

## Markør-assisteret indkrydsning af brokresistens

### Projektansvarlig og deltagere

Projektansvarlig: Ea Høegh Riis Sundmark, eri@danespo.com, Danespo A/S, Dyrskuevej 15, 7323 Give.  
Deltager: Kåre Lehmann Nielsen, kln@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 i dansk kartoffelforædling. 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 delvist 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. Projektet har udnyttet at der tidligere er lavet en stor population, hvor en af forældrene er den brokresistente sort Aventra, samtidig med at der blev lavet et stort arbejde i samarbejde med Aalborg Universitet og Wageningen Universitet i Holland, hvor forskellige kilder til yderlige brokresistens blev undersøgt.

Gennem et længere forædlingsarbejde har Danespo udført krydsninger mellem kendte brokresistente sorter og sorter uden brokresistens for at producere en stor mængde afkom med samme baggrund. Når en sådan population af tilstrækkelig størrelse undersøges for resistens med biologiske test bliver det muligt at dele afkommet op i to grupper af resistente og ikke-resistente afkom. Ved at genomsekventere de to grupper og sammenligne resultaterne bliver det muligt at finde frem til de områder i planternes DNA som adskiller grupperne og dermed indsnævre områderne for hvor der kan være mulige resistensgener. Dette arbejde blev udført i samarbejde med Aalborg universitet i 2016-2017.

Sideløbende havde Danespo et samarbejde med Wageningen universitet i Holland om undersøgelse af brokresistensgener i 73 forskellige sorter og vildarter ved at undersøge broktypernes kendetegnende proteiner og de tilsvarende resistensreaktioner i kartoffelsorterne og sammenholde disse resultater med biologiske test. Disse undersøgelser ledte til det første sæt genetiske markører i form af KASP markører for 4 store resistensgener mod brok; Sen1, Sen3, Sen4 og Sen5 i 2018. I 2018 og 2019 blev markørerne anvendt på Danespos materiale, hvorved der blev fundet at koblingen mellem de genetiske markører og den biologiske brokresistens kunne forbedres. I 2020 modtog Danespo et sæt nye markører der er i tættere kobling med de nævnte resistensgener samt yderligere et resistensgen; Sen2. Danespo har efterfølgende påbegyndt arbejdet med at teste og implementere disse nye markører i forædlingen.

### Projekts faglige forløb

Der findes to ret forskellige metoder til biologiske 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-Lemmerzahn, 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 fejlagtige resistensvurderinger.

Projektet har primært omhandlet undersøgelser af den genetiske baggrund for resistens imod brok af forskellige typer, for at finde gener der helt eller delvist giver resistens mod så mange typer af brok som muligt. Dette er blevet gjort dels ved brug af Bulk Segregant Analyse (BSA), dels ved identificering af cognate avirulens gener (Avr's) og karakterisering af demutationer der adskiller patotyperne og efterfølgende fin mapping af de tilsvarende R gener i en række kartoffelsorter.

Til BSA analysen blev Aventra krydset med 14 forskellige sorter, hvoraf nogle sorter havde komplementære gener for resistens mod brok race 6 og/eller race 18, andre ikke. 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 og resultaterne analyseret for at finde QTL regioner for brokresistens og i bedste fald SNP markører i potentielle R gener. Dette arbejde er sammenfattet i kandidatprojektet af 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.

Gennem analyse af patotypernes Avr gener blev der fundet potentielle KASP markører for i alt 5 forskellige R gener (Sen1, Sen3, Sen4 og Sen5), som blev testet dels hos Wageningen Universitet i Holland i et

# Kartoffelafgiftsfonden

valideringspanel af navnesorter og vildarter og dels hos Danespo A/S, hvor markørerne blev anvendt på 93 forædlingskloner. I 2020 blev der udviklet nye og mere præcise flankerende markører for brokresistensgenerne Sen1, Sen2, Sen3, Sen4 og Sen5 som hver især bidrager med resistens mod en eller flere af broktyperne 1, 2, 6, 8 og 18, hvoraf type 8 og 18 er de mest relevante for dyrkning af kartofler i Danmark. Disse markører er nu under test og implementering i Danespo.

I 2020 har Danespo foretaget følgende aktiviteter i forbindelse med at få implementeret de fundne brokresistenser i forædlingsmaterialet:

- Foretaget biologisk test af brokresistens på 2685 forædlingskloner og potentielle nye sorter. Resultaterne af disse test foreligger senere på foråret, men resultaterne fra de biologiske test i 2019 kan ses i tabel 1.
- Lavet 8 forskellige krydsninger af brokresistente forældrekloner udvalgt gennem projektarbejdet med fokus på at kombinere to eller flere af de store resistensgener i samme sort og derved opnå en stærkere og mere stabil resistens. Heraf blev der dannet frø i 4 af krydsningerne (Tabel 2).
- Foretaget markforsøg af brokresistente forædlingskloner for at evaluere deres kvalitetsegenskaber (Tabel 3).
- Sået frø af krydsninger fra 2019 med henblik på at producere frøknolde til videre udvælgelse.
- Vedligeholdt sorter der udgør grundlæggende kilder til brokresistensgenerne.
- Opstartet test og implementering af de nye markører for brokresistensgener.

Opsummerende har der været gode resultater i projektet. Selvom den endelige implementering af markører for store R gener sker senere end forventet er der gode forventninger til markørernes brugbarhed i forædlingen og i stedet har der været fokus på at indarbejde arvemateriale fra de fundne kilder til brokresistens, således at dette arbejde allerede er langt i selektionsprocessen.

*Tabel 1: Resultater af biologiske test foretaget i 2019. Karaktererne gives fra 1 (fuldt modtagelig) til 9 (fuldt resistent)*

SOR	Brok1	Brok 6	Brok 8	Brok 18
15-NPD-2	9	8	9	3
15-NPD-3	9			
15-NPE-13	7		3	2
15-NPE-15	8			
15-NPE-7	9			3
15-NPG-1	8		7	1
166002			1	2
166036			3	3
166039			2	3
166040			1	4
166041	9	4	7	5
166048	8	2	1	3
166052	7	1	5	3
166056			7	1
166063			8	8
166067			6	3
166069	9	8	3	1
166075			4	5
166076			5	2
166078			3	4
166081			3	5
166082			3	1
166088	9	5	8	4
166091			1	1
166092			3	5
166101			3	2
166102			3	4
166105			3	1
166106	9	5	6	1
166110			3	7
166112			5	3
166116	5	1	4	4
166119			1	3
166123			1	4
166127			3	1
166128	9	6	5	8

# Kartoffelafgiftsfonden

166129	8	6	3	3
166130			1	3
166135	3	5	1	1
166138			2	2
166141	8	1	2	1
166143			3	4
166147			3	3
166148			2	2
166149			1	1
166170			7	3
176001	4		4	
176003	2		5	
176004	5		4	
176008	8		4	
176013	9		7	
176021	8		8	
176022	9		5	
176025	7		5	
176027	8		3	
176028	8		5	
176029	8		5	
176033	6	6	3	3
176034	3		2	
176035	8		5	
176036	8		6	
176037	8		4	
176039	8		4	
176040	9		5	
176042	7		5	
176043	8		3	
176045	8		5	
176046	3		4	
176047	6		3	
176048	8		5	
176052	9		3	
176055	8		4	
176060	8		4	
176061	7		7	
176062	8		6	
176063	8		5	
176067	3		4	
176069	5		1	
176075	7		4	
176080	5	2	5	1
176083	5		4	
176086	8		3	
176087	4		2	
176089	8	5	5	4
176091	7		3	
176092	4		1	
176093	5		5	
176095	5		2	
176098	6		5	
176099	6		3	
176100	8		5	
176101	5		2	
176102	1		2	
176106	5		3	
176107	8	5	7	2
176108	7	5	8	8
176109	7		5	
176110	5		3	
176111	7		3	
176116	8		1	
176118	8		5	
176125	9		7	

# Kartoffelafgiftsfonden

176126	8		1	
176128	8		4	
176130	8		4	
176133	6		3	
176134	9		1	
176135	3		5	
176136	5		2	
176137	3		2	
176139	3		1	
176143	8		2	
176146	9		3	
176151	9		4	
176154	8		3	
176155	8		2	
176157	8		3	
176160	8		3	
176163	8		2	
176165	8		3	
176166	8		5	
176167	8		2	
176168	9		3	
176201	8		3	
176205	9		4	
176206	1		1	
176215	8		5	
176216	8		7	
176220	9		5	
176230	9		1	
176232	5		5	
176238	8		3	
176243	7		3	
176244	8		8	
176248	9		6	
176250	9		3	
176251	9		7	
176253	1		3	
176254	8		6	
176255	9		6	
176256	1	3	5	9
176257	7	3	7	3
176260	4		3	
176267	6		5	
176271	8		3	
176273	5		5	
176276	8		7	
176279	5	1	3	2
176280	5		1	
176281	5		4	
176282	1	1	1	1
176283	8		4	
176284	5		5	
176286	4		4	
176288	4		4	
176291	8		4	
176292	9		5	
176293	8		5	
176298	8		2	
176299	9		3	
176300	8		5	
176302	7		4	
176304	8		1	
176305	8		5	
176306	8		3	
176308	8		4	
176310	8		5	
176311	9		2	

# Kartoffelafgiftsfonden

176313	8		3	
176316	8		3	
176322	8		1	
176324	8		3	
176325	9		5	
176326	8		4	
176328	8		4	
176332	5		3	
176333	9		5	
176339	4		5	
176340	8		2	
176341	7		4	
176342	8		1	
176344	8		2	
176345	3		2	
176347	8		3	
176358	9		1	
176359	9	3	6	4
176360	6		3	
176363	8		7	
176365	8	3	3	1
176367	9		3	

Tabel 2: Producerede frø i 2020

Krydsningsår	Mor	Far	Frø høstet
2020	165434	14-NJB-4	150
2020	165435	166039	150
2020	165453	166039	200
2020	12-352-32	12-333-36	600

Table 3: Resultater af markforsøg 2020

SOR	Generelt indtryk	Tørstof	Chipskvalitet	Kogetype	Estimeret udbytte (hKg/Ha)
09-0-192-04	5	29	4	7	88
15-NPD-2	5	25			663
15-NPD-3	5	27			621
15-NPE-13	7	27	7		659
15-NPE-15	7	25			687
15-NPE-7	6	28	4		655
161834	5	23			677
161843	6	21		6	523
161954	5	22		6,5	457
161973	7	20		6,5	626
162016	6	24	6	4	672
162029	7	22		6	632
162044	5	21			686
162076	5	22			403
166002	5	28			539
166036	7	28			552
166039	6	26	2		680
166040	5	24			467
166041	6	26	4		743
166048	5	23			461
166052	8	25			725
166056	6	24	4		600
166063	6	25	4		470
166067	5	27			643
166069	6	26			523
166075	5	23			765

# Kartoffelafgiftsfonden

166076	5	21		702
166078	6	27	6	509
166081	6	31	4	599
166082	5	28		651
166088	7	26	5	628
166091	5	27		584
166092	5	26		360
166101	6	26		638
166102	5	26		532
166105	6	26	2	609
166106	6	26		673
166110	6	28		475
166112	5	26		494
166116	5	25		748
166119	7	26	4	738
166123	5	25		751
166127	6	28		714
166128	5	24		655
166129	6	26		568
166130	5	25		446
166135	6	28		645
166141	6	25	2	576
166143	7	26	2	676
166147	5	26		562
166148	5	27		574
166149	6	27	2	609
166170	5	26		536
166172	7	28	4	633
176001	5	27		366
176003	5	29		701
176004	6	26	5,5	472
176008	5	26		614
176013	5	27		617
176022	5	25	6	560
176025	6	26	5	633
176027	5	25	9	596
176029	5	25	9	544
176033	6	24		753
176036	7	25	5	792
176043	5	24	9	606
176045	6	25	7	662
176046	5	24		745
176047	6	25	6	555
176048	6	24	5	895
176052	7	24	6	652
176067	5	25		780
176075	6	27		661
176080	6	26		759
176083	6	27	4	728
176086	7	25		927
176089	6	25	4	972
176091	5	26	7	545
176092	5	26		626
176093	5	26		726
176095	5	30		414
176098	6	28		950
176099	5	27		575
176100	5	29		576
176101	8	24		695
176102	5	26		595
176107	6	29	5	639

# Kartoffelafgiftsfonden

176108	6	28	8		713
176109	7	26			674
176110	7	27			692
176111	5	28	6		602
176133	5	22			683
176134	6	24	5		700
176135	5	23	8		733
176136	5	23	6		565
176137	5	24			666
176151	7	26			689
176163	5	26	6		687
176166	6	24	5,5		652
176168	6	23			813
176201	6	23			811
176205	6	25			782
176206	5	23	2		724
176215	8	24			710
176250	7	27			814
176251	6	25			844
176254	6	26	6		669
176256	6	27			631
176267	6	25			685
176279	6	27			717
176282	5	28			432
176283	6	26			729
176284	5	29			566
176286	5	29			503
176288	6	24			794
176298	5	25			503
176300	6	22			803
176306	6	26	6,5		817
176310	6	26	3		659
176328	5	25	9		653
176339	5	26			720
176340	5	25	4		689
176342	5	27			632
176344	5	26			589
176345	5	24			673
176347	5	25			535
176358	5	26			695
176359	5	24	2		668
176363	5	25			561
176365	5	27			660
181850		18			
181851		21			
181853		18			
181859	6	21		6	
181867	6	18		7	
181868	6	19		6	
181870	6	19		7	
181889	7	20			
181893	7	17		8	
181897	7	17			
181898	7	21			
181901	7	20			
181916	6	20		7	
181918	6	18		7	
181919	6	21		8	
181922	7	17		6	
181923	6	22		6	
181930	7	23			

# Kartoffelafgiftsfonden

181931	5	20		6	
181936	5	21		6	
181937	6	21		8	
181938	5	20		6	
181946	7	25	6		
181948	7	27	8	7	
181949	7	24			
181950	7	24			
181952	7	26	6		
181957	7	25			
181965	7	25			

## Offentliggørelser vedrørende projektet.

Ud over KAF rapporten formidler Danespo viden om de resistente sorter der kommer ud af projektet på avlermøder og lignende. Samarbejdet med Universiteterne er resulteret i:

- kandidatprojektet af 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.
- PhD afhandlingen af Charlotte Prodhomme: Warts Wars – The Resistant Potatoes Strike Back, Wageningen University 2020.
- Bart T. L. H. van de Vossen, Balázs Brankovics, Hai D. T. Nguyen, Marga P. E. van Gent-Pelzer, Donna Smith, Kasia Dadej, Jarosław Przetakiewicz, Jan F. Kreuze, Margriet Boerma, Gerard C. M. van Leeuwen, C. André Lévesque and Theo A. J. van der Lee (2018) The linear mitochondrial genome of the quarantine chytrid *Synchytrium endobioticum*; insights into the evolution and recent history of an obligate biotrophic plant pathogen. BMC Evolutionary Biology 18:136 <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1246-6>
- Genomic studies of *Synchytrium endobioticum*, the potato wart pathogen, in the context of chytrid fungi reveal insight into its obligate biotrophic lifestyle (submitted)
- B.T.L.H. van de Vossen, S. Warris, H.D.T. Nguyen, M. van Gent-Pelzer, D. Joly, H.C. van de Geest, P. Bonants, D.S. Smith, C.A. Lévesque, T.A.J. van der Lee B.T.L.H. van de Vossen, M. Boerma, L.P. van der Gouw, T.A.J. van der Lee, J.H. Vossen (2018) An alternative bioassay for *Synchytrium endobioticum* demonstrates the expression of potato wart resistance in aboveground plant parts. Under review, Phytopathology
- Charlotte Prodhomme, Danny Esselink, Theo Borm, Richard G. F. Visser Herman J. van Eck, Jack H. Vossen. Comparative Subreads Sets Analysis (CoSSA) is a robust approach to identify haplotype specific SNPs; Mapping and pedigree analysis of the potato wart disease resistance gene Sen3. Under review, plant Methods