropfung der Pflanzen auf eine mit PVY infizierte anfällige Kartoffelsorte und nachfolgendem quantitativen Virusnachweis (RT-qPCR)

Fig. 4 *Assessment of resistance to potato virus Y obtained by grafting the plant on to a susceptible and virus infected potato cultivar, which was confirmed using a quantitative virus test (RT-qPCR)*

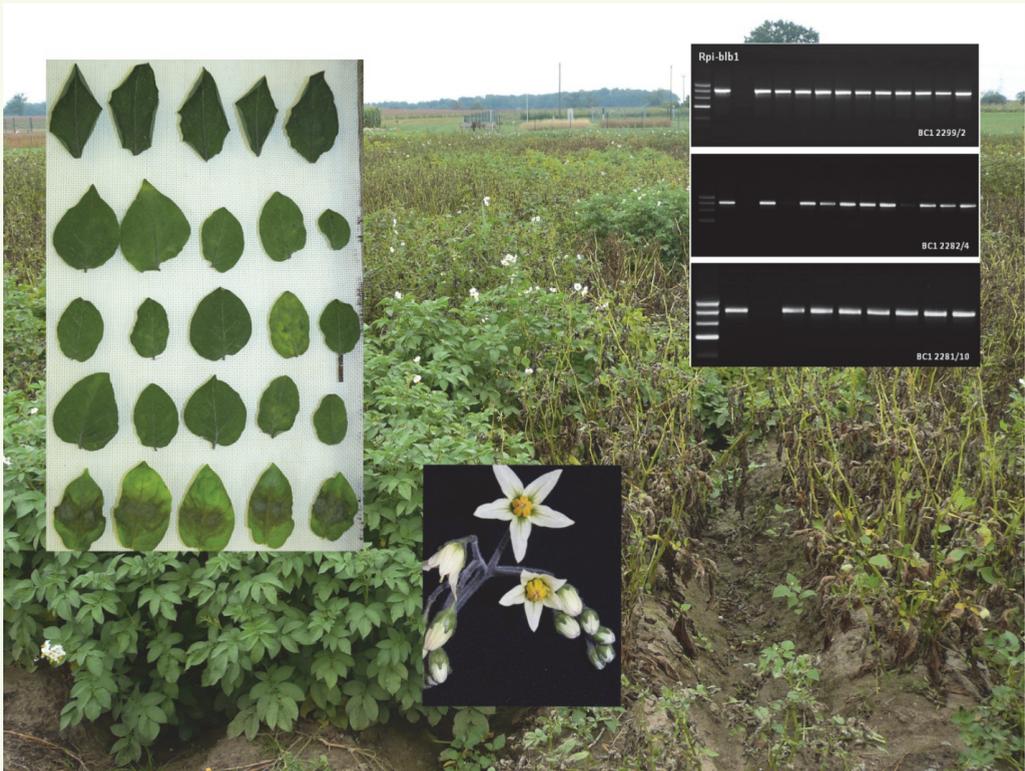


Abb. 5 Resistenzprüfung bei interspezifischen somatischen Hybriden und Nachkommen sowie Einsatz molekularer Marker zur Selektion von Zuchtstämmen mit verbesserter Krautfäuleresistenz

Fig. 5 Assessment of resistance to late-blight of inter-specific somatic hybrids and progenies by a detached leaflet assay and use of molecular markers to select breeding lines with improved resistance to foliage blight

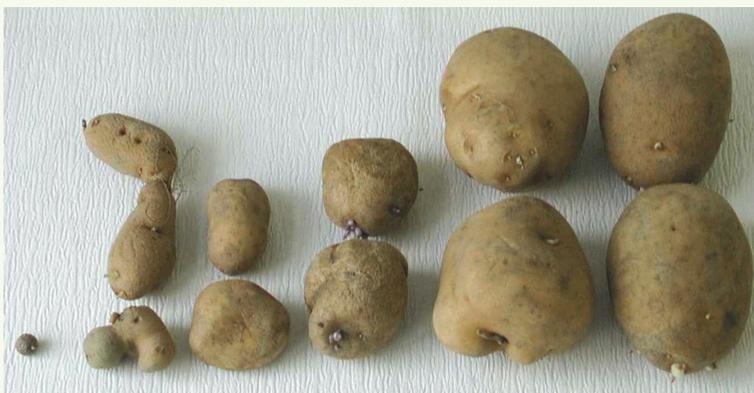


Abb. 6 Zuchtfortschritt in der Knollenform bei Kartoffelzuchtstämmen (BC) nach Kreuzung mit *S. demissum* (*dms*)

Fig. 6 Breeding progress for good tuber shape in potato pre-basic material after crossing potato cultivar and *S. demissum* (*dms*) followed by continued back crossing (BC₁ to BC₅)

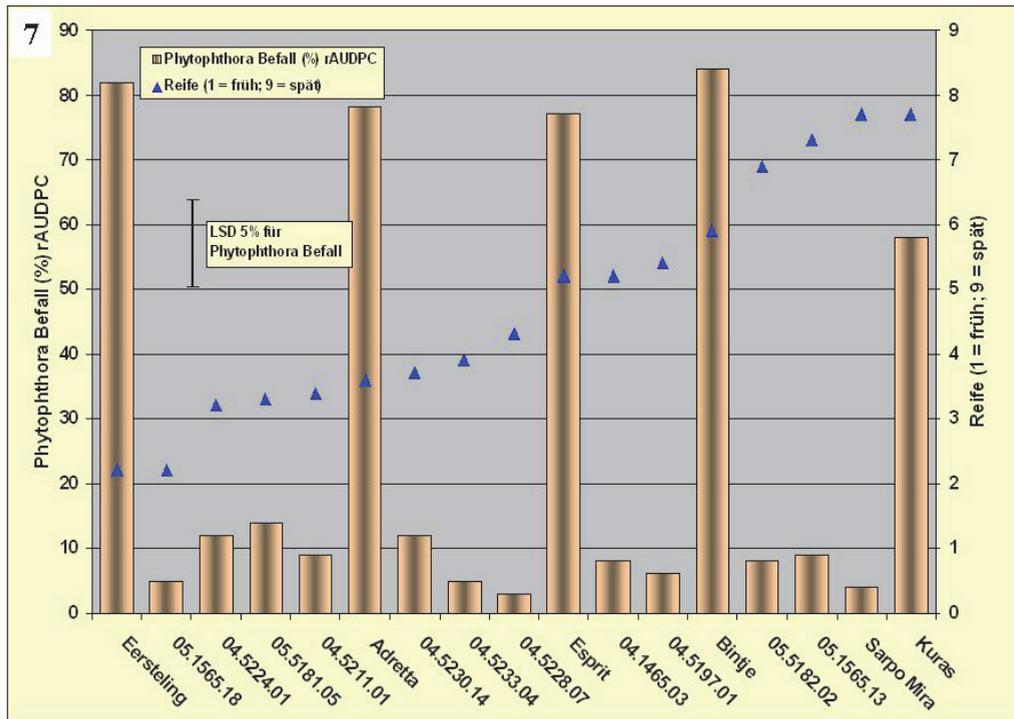


Abb. 7 Krautfäulebefall (*Phytophthora infestans*), gemessen als relative Fläche unter der Befallskurve (rAUDPC), und Reifezeit von ausgewählten Kartoffelzuchtstämmen und Standardsorten in Groß Lüsewitzer Feldversuchen

Fig. 7 Infestation of foliage blight (*Phytophthora infestans*) calculated in terms of relative Area Under Disease Progress Curve (rAUDPC) and time of maturation of selected potato breeding lines and standard cultivars in field trials at Groß Lüsewitz

Danksagung

Besonderer Dank gilt den Kooperationspartnern des In- und Auslandes, dem DAAD und dem BMELV für die finanzielle Unterstützung zahlreicher bilateraler Kooperationsprojekte.

Literatur

FRESE, L., C. GERMEIER und M. NACHTIGALL, 2012: Identifizierung, Aufbau und Ausbau genetischer Schutzgebiete für wildlebende Verwandte unserer Kulturarten (WVK). JKI-Archiv in diesem Journal.

HAMMANN, T., B. TRUBERG und R. THIEME, 2009: Improving resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) by using interspecific crosses in potato (*Solanum tuberosum* ssp.). Proceedings of the 3rd Internat. Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe, Berlin-Dahlem, Germany, 14 – 16 May 2009, In: Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors: Current Potential and Future Demands. Eds.: FELDMANN, F., D.V. ALFORD und C. FURK, Braunschweig, DPG Verlag, 407-414.

JARVIS, A., A. LANE und R. J. HUMANS, 2008: The effect of climate change on crop wild relatives. Agriculture, Ecosystems and Environment **126**, 13-23. doi:10.1016/j.agee.2008.01.013

OTT, K. H., R. GREGORIUS und I. KISSLING, 2007: Biodiversität als Lebensgrundlage – Grundprinzipien zu Schutz und Nutzung. In: Biodiversität – Schlüsselbegriff des Naturschutzes im 21. Jahrhundert. Hg.: T. POTTHAST, BfN, Bonn-Bad Godesberg, 85-222.

THIEME, R., E. RAKOSY-TICAN, T. GAVRILENKO, O. ANTONOVA, J. SCHUBERT, M. NACHTIGALL, U. HEIMBACH und T. THIEME, 2008: Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC₁ progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. Theor. Appl. Genet. **116**, 691-700.

THIEME, R., E. RAKOSY-TICAN, M. NACHTIGALL, J. SCHUBERT, T. HAMMANN, O. ANTONOVA, T. GAVRILENKO, U. HEIMBACH und T. THIEME, 2010: Introduction of multiple resistance traits of *Solanum cardiophyllum* Lindl. into commercial potato cultivars by somatic hybridization. Plant Cell Reports **29**, 1187-1201.

TRUBERG, B., R. THIEME, T. HAMMANN und U. DARSOW, 2009: A QTL study on quantitative maturity-corrected resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). Proceedings of the 3rd Internat. Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe, Berlin-Dahlem, Germany, 14 – 16 May 2009, In: Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors: Current Potential and Future Demands. Eds.: FELDMANN, F., D.V. ALFORD und C. FURK, Braunschweig, DPG Verlag, 415-418.