

Markør-assisteret indkrydsning af brokresistens 2015-2020

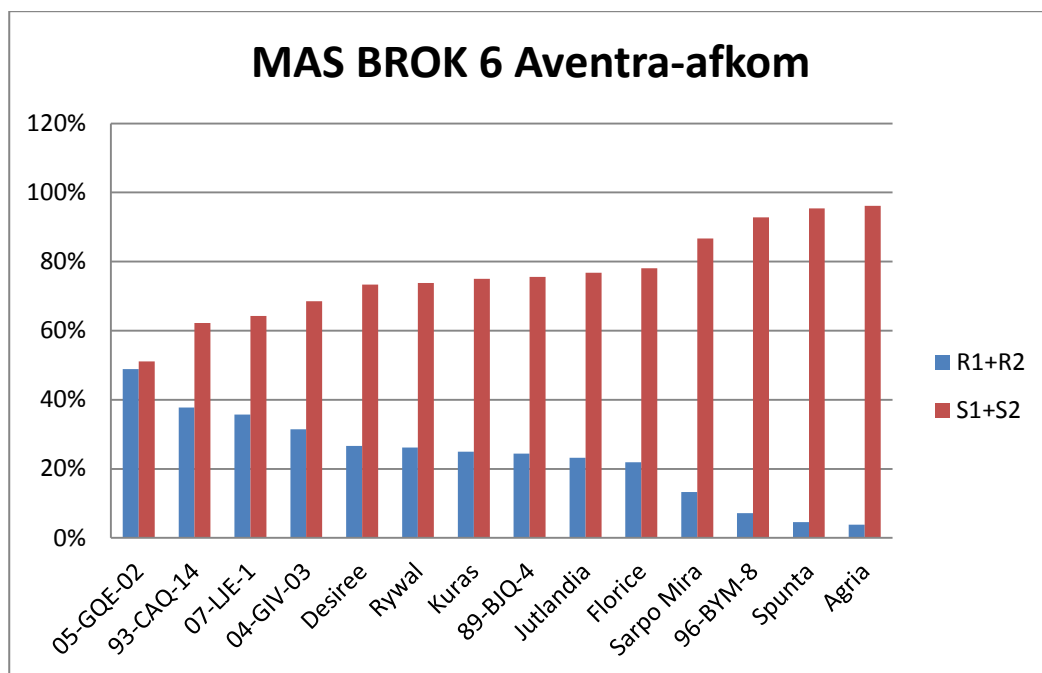
Delrapport 2016

Projektansvarlig: Jens Kr. Ege Olsen, jko@lkfvandel.dk, Landbrugets Kartoffelfond
Deltager: Kåre Lehmann Nielsen, kl@bio.aau.dk, Aalborg Universitet, Afd. for bioteknologi

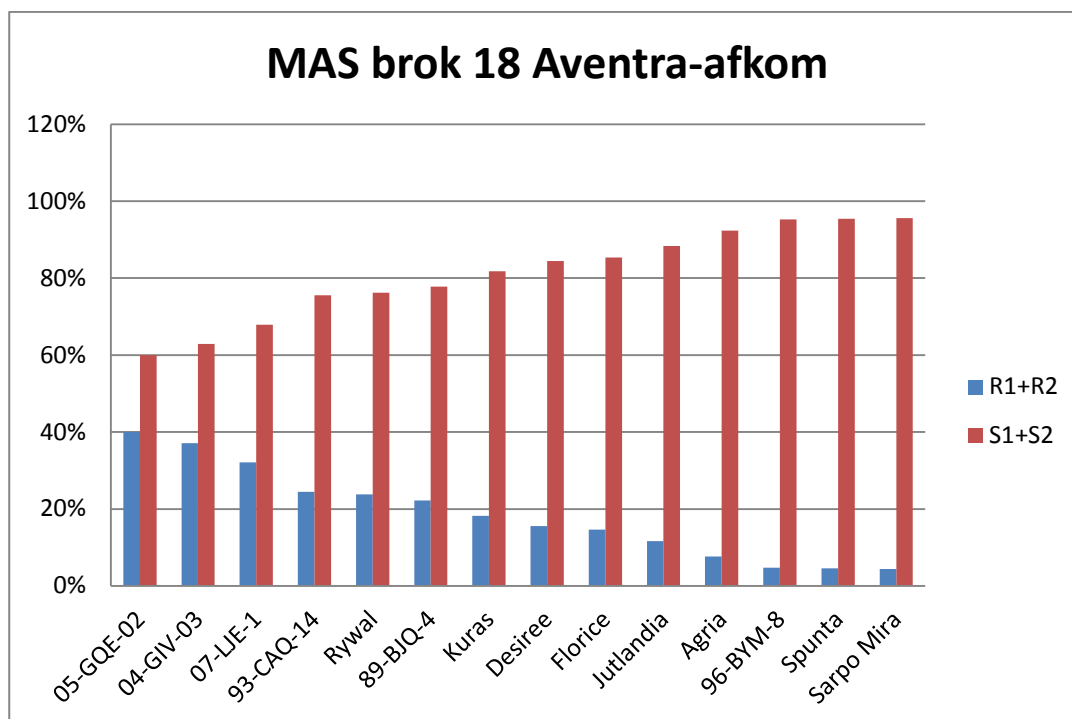
Resume

Fundet af brok i Midtjylland i efteråret 2014 har flyttet brokresistens i stivelsessorter op som en af de vigtigste forædlingsparametre. Test for brokresistens er imidlertid dyr og kræver overskud af knolde, hvorfor den tidligst kan udføres efter 2. år i marken, på hvilket tidspunkt der kun er 3% af de oprindeligt såede kloner tilbage. Da brokresistens kræver samvirken af flere forskellige gener er succesraten lav, så det er nødvendigt at have et stort antal mulige kandidater at lede i. Dette dilemma kan i hvert fald delvis løses ved på et tidligere tidspunkt at undersøge, om et antal nødvendige resistensgener er til stede, og kun beholde de sorter, der har potentiale for brokresistens. Dette projekt vil bruge en delmængde af den eksisterende MASPOT-population, hvor den brokresistente sort Aventura er den ene forælder, til at finde disse gener og lave markører, der kan bruges til at sortere i materialet.

Aventura blev krydset med 14 forskellige sorter, hvoraf nogle sorter havde komplementære gener for resistens mod brok race 6 og/eller race 18, andre ikke. Variationen i afkommet fremgår af Fig. 1 og 2.



Figur 1. Resistens mod Brok race 6 i afkom efter de listede sorter krydset med Aventura. R1 og R2: Resistente sorter, S1 og S2: Modtagelige sorter



Figur 2. Resistens mod Brok race 18.

Der blev valgt afkom fra de 6 forældre, der gav flest resistente for de to racer, nemlig 05-GQE-02, 04-GIV-03, 07-LJE-1, 93-CAQ-14, Rywal og Desiree. Afkommet blev delt i en resistent og en modtagelig gruppe (bulk) og sekventeret på AAU. Resultaterne er analyseret i 2016. Der blev fundet flere områder på kromosomerne med betydning for resistens. De statistisk mest sikre kommer fra Aventra, der er den gennemgående forælder og derfor har lige så mange resultater som de øvrige forældre tilsammen. De øvrige forældre bidrager med forskellige gener afhængig af deres baggrund.

Den modtagelige bulk samt alle resistente kloner blev gentestet i foråret 2016 samt lagt i marken til vedligehold. Som forventet er der stor årsvariation i resistenstesten. Det skyldes delvis, at det er en biologisk test, der er meget påvirkelig af ydre faktorer, men det parallelt forløbende brokprojekt med Wageningen Universitet har også afdækket endnu en usikkerhedsfaktor: Forskellige isolater, der henføres til samme brokrace, kan være genetisk ret forskellige og kan udløse forskellig reaktion i sorterne, og testen udføres ikke nødvendigvis med samme isolat fra år til år.

Projektets faglige forløb

Der findes to ret forskellige metoder til test af brokresistens:

Spieckerman-testen, der bruger en kompost med tørrede vintersporangier som inokulum og anvendes af HLB i Holland. Det hollandske projekt bruger denne metode.

Glynne-Lemmerzähl, der bruger frisk brokvæv med sommersporangier og anvendes af bl.a. IHAR i Polen, hvor knoldene fra dette projekt testes.

Spieckerman-testen er den mildeste og samtidig den, der er mest variabel og med flest escapes. 80 kloner blev sendt parallelt til begge tests for brok 6. Gennemsnitsresultatet omregnet til 1-9 skala, hvor 9 er mest resistent, var på 7,8 fra HLB og 3,7 fra IHAR.

Til trods for disse store forskelle ser det ud til, at det samme genetiske område med indflydelse på resistens fra Aventra findes i både det hollandske og det danske projekt, hvilket er meget betryggende.

I foråret 2016 blev 120 sorter, der var resistente i 2015-testen for race 6 og 18, sendt til test igen, denne gang også for race 8. Den modtagelige bulk blev gentestet for race 6 og 18. Derudover blev 52 sorter, der kører parallelt med det hollandske projekt, sendt til test for 2, 6, 8 og 18.

Disse sorter blev også vedligeholdt i marken.

Efter høst blev der selekteret på resistens og knoldkarakterer, og de bedste sendt til en afsluttende test, tabel 1.

Tabel 1. Antal kloner til test vinter 2016/17

Brok 2	76
Brok 6	70
Brok 8	44
Brok 18	38

Resultaterne fra resistenstesten sendes tilbage både som rådata med angivelse af antal knolde i 5 klasser med stigende angrebsgrad og en tolkning fra IHARs side, hvor resistensen opgøres i fire klasser, R1, R2, S1 og S2. De resistente bulks blev udvalgt i 2015 blandt R1 og R2 for hver race, den modtagelige bulk er fælles for racerne, dvs S1 eller S2 for begge racer.

Efterfølgende har vi valgt at omregne rådata til en 1-9 skala, dels for at kunne sammenligne med HLBs resultater, der opgøres på en anden måde, dels for at kunne beregne gennemsnit og årsvariation.

Der er lavet nye krydsninger i 2016 med brokresistente sorter, Tabel 2. Tre af de resistente Aventra-afkom fra projektet er blevet krydset med andre sorter med resistens mod en eller flere broktyper, og der er høstet 4.500 frø, hvoraf ca 1500 vil blive sået sommeren 2017.

Tabel 2. Krydsningsplanter med brokresistens 2016

Sor	Anv	Mor	Far
01-EBQ-9	fpa	Karakter	Kardent
02-ENU-5	f	Seresta	Tivoli
Fenja	f	Bzura	Godiva
Karakter	f	KA77-133	AM 78-3736
Katinka	fpa	KA 77-281	AM 78-3704
Tivoli	c	I-1039	N84-AXX-3
12-349-45	s?	Aventra	05-GQE-02
12-351-05	sf?	Aventra	93-CAQ-14
12-428-05	f	07-LJE-1	Aventra

Der er høstet ca. 1500 frøknolde i drivhuset, som kommer i marken sommeren 2017.

Der er udvalgt 174 sorter med potentiel brokresistens fra 1.års udvalg i marken, som vil blive testet v.hj.a. de DNA-markører, der er fundet i projektet.

Identifikation af QTL for brok resistens.

På baggrund af den 1. måling af resistensfænotypen blev klonerne inddelt i to grupper: en resistent bulk og en modtagelig bulk. Genomisk DNA blev isoleret fra alle kloner, poollet og DNA sekventeret. Herefter blev alle polymorfe sites identificeret og områder med statistisk signifikant forskellige fordeling af polymorfier identificeret (se Figur 3.) Områder markeret med gult viser områder hvor der er genetisk diversitet som er signifikant associeret med brokresistens.

Figur 3.

Using the bulk segregant analysis. The circular plot is subdivided into 12 separate plots, one for each chromosome. For each chromosome there are two plotted curves (green and red) and two plotted lines (green and red). The pair of curve and line plotted in green are for the BSA performed with the resistant bulk as expected and susceptible bulk as the observed and the associated FDR cutoff line. The red pair of curve and line are from the BSA performed with the susceptible bulk as the expected and the resistant as the observed and the associated FDR cutoff line. The outermost green gradient layer shows a gene density map of the potato reference genome.

with only approximately 100 p, chromosome 6 also has 2 peaks situated at Chromosomes 3, 7, 8

maxima above the are probably e 1 peak. On middle one. le and the eded the

r and pri- on which tion, the ch peak

itions

ght

17.177

17.177

19.631

13.802

13.805

13.805

12.047

12.047

12.047

15.471

14.306

16.492

14.001

ween unt to pathotype

re the offspring resistant to type wer but can indicate where the dif- or type 18 and the same susceptible bulk

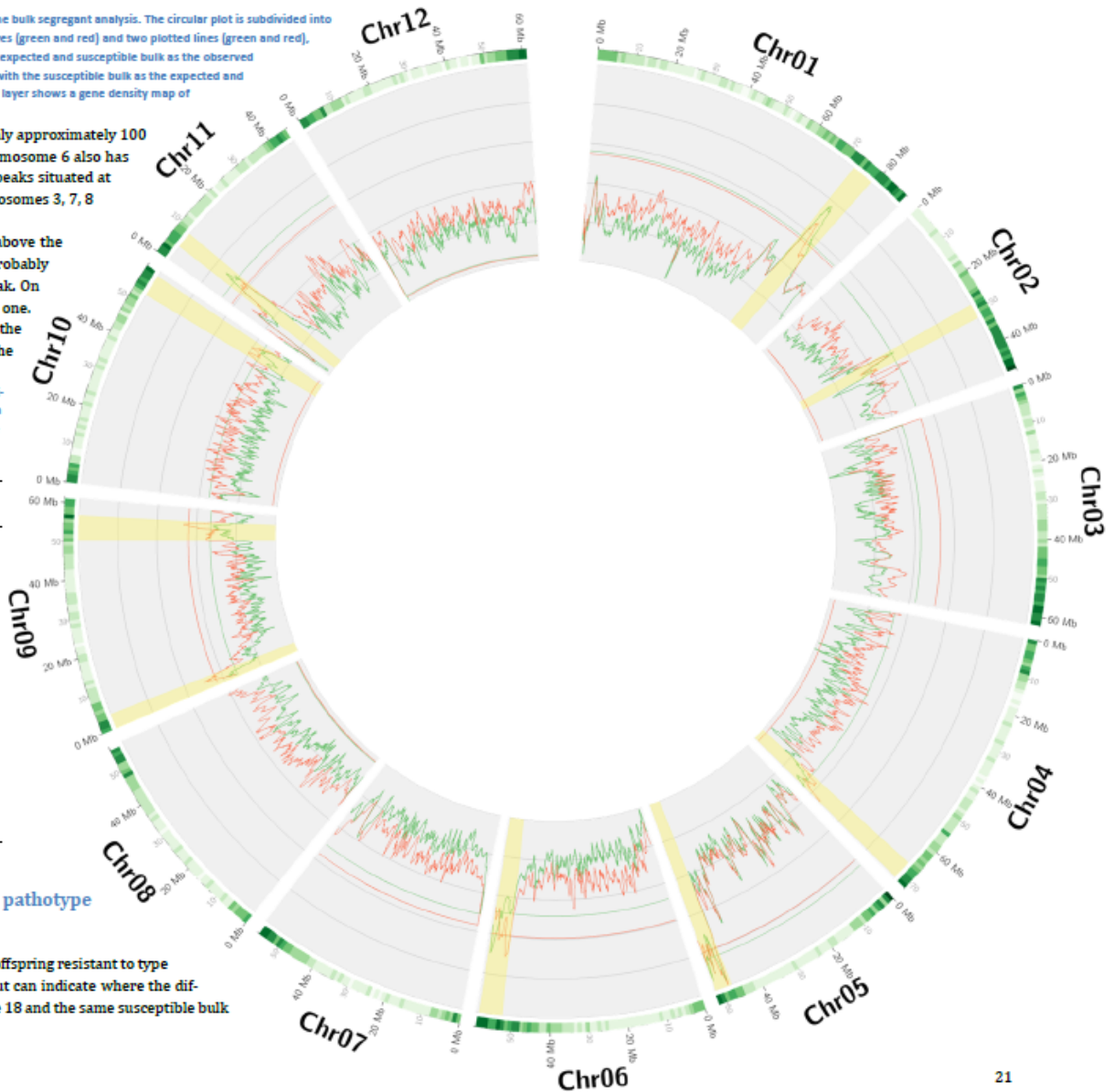


Figure 11 - Circular plot of Q-values obtained from the bulk vs bulk analyses performed using the bulk segregant analysis. The circular plot is subdivided into 12 separate plots, one for each chromosome. For each chromosome there are two plotted curves (green and red) and two plotted lines (green and red). The pair of curve and line plotted in green are for the BSA performed with the resistant bulk as expected and susceptible bulk as the observed and the associated FDR cutoff line. The red pair of curve and line are from the BSA performed with the susceptible bulk as the expected and the resistant as the observed and the associated FDR cutoff line. The outermost green gradient layer shows a gene density map of the potato reference genome.

Nogle af de identificerede QTL regioner var overlappende med hvad der var kendt fra tidligere litteratur. Tabel 3 viser en oversigt over hvilke der var kendt i forvejen og hvilke der var nye.

Tabel 3

Chromosome	Obdiegwu et al. 2014	This Project
Chr 1	10 Mbp	-
-	78 Mbp	75.25 Mbp
Chr 2	30 Mbp	29.3 Mbp
Chr 3	-	-
Chr 4	72 Mbp	69.3 Mbp
Chr 5	-	50 Mbp
Chr 6	49 Mbp	56 Mbp
Chr 7	38 Mbp	-
Chr 8	44 Mbp	-
Chr 9	-	2.1 Mbp
-	56 Mbp	55.5 Mbp
Chr 10	54 Mbp	56.7 Mbp
Chr 11	4 Mbp	6.7 Mbp
-	45 Mbp	-
Chr 12	-	-

Som det kan ses er QTLs på kromosom 5 og 9_2,1 Mbp nye. Ved at opløse den statistiske analyse på enkeltkryds (Aventra indgår som forældre i alle kryds) er det klart at disse to QTLs optræder i alle kryds og det er derfor sandsynligt, at Aventra er donor af disse to QTLs.

Prædiktiv model baseret på PCR amplikons.

Tabel 3 viser primerpar som blev brugt til at amplificere de "gule" loci fra genomisk DNA af de enkelte kloner. 10000 DNA molekyler fra hver af disse amplikons blev sekventeret og de forskellige haplotyper bestemt for hver loci. Herefter blev den mest sandsynlige allelstruktur (haplotypedosis) forudsagt under forudsætning om tetraploiditet.

Tabel 4

Primer designation	Forward primers (fw)	Reverse primers (rev)
Chr_01_75,2	TGAGGCCTATATTTCTACTG	TCTCTGTCTTCGGAATGT
Chr_01_75,3	YCAAATAATGCCTCCAC	ATGATAGTTGGATGGAGATG
Chr_02_29,3	CCATATACCTTCAARACCA	CCTCCACGAAATGCAAAA
Chr_04_69,3	CCACCTTCCATTTTAATCACY	CTTCCCTCTCTCCTCTCT
Chr_05_48,2	YCCCCAGCAGAATACTTT	GGGGAACTCAGTTAAGTAAT
Chr_05_51,4	GATATAGAGAAGTGGTAGTC	GGATCAGTRCATGCAAGA
Chr_06_58,1	GGAAGTAGCAAAAACAGG	GAAGATATATACTGCACGAC
Chr_06_53,6	CCTCACCTTCAGTTCCTC	AATGCYCCAACCCATAA
Chr_06_56,3	RAYATTAGTCTACTGGAGG	TGAAGAGACAGGGAAGGA
Chr_09_2,1	TYTCTCCTGCCTCAGTTC	RATCTGACCTTGTGTCTTT
Chr_10_56,6	ATTACATTCTCCAGCCA	GGAAGCAGCATAAAGTTTG
Chr_11_6,7	TCTTCTTGCATTGCCTTC	CCCRTCAAAACTCAYAYRAC

Det lykkedes ikke at få et amplikon fra regionen på kromosom 11, men ellers fra alle andre områder. Haplolyper, hvis fordeling var korreleret ($r > 0,2$) med den observerede resistensscore blev identificeret og deres effekt størrelse estimeret som hældningen af korrelationen med resistensscoren. Haplolyper fra kromosom 2, 5, 6 og 10 er inkluderet. Disse indgik i en prædiktionsalgoritme, hvor hvert individ fik beregnet en score som summen af produktet mellem de signifikante haplolyper og deres effektstørrelse (hældning).

En klassificerings algoritme som forudsiger resistent eller modtagelig blev konstrueret ved at definere en threshold prædiktionscore, hvor en prædiktionsværdi over tærskelværdien giver resistent og under giver modtagelig.

Under forudsætning af, at alle de observerede værdi er korrekte er kan denne klassificerings forudsige korrekt i 84% af tilfældene.

Det bør understreges, at der i dette studie er brugt de samme prøver til at træne prædiktionsalgoritmen og til at teste algoritmen. Dvs. der er stor sandsynlighed for, at forudsigelsesnøjagtigheden falder, hvis man prøver at forudsige individer som ikke har været en del af træningspopulationen. Det er normalt for denne slags algoritmer og løsningen ligger lige for – man kan inkludere nye data i træningssættet løbende og med flere data vil algoritmen blive mere og mere robust.

På baggrund af de sekventerede haplolyper er det også tydeligt, at Aventura er donor for den mest betydelige haplotype på kromosom 5, da den er den eneste af forældrene som indeholder denne haplotype. Det er til gengæld ikke klart om Aventura er donor for den på kromosom 9.

En simplificeret klassificerings baseret alene på haplotypesammensætningen på kromosom 5 har en præcision på 71.4%. Det er vigtigt at understrege, at denne simplificerede klassificerings kun er relevant for kryds, hvor Aventura er en af forældrene.

Offentliggørelser vedrørende projektet

Leivur Nattestad Lydersen: Genome sequencing and analysis of DNA from selected potato cultivars for the identification of resistance genes against potato wart disease. Master thesis, Aalborg University 2016.