

Bernd Truberg¹, Thilo Hammann¹, Ulrich Darsow¹, Hans-Peter Piepho²

Empirischer Vergleich verschiedener Methoden zur Reifekorrektur von Daten zum Befall mit Krautfäule (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) in Selektionsexperimenten bei der Kartoffel (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*)

Empirical comparison of different methods for correcting late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) data for maturity in selection experiments of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*)

77

Zusammenfassung

Ein Vergleich verschiedener Maßzahlen zur Ermittlung der Resistenz gegenüber Krautfäule bei Kartoffel wurde mit Hilfe des multivariaten Verfahrens der Clusteranalyse durchgeführt. Bei der Darstellung einer Gruppe von Maßzahlen kam das BLUP-Verfahren (Best Linear Unbiased Prediction) zur Anwendung. Die Maßzahl rAUDPC_3, die vom Abreifeverhalten des jeweiligen Genotyps abhängt, wird zur Erfassung der reifekorrigierten Resistenz favorisiert, da sie bei ansonsten ähnlichem Verhalten mit den wenigsten theoretischen Annahmen im Vergleich zu den anderen Maßzahlen auskommt.

Stichwörter: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, reifekorrigierte Resistenz, BLUP, AUDPC, Clusteranalyse

Abstract

A comparison of different measures to calculate resistance against late blight in potato was accomplished by means of the multivariate statistical tool of cluster analysis. One group of measures was based on the BLUP technique (Best Linear Unbiased Prediction). The measure rAUDPC_3, which takes into consideration the maturity group of the respective genotype, is recommended to

capture maturity-corrected resistance, because of less theoretical assumptions with otherwise similar behaviour as compared to the rest of the measures.

Key words: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, maturity-corrected resistance, BLUP, AUDPC, cluster analysis

Einleitung

Verzögerter Krautfäulebefall und späte Abreife erscheinen bei der Kulturkartoffel (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) korreliert (WASTIE, 1991). Eine Selektion auf scheinbare Krautfäuleresistenz führt damit zu einer indirekten Selektion auf späte Abreife. Späte Abreife ist jedoch eine züchterisch unerwünschte Eigenschaft. Solche negativen Korrelationen zwischen züchterisch relevanten Merkmalen sind bei vielen Kulturarten bekannt. So sind z.B. beim Mais Flächenertrag und Frühreife oder bei der Zuckerrübe Zuckerertrag und Zuckergehalt negativ miteinander korreliert. Allen Fällen gemeinsam ist das Problem des korrigierten Vergleichs in einem der Merkmale bei verschiedenen Ausprägungen des anderen Merkmals. Um eine Selektion auf Krautfäuleresistenz ohne gleichzeitige Selektion auf späte Abreife zu ermöglichen, wurden verschiedene reifekorrigierte Maßzahlen

Institut

Julius Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Quedlinburg¹
Universität Hohenheim, Institut für Pflanzenbau und Grünland, Fachgebiet Bioinformatik, Stuttgart²

Kontaktanschrift

Dr. Bernd Truberg, Julius Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, OT Groß Lüsewitz, 18190 Sanitz, E-Mail: bernd.truberg@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

Juli 2008

vorgeschlagen. Die Reifekorrektur des Krautfäulebefalls führt zur Ermittlung der quantitativen Krautfäuleresistenz. Die Reifekorrektur ist nicht nur für die züchterische Selektion notwendig, sondern auch für die genetische Analyse mittels molekularer Marker. Nachfolgend soll ein Vergleich dieser Verfahren am Beispiel eines empirischen Datensatzes erfolgen.

Material und Methoden

Die Daten wurden an einer Vollgeschwister-Gruppe, die auf eine Kreuzung heterozygoter Eltern zurückgeht, erfasst. Mutter der Vollgeschwister-Gruppe ist der Klon GL-93.7015.04 aus dem Züchtungsforschungsprogramm des Julius Kühn-Instituts; Vater ist die zugelassene Sorte 'Delikat' (DARSOW, 2008). Die Population umfasst 302 Klone.

Der Befall mit *Phytophthora infestans* wurde in den Jahren 2004, 2005 und 2006 am Standort Groß Lüsewitz in jeweils zwei Wiederholungen in einer randomisierten vollständigen Blockanlage erfasst. Zu diesem Zweck wurde eine künstliche Inokulation vorgenommen. Als Inokulationszeitpunkt wurde das Blühende der mittelfrühen Sorte 'Adretta' gewählt. Zur Inokulation wurde eine Sporensuspension mit 12.000 Zoosporen/ml mit der Rückenspritze ausgebracht. Je Klon wurden zwei bodennahe Blätter einer Randpflanze an der Blattunterseite inokuliert. Die Inokulation erfolgte bei Lufttemperaturen unter 16°C und hoher Luftfeuchtigkeit in den Abendstunden bei Taubildung. Durch Beregnung und Windschutz wurde die Ausbreitung der Krautfäule in geeignetem Maße unterstützt.

Ausgangsmaterial für die Erstellung der Sporensuspension war ein Isolat mit hoher quantitativer Pathogenität mit der Virulenzkombination V1 bis V11, das auf Knollenscheiben vermehrt wurde.

Der Befall wurde als Prozent Krautfall in der Parzelle an 16 bis 19 Terminen in der Zeit von Mitte Juli bis Mitte September bewertet.

Eine Erfassung des Reifeverhaltens aller Linien wurde in einer mit Fungiziden befallsfrei gehaltenen Variante des Versuchs in Form einer Bonitur von 1 bis 9 vorgenommen. Der Boniturnote 1 steht dabei für extrem frühe Abreife und die Boniturnote 9 für sehr späte Reife. Die Reifebonitur erfasst die Blatt- und Stängelvergilbung im Vergleich zu Standardsorten mit definierter Abreife.

AUDPC-Werte

Der AUDPC-Wert ist die Fläche unter der Befallsverlaufskurve (AUDPC – Area Under Disease Progress Curve), die sich aus den einzelnen Erhebungsterminen ergibt. Der AUDPC-Wert wird nach Formel (1) berechnet (SHANER und FINNEY, 1977):

$$(1) \quad AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\left(\frac{x_{i+1} + x_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i) \right)$$

mit

i – Index für den Boniturtermin

x_i – Befallswert in % zum Boniturtermin i

t_i – Boniturtermin i in Tagen

In dieser Untersuchung wurde der AUDPC-Wert auf drei Arten berechnet, die nachfolgend mit AUDPC_1 bis AUDPC_3 bezeichnet werden.

AUDPC_1: Der letzte Boniturtermin (t_n) je Genotyp ergibt sich, sobald 100% Krautfall erreicht ist (DARSOW, 2008).

AUDPC_2: Der letzte Boniturtermin (t_n) ist ein vor Versuchsbeginn festgelegter, fixer Termin für alle Genotypen (BORMANN, 2003).

AUDPC_3: Der letzte Boniturtermin (t_n) orientiert sich an der Abreife des jeweiligen Genotyps (JOSHI et al., 2007).

rAUDPC-Werte

Der rAUDPC-Wert ist ein relativer AUDPC-Wert. Er ergibt sich aus der Relativierung des AUDPC-Wertes am höchstmöglichen AUDPC-Wert. Der höchstmögliche AUDPC-Wert wird im Folgenden max AUDPC genannt. Er wird berechnet nach Formel (2).

$$(2) \quad \max AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} ((100)(t_{i+1} - t_i))$$

Äquivalent dazu ist Formel (3).

$$(3) \quad \max AUDPC = (100)(t_n - t_1)$$

Der rAUDPC-Wert ergibt sich entsprechend aus Formel (4) (BORMANN, 2003).

$$(4) \quad rAUDPC = \frac{AUDPC}{\max AUDPC}$$

Der rAUDPC-Wert nimmt entsprechend Werte zwischen 0 und 1 an.

Abhängig davon, welcher AUDPC-Wert in die Berechnung eingeht, werden nachfolgend die Bezeichnungen rAUDPC_1 bis rAUDPC_3 verwendet.

rAUDPC_1: AUDPC_1 liegt der Berechnung zugrunde.

rAUDPC_2: AUDPC_2 liegt der Berechnung zugrunde.

rAUDPC_3: AUDPC_3 liegt der Berechnung zugrunde.

Δ rAUDPC-Werte

Aus der Regression der rAUDPC-Werte auf die Reifebonitur ergibt sich eine Regressionsgleichung zur Vorhersage der rAUDPC-Werte aus den Werten für die Reifebonitur in der Form von Formel (5).

$$(5) \quad \text{pred_rAUDPC} = a + b(\text{Reifebonitur})$$

mit

pred_rAUDPC – vorhergesagter Wert für rAUDPC

a – Achsenabschnitt der Regression von rAUDPC auf die Reifebonitur

b – Regressionskoeffizient der Regression von rAUDPC auf die Reifebonitur

Der Δ AUDPC-Wert entspricht dem Residuum der Regression auf die Reifezeit und ergibt sich aus Formel (6) (BORMANN, 2003).

$$(6) \quad \Delta rAUDPC = rAUDPC - \text{pred_}rAUDPC$$

Der Δ rAUDPC-Wert ist eine Maßzahl für die reifekorrigierte Resistenz.

Abhängig davon, welcher rAUDPC-Wert in die Berechnung eingeht, werden nachfolgend die Bezeichnungen Δ rAUDPC_1 bis Δ rAUDPC_3 verwendet.

Δ rAUDPC_1: rAUDPC_1 liegt der Berechnung zugrunde.

Δ rAUDPC_2: rAUDPC_2 liegt der Berechnung zugrunde.

Δ rAUDPC_3: rAUDPC_3 liegt der Berechnung zugrunde.

BLUP-Werte

Die BLUP-Werte (Best Linear Unbiased Prediction) wurden aus folgendem Modell, in der Syntax von PIEPHO et al. (2003), bestimmt:

$$Y = \text{REIFE} + \text{REIFE} \cdot \text{JAHR} : \text{JAHR} + \text{WDH} \cdot \text{JAHR} + \text{KLON} \cdot \text{JAHR} + \text{KLON}$$

Der Faktor Reife ist hierbei eine quantitative Variable, für die eine Regression durchgeführt wird. Für die Umsetzung in SAS PROC MIXED bedeutet dies, dass die REIFE nicht in die CLASS Anweisung geschrieben wird. Für die Zufallsvariable Y wurde der jeweils zu untersuchende Parameter eingesetzt.

Die Verwendung von BLUP-Werten zur Darstellung reifekorrigierter Befallswerte wurde von EMRICH et al. (2008) vorgeschlagen, um eine Reifekorrektur des Befalls von Winterweizen mit *Fusarium* vorzunehmen.

Die Berechnung erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS (SAS Institute Inc, 2004).

Korrelationen

Die Korrelationen zwischen den zu vergleichenden Parametern sowie der Reifebonitur wurden als Rang-Korrelationen nach Spearman (r_s) mit der Prozedur „corr“ in SAS (SAS Institute Inc, 2003) berechnet.

Clusteranalyse

Zur Gruppierung der Parameter wurde eine Clusteranalyse in dem Programm „R“ (R Development Core Team 2008) angewendet. Als Distanzmaß diente $1 - r_s$, als Algorithmus wurde „average linkage“ gewählt.

Varianzstabilisierende Transformation

Die Zusammenhänge zwischen Reife und Krautfäulebefall zeigen sich in Abb. 1: In Richtung Spätreife nimmt das Befallsniveau ab und die Variation zu. Beide Zusammenhänge spielen für die Reifekorrektur eine Rolle und legen die Anwendung einer varianzstabilisierenden Transformation der Befallsdaten zur Berechnung der Krautfäule-resistenz in Form der 3. Potenz (x^3) nahe.

Als varianzstabilisierende Transformation kam die Bildung der 3. Potenz (x^3) bei der Berechnung der BLUP-Werte aus den AUDPC-Werten und den rAUDPC-Werten zur Anwendung (Abb. 2). Daraus ergaben sich die Maßzahlen BLUP_AUDPC_1_X3, BLUP_rAUDPC_1_X3, BLUP_AUDPC_2_X3, BLUP_rAUDPC_2_X3, BLUP_AUDPC_3_X3 und BLUP_rAUDPC_3_X3.

Ergebnisse

Der Effekt der varianzstabilisierenden Transformation ist aus Abb. 2 ersichtlich. Die typische Keilform, wie sie bei den untransformierten Daten auftritt (Abb. 1), ist abgelöst von einem gleichmäßig breiten Band der Werte über alle Reifebereiche.

Die Korrelationsstruktur der zu vergleichenden Maßzahlen ist dem Dendrogramm in Abb. 3 zu entnehmen. Den Korrelationen liegen jeweils 302 Einzelwerte zugrunde.

Das Dendrogramm der Clusteranalyse zeigt eine deutliche Klassifizierung der Methoden in zwei Gruppen. Die im Dendrogramm rechts erscheinende Gruppe besteht aus AUDPC_1 und direkt daraus abgeleiteten Maßzahlen. In diese Gruppe fällt auch die Reife. Diese Gruppe

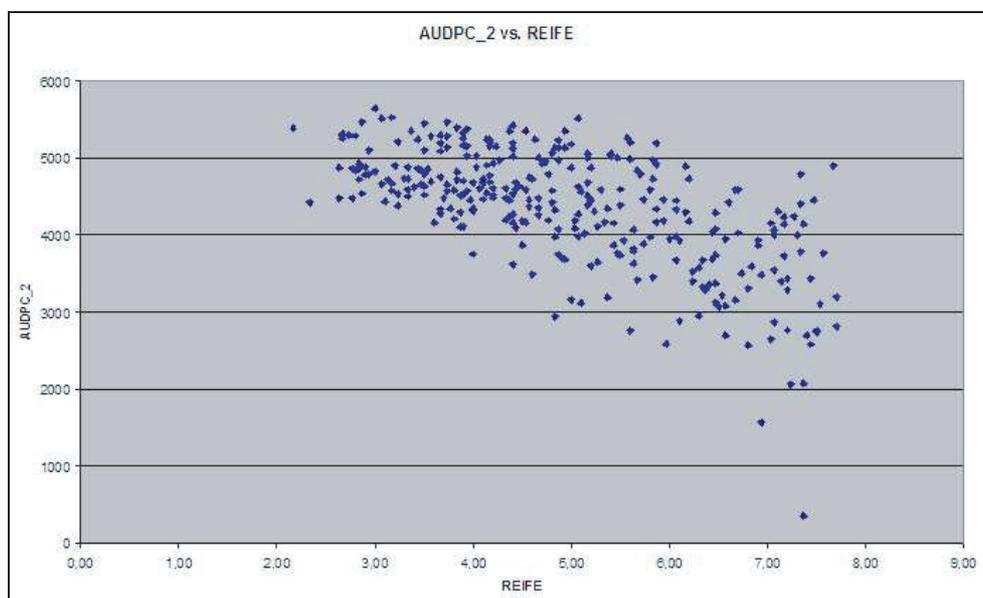


Abb. 1. Zusammenhänge zwischen Reife und Krautfäulebefall in dem verwendeten Datensatz: In Richtung Spätreife nimmt das Befallsniveau ab und die Variation zu.

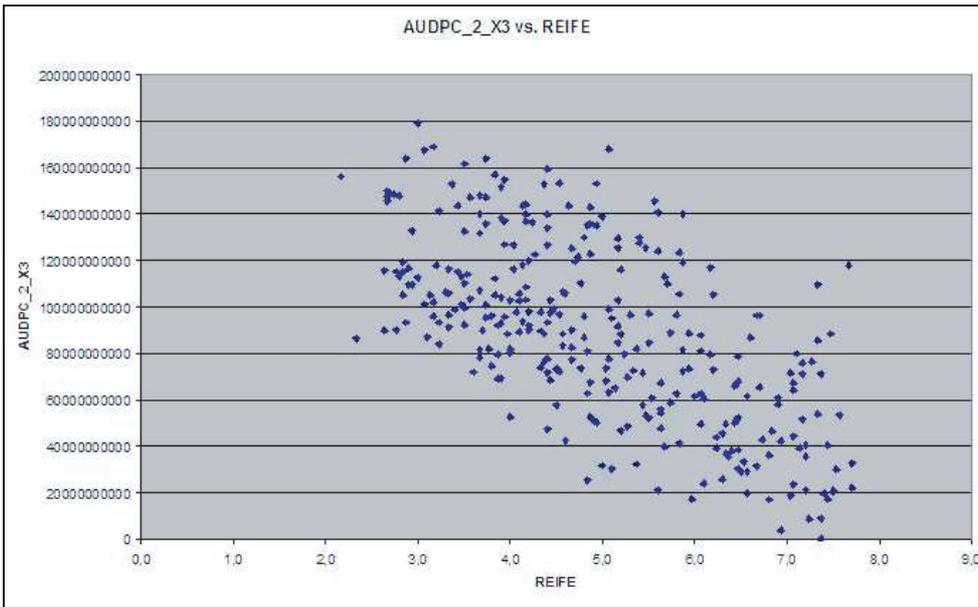


Abb. 2. Effekt der varianzstabilisierenden Transformation: Die Bildung der 3. Potenz (x^3) aus den AUDPC_2-Werten führt zu einer gleichmäßigen Streuung über alle Reifebereiche.

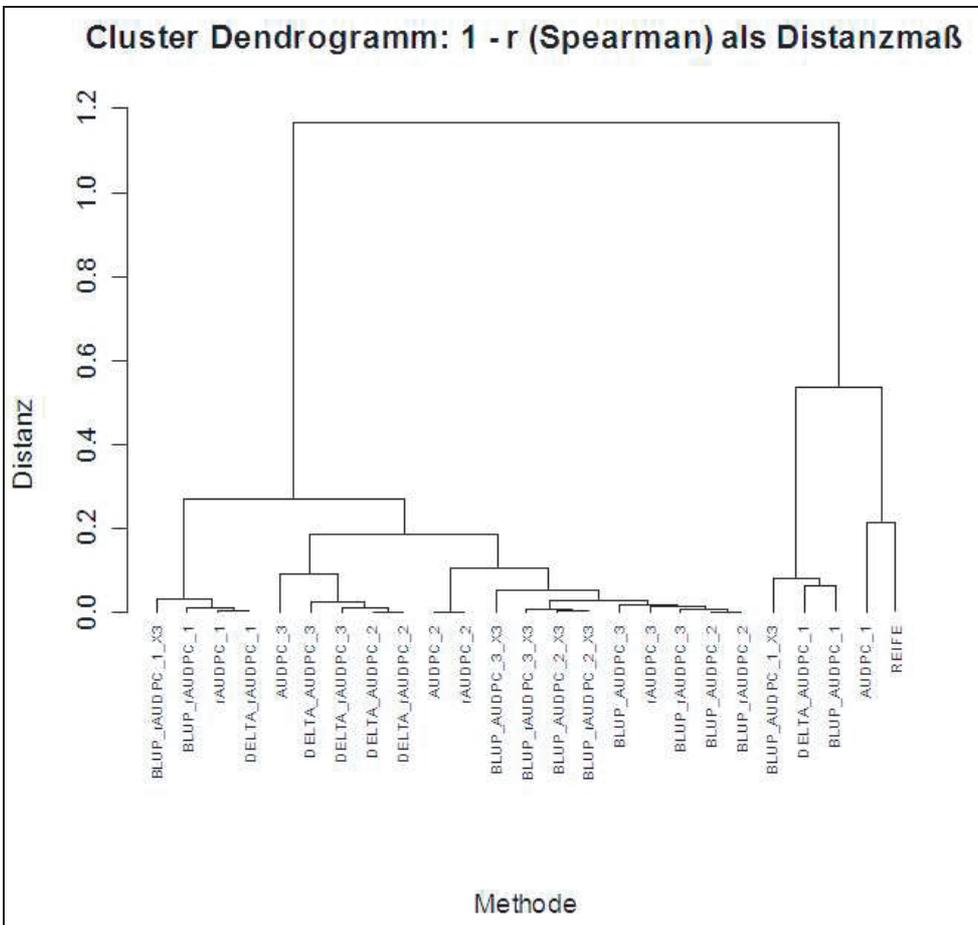


Abb. 3. Cluster-Dendrogramm der Methoden. Distanzmaß: $1 - r_s$. Algorithmus: average linkage. In die Berechnung der Korrelationen r_s gingen jeweils 302 Werte ein.

zeigt einen starken Einfluss der Reife. Die Krautfäuleresistenz wird mit diesen Parametern nicht dargestellt, sondern sie stellen unterschiedliche Maße des Befalls dar. Die im Dendrogramm links erscheinende Gruppe besteht aus Maßzahlen, die einen geringeren Einfluss der Reife zeigen und damit als reifekorregierte Maßzahlen mit unterschiedlicher Eignung anzusehen sind. Diese Gruppe wiederum zerfällt in drei Untergruppen. Die Untergrup-

pe ganz links umfasst die aus rAUDPC_1 abgeleiteten Maßzahlen. Auch rAUDPC_1 selbst fällt in diese Gruppe. Die mittlere Untergruppe besteht aus AUDPC_3 und den mit Hilfe des Regressionsansatzes reifekorregierten Maßzahlen (Präfix „DELTA_“), die aus AUDPC_2 und AUDPC_3 abgeleitet sind. Die rechte Untergruppe enthält einerseits AUDPC_2 und rAUDPC_2 sowie andererseits alle über das BLUP-Verfahren aus AUDPC_2 und

AUDPC_3 abgeleiteten Maßzahlen und schließlich rAUDPC_3. Alle rAUDPC-Werte zeigen gegenüber ihren AUDPC-Werten eine verringerte Korrelation zur Reife.

Diskussion

Die rechte Hauptgruppe im Dendrogramm kann als die Gruppe der bezüglich Reife unkorrigierten Maßzahlen angesehen werden. Diese Maßzahlen beschreiben den Befall und trennen nicht den reifebedingten Effekt auf den Krankheitsverlauf von der eigentlichen Resistenz ab. AUDPC_1 zeigt die höchste Abhängigkeit von der Reife. Die drei Korrekturmechanismen Regression, BLUP sowie BLUP aus den transformierten Daten zeigen nur geringen Erfolg.

Die linke Hauptgruppe im Dendrogramm kann als die Gruppe mit unterschiedlich stark bezüglich Reife korrigierten Maßzahlen angesehen werden.

Die linke Untergruppe der linken Hauptgruppe besteht aus Maßzahlen, die aus AUDPC_1 abgeleitet sind und bei denen die Reifekorrektur erfolgreich war. MADDEN (2008) äußert Bedenken gegen die Verwendung von AUDPC_1 und daraus abgeleiteten Werten, da vorausgesetzt wird, dass ein Befallsniveau von 100% erreicht wird. Dieses ist bei den verwendeten Daten durchgehend der Fall. Es lassen sich aber auch Szenarien denken, bei denen ein Befallsniveau von 100% nicht erreicht wird. Ein genereller Einsatz der aus AUDPC_1 abgeleiteten Maßzahlen kann also nicht empfohlen werden.

Die mittlere Untergruppe der linken Hauptgruppe enthält alle aus AUDPC_2 und AUDPC_3 abgeleiteten Maßzahlen, die auf den Regressionsansatz zurückgehen. Dieser Ansatz führt also in beiden Gruppen zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Die Verwendung dieser Ansätze ist jedoch an die Erfüllung der Voraussetzungen zur Durchführung der Regressionsanalyse gebunden.

Die Sonderstellung von AUDPC_3 in dieser Gruppe erklärt sich durch das Fehlen einer expliziten Reifekorrektur. Die Reifekorrektur erfolgt vielmehr indirekt durch die nach Reife gestaffelten Endtermine bei der Bestimmung von AUDPC_3.

Ebenso nehmen AUDPC_2 und rAUDPC_2 in der rechten Untergruppe der linken Hauptgruppe eine Sonder-

stellung ein. Auch hier erfolgt keine explizite Reifekorrektur. Jedoch sorgt der einheitliche Endtermin bei der AUDPC-Berechnung für Benachteiligung früh abreifender Klone, die umso stärker ausfällt je fröheifer ein Klon ist.

Die auf BLUP basierenden Maßzahlen einerseits und rAUDPC_3 andererseits zeigen eine sehr große Ähnlichkeit. Die Attraktivität von rAUDPC_3 besteht in dem Fehlen von statistischen Voraussetzungen, wie sie bei der Verwendung des linearen Modells für die Berechnung der BLUP-Werte erfüllt sein müssen.

Die varianzstabilisierende Transformation bringt nicht unbedingt abweichende Ergebnisse, auch wenn sie einen sichtbaren Effekt auf die Rohdaten hat.

Für Datensätze mit ähnlicher Struktur wie der in dieser Arbeit verwendete Datensatz kann also die Verwendung von rAUDPC_3 zur Ermittlung der Resistenz uneingeschränkt empfohlen werden. Regressionsansatz und BLUP sind Verfahren zur Berechnung der Resistenz mit gut entwickelter theoretischer Basis, aber auch mit höheren Ansprüchen an die zu erfüllenden Voraussetzungen.

Literatur

- BORMANN, C.A., 2003: Genetic and molecular analysis of quantitative and qualitative late blight resistance in tetraploid potato. Diss. Universität Hohenheim. 115 S., ISBN 3-86537-051-9.
- DARSOW, U., 2008: mündliche Mitteilung.
- EMRICH, K., H.-P. PIEPHO, T. MIEDANER, F. WILDE, 2008: REML approach for adjusting the Fusarium head blight rating to a phenological date in inoculated selection experiments of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **117**, 65-73.
- MADDEN, L., 2008: mündliche Mitteilung.
- JOSHI, A.K., G. ORTIZ-FERRARA, J. CROSSA, G. SINGH, G. ALVARADO, M.R. BHATTA, E. DUVEILLER, R.C. SHARMA, D.B. PANDIT, A.B. SIDDIQUE, S.Y. DAS, R.N. SHARMA, R. CHAND, 2007: Associations of Environments in South Asia Based on Spot Bloch Disease of Wheat Caused by *Cochliobolus sativus*. *Crop Science* Vol. **47**, 1071-1081.
- PIEPHO, H.P., A. BÜCHSE, K. EMRICH, 2003: A hitchhiker's guide to the mixed model analysis of randomized experiments. *Journal of Agronomy and Crop Science* **189**, 310-322.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- SAS INSTITUTE INC., 2003: Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SHANER, G., R.E. FINNEY, 1977: The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* **67**, 1051-1056.
- WASTIE, R.L., 1991: Breeding for resistance. *Advances in Plant Pathology* **7**, 193-224.