

Framtagning av nytt hybridiseringsmaterial för ökad bladmögelresistens i ekologisk potatisodling

Development of new hybridization material for improved resistance to late blight in organic growing systems

Ulrika Carlson-Nilsson (projektansvarig), Nadezhda Zoteyeva, Trupti Kad, Fredrik Reslow
Institutionen för växtförädling, LTV-fakulteten, Alnarp, SLU

Delredovisning 2014

Projektets syfte

Syftet med projektet är att ta fram ett hybridiseringsmaterial med god resistens mot bladmögel som i förlängningen kan användas för att utveckla nya resistenta sorter lämpade för ekologisk potatisodling.

I projektet använder vi oss framför allt av olika vilda *Solanum*-arter och interspecifika hybrider mellan dessa. Materialet har dokumenterad resistens mot bladmögel. Dock finns ingen vetskap om vilka gener som orsakar resistensen i de olika accessionerna. I projektet undersöker vi därför materialet med olika molekyllära markörer för att bekräfta vilka resistensgener som är verksamma. Med vägledning av dessa resultat kommer hybridiseringar att genomföras med syfte att kombinera olika resistensgener i en och samma genotyp med målsättningen att ta fram ett hybridiseringsmaterial med mer hållbar bladmögelresistens.

Bakgrund

Potatisodling upptar endast cirka 1 % av den totala odlade arealen av agrikulturella växtslag men är den gröda som besprutas med den största mängden fungicider per hektar i vårt land. I södra Sverige besprutas konventionella potatisodlingar 8-12 gånger/säsong. Den huvudsakliga orsaken är angrepp av bladmögel/brunröta orsakade av *Phytophthora infestans*. Kostnaderna för bekämpning plus de förluster i avkastning som patogenen orsakar beräknas uppgå till närmare 5 miljoner € årligen i världen. Den omfattande fungicidanvändningen mot bladmögel innebär naturligtvis inte bara en stor kostnad utan är även en klar miljöbelastning. På lång sikt är den enda bärkraftiga lösningen på bladmögel/brunröta-problemet förädling av nya och mer resistenta sorter anpassade för våra svenska odlingsförhållanden.

Vilda resistenta potatisarter är viktiga källor för resistensgener för *P. infestans*. Därför är det av största vikt att få mer kunskap kring deras genetiska bakgrund. Molekyllära markörer tätt länkade till olika resistensgener (R-gener/QTLs) har använts av forskare för att identifiera gener i accessioner från vilda arter liksom i interspecifika hybrider och sorter. Genom att identifiera olika resistensgener i interspecifika hybrider från olika

vildarter av *Solanum* kan ett hybridiseringsmaterial med dokumenterat resistens mot *P. infestans* tas fram. I vårt projekt har vi därför under 2014 försökt använda befintliga molekylära markörer vi funnit i litteraturen för att skaffa en ökad kunskap kring vår tillgängliga genpool av förädlingsmaterial. Det är vår förhoppning att denna information kan leda till effektivare introgression av nya resistensgener från bl a vilda potatissläktingar och en fungerande metodik att testa förekomsten av pyramidiserade gener i förädlingsmaterialet.

Resultat 2014

I projektet arbetar vi med hybridpopulationer från olika bladmögelresistenta accessioner från vilda arter som *S. berthaultii*, *S. neoantipoviczii*, *S. ruiz-ceballosii*, *S. guerreroense*, och *S. tuberosum* subs. *andigenum* liksom hybriden *S. microdontum* × *S. tarijense*. Västmaterialet kommer från en arbetskollektion som tillhör projektmedarbetaren Nadezhda Zoteyeva från N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR) i St Petersburg, Ryssland. Interspecifika korsningar mellan de olika arterna har gjorts i tidigare samarbetsprojekt och resulterat i frön av varierande antal från de olika kombinationerna. Vissa av dessa arter ingår oss veterligen ännu inte i några stamtavlor över potatissorter framtagna i olika förädlingsprogram världen över.

Under försommaren 2014 såddes frön från 15 stycken olika hybridpopulationer. Tabell 1. Maximalt 30 fröplantor per population beroende på tillgång krukades upp för fortsatt odling i växthus. Unga blad användes för extraktion av DNA. Under senhösten skördades knölar från samtliga plantor där sådana producerats. Knölarna förvaras i kylrum under vintern i väntan på urval och odling i växthus under växtsäsongen 2015.

Tabell 1. Olika interspecifika hybrider av vildarter av *Solanum* som ingick i projektet 2014.

Hybrid	Kod
<i>Solanum guerreroense</i> x Superb	F1
<i>S. guerreroense</i> x <i>S. andigenum</i>	F2
<i>S. demissum</i> x Superb	F3
<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>	F4
(<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>) x <i>S. berthaultii</i>	F5
[(<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>) x <i>S. kurtzianum</i>] x Aurora	F6
<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. kurtzianum</i>	F7
<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. berthaultii</i>	F8
<i>S. neoantipovichii</i> x (<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>)	F9
<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	F11
<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	F12
<i>S. papita</i> x <i>S. phureja</i>	F14
<i>S. ruiz-ceballosii</i> x <i>S. berthaultii</i>	F15
<i>S. ruiz-ceballosii</i> x <i>S. kurtzianum</i>	F16
<i>S. phureja</i> x <i>S. ruiz-ceballosii</i>	F18

Förutom vildartsmaterialet ingår i projektet även hybrider mellan en sedan tidigare bevisat bladmögelsresistent förädlingslinje, SW93-1015, och den mycket resistent sorten Sarpo Mira. Bild 1. Vissa av hybriderna har i stället för SW93-1015 en av tre olika avkommor till densamma (SW04-2081, SW04-2662 eller SW04-3262) som förälder. Tabell 4. Även i detta material ville vi med hjälp av befintliga markörer kartlägga förekomsten av resistensgener. Värdefullt är naturligtvis att kunna identifiera de eventuella avkommor som har ärvt både resistensgener från SW93-1015 och Sarpo Mira då dessa två genotyper med största sannolikhet bär på olika typer av resistensgener. Även detta växtmaterial odlades i krukor i växthus under 2014.

Det molekylära arbetet har framför allt utförts av Trupti Kad (vildartshybriderna) och Fredrik Reslow (övrigt material).



Bild 1. De två bladmögelsresistenta genotyperna SW93-1015 (tv) och sorten Sarpo Mira (th) i ett obekämpat sortförsök.

Lämpliga markörer för vildartsmaterialet hittades i litteraturen och beställdes syntetiserade från ett kommersiellt företag. I vissa fall har inte markörer för exakt våra arter/arthybrider kunnat hittas och vi har i dessa fall använt oss av markörer som rapporterats för närbesläktade arter. Hittills har det ovan listade vildartsmaterialet undersökts med 12 olika markörer. Tabell 2. Markören RB629 tillhör den så kallade RB-gruppen, det vill säga *Rpi* (resistensgenen mot *Phytophthora infestans*) från arten *S. bulbocastanum*. På samma sätt är BLB-markörerna (BLB1F/R, BLB1F1/R och BLB1F/R1) på kromosom 8 genspecifika markörer som också rapporterats från *S. bulbocastanum*. *Rpi-blb1* paralogerna identifieras med RGA1- och RGA3-markörerna. Markören 1+1' är

designad för att speciellt identifiera en 12 bp deletion i RB-genen som är närvarande hos mottagliga genotyper. Markörerna 76-2sf2/76-2SR och R1-1205 amplifierar R1-genen (kromosom 5) för bladmögelresistens. R2-markören identifierar R2-genen på kromosom 4. R3-komplexet på kromosom 11 består av två funktionellt distinkta R-gener, R3a och R3b. Markören R3 identifierar R3-genen men med lägre specificitet medan Sha F/R amplifierar R3a-genen som ger rasspecifik bladmögelresistens.

Under våren 2015 kommer vi att fortsätta arbetet med ytterligare markörer lämpliga för vårt hybridmaterial. På grund av vissa komplikationer med några av markörerna under 2014 har vårt arbete försenats något.

Tabell 2. Markörer som hittills använts för vildartshybriderna i projektet.

Namn	Typ av markör	Sekvens (5'-3')
RB-629	SCAR (RB-gruppen)	GAATCAAATTATCCACCCCAACTTTTAAAT CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGT
BLB1F/R	Genspecifik	AACCTGTATGGCAGTGGCATG GTCAGAAAAGGGCACTCGTG
BLB1F1/R	Genspecifik	GWGMATGGGAACATGTGAGAG GTCAGAAAAGGGCACTCGTG
BLB1F/R1	Genspecifik	AACCTGTATGGCAGTGGCATG GYTGTTAGGTGCTGCAATCC
RGA1	Genspecifik	CAGTCACTTTCTTGTGTTGCCG CAGTAGTGAAGTCACTGTGTG
RGA3	Genspecifik	CATGCCTTAAGTCTCTAAGTTG TGGGAGTGAAGTAGCTTCTAC
1+1'	SCAR	CACGAGTGCCCTTTTCTGAC ACAATTGAATTTTACTACTT
76-2sf2/76-2SR	Genspecifik	CACTCGTGACATATCCTCACTA CAACCCTGGCATGCCACG
R1-1205	Genspecifik	CACTCGTGACATATCCTCACTA GTAGTACCTATCTTATTTCTGCAAGAAT
R2 F/R	Genspecifik	ATGGCTGATGCCTTTCTATCATTTGC TCACAACATATAATTCCGCTTC
R3 F/R	SCAR	TCCGACATGTATTGATCTCCCTG AGCCACTTCAGCTTCTTACAGTAGG
Sha F/R	Allele specifik	ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT

Flera av markörerna vi har använt för studierna av våra vildartshybrider har tyvärr inte kunna identifiera sina respektive gener eller locus i våra besläktade vilda arter. Sådana exempel är t ex markörerna 1+1', R2, R3 (resultat från dessa redovisas därför inte i Tabell 3). Därför har vi varit tvungna att designa nya markörer baserade på sekvensspecificiteter och i vissa fall använda alternativa markörer för att lyckas amplifiera dessa gener. R3 amplifierades med den allel-specifika Sha-markören, medan

mindre förändringar i BLB-markör/primer-setet användes för att amplifiera och identifiera deletionen som kändes igen av 1+1'-primern. Vi har sett positiv amplifiering med Sha-markören för vissa av våra föräldraarter och håller nu på att standardisera metoden för denna markör. Studier av hybriderna med denna markör är därför inte avslutade och den nämns därför inte i Tabell 3.

Våra analyser pekar på att resistensgenerna som identifieras av markörerna RGA1 och RGA3 finns närvarande i samtliga hybrider. Det har tidigare rapporterats att R-gener är närvarande i tätt kopplade genkluster. RGA1, RGA3 och *Rpi-blb1* formar ett sådant kluster. Förekomsten av RGA1 i knölbärande såväl som icke-knölbärande *Solanum*-arter har rapporterats, vilket tyder på vanlig förekomst av den här genen.

Sammanfattningsvis tyder våra preliminära resultat på att R1-genen finns närvarande i ett antal av avkommorna från hybriderna F1, F2, F3, F5, F11, F12, F14 och F18. I F11 (*S. neoantipovichii* x *S. papita*) har den dessutom identifierats hos samtliga 30 individer. BLB-genen kunde identifieras hos som minst en individ hos samtliga hybridkombinationer utom F4 och F9 ((*S. microdontum* x *S. tarijense*) respektive {*S. neoantipovichii* x (*S. microdontum* x *S. tarijense*)}).

Gener kopplade till samtliga av de hittills genomgångna markörerna kunde återfinnas hos fem av hybridkombinationerna (F2, F3, F11, F12, F14 och F18).

Tabell 3. Antal undersökta plantor per hybridpopulation samt antal plantor som uppvisar amplifiering för respektive markör.

Hybrider	Antal plantor	RB629	RGA1	RGA3	R1/76sf*	BLB1#
F1	25	0	25	25	12	19
F2	25	25	25	25	11	25
F3	4	2	4	4	2	1
F4	18	16	15	18	0	0
F5	16	0	16	13	9	10
F6	12	3	12	8	0	11
F7	12	10	12	12	0	7
F8	23	14	23	23	0	18
F9	25	25	25	24	0	0
F11	30	29	30	30	30	22
F12	30	28	28	28	12	9
F14	21	15	21	21	14	8
F15	25	4	25	25	0	17
F16	22	19	22	22	0	20
F18	8	8	8	8	8	7

BLB1 omfattar en kombination av BLB-primers omnämnda i Tabell 2.

* Båda markörerna omnämns tillsammans eftersom de identifierar samma gen (R1).

För resterande material har i första hand använts en markör framtagna specifikt för resistensen hos SW93-1015. Denna markör har vi fått tillgång till genom samarbete med forskare vid enheten för resistensbiologi på Institutionen för Växtskyddsbiologi i Alnarp och sekvensen är ej ännu publicerad.

Vi analyserade först föräldramaterialet med denna markör och fann att sekvensen amplifierades hos SW93-1015, SW04-2662, SW04-2081 men inte hos SW04-3262 eller, som förväntat, Sarpo Mira. Därför valde vi att inte undersöka avkomman från kombinationen SW04-3262 och Sarpo Mira vidare med denna markör utan fokusera på de övriga kombinationerna. Tabell 4. Hittills har 15 linjer analyserats men mer material kvarstår som kommer att studeras med denna markör under våren 2015.

Tabell 4. Antal undersökta linjer härstammande från korsningar mellan SW93-1015 alternativt dess avkommor och sorten Sarpo Mira.

Korsning	Föräldrar	Antal linjer per korsning
0902	SW04-3262 x Sarpo Mira	-
0903	SW93-1015 x Sarpo Mira	7
0904	SW04-2662 x Sarpo Mira	4
0905	SW04-2081 x Sarpo Mira	4
0907	Sarpo Mira x SW04-3262	-

De preliminära resultaten visar att vi troligtvis i det hittills analyserade materialet har 1-3 linjer från kombinationen SW93-1015 x Sarpo Mira (korsning 0903) som bär på resistensgenen från SW93-1015. En upprepning av analysen kommer att göras inom kort för att definitivt bekräfta hur många linjer det rör sig om. Även från kombinationerna med SW04-2662 (0904) och SW04-2081 (0905) visar preliminära resultat att 1 respektive 3 linjer bär på genen.

Samtligt material, inklusive linjerna från korsningarna 0902 och 0907, kommer också att analyseras med markörer speciellt framtagna för Sarpo Miras resistensgener. Detta arbete har påbörjats men vi har tyvärr stött på en del problem för ett par av markörerna vilket gör att arbetet försenats något och kommer att slutföras under våren 2015.

Framtida arbete inom projektet

Arbetet som kvarstår avseende de molekylära analyserna planeras slutföras under mars-april 2015. Därefter kommer ett urval göras baserat på de resultat vi erhållit avseende de olika genotypernas/linjernas innehåll av olika resistensgener. Därefter kommer ett korsningsschema att konstrueras för 2015 års hybridiseringar. Knölar från de utvalda genotyperna/linjerna kommer att sättas i krukor i växthus och korsningar kommer att göras under sensommar/höst med målsättningen att producera hybrider med pyramidiserade resistensgener.