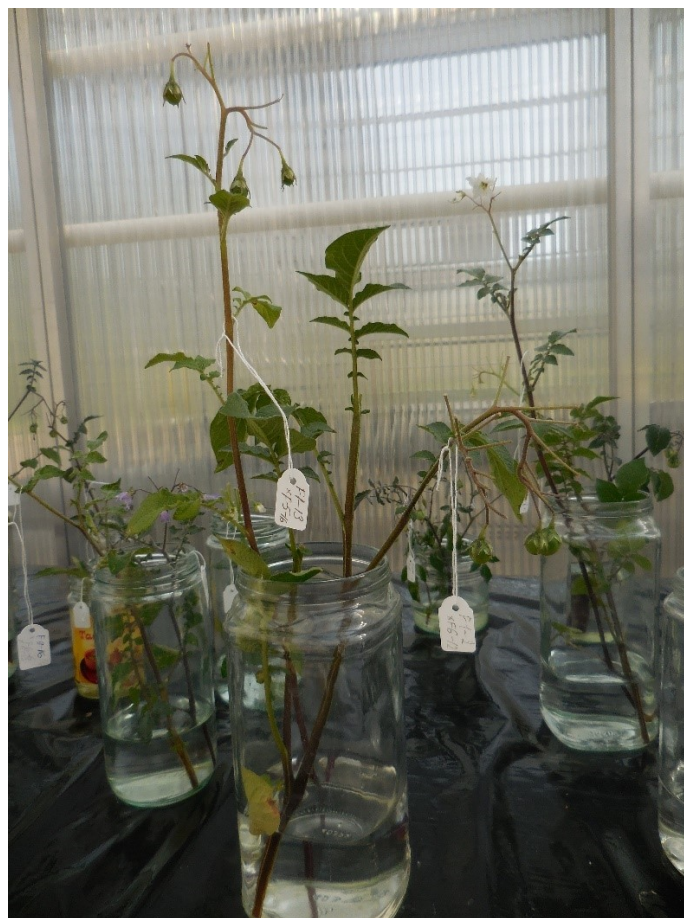


# Framtagning av nytt hybridiseringsmaterial för ökad bladmögelresistens i ekologisk potatisodling

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

## Slutredovisning



Projektet finansierat av SLU Ekoforsk

*Ulrika Carlson-Nilsson (projektansvarig), Therese Bengtsson, Trupti Kad, Fredrik Reslow, Nadezhda Zoteyeva*

*Institutionen för växtförädling, LTV-fakulteten, Alnarp, SLU*

## Sammanfattning

Syftet med projektet har varit att undersöka olika vilda *Solanum*-arter och interspecifika hybrider med sedan tidigare dokumenterad resistens mot bladmögel (*Phytophthora infestans*) med olika molekylära markörer för att utröna vilka resistensgener som är verksamma. Även hybridiseringar har genomförts med syfte att kombinera olika resistensgener i en och samma genotyp. Arter som ingått i projektet är t ex *Solanum guerreroense*, *S. microdontum*, *S. tarijense*, *S. berthaultii*, *S. kurtzianum*, *S. neoantipovichii*, *S. papita*, *S. phureja* och *S. ruiz-ceballosii*.

Frön från 15 olika vildartshybridpopulationer såddes och DNA extraherades för studier med ett antal olika i litteraturen funna molekylära markörer. Markörerna representerade olika typer av resistensgener för *P. infestans* och utvärderades för de i projektet ingående vildarterna. Totalt testades 14 olika markörer och det kunde konstateras att 9 av dem fungerade att använda i det material som ingick i vår studie. Sex hybridkombinationer där samtliga använda markörer gav amplifiering av förväntat fragment hos en eller flera individer kunde identifieras vid denna inledande markörstudie.

De 15 populationerna omfattade 115 olika kloner varav ett urval användes för att utföra korsningar mellan de olika vildartshybriderna. Korsningarna resulterade i 9 olika korsningsfamiljer från vilka DNA extraherades för ytterligare markörstudier. Ett stickprov på max 12 individer från varje familj analyserades med de 9 tidigare utvalda markörerna. Sju markörer visade sig fungera tillfredsställande och representerade ett antal olika resistensgener. 1) *Rpi-blb1* som är en del av RGA-klustret på kromosom VIII, 2) *R3a* som ingår i R3-komplexet på kromosom XI, 3) *Rpi\_ber*, en resistensgen på kromosom X och 4) ett QTL för resistens *QTL\_phu\_stn*, beläget på kromosom III.

Tio olika korsningsavkommor kunde identifieras som uppvisade amplifiering för samtliga 7 markörer. Två av dem härstammade från korsningar där arterna *S. papita* och *S. neoantipovichii* ingick medan de övriga hade en mer komplicerad stamtavla där föräldrarna bar på genetiskt material från bl a *S. guerreroense*, *S. microdontum*, *S. tarijense* och *S. kurtzianum*. Studierna identifierade även 65 individer som erhöll positiva resultat från, om inte samtliga, så minst en av de använda markörerna i respektive grupp av resistensgener. Sammantaget uppvisade 87% av de undersökta individerna hög förekomst av olika resistensgener mot bladmögel vilket till fullo talar för ökat användande av vildartsmaterial i förädlingsarbetet.

Projektet omfattade även studier av förädlingsmaterial innehållande korsningar mellan sorten Sarpo Mira och förädlingslinjen SW93-1015 respektive tre olika avkommor från denna linje. Tjugofyra kloner analyserades med 2 olika markörer (Mira2 och R2KADD) specifika för de två olika typerna av bladmögelresistens hos Sarpo Mira respektive SW93-1015. Nio kloner med en kombination av de olika typerna av resistensgener kunde identifieras bland korsningsavkommorna. Ett antal av de analyserade klonerna används nu för vidare korsningar i växtförädlingsprogrammet för potatis vid Institutionen för växtförädling, SLU, Alnarp.

## Summary

The purpose of the project has been to investigate various wild *Solanum* species and interspecific hybrids with previously documented resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) with different molecular markers to determine which resistance genes are present. Hybridizations have also been carried out with the aim of combining different resistance genes into one genotype. Species included in the project are, for example, *Solanum guerreroense*, *S. microdontum*, *S. tarijense*, *S. berthaultii*, *S. kurtzianum*, *S. neoantipovichii*, *S. papita*, *S. phureja* and *S. ruiz-ceballosii*.

Seeds from 15 different wild species hybrid populations were sown and DNA extracted for studies with a number of different molecular markers found in the literature. The markers represented different types of resistance genes for *P. infestans* and were evaluated for the wild species included in the project. A total of 14 different markers were tested and it was found that 9 of them functioned in the material included in our study. Six hybrid combinations, in which all the markers used gave amplification of the expected fragment in one or more individuals, could be identified in this initial marker study.

The 15 populations included 115 different clones, of which a selection was used to make crosses between the various wild species hybrids. The crossings resulted in 9 different hybrid families from which DNA was extracted for further marker studies. A sample of a maximum of 12 individuals from each family was analyzed with the 9 previously selected markers. Seven markers were found to function satisfactory and represented a number of different resistance genes. 1) *Rpi-blb1* that is part of the RGA cluster on chromosome VIII, 2) *R3a* that is part of the R3 complex on chromosome XI, 3) *Rpi\_ber*, a resistance gene on chromosome X, and 4) a QTL for resistance *QTL\_phu\_stn*, located on chromosome III.

Ten different hybrid offspring could be identified as exhibiting amplification for all 7 markers. Two of them originated from crosses where the species *S. papita* and *S. neoantipovichii* were included, while the others had a more complicated pedigree where the parents carried genetic material from *S. guerreroense*, *S. microdontum*, *S. tarijense* and *S. kurtzianum*, among others. The studies also identified 65 individuals who received positive results from, if not all, at least one of the markers used in each group of resistance genes. Overall, 87% of the individuals surveyed showed a high incidence of various resistance genes against late blight, which fully indicates increased use of wild species material in the breeding work.

The project also included studies of breeding material containing crosses between the cultivar Sarpo Mira and the breeding line SW93-1015 and three different offspring from this line, respectively. Twenty-four clones were analyzed with 2 different markers (Mira2 and R2KADD) specific to the two different types of late blight resistance of Sarpo Mira and SW93-1015, respectively. Nine clones with a combination of the different types of resistance genes could be identified among the offspring. A number of the analyzed clones are now used for further crosses in the plant breeding program for potatoes at the Department of Plant Breeding, SLU, Alnarp.

### Projektets bakgrund och syfte

Potatis är världens största livsmedelsgröda, cerealier borträknade. Trots att den totala potatisarealen i Sverige bara täcker 1 % av den totala odlingsarealen är potatis den gröda som behandlas med störst mängd fungicider sett per hektar (SCB, 2012).

Huvudorsaken är angrepp av oomyceten *Phytophthora infestans* (bladmögel/brunnröta).

Även inom ekologisk odling är potatis en viktig gröda, men samtidigt också en av de mest problematiska på grund av dess känslighet för flera olika skadegörare och sjukdomar (Tiemens-Hulscher *et al.*, 2012). Skördarna av ekologisk potatis är relativt låga i Sverige och dessutom väldigt variabla mestadels på grund av årliga variationer i angreppstid och omfattning av bladmögelsangrepp.

Odlare som använder ekologiska odlingsystem har mycket begränsade möjligheter att minska mottagligheten för bladmögel. Eftersom det till största del saknas effektiva bekämpningsmetoder är alternativet i huvudsak att använda tidigmognande sorter som kan skördas innan bladverket förstörs av angreppen. Alternativet är att avblasta före angrepp. Ett mer tillförlitligt alternativ är att använda mer resistent och, om möjligt, tidigmognande sorter. Tyvärr är denna typ av potatis ännu sällsynt och borde därför vara högsta prioritet för växtförädlingen världen över (Lammerts van Bueren *et al.*, 2008). Tyvärr är resistens mot bladmögel och tidighet två egenskaper som är svåra att kombinera i en och samma sort (Gebhardt *et al.*, 2004).

I dag är den ekologiska sektorn till stor del beroende av det sortutbud som presenteras för konventionell odling. Eftersom konsumenternas krav på ekologisk potatis är de samma som för konventionella sorter så länge det rör slätt skal, grunda ögon, tilltalande färg och god smak är detta acceptabelt. Men även om myndigheterna strävar efter minskat användandet av kemiska fungicider, har avkastningen fortfarande högsta prioritet vid konventionell potatisproduktion så länge svampsjukdomar kan minimeras genom kemisk bekämpning. Hög avkastning kan däremot, åtminstone i dagsläget, inte vara högsta prioritet vid ekologisk potatisproduktion. Detta kan dock fortfarande kompenseras med att ett högre pris kan begäras för den ekologiska potatisen. Högsta prioritet för ekologiskt odlad potatis måste i stället vara tillgång till sorter med resistens mot bladmögel, hög näringseffektivitet och tidig mognad.

I motsats till de i dag vanligast förekommande potatissorterna finns det i många vilda *Solanum*-arter goda resistenskällor mot *P. infestans*. Bara en mycket begränsad del av biodiversiteten har hittills utnyttjats av världens potatisförädlare. Den genetiska basen i moderna indiska potatissorter är tillexempel begränsad till 49 anfäder som omfattar enbart 2 vilda arter, *Solanum rybinii* och *S. demissum* (Tiwari *et al.*, 2013). Andra arter som använts i andra delar av världen är *S. stoloniferum* och *S. phureja* (Bradshaw *et al.* 2006).

Resistens mot bladmögel baseras ofta på så kallade ras-specifika *R*-gener. Åtminstone 11 sådana enkla, dominant gener har identifierats från den vilda arten *S. demissum* (Sokolova *et al.*, 2011). Dessa gener användes flitigt under 1950- och 1960-talet då *S. demissum* korsades med *S. tuberosum* (Bradshaw & Ramsay, 2005). De flesta av dagens sorter innehåller därför resistensgener från just *S. demissum*. Problemet är dock att motståndskraft från denna typ av resistensgener inte ansetts varaktigt då nya virulenta raser av *P. infestans* ständigt utvecklas. Av denna anledning började förädlare i stället

arbeta för att försöka förbättra den så kallade fältresistensen. Denna egenskap är i motsats till *R*-generna kvantitativ och ej rasspecifik (van der Vossen *et al.*, 2003). Dock har framgångarna låtit vänta på sig (Tiemens-Hulscher *et al.*, 2012). En orsak är som tidigare nämnts kopplingen mellan motståndskraft (av kvantitativ typ) och sen mognad. På senare år har i stället ett förnyat intresse att kombinera (pyramidisera) flera olika resistensgener (*R*-gener) för att skapa sorter med mer hållbar breddspektrumresistens noterats (Tan *et al.*, 2010). *RB*-genen med ursprung i arten *S. bulbocastanum*, ger denna typ av resistens och ett flertal funktionellt ekvivalenta homologer av denna gen har klonats sedan den upptäcktes 2003 av Song *et al.* *RB*-lika sekvenser har exempelvis hittats i samtliga accessioner av 21 olika vilda *Solanum*-arter vilket pekar på en universell distribution av strukturella *RB*-homologer bland olika *Solanum*-genom (Pankin *et al.*, 2011). Enlig en studie gjord av Wang *et al.* (2008) har konserverade homologer av *Rpi-blb1* påvisats i tetraploida arter vilket ökar möjligheten att lättare överföra resistensgener till vanliga potatissorter (*S. tuberosum*) genom klassisk växtförädling.

År 2013 hade runt 40 *R*-gener och ett antal QTLs (Quantitative Trait Locus) identifierats (Tiwari *et al.*, 2013). Enligt Gebhardt (2013) har åtskilliga studier lett fram till en arbetsmodell som innebär att de gener som kontrollerar kvantitativ resistens är, åtminstone delvis, de samma som de som kontrollerar försvarsmekanismer triggade av *R*-generna.

Molekylära markörer tätt kopplade till olika resistensgener (*R*-gener/QTLs) har i flera studier använts för att identifiera gener i accessioner från vilda arter liksom i interspecifika hybrider och sorter. Till exempel har 35 olika markörer listats av Tiwari *et al.* (2013) och ett stort antal studier där dessa har använts finns redovisade. Att använda traditionell hybridiseringsteknik kombinerad med markörstödd växtförädling (MAS) för att skapa adekvat pyramidisering av resistensgener från olika källor är ett sätt att förlänga resistensens hållbarhet som stämmer väl överens med ekologiska principer till skillnad mot olika GMO-tekniker.

**I vårt projekt har framför allt olika vilda *Solanum*-arter och interspecifika hybrider med en sedan tidigare dokumenterad resistens mot bladmögel använts. Dock har vetenskap om vilka gener som orsakar resistensen i de olika accessionerna saknats. Även ett antal hybrider mellan en bevisat resistent förädlingslinje, SW93-1015 (samt avkomma från denna) och sorten Sarpo Mira har ingått i projektet.**

**Syftet med projektet har varit att undersöka ovanstående material med olika molekylära markörer för att försöka utröna vilka resistensgener (*R*-gener och QTLs) som är verksamma. Med vägledning av dessa resultat har hybridiseringar genomförts med syfte att kombinera olika resistensgener i en och samma genotyp. Målsättningen med detta har varit att ta fram ett hybridiseringsmaterial med mer hållbar bladmögelresistens som i förlängningen skulle kunna användas för att utveckla nya resistenta sorter lämpade för ekologisk potatisodling.**

## Material och metoder

### Växtmaterial-vildartshybrider

Det använda växtmaterialet härstammar till största del från projektdeltagaren Dr Nadja Zoteyevas arbetskollektion vid N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Petersburg, Ryssland. Interspecifika korsningar mellan accessioner från vildarter såsom *S. berthaultii*, *S. neoantipoviczii*, *S. ruiz-ceballosii*, *S. guerreroense* och *S. tuberosum* ssp. *andigenum* från ovanstående kollektion har utförts i ett tidigare samarbetsprojekt. Dessa korsningar har resulterat i frön (hybridpopulationer) av varierande antal från de olika artkombinationerna (Tab. 1). Flera av dessa arter/hybridkombinationer har, enligt vår vetenskap, ännu ej använts i något förädlingsprogram världen över.

**Tabell 1.** Olika interspecifika vildartshybrider ingående i projektet samt antal utvalda kloner i korsningsarbetet 2015.

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

\*Art där resistengener/QTLer har identifierats och rapporterats i olika vetenskapliga studier enligt Tiwari *et al.* (2013).

Vid projektstarten 2014 såddes frön från 15 olika hybridpopulationer (Tab. 1). Maximalt 30 fröplantor (slumpvis valda) per population odlades i växthus. Unga blad samlades in och användes för extraktion av DNA till markörstudier. Knölar från samtliga knölproducerande plantor skördades efter växtperioden och förvarades i kylrum över vintern i väntan på urval och vidare odling i växthus 2015. Två knölar per planta (hädanefter benämnda kloner) användes. Totalt ingick 115 kloner från de 15 interspecifika hybridkombinationerna (Tab. 1).

Ett urval av dessa kloner användes 2015 för korsningar (se nedan). Frön från lyckade korsningar sparades och såddes i växthus 2016. Blad samlades in och användes för DNA-extraktioner och vidare molekylära studier under 2016-2018 (se nedan).

### Växtmaterial-förädlingslinjer

Förutom vildartsmaterialet ingick i projektet även hybrider mellan en sedan tidigare bevisat bladmögelsestent förädlingslinje, SW93-1015, och den mot samma sjukdom motståndskraftiga sorten Sarpo Mira. Ytterligare använda hybrider hade i stället för SW93-1015 en av tre olika avkommor till densamma (SW04-2081, SW04-2662 eller SW04-3262) som förälder (Tab. 2).

Knölar från dessa förädlingslinjer sattes i krukor i växthus och odlades upp till plantor från vilka DNA extraherades från unga blad och användes för markörstudier.

*Tabell 2. Analyserade hybrider med härstamning från SW93-1015 och Sarpo Mira.*

Korsningsnummer	Moder	Fader	Antal analyserade kloner
0902	SW04-3262 (SW93-1015 x AR92-1042)	Sarpo Mira	9
0903	SW93-1015	Sarpo Mira	7
0904	SW04-2662 (SW93-1015 x Vivaldi)	Sarpo Mira	4
0905	SW04-2081 (SW93-1015 x SW97-2066)	Sarpo Mira	4

### Molekylära markörer-vildartshybrider

Olika lämpliga markörer för vildartsmaterialet hittades i litteraturen och beställdes syntetiserade från ett kommersiellt företag (Tab. 3). I de fall då markörer saknades för exakt de arter/ arthybrider som ingick i vår studie valde vi i stället att använda oss av markörer som rapporterats för närbesläktade arter.

*RB*-gruppen är en av tre distinkta grupper av funktionellt aktiva *RB*-liknande loci. *RB*-gruppen innehåller bl a *Rpi* (resistensgenen för *P. infestans*) från arten *S. bulbocastanum*, benämnd *Rpi-blb1*. Markören **RB-629** är specifik för *RB*-gruppen och klonades från 16 accessioner representerande 12 *Solanum*-arter (Pankin *et al.*, 2011). Denna markör amplifierar ett fragment på 629 bp. Vid en studie av Sokolova *et al.* (2011) kunde denna sekvens hittas i 15 av 19 olika vilda *Solanum*-arter. Enlig en studie gjord av Wang *et al.* (2008) har konserverade homologer av *Rpi-blb1* påvisats även i tetraploida arter vilket ökar möjligheten till lättare överföring av resistensgener till vanliga potatissorter (*S. tuberosum*) genom klassisk växtförädling.

*Rpi-blb1* är en del av ett resistensgenanalog(RGA)kluster som sitter på kromosom VIII. Klustret innehåller fyra medlemmar (*RGA1-blb*, *Rpi-blb1/RB/RGA2-blb*, *RGA3-blb*, *RGA4-blb*) (Wang *et al.*, 2008). Markören **1 + 1'** är allelspecifik och amplifierar en funktionell allel av *bulbocastanum RB*. Markören amplifierar ett band på 213 bp vid förekomst av genen *RB* och amplifierar inte någon av de paraloger som flankerar *RB*-genen i klustret (Colton *et al.*, 2006).

Den genspecifika markören **BLB1F/R** är designad baserad på *Rpi-blb1*-homologa sekvenser för att erhålla specifik amplifiering av *Rpi-blb1*-genen (van der Vossen *et al.*, 2003). Ytterligare markörer BLB1F1 och BLB1R1 placerade uppströms respektive nedströms från BLB1F/R designades av Wang *et al.* (2008). Kombinationerna **BLB1F/R** och **BLB1F/R1** amplifierar fragment runt 820 respektive 1133 bp.



*Rpi-blb1* paralogerna *RGA1-blb* och *RGA3-blb* identifieras med **RGA1F/R** och **RGA3F/R**-markörerna (Wang *et al.*, 2008). Storleken på dessa fragment är 835 respektive 785 bp.

Markörerna **76-2sf2/76-2SR** (Ballvora *et al.*, 2002) och **R1-1205** (Sokolova *et al.*, 2011) amplifierar *R1*-genen för bladmögelresistens på kromosom V med ett fragment på 1400 bp respektive 1205 bp. R1-1205 är designad från arten *S. demissum* men har rapporterats finna strukturella homologer även i ett antal andra vildarter (Sokolova *et al.*, 2011).

**R2**-markören identifierar *R2*-genen på kromosom IV med ett fragment på 2500 bp (Kim *et al.*, 2012).

R3-komplexet på kromosom XI består av två funktionellt distinkta *R*-gener, *R3a* och *R3b*. Markören **R3-1380**, är liksom R1-1205 designad från arten *S. demissum* men har rapporterats finna strukturella homologer även i flera andra vildarter (Sokolova *et al.*, 2011). Den identifierar liksom markören **SHa-F/SHa-R** *R3a*-genen (Huang *et al.*, 2005). SHa-F/SHa-R identifierar flera paraloger som sitter i ett kluster och ger upphov till fragment mellan 920 och 1070 bp.

*Rpi\_ber* är en resistensgen funnen i *S. berthaultii*. Genen ligger på kromosom X och SCAR-markören **Q133** identifierar en region på denna gen (Tan *et al.*, 2010). Den amplifierar en sekvens på 373 bp.

Ett QTL för bladmögelresistens, *QTL\_phu\_stn*, beläget på kromosom III, amplifieras av markören **GP198-F1/R**. Det är en allelspecifik markör, utvecklad från en RFLP-markör GP198 (Wickramasinghe *et al.*, 2009). Storleken på den amplifierade sekvensen är runt 450 bp.

**Tabell 3.** Markörer som användes i studien av vildartshybriderna samt den gen/QTL respektive markör identifierar (Wang *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2013).

Gen/QTL	Markör	Typ av markör	Sekvens (5'-3')
<i>Rpi-blb1</i>	RB-629	SCAR, locus-specifik	AATCAAATTATCCACCCCAACTTTTAAAT CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGT
<i>Rpi-blb1</i>	1+1'	SCAR, allelspecifik	CACGAGTGCCCTTTTCTGAC ACAATTGAATTTTTAGACTT
<i>Rpi-blb1</i>	BLB1F/R	Genspecifik	AACCTGTATGGCAGTGGCATG GTCAGAAAAGGGCACTCGTG
<i>Rpi-blb1</i>	BLB1F1/R	Genspecifik	GWGMATGGGAACATGTGAGAG GTCAGAAAAGGGCACTCGTG
<i>Rpi-blb1</i>	BLB1F/R1	Genspecifik	AACCTGTATGGCAGTGGCATG GYTGTTAGGTGCTGCAATCC
<i>RGA1-blb</i> *	RGA1F/R	Genspecifik	CAGTCACTTTCTTGTGTTGCCG CAGTAGTGAAGTCACTGTGTG
<i>RGA3-blb</i> *	RGA3F/R	Genspecifik	CATGCCTTAAGTCTCTAAGTTG TGGGAGTGAAGTAGCTTCTAC
<i>R1</i>	R1 (76-2sf2/76-2SR)	Allelspecifik	CACTCGTGACATATCCTCACTA CAACCCTGGCATGCCACG
<i>R1</i>	R1-1205	SCAR	CACTCGTGACATATCCTCACTA GTAGTACCTATCTTATTTCTGCAAGAAT
<i>R2</i> (family)	R2F/R	Genspecifik	ATGGCTGATGCCTTCTATCATTTGC TCACAACATATAATTCCGCTTC



Gen/QTL	Markör	Typ av markör	Sekvens (5'-3')
R3	R3-1380	SCAR	TCCGACATGTATTGATCTCCCTG AGCCACTTCAGCTTCTTACAGTAGG
R3	SHa-F/SHa-R	Allelspecifik	ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT
<i>Rpi_ber</i>	Q133	SCAR	ATCATCTCCTCAAAGAATCAAG ATCTCCCCATTGACAACCAA
<i>QTL_phu_stn</i>	GP198F-1 /R	Allelspecifik	TTTGCTTACTCTTGTGTATG TCACTTTGGTGCTTCTGTCCG

\**Resistance gene analog (RGA)*. Markörer som vi ej lyckades erhålla amplifiering med i våra vildarter eller av andra anledningar inte gav tillförlitliga resultat vid analyserna 2014/2015 och därför inte användes i analyserna av korsningsavkommorna 2016-2018 är skrivna i grått.

Under 2014 provades 12 olika markörer på material från de 15 olika vildartskombinationerna. Analyserna gjordes med hjälp av PCR och efterföljande elektrofores på agarogel. Protokoll för de olika markörerna hämtades från litteraturen. Detta arbete avslutades våren 2015 då även ytterligare 2 markörer tillkom.

Det molekylära arbetet fortsatte 2016 med analyser av 86 av de korsningsfröplantor som erhållits 2015 efter korsningarna mellan de utvalda klonerna av vildartshybriderna (se nedan). Av framför allt ekonomiska orsaker valde vi att undersöka ett slumpmässigt urval av maximalt 12 individer från de 9 resulterande korsningsfamiljerna. Möjligheten att analysera fler individer i de familjer där intressanta resultat erhållits finns eftersom DNA finns extraherat av samtliga fröplantor och förvaras nedfryst i -80 grader C.

Eftersom vi i flera fall haft problem med att uppnå önskad säkerhet i avläsningarna av specifika band när vi använt oss av enbart gelelektrofores valde vi att i samband med de fortsatta molekylära analyserna att i stället använda kapillärelektrofores. Från det set av markörer som provats i det tidigare arbetet valdes de 9 bäst fungerande ut för analys av korsningsmaterialet (Tab. 3).

Resultaten analyserades med hjälp av GeneMarker v 2.6.4 (GeneMarker, 2014). Toppar med en signalstyrka över 100 RFU (Relative Fluorescent Units) i de av programmet skapade elektroferrogrammen räknades som positiv amplifiering av aktuellt markörfragment. En viss risk kan på grund av detta finnas att individer som trots allt bär på genen i fråga inte uppmärksammas om signalstyrkan varit strax under 100 RFU. Erhölls lägre eller inga toppar alls vid den förväntade storleken, alternativt att enbart "brus" syntes i elektroferrogrammet, räknades det som att fragmentet saknades hos individen i fråga. Det kan inte uteslutas ett några av dessa "negativa" resultat i vissa fall kan förklaras av att provet i fråga av någon anledning inte har fungerat korrekt antingen i PCR-reaktionen eller i kapillärelektroforesen. Detta har i så fall lett till att antalet individer med positiv amplifiering har undervärderats något.

### Molekylära markörer-förädlingslinjer

För förädlingslinjerna användes markörerna, **R2KADD** (framtagen specifikt för resistensen hos förädlingslinjen SW93-1015 (Lenman *et al.*, 2016)) som amplifierar en sekvens på 1137 bp och **Mira2** som ger ett 1434 bp långt fragment (kopplad till en av flera gener som ger bladmögelsresistens hos sorten Sarpo Mira) (Tab. 4). Mira2 är en

ännu inte publicerad markör framtagen av Marit Lenman vid Institutionen för växtskyddsbiologi, SLU Alnarp. Sarpo Miras genkarta över kromosom XI innehåller enligt Tomczyńska *et al.* (2014) 11 markörer varav markören 45/XI uttrycker den starkaste kopplingen till genkomplexet *R3* (Tomczyńska *et al.*, 2014). Under projektets gång gjordes flera försök att analysera vårt förädlingsmaterial med såväl markören 45/XI som med andra markörer för *R3a* och *R3b* som tyvärr misslyckades trots försök att optimera protokollen. Därför föll valet slutligen på markören Mira2.

**Tabell 4.** Markörer som användes i studien av hybrider mellan förädlingslinjen SW93-1015 (samt avkomma från denna) och sorten Sarpo Mira.

Markör	Sekvens (5'-3')
R2KADD1280 F1	AAGATCAAGTGGTAAAGGCTGATG
R2RLDW2420 R1	ATCTTTCTAGCTTCCAAAGATCACG
Mira2F76	AAGATTCGTCGTATTGGGGAT
Mira2R1510	AGCGAGGATTAAGAGGAATGTT

Analyserna utfördes enligt protokoll i litteraturen samt muntlig information (Lenman *et al.*, 2016 respektive Lenman, M. 2019). Resulterande fragment storleksbestämdes genom elektrofores på agarosgel.

### Korsningsarbete

Då de molekylära undersökningarna avslutats våren 2015 gjordes ett urval av accessioner baserat på de resultat vi erhöll avseende de olika genotyperna/linjernas innehåll av olika resistensgener. Vi tog också i beaktning resultat från inokulering av blad från de olika accessionerna med *P. infestans* (ej en del av detta projekt och redovisas inte här).

Korsningar genomfördes i växthus 2015 där två knölar per klon sattes i krukor. Korsningarna utfördes på avskurna blommande skott från plantorna. Skotten förvarades i rent vatten i glasburkar i en sval växthusavdelning. De resulterande bären skördades och frön extraherades.

Fröna såddes i växthus 2016 och från de resulterande fröplantorna insamlades unga blad för extraktion av DNA. Screening med lämpliga markörer utfördes på 86 av fröplantorna som beskrivits ovan. Knölar skördades från dessa fröplantor under hösten. De lagrades i kylrum över vintern och sattes sedan i krukor för odling i växthus 2017 tillsammans med de föräldrakloner som ingått i de olika korsningskombinationerna (Tab. 5). Inokulering med bladmögel gjordes på blad från avkomme- respektive föräldrakloner (ej en del av projektet och redovisas inte här).

## **Resultat och diskussion**

### Korsningar

Så många pollineringar som möjligt genomfördes mellan de olika hybridklonerna under blomningssäsongen 2015. Av dessa korsningar erhölls fullt utbildade bär från 10 av kombinationerna. Tyvärr innehöll dock inte samtliga bär frön (Tab. 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 orsakade av olika ploidalitet hos de ingående arterna/ arthybriderna. Kombinationen F7 x F18 gav bär som inte innehöll några frön.

**Tabell 5.** Korsningskombinationer som gav upphov till bär samt resulterande antal frön från varje kombination. Varje kombination som resulterade i frön gavs en unik kod.

Korsning	Kod	Moder	Fader	Antal frön
F1-2 x F4-18	Fx10	<i>Solanum guerreroense</i> x Superb	<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>	67
F1 x F6-12	Fx8	<i>Solanum guerreroense</i> x Superb	[( <i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i> ) x <i>S. kurtzianum</i> ] x Aurora	40
F7-1 x F18-8	-	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. kurtzianum</i>	<i>S. phureja</i> x <i>S. ruiz-ceballosii</i>	0
F11-1 x F12-7	Fx3	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	150
F11-7 x F4-18	Fx1	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	<i>S. microdontum</i> x <i>S. tarijense</i>	29
F11-22 x F12-18	Fx2	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	60
F12 x F11	Fx5	<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	160
F12-2 x F11-21	Fx6	<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	78
F12-3 x F11-12	Fx4	<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	40
F12-24 x F11-6	Fx7	<i>S. papita</i> x <i>S. neoantipovichii</i>	<i>S. neoantipovichii</i> x <i>S. papita</i>	3

Den korsningskombination som gav upphov till flest avkommor var mellan olika kloner från F11 och F12, dvs korsningar (även reciproka) mellan arterna *S. neoantipovichii* och *S. papita*. I de inokuleringsstest som gjordes 2014/2015 (ej redovisade här) uppvisade F9, F11 och F12 god motståndskraft mot *P. infestans* hos samtliga undersökta kloner. F2, F7 och F18 hade en hög andel resistent och moderat resistent kloner.

#### Markörstudier, vildartshybrider

En stor del av projektiden ägnades åt att försöka ta fram optimerade PCR-protokoll för de 14 utvalda markörerna (Tab. 3) och utvärdera deras lämplighet för vårt material. Flera av markörerna kunde tyvärr inte identifiera sina respektive gener eller locus i våra besläktade vilda arter. Under 2014 och 2015 gjordes försök att designa nya markörer baserade på sekvensspecificiteter för att amplifiera generna *R2* och genkomplexet *R3* i våra specifika arthybrider. Trots detta lyckades vi 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*-komplexet, som vi initialt misslyckades med att amplifiera med de två valda *R3*-markörerna (*R3-1380* och *SHa*), lyckades vi slutligen amplifiera med den allelspecifika *R3a*-markören **SHa**. Mellan 50% och 100% av individerna i de olika undersökta vildartshybridfamiljerna bar på det fragment som identifieras av denna markör (Tab. 6).

Ett kluster av resistensgenanaloger (*RGA*) finns som tidigare nämnts på kromosom VIII och innehåller bl a *RGA1-blb*, *RGA3-blb* och *Rpi-blb1*. Våra analyser 2014/2015 visade att resistensgenerna som identifieras av markörerna **RGA1** och **RGA3** fanns närvarande i samtliga hybrider (Tab. 6). Förekomst av kraftigt konserverade *RGA1-blb1*

homologer i knölbärande såväl som icke-knölbärande *Solanum*-arter har rapporterats (Wang *et al.*, 2008), vilket tyder på vanlig förekomst av den här genen.

Markören 1 + 1' amplifierar en funktionell allel av *Rpi-blb1*. Mindre förändringar i BLB-markörsetet (de tre olika BLB-markörerna redovisade i Tab. 3) användes för att amplifiera och identifiera den allel som 1+1'-markören identifierar. *Rpi-blb1* kunde i vår studie med hjälp av olika kombinationer av BLB1-markörer identifieras hos minst en individ hos samtliga vildartshybrider utom F4 och F9 ((*S. microdontum* x *S. tarijense*) respektive {*S. neoantipovichii* x (*S. microdontum* x *S. tarijense*)} vid analyserna 2014/2015 (Tab. 6). Markören RB-629, som även den används för att identifiera genen *Rpi-blb1*, gav amplifiering hos många av vildartshybriderna. Inför de fortsatta markörstudierna 2016 och framåt valde vi därför att fokusera på markörerna **BLB1F/R**, **BLB1F/R1** och **RB-629**.

Våra resultat från 2014/2015 visade att *R1*-genen fanns närvarande i ett antal av vildartshybriderna F1, F2, F3, F5, F11, F12, F14 och F18. I F11 identifierades den dessutom hos samtliga 30 individer (Tab. 6). I det fortsatta arbetet valde vi att för denna gen använda markören **R1-1205** eftersom vi hade problem att använda markören 76-2sf2/76-2SR rent tekniskt i kapillärelektroforesen.

Det kunde efter 2014 och 2015 års arbete även konstateras att *R3a*-genen, *Rpi\_ber* och *QTL\_phu\_stn* verkar finnas representerade i mycket hög utsträckning hos individer från samtliga arthybridpopulationer (Tab. 6).

Sex hybridkombinationer där samtliga använda markörer gav amplifiering av förväntat fragment hos en eller flera individer kunde identifieras (F2, F3, F11, F12, F14 och F18) efter de två inledande årens arbete. Hos övriga kombinationer saknades en eller flera av de undersökta generna.

**Tabell 6.** Antal undersökta plantor per hybridpopulation samt antal plantor som uppvisade amplifiering för respektive gen/markör, d v s trolig förekomst av aktuell resistensgen/QTL vid studierna 2014/2015.

Hybrid	Antal plantor	RB-629	RGA1	RGA3	R1/76sf*	BLB1#	SHa	Q133	GP198F-1
<b>F1</b>	25	0	25	25	12	19	22	25	12
<b>F2</b>	25	25	25	25	11	25	24	25	25
<b>F3</b>	4	2	4	4	2	1	2	3	3
<b>F4</b>	18	16	15	18	0	0	18	17	17
<b>F5</b>	16	0	16	13	9	10	16	16	16
<b>F6</b>	12	3	12	8	0	11	12	10	10
<b>F7</b>	12	10	12	12	0	7	10	11	11
<b>F8</b>	23	14	23	23	0	18	22	23	22
<b>F9</b>	25	25	25	24	0	0	21	25	22
<b>F11</b>	30	29	30	30	30	22	19	30	24
<b>F12</b>	30	28	28	28	12	9	25	28	23
<b>F14</b>	21	15	21	21	14	8	18	21	20
<b>F15</b>	25	4	25	25	0	17	21	24	13
<b>F16</b>	22	19	22	22	0	20	21	22	17
<b>F18</b>	8	8	8	8	8	7	8	8	6

# BLB1 omfattar en kombination av de BLB-primers som omnämns i Tab. 3. \* Båda markörerna omnämns tillsammans eftersom de identifierar samma gen (R1). Hybridpopulationer där individer som använts till korsningar 2016 ingår är markerade i rött.

### Markörstudier, korsningshybrider

Vid analyserna av de hybrider som togs fram vid korsningsarbetet 2016 visade sig flera av individerna bära på sekvenser kopplade till funktionellt aktiva *RB*-liknande loci. Denna grupp innehåller som tidigare nämnts bl a genen *Rpi-blb1*. Den sekvens som identifieras av markören **RB-629** som är specifik för *RB*-gruppen kunde amplificeras hos 74% av våra analyserade individer och inom samtliga korsningsfamiljer. Inom familjerna Fx4, Fx6 och Fx7 amplifierades det hos samtliga individer i familjen (Tab. 7). Vissa ytterligare individer uppvisade tecken på viss amplifiering av fragmentet men då dessa gav en signalintensitet under 100 RFU i analysprogrammet för kapillärelektroforesen valdes de att inte tas med. Detta var speciellt vanligt förekommande i korsningsfamiljen Fx8.

Analysen av korsningsfröplantorna med markören BLB1F/R1 uppvisade enbart svag amplifiering av det förväntade fragmentet av storleken 1133 bp för några av individerna från familjen Fx10. Amplifiering av fragment av närliggande storlekar (1160 och 1200bp) var dock relativt vanligt förekommande hos ett antal individer. Då våra tidigare studier gjordes med gelelektrofores, där de exakta fragmentstorlekarna är svåra att uppskatta, är det tänkbart att även de nu observerade fragmenten tidigare har bedömts som det "rätta" fragmentet. Intressanta skillnader i fragmentförekomst av de olika storlekarna kunde konstateras mellan de olika korsningsfamiljerna vilket bör studeras vidare om möjligheter ges. Protokollet för denna markör bör dock optimeras ytterligare innan resultaten kan bedömas som tillförlitliga och vi väljer att ej redovisa dessa. Markören **BLB1F/R** som identifierar samma gen gav däremot tillförlitliga resultat. Även med denna markör fick vi en amplifiering av det sökta fragmentet hos individer från familjen Fx10, men även hos Fx8 liksom för enstaka individer från familjerna Fx3, Fx4 och Fx6. Totalt sett uppvisade 21% av individerna detta fragment (Tab. 6).

*Rpi-blb1* paralogerna *RGA1-blb* och *RGA3-blb* identifieras med markörerna **RGA1F/R** och **RGA3F/R**. Samtliga analyserade korsningsfröplantor gav ett fragment runt 842 bp när de analyserades med markören RGA1F/R som förväntas amplifiera ett fragment runt 835 bp (Tab. 7). Vi antar därför att *Rpi-blb1* paralogen *RGA1-blb* finns i samtliga av de analyserade individerna. Markören RGA3F/R amplifierade i våra fröplantor ett fragment på runt 721 bp vilket skiljer sig från den förväntade fragmentstorleken med 65 bp. Då endast 5 % av fröplantorna saknade det amplifierade fragmentet misstänker vi dock att det rör som om den rätta sekvensen kopplad till *RGA3-blb* (Tab. 6).

Tyvärr erhöles inga positiva resultat för markören R1-1205 vilket troligtvis tyder på att protokollet antingen måste optimeras ytterligare, alternativt att de sekvenser från *S. demissum* som markören konstruerats från inte fungerar för våra arthybrider. Då vi i analyserna som gjordes 2014/2015 fick positiva resultat för samma gen med markören 76-2sf2/76-2SR i ett flertal av de då analyserade individerna känns det mindre troligt att de uteblivna positiva resultaten med markören R1-1205 skulle bero på utebliven identifiering av de aktuella sekvenserna. Tyvärr kunde, som tidigare nämnts, 76-2sf2/76-2SR p g a tekniska orsaker inte användas i vår kapillärelektrofores.

Markören **SHa-F/SHa-R** amplifierade i samtliga korsningsfamiljer en till flera fragment i det intervall där det förväntade klustret ska finnas. Endast 2 individer uppvisade inga sekvenser alls kopplade till *R3a*-genen. Dessa återfanns i familjen Fx1 och Fx6 (Tab. 7).

Samtliga fröplantor utom 2 (från Fx3 respektive Fx5) uppvisade ett tydligt fragment runt 395 bp när de analyserades med markören **Q133** som identifierar sekvenser kopplade till genen *Rpi\_ber* (Tab. 7). Det förväntade fragmentet uppges ha storleken 373 bp men är med största sannolikhet identiskt med det i våra studier observerade fragmentet.

Samtliga individer i alla korsningsfamiljer utom Fx8 och Fx10 uppvisade amplifiering av det aktuella fragmentet för markör **GP198F-1/R** och därmed koppling till ett QTL för bladmögelresistens på kromosom III (Tab. 7). Det förväntade fragmentet skulle vara något kortare än 450 bp och det fragment vi bedömde som positivt var strax under 420 bp.

**Tabell 7.** Antal undersökta plantor per korsningsfamilj samt antal plantor som uppvisar amplifiering för respektive markör, d v s trolig förekomst av aktuell resistensgen/QTL.

Korsning	Antal plantor	RB-629	BLB1 F/R	RGA1 F/R	RGA3 F/R	SHa-F/SHa-R	Q133	GP198 F-1/R
Fx1	12	8	0	12	11	11	12	12
Fx2	12	9	0	12	11	12	12	12
Fx3	12	9	1	12	12	12	11	12
Fx4	3	3	1	3	3	3	3	3
Fx5	12	11	0	12	10	12	11	12
Fx6	12	12	2	12	12	11	12	12
Fx7	1	1	0	1	1	1	1	1
Fx8	12	4	7	12	12	12	12	9
Fx10	10	7	7	10	10	10	10	7

Sett på individnivå hade 10 olika individer amplifiering för samtliga 7 markörer. Dessa individer var fördelade på familjerna Fx4 (1), Fx6 (1), Fx8 (3) och Fx10 (5). Det två första familjerna är båda korsningar där arterna *S. papita* och *S. neoantipovichii* ingår (Tab. 5), både som moder och fader vilket tyder på att dessa två vildarter är väl värda att undersöka närmare som resistenskällor i ett förädlingsarbete för bladmögelresistent potatis. Familjen Fx8 har en mer komplicerad stamtavla där föräldrarna innehåller genetiskt material från såväl *S. guerroense*, *S. microdontum*, *S. tarijense*, *S. kurtzianum* samt sorterna Superb och Aurora. Fx10 har samma bakgrund förutom förekomsten av *S. kurtzianum* och Aurora (Tab. 5). Även i dessa artkombinationer finns stora chanser att finna bladmögelresistenta genotyper att arbeta vidare med.

Markörerna som använts vid analysen av korsningsfröplantorna representerar olika resistensgener vilket ökar chanserna för en mer hållbar resistens. 1) *Rpi-blb1* som är en del av RGA-klustret på kromosom VIII, 2) *R3a* som ingår i R3-komplexet på kromosom XI, 3) *Rpi\_ber*, en resistensgen på kromosom X och 4) ett QTL för resistens *QTL\_phu\_stn*, beläget på kromosom III. Förutom de 10 individerna beskrivna ovan kunde våra studier identifiera 65 individer som erhöll positiva resultat från, om inte samtliga, så minst en av de använda markörerna i respektive grupp av resistensgener. Sammantaget



uppvisade därmed 87% av de undersökta individerna hög förekomst av olika resistensgener mot bladmögel vilket till fullo talar för ökat användande av vildartsmaterial i förädlingsarbetet.

### Markörstudier, förädlingslinjer

Tjugofyra kloner med ursprung i 4 olika korsningskombinationer där en av föräldrarna är den bladmögelresistenta sorten Sarpo Mira och den andre den bladmögelresistenta förädlingslinjen SW93-1015 respektive någon dess avkommor SW04-2081, SW04-2662 alternativt SW04-3262, undersöktes med markörerna R2KADD respektive Mira2 (Tab. 8). Dessutom undersöktes föräldrarna SW93-1015 och Sarpo Mira.

Hos SW93-1015 erhölls ingen amplifiering med markören Mira2 och för Sarpo Mira ingen amplifiering av R2KADD vilket tyder på att de två markörerna amplifierar olika typer av resistensgener.

Åttiosex procent av de undersökta klonerna från kombinationen SW93-1015 x Sarpo Mira (korsning 0903) bär på resistensgenen från SW93-1015. I de kombinationer där SW93-1015 utgör förälder en generation tillbaka och avkomman SW04-2662 (0904), SW04-3262 (0902) respektive SW04-2081 (0905) har korsats med Sarpo Mira uppvisade 78% av klonerna från korsning 0902 denna gen. För de andra två korsningskombinationerna (0904 och 0905) nedärvdes den till samtliga av de undersökta klonerna (Tab. 8). Det ska då poängteras att de i studien analyserade klonerna inte utgör samtliga avkommor från de olika korsningsfamiljerna. Vid tidpunkten för analyserna har flera säsongers urval gjorts bland klonerna bl a med hänsyn till bladmögelresistens.

Andelen kloner som uppvisade amplifiering för Mira2 var något lägre än för R2KADD. Från korsningen mellan SW93-1015 och Sarpo Mira gav 57% av klonerna positiva resultat och för de övriga familjerna varierade det mellan 25 och 44% (Tab. 8).

**Tabell 8.** Antal undersökta kloner härstammande från korsningar mellan Sarpo Mira och SW93-1015 alternativt dess avkommor, samt antal med amplifiering för markörerna R2KADD respektive Mira2.

Korsningsfamilj	Föräldrar	Analyserade kloner	Amplifiering R2KADD	Amplifiering Mira2	Amplifiering båda markörerna
0902	SW04-3262 x Sarpo Mira	9	7	4	3
0903	SW93-1015 x Sarpo Mira	7	6	4	4
0904	SW04-2662 x Sarpo Mira	4	4	1	1
0905	SW04-2081 x Sarpo Mira	4	4	1	1

En av målsättningarna med projektet var att kunna identifiera eventuella hybrider i förädlingsmaterialet som bär på kombinerad resistens från både SW93-1015 och Sarpo Mira. I det undersökta materialet kunde vi påvisa 9 kloner som uppvisade positiva resultat för båda typerna av resistensgener. Samtliga korsningsfamiljer var

representerade bland dessa 9 kloner (Tab. 8). Det ska dock påpekas att som nämnts ovan amplifierar markören Mira2 bara fragment kopplat till en av flera resistensgener som hittats i Sarpo Mira.

Ett antal av de analyserade klonerna används i växtförädlingsprogrammet för potatis vid Institutionen för växtförädling, SLU, Alnarp, för vidare korsningar. Exempelvis ingår 4 av klonerna från korsningsfamiljerna 0902, 0903 och 0905 i 2019/2020 års korsningsprogram.

### Presentation av projektet

Två delrapporter (2014 och 2015 års arbete) från projektet har sänts in till Ekoforsk. Arbetet har presenterats vid seminarium anordnat av institutionen för växtförädling vid SLU Alnarp och vid FoU-dagarna i Hässleholm 2015.

### Publikationer

Projektet har hittills inte resulterat i några publikationer. Orsaken är framför allt att projektledaren plus ytterligare 2 av projektmedlemmarna inte längre arbetar kvar vid SLU utan har nya anställningar hos annan arbetsgivare sedan 2016.

### Referenser

- Ballvora, A., Ercolano, M., Weiss, J., Meksem, K., Bormann, C., Oberhagemann, P., Salamini, F. and Gebhardt, C., 2002: The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J* 30(3), 361-371.
- Bradshaw, J., Bryan, G. and Ramsay, G., 2006: Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Res* 49, 49-65.2006
- Bradshaw, J. & Ramsay, G., 2005: Utilisation of the commonwealth potato collection in potato breeding. *Euphytica*, 146, 9-19.
- Colton, L., Groza, H., Wielgus, S. and Jiang, J., 2006: Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene *RB* derived from a wild potato species. *Crop sci* 46, 589-594.
- Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeir, B., Oberhagemann, P. and Schüler, K., 2004: Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Mol Breed* 13, 93-102.
- Gebhardt, C., 2013: Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. *Trends in Genetics*, 29(4), 248-256.
- GeneMarker, 2014: GeneMarker The Biologist Friendly Software, User Manual. Softgenetics, Software Power Tools for Genetic Analysis.
- Huang, S., van der Vossen, E., Kuang, H., Vleeshouwers, V., Zhang, N., Borm, T., van Eck, H., Baker, B., Jacobsen, E. And Visser, R., 2005: Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *Plant J* 42, 251-261.
- Kim, H., Lee, H., Jo, K., Mortazavian, S., Huigen, D., Evenhuis, B., Kessel, G., Visser, R., Jacobsen, E. and Vossen, J., 2012: Broad spectrum late blight resistance in potato differential stacked *R* genes. *Theor Appl Genet* 124, 923-935.
- Lammerts van Bueren, E., Tiemens-Hulscher, M. and Struik, P., 2008: Cisgenesis does not solve the late blight problem of organic potato production: alternative breeding strategies. *Potato Res* 51(1) 89-99.
- Lenman, M., Ashfaq, A., Mühlenbock, P., Carlson-Nilsson, U., Liljeroth, E., Champouret, N., Vleeshouwers, V., 2016: Effector-driven marker development and cloning of resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato breeding clone SW93-1015. *Theor Appl Genet* 129, 105-115.
- Pankin, A., Sokolova, E., Rogozina, E., Kuznetsova, M., Deahl, K., Jones R. and Khavkin, E., 2011: Allele mining in the gene pool of wild *Solanum* species for homologues of late blight resistance gene *RB/Rpi-blb1*. *Plant Genet Resour: Charact and Utiliz* 9(2), 305-308.
- SCB, Statistiska meddelanden, Växtskyddsmedel i jordbruket 2011, 2012. Online <http://www.scb.se>

- Sokolova, E., Pankin, A., Beketova, M., Kuznetsova, M., Spiglazova, S., Rogozina, E., Yashina, I. and Khavkin, E., 2011: SCAR markers of the *R*-genes and germplasm of wild *Solanum* species for breeding late blight-resistant potato cultivars. *Plant Genet Resour* 9, 309-312.
- Song, J., Bradeen J., Naess, S., Raasch, J., Wielgus, S., Haberlach, G., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C., Helgeson, J. and jiang, J., 2003: Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9128-9133.
- Tan, A., Hutten R., Visser, R. and van Eck, H., 2010: The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes *R<sub>Pi-mcd1</sub>* and *R<sub>Pi-ber</sub>* in potato. *Theor Appl Genet* 121, 117-125.
- Tiemens-Hulscher, M. Lammerts van Bueren, E. and Hutten, R., 2012 In: *Organic Crop Breeding*. First Edition, Eds. Lammerts van Bueren, E.T. & Myers, J.R. John Wiley & Sons, Inc.
- Tiwari, J., Siddappa, S., Singh, B., Kaushik, S., Chakrabarti, S., Bhardway and V., Chandel, P., 2013: Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update. *Plant Breeding* 132, 237-245.
- Tomczyńska, I., Stefańczyk, E., Chmielarz, M., Karasiewicz, B., Kamiński, P., Jones, J., Lees, A. and Śliwka, J., 2014: A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sárpo Mira maps to chromosome XI. *Theor Appl Genet* 127, 647-657.
- van der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W. and Allefs, S., 2003: An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J* 36, 867-882.
- Wang, M., Allefs, S., van den Berg, R., Vleeshouwers, V., van der Vossen, E. And Vosman, B., 2008: Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor Appl Genet* 116, 933-943.
- Wickramasinghe, W., Qu, X., Costanzo, S., Haynes, K and Christ, B., 2009: Development of PCR-based markers linked to quantitative resistance to late blight in a diploid hybrid potato population of *Solanum phureja* x *R. stenotomum*. *Am J Potato Res* 86, 188-195.