

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 2015

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 molekylära 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.

Tidigare arbete inom projektet

Under 2014 användes befintliga molekylära markörer från litteraturen för att skaffa 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.

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*. Interspecifika korsningar mellan de olika arterna har gjorts i tidigare projekt 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 (Se Delredovisning 2014). Maximalt 30 fröplantor per population beroende på tillgång krukades upp för fortsatt odling i växthus. Bladmaterial från dessa plantor användes för extraktion av DNA till de markörstudier som utfördes 2014 och 2015. Under senhösten skördades knölar från samtliga plantor där sådana producerats.

Under vintern studerades de erhållna resultaten från markörstudierna (Se Delredovisning 2014). Utifrån dessa gjordes därefter ett urval av vilka individer som lämpade sig för vidare korsningsarbete med syfte att kombinera olika resistensgener för *Phytophthora infestans*.

Förutom vildartsmaterialet ingår i projektet även hybrider mellan en sedan tidigare bevisat bladmögelsestent förädlingslinje, SW93-1015, och den mycket resistent sorten Sarpo Mira. Vissa av hybriderna har i stället för SW93-1015 en av tre olika avkommor från densamma (SW04-2081, SW04-2662 eller SW04-3262) som förälder. Även i detta material ville vi med hjälp av befintliga markörer kartlägga förekomsten av resistensgener. Knölar från förädlingslinjerna sattes i krukor i växthus och odlades upp till plantor under 2014. DNA extraherades från bladen och användes för markörstudier. Tyvärr uppnådde vi under 2014 inte tillfredsställande resultat för denna del av projektet varför detta arbete fortsatt under 2015.

Genomförande och resultat

Markörstudier vildartsmaterial

Under 2014 undersöktes vildartsmaterialet med 12 olika markörer (se Delredovisning 2014). Under våren 2015 fortsatte detta arbete med ytterligare markörer. Tabell 1. *Rpi_ber* är en resistensgen funnen i *Solanum berthaultii*. Genen ligger på kromosom 10 och SCAR-markören Q133 identifierar en region på denna gen. Ett Quantitative Trait Locus (QTL) för bladmögelsestent, QTL_phu_stn, beläget på kromosom 3, amplifieras av markören GP198. Det är en SCAR markör utvecklad från RFLP markörer. I vårt arbete använde vi även GP198F1 som är en allelspecifik markör utvecklad från GP198.

Tabell 1. Markörer som använts för vildartshybriderna i projektet under 2015.

Gen/QTL	Typ av markör	Sekvens (5'-3')
<i>Rpi_ber</i>	SCAR	ATCATCTCCTCAAAGAATCAAG ATCTCCCCATTGACAACCAA
QTL_phu_stn	Allelspecifik	TTTGCTTACTCTTGTTGTATG TCACTTTGGTGCTTCTGTCTG

Optimerade PCR-protokoll för de olika markörerna har tagits fram och deras lämplighet för vårt material har utvärderats. Under 2014 stötte vi på problem med vissa av markörerna och har därför sedan dess arbetat en hel del med att designa nya

markörer baserade på sekvensspecificiteter för att amplifiera generna *R2* och *R3* i våra specifika arthybrider. Vi lyckades dock inte få någon amplifiering i någon av våra hybrider eller deras respektive föräldrar med markörerna för *R2* genen. Därför valde vi att avbryta arbetet med denna markör. *R3* genen, som vi initialt misslyckades med att amplifiera med *R3* markörer, lyckades vi slutligen amplifiera med en allelspecifik *R3a* markör kallad Sha. Denna markör amplifierar en homolog till *R3* genen. Resultaten redovisas i Tabell 2.

Tabell 2. Antal undersökta plantor per hybridpopulation samt antal plantor som uppvisar amplifiering för respektive gen/markör, d v s trolig förekomst av aktuell resistensgen/QTL.

Hybrid-kod	Antal plantor	RB629	RGA1	RGA3	<i>R1/76sf</i> *	<i>BLB1</i> #	<i>R3a</i>	<i>Rpi_ber</i>	QTL_phu_stn
F1	25	0	25	25	12	19	22	25	12
F2	25	25	25	25	11	25	24	25	25
F3	4	2	4	4	2	1	2	3	3
F4	18	16	15	18	0	0	18	17	17
F5	16	0	16	13	9	10	16	16	16
F6	12	3	12	8	0	11	12	10	10
F7	12	10	12	12	0	7	10	11	11
F8	23	14	23	23	0	18	22	23	22
F9	25	25	25	24	0	0	21	25	22
F11	30	29	30	30	30	22	19	30	24
F12	30	28	28	28	12	9	25	28	23
F14	21	15	21	21	14	8	18	21	20
F15	25	4	25	25	0	17	21	24	13
F16	22	19	22	22	0	20	21	22	17
F18	8	8	8	8	8	7	8	8	6

BLB1 omfattar en kombination av BLB-primers omnämnda i Tabell 2 i Delredovisning 2014.

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

Förutom de tidigare rapporterade resultaten (Se Delredovisning 2014) kan vi nu konstatera att *R3* genen verkar finnas representerad i mycket hög utsträckning hos de undersökta plantorna inom samtliga arthybridpopulationer. Samma sak gäller genen *Rpi_ber*. Även för QTL_phu_stn erhöles amplifiering för flertalet plantor inom de olika artkombinationerna undantaget F1, F11, F12, F15 och F16 där 48%, 80%, 77%, 52% respektive 80% av avkommorna bar på detta QTL.

Sex hybridkombinationer inom vilka samtliga gener/markörer fanns representerade kunde identifieras (F2, F3, F11, F12, F14 och F18). Hos övriga kombinationer saknades en eller flera av de undersökta generna/markörerna.

Markörstudier förädlingslinjer

För detta material har vi använt en markör, R2KADD (framtagen specifikt för resistensen hos förädlingslinjen SW93-1015 (Lenman *et al.*, 2016)). Mycket tyder på att

denna resistens skiljer sig från flertalet tidigare undersökta källor för bladmögelresistens exempelvis den från sorten Sarpo Mira.

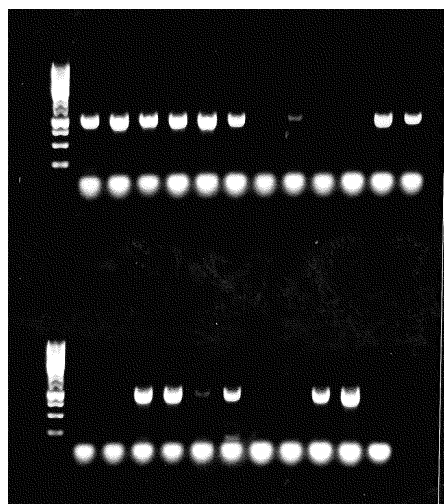
Under 2015 har vi fortsatt arbetet med att undersöka ett flertal avkommor från 6 korsningskombinationer där en av föräldrarna varit Sarpo Mira och den andre SW93-1015, SW04-2081, SW04-2662 alternativt SW04-3262. Då vi inte lyckades erhålla tillförlitliga resultat från 2014 års arbete valde vi att inte använda detta DNA utan utgå från nytt växtmaterial. Två knölar per klon sattes därför i krukor i växthus under 2015 och nytt DNA för markörstudierna extraherades från blad. Goda resultat erhöles med markören R2KADD. Tabell 3.

Tabell 3. Ursprung för de förädlingslinjer som undersökts med hjälp av markören R2KADD. Antal linjer där amplifiering erhöles samt totalt antal linjer inom varje korsningskombination.

Korsning	Föräldrar	Linjer med amplifiering för R2KADD/ Totalt antal analyserade linjer
0902	SW04-3262* x Sarpo Mira	11/13
0903	SW93-1015 x Sarpo Mira	9/11
0904	SW04-2662* x Sarpo Mira	6/7
0905	SW04-2081* x Sarpo Mira	8/8
0907	Sarpo Mira x SW04-3262*	2/6

* SW93-1015 ingår som en av föräldrarna.

Resultat efter amplifiering genom PCR och elektrofores för några av de undersökta linjerna visas i Figur 1.



Figur 1. Elektrofores efter PCR-amplifiering med markören R2KADD. Övre raden fr. vänster, brunn 1, 2: 0904032; 3, 4: 0903056; 5, 6: 0905176; 7, 8: 0902106; 9, 10: 0904042; 11, 12: 0904027. Nedre raden fr. vänster 13, 14: —; 15, 16: 0903059; 17, 18: 0903066; 19, 20: Sarpo Mira; 21, 22: SW93-1015; 23 Negativ kontroll.

Vår ambition var även att analysera materialet med markörer som skulle kunna ge oss svar huruvida avkomman även ärvt specifika resistensgener från Sarpo Mira. Enligt Tomczyńska *et al.* (2014) finns ett locus med stark effekt på bladmögelsresistens placerat på kromosom XI i närheten av locus för *R3*. Sarpo Miras genkarta över kromosom XI innehåller i studierna av Tomczyńska *et al.* (2014) 11 markörer. Markören 45/XI uttryckte i studien den starkaste kopplingen till detta resistenslocus.

Vi har under 2015 dessvärre inte kunnat upprepa de relativt lovande resultat som vi under 2014 erhöll för markörerna 45/XI och *R3a*. Arbetet med att optimera protokollen för dessa markörer bör därför fortsätta under 2016. Tyvärr har vi efter flera analysförsök också misslyckats med att amplifiera specifika gener hos Sarpo Mira med hjälp av markören för *R3b* och därför valt att för närvarande inte arbeta vidare med denna markör.

Korsningsarbete

Två knölar skördade från de individuella plantor som valts ut med hjälp av de erhållna resultaten från markörstudierna sattes i krukor i växthus sommaren 2015. Totalt ingick 115 kloner från de 15 interspecifika hybridkombinationerna. Tabell 4.

Tabell 4. Antal individer av de olika hybridpopulationerna som planterades i växthus för korsningar.

Hybridkod	Hybridkombination	Antal kloner
F1	<i>Solanum guerreroense</i> x Superb	6
F2	<i>S. guerreroense</i> x <i>S. andigenum</i>	6
F3	<i>S. demissum</i> x Superb	2
F4	<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>	6
F5	(<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>) x <i>S. berthaultii</i>	7
F6	[(<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>) x <i>S. kurtzianum</i>] x Aurora	9
F7	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. kurtzianum</i>	7
F8	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. berthaultii</i>	11
F9	<i>S. neoantipovichii</i> x (<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>)	8
F11	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	10
F12	<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	10
F14	<i>S. papita</i> x <i>S. phureja</i>	8
F15	<i>S. ruiz-ceballosii</i> x <i>S. berthaultii</i>	10
F16	<i>S. ruiz-ceballosii</i> x <i>S. kurtzianum</i>	8
F18	<i>S. phureja</i> x <i>S. ruiz-ceballosii</i>	7

De olika hybridklonernas motståndskraft mot bladmögels undersöktes genom inokulering av blad med en suspension av *Phytophthora infestans*. Klonerna klassificerades i grupperna 1) resistent, 2) moderat resistent och 3) mottaglig. Flest motståndskraftiga kloner uppvisade hybridkombinationerna F9, F11 och F12 som enbart innehöll resistent kloner. Även F2, F7 och F18 innehöll en hög andel resistent

och moderat resistent kloner. Störst andel mottagliga kloner hade klonerna i kombinationen F16.

Ett korsningsschema för hur de olika klonerna bäst skulle kombineras med hänsyn till de resistensgener de uppvisat och resultaten av inokuleringen konstruerades. Korsningarna utfördes på avskurna blommande skott från de krukodlade plantorna. Skotten förvarades i rent vatten i glasburkar i en sval växthusavdelning. Figur 2.



Figur 2. Korsningar utförda på avklippta blommande skott.

Så många pollineringar som möjligt genomfördes under blomningssäsongen. Totalt pollinerades 395 blommor fördelade på runt 100 olika korsningskombinationer. Av dessa korsningar erhöles fullt utbildade bär från 16 av kombinationerna. Tyvärr innehöll dock inte samtliga bär frön. Tabell 5. Antalet korsningar som lyckades och gav upphov till frön kan tyckas lågt men var till viss del förväntat då det är känt att interploida korsningar ofta misslyckas på grund av korsningsbarriärer bl a på grund av olika ploidital hos de ingående arterna/arthybriderna. En annan bidragande faktor är att vi tyvärr drabbades av stora problem med bladlöss i växthuset från mitten av juni och därefter periodvis under resterande växtsäsong. Trots upprepade bekämpningsförsök har detta med all säkerhet haft en negativ inverkan på plantornas allmänna status och deras förmåga att producera pollen och utveckla bär.

Den korsningskombination som var mest framgångsrik var den mellan kloner från F11 och F12. Kombinationen mellan den mycket bladmögelskänsliga sorten Desirée som saknar resistensgener och den resistenta klonen F1-8 gjordes för att studera nedärvningen av resistensgener från F1 kombinationen till avkomman.

Tabell 5. Korsningskombinationer utförda 2015 som gav upphov till bär samt antal frön från varje kombination.

Korsningskombination	Antal frön
F1-2 x F4-18	67
F1-12 x F6-12	40
F7-1 x F18-8	0
F11-1 x F12-7	150
F11-7 x F4-18	29
F11-22 x F12-18	60
F12 x F11	160
F12-2 x F11-21	78
F12-3 x F11-12	40
F12-24 x F11-6	3
5-I-7 x F5-8	0
Valor x F5-13	0
Desirée x F1-8	111

Framtida arbete inom projektet

Under 2016 kommer vi att så ut de erhållna fröna och undersöka dem med de olika markörerna vi nu har fullt optimerade protokoll för. Förhoppningen är att då kunna identifiera nya hybrider som genom kombination av flera olika resistensgener uppnått en pyramidisering av gener och därmed ökat möjligheterna till hållbar resistens.

När det gäller hybridmaterialet mellan SW93-1015 och Sarpo Mira kommer vi att fortsätta arbetet för att om möjligt optimera metoden för markören 45/XI alternativt finna en eller flera andra markörer lämpliga för att amplifiera en eller flera resistensgener specifika för Sarpo Mira. Vi kommer då förhoppningsvis att kunna identifiera eventuella hybrider i vårt material som bär på kombinerad resistens från både SW93-1015 och Sarpo Mira. De linjer som vi redan nu funnit bär på resistensgenen från SW93-1015 kommer att användas i SLUs växtförädlingsprogram vid institutionen för växtförädling i Alnarp för vidare korsningar samt i lämpliga fall utvärderas avseende sin potential som nya sortkandidater.

Referenser

Lenman M, Ali A, Mühlenbock P, Carlson-Nilsson U, Liljeroth E, Champouret N, Vleeshouwers VG, Andreasson E (2016) Effector-driven marker development and cloning of resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato breeding clone SW93-1015. Theor Appl Genet. 129(1)

Tomczyńska I, Stefańczyk E, Chmielarz M, Karasiewicz B, Kamiński P, Jones J, Lees A, Śliwka J (2014) A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sárpo Mira maps to chromosome XI. *Theor Appl Genet.* 127(3): 647–657