

Slutrapport SLF projekt, H1333172, 2014-2016

Förädling av ärt för ökad motståndskraft mot rotröta

Huvudsökande: Magnus Karlsson, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

Medsökande: Rolf Stegmark, Findus Sverige AB, Bjuv

Medsökande: Örjan Carlborg, Institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

Medsökande: Dan Funck Jensen, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

Bakgrund till projektet

Ärt (*Pisum sativum*) odlas i Sverige både för mänsklig konsumtion och som grönfoder. I södra Sverige är produktion av frysta, gröna ärter en viktig inkomstkälla, och en stor del av den årliga produktionen exporteras till den europeiska marknaden. Ärt bör dock inte odlas på samma fält oftare än vart sjätte till åttonde år på grund av risken för ärtrotröta, vilket ger en kraftig inskränkning på den totala produktionskapaciteten. Vid kraftigt smittade fält kan växtföljden behöva dras ut till 10-15 års mellanrum för ärtodling. Ärtrotröta orsakas främst av algsvampen *Aphanomyces euteiches* (Jones and Drechsler 1925), som bildar mycket långlivade vilsporer (oosporer) i jorden. Kemisk bekämpning är ej möjlig ens inom konventionell odling, och vid kraftiga angrepp kan mycket stora förluster uppstå. Det finns idag inte heller några resistent kommersiella ärtsorter.

På senare år har man i en nordamerikansk genbank hittat en sort, PI180693, som visats sig bära på partiell resistens mot aphanomyces ärtrotröta och flera loci (quantitative trait loci, QTL) för denna kvantitativa egenskap har identifierats (Hamon et al 2011). Ärtsorten PI180693 har testats med svenska *A. euteiches* isolat vid Findus försöksstation i Bjuv, och resultaten bekräftar att PI180693 uppvisar partiell resistens. Plantans morfologi saknar dock många kommersiellt önskvärda egenskaper såsom vit blomma, kort planta, halvbladlöshet, skrynkliga frön (sötma), resistens mot bladmögel, mjöldagg och ärt-enations-mosik virus. Inom klassisk växtförädling kan man då korsa två sorter med önskvärda egenskaper för att sedan välja ut avkommor med bästa möjliga egenskaper. Genom att upprepa urval och nya korsningar kan man över tiden utveckla grödor med nya egenskaper, såsom hög motståndskraft mot sjukdomar. Denna typ av växtförädling kräver dock stora resurser i form av växthus, fältförsök och antal plantor. Det är också svårt att kombinera flera olika bra egenskaper i samma sort, eftersom mindre önskvärda genvarianter kan vara fysiskt nära kopplade med bra genvarianter och därför svåra att bli av med under förädlingsprocessen.

Ett sätt att underlätta och effektivisera förädlingsarbetet är att utveckla genetiska markörer för de genvarianter som ger önskvärda egenskaper, så att urvalet kan ske redan på fröstadiet med högre genetisk precision. Under de senaste åren har det skett en teknisk revolution vad gäller möjligheterna till analys (sekvensering) av det genetiska materialet (DNA). Nya tekniker för storskalig DNA-sekvensering kan användas för snabb och omfattande genotypning av stora populationer djur eller växter. En sådan teknik är RAD-Seq, där identifiering, detektion och utvärdering av genetiska markörer sker i ett och samma steg.

Frågeställning

Målet för detta forskningsprojekt var att utveckla nya ärtsorter som uppvisar resistens mot aphanomyces ärtrottröta, i kombination med önskvärda produktionsegenskaper (resistens mot bladmögel, mjöldagg och virus, kort planta, skrynkliga frön, klängen & vita blommor). För att uppnå detta planerade vi att använda tekniken RAD-Seq för identifiera genetiska markörer som segregerar med resistens mot aphanomyces ärtrottröta, och att använda dessa markörer för att styra urvalet av avkommor under förädlingsprocessen.

Material och metoder

Växtmaterial, korsningar och urval

Under sommaren 2013 korsades PI180693 med ärtsorten Linnea (med goda produktionsegenskaper) för att skapa en F1-generation. Dessa avkommor korsades tillbaka mot Linnea för att skapa en första back-cross generation (BC1) som sedan inavlades (BC1S1), vilken utgjorde grunden för den klassiska växtförädlingsdelen av projektet. Under projektets tre år så testades många individer (linjer) för resistens mot ärtrottröta och andra egenskaper i växthus och i fält (Figur 1). I varje generation valdes de mest resistent familjerna ut för vidare inavel och urval för resistens. I projektets slutfas arbetade vi med linjer som inavlats till femte generationen (BC1S5).

Parallellt med detta så korsades F1-individerna för att skapa en F2-generation, som användes i arbetet med att identifiera genetiska markörer för resistens mot ärtrottröta. F2-individer utvärderades med avseende på resistens mot ärtrottröta i växthus där varje planta klassificerades med ett sjukdomsindex (0, 10, 25, 50, 75 eller 100% av rotsystemet med symptom), enligt ett etablerat system (Hosseini et al 2014). Resistens och andra produktionsegenskaper testades också i fält.

Genotypning

DNA extraherades från blad med Qiagen Genomic Tip 20 kit, enligt manualen. DNA behandlades med två olika restriktionsenzym, EcoRI och Taq α 1, renades och ligerades ihop med DNA prober, enligt ett publicerat RAD-Seq protokoll (Peterson et al 2012). Det

genererade RAD-Seq biblioteket sekvenserades av SNP&SEQ teknikplattformen vid Uppsala Universitet, med HiSeq2500 instrument. Genotypning av individuella genetiska markörer gjordes även med PCR (polymerase chain reaction) följt av Sanger sekvensering, samt med iPLEX systemet, även detta utfört av SNP&SEQ teknikplattformen. Genotypning av redan publicerade mikrosatelliter (Hamon et al 2011), utfördes av Uppsala Genome Center vid Uppsala Universitet.



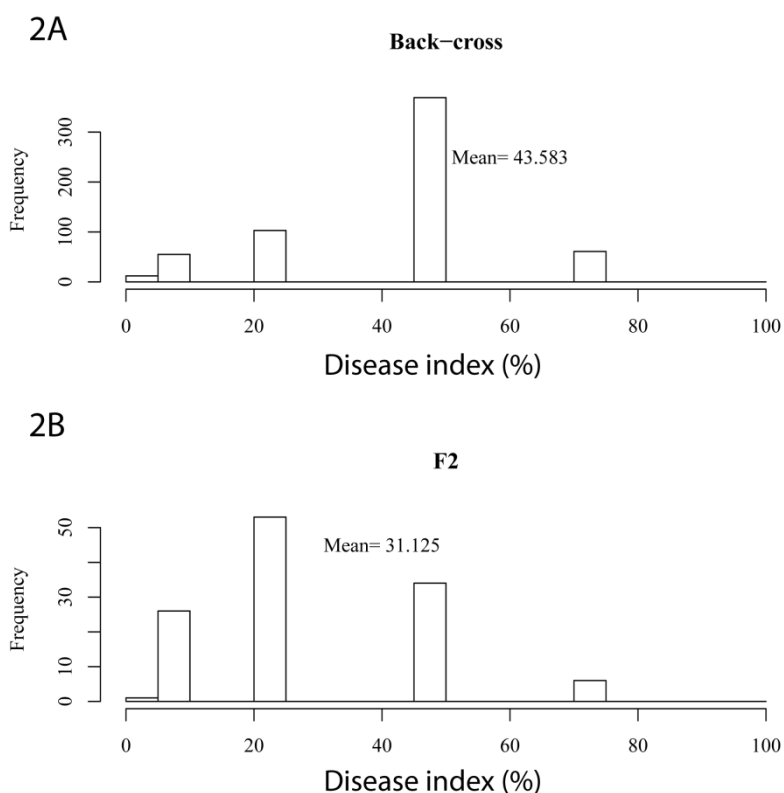
Figur 1: Exempel från fältförsök vid Findus försöksstation i Bjuv. (A) Fältförsök. (B) Ärtsort Linnea (L) i fält. (C) Ärtsort PII80693 (P) i fält. (D) Exempel på vita (L) respektive lila (P) blommor. (E) Exempel på plantor med klängen istället för småblad (L, vänster) respektive småblad (P, höger). (F) Exempel på skrynkliga (L) respektive släta (P) frön.

Bioinformatik och QTL analys

Sekvensdata från RAD-Seq analyserades med `denovo_map.pl` i programmet STACKS (Catchen et al 2013). Identifierade genetiska markörer (SNP, single nucleotide polymorphisms) exporterades till R/qtl format, med kravet att markörer identifierades i minst 25 individer. För konstruktion av kopplingskarta och korrelationstest mellan genotyp och fenotyp (QTL analys) användes paketet R/qtl i programmet R (Broman et al 2003).

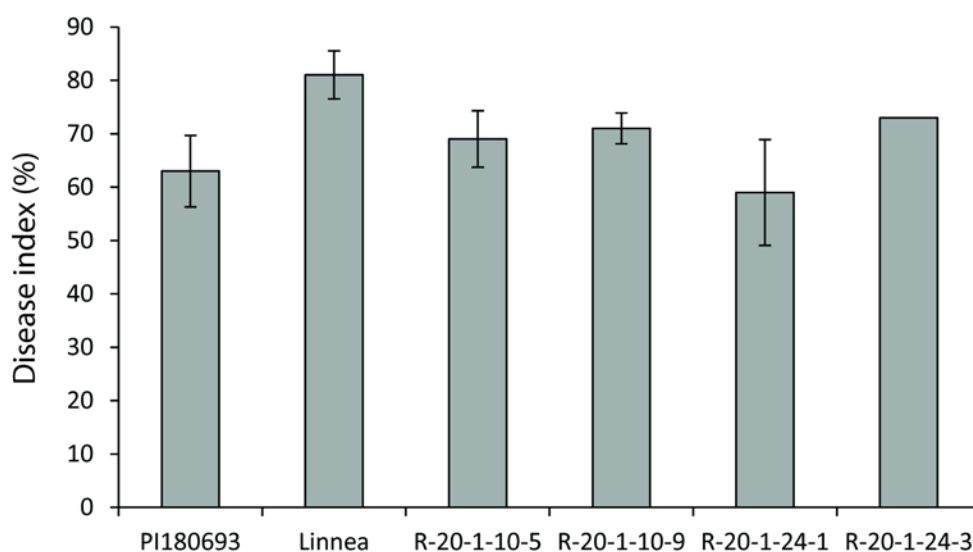
Resultat

Individer från den första BC1S1 generationen uppvisade en normalfördelad spridning av sjukdomsresistens mot ärtrotröta (Figur 2A), vilket indikerade att resistensen är en polygent nedärvd, kvantitativ egenskap. Eftersom en tidigare artikel (Hamon et al 2011) indikerade att generna för egenskaperna kort planta, skrynkliga frön och resistens mot mjöldagg (*le*, *r* och *er*) ej är genetiskt kopplade till sjukdomsresistens mot ärtrotröta, så valdes plantor med dessa egenskaper för det fortsatta förädlingsarbetet. Även individer med de ogynnsamma egenskaperna småblad istället för klängen samt lila blommor (*AF* och *A*) inkluderades i det fortsatta arbetet, eftersom det finns en möjlig genetisk koppling mellan generna för dessa egenskaper och resistens mot ärtrotröta (Hamon et al 2011) och vi ville försäkra oss om att inte välja bort potentiella resistensgener på detta tidiga stadium.



Figur 2: Resistens mot ärtrotröta i två olika ärtpopulationer, BC1S1 (A) och F2 (B). Y-axeln (frequency) indikerar det totala antalet plantor i varje sjukdomsklass.

Under det fortsatta förädlingsarbetet uppvisade ett flertal linjer ökad resistens mot ärtrotröta, t.ex. i den femte inavels-generationen (BC1S5) visade >4 familjer (bestående av flera besläktade linjer) signifikant högre resistens (lägre sjukdomsindex) jämfört med den mottagliga föräldern Linnea (Figur 3).

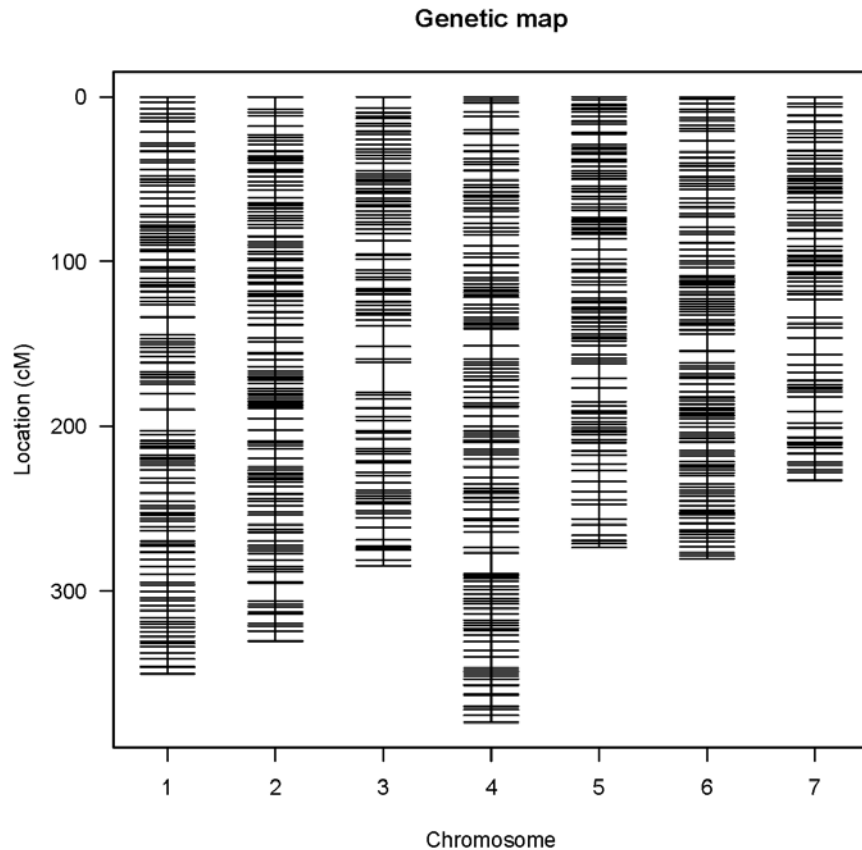


Figur 3: Resistens mot ärtrotträta i utvalda familjer från generation BC1S5, med standardavvikelse mellan linjer inom varje familj.

I likhet med resultaten från BC1S1 generationen, så uppvisade 120 individer från F2 generationen också en spridning av sjukdomsresistens mot ärtrotträta (Figur 2B). Baserat på detta resultat så valdes de 18 mest resistenta och de 18 mest mottagliga individerna ut för identifiering av genetiska markörer för resistens mot ärtrotträta. Dessa 36 individer, samt föräldrarna PI180693 och Linnea, sekvenserades med RAD-Seq. Totalt genererades 288,807,005 sekvenser av hög kvalitet, vardera med en längd av 120 DNA baspar (bp). Totalt genererades alltså 34,656,840,600 bp DNA från ärt. Från dessa sekvensdata identifierades ett stort antal (tusentals) genetiska markörer. Det exakta antalet är ej möjligt att specificera, eftersom det beror på vilken avgränsning i kvalitet som används i de respektive analyserna. En första kopplingsanalys där endast de 1000 bästa markörerna användes genererade en genetisk karta bestående av sju stora kopplingsgrupper (Figur 4), vilket stämmer bra med de sju kromosomer som finns i ärt. Mikrosatellit-markörer publicerade av Hamon et al (2011) användes för att korrelera kopplingsgrupper med korrekt kromosom (data visas ej).

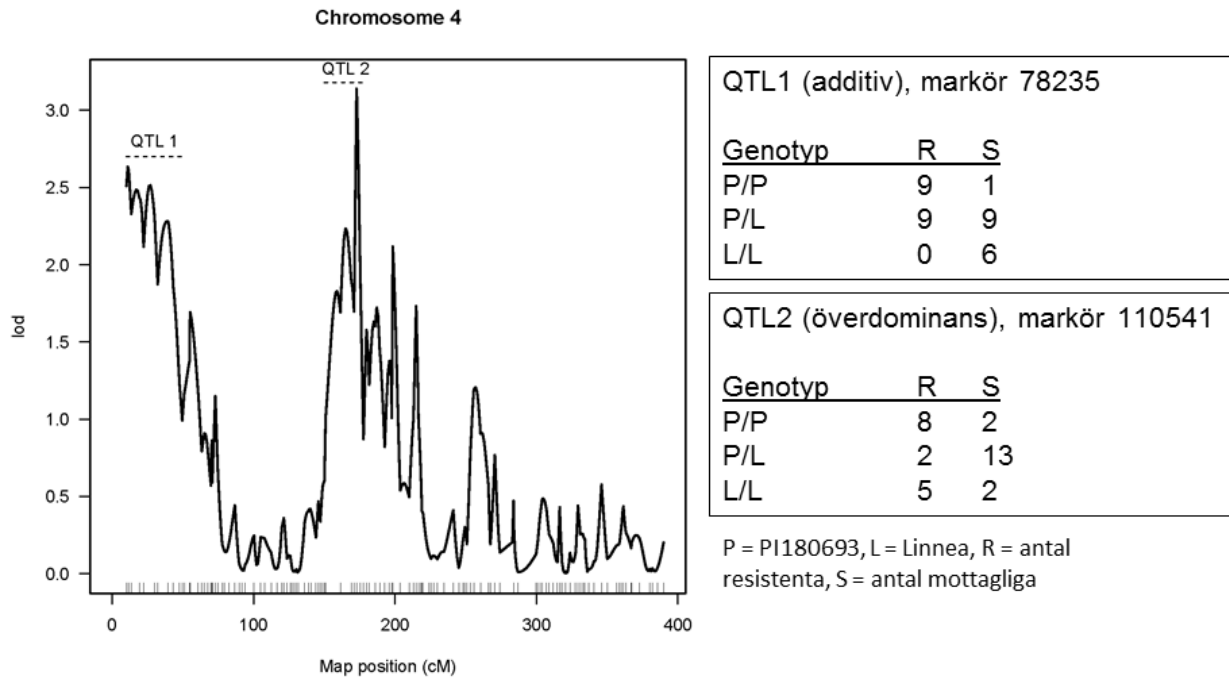
En efterföljande QTL-analys i R/qtl identifierade 14 genetiska markörer (13 SNP från RAD-Seq och en mikrosatellit [Hamon et al 2011]) som signifikant korrelerade med resistens mot ärtrotträta. Dessa 14 markörer var lokaliserade i två olika regioner (QTL1 och QTL2), båda på kromosom 4 (Figur 5). Alleler i QTL1 var additiva, där homozygoten PI180693/PI180693 (P/P) var mer resistent än heterozygoten PI180693/Linnea (P/L), vilken i sin tur var mer resistent än homozygoten Linnea/Linnea (L/L) (Figur 5). QTL2 uppvisade överdominans för sjukdomsbenägenhet, där heterozygoten (P/L) var mer känslig än någon av homozygoterna (P/P, L/L) (Figur 5). Mikrosatellit-markörer från Hamon et al (2011) kunde återigen användas för att korrelera QTL1 och QTL2 med tidigare kända QTL för resistens mot ärtrotträta; QTL1

motsvarade troligen QTL Ae-Ps4.1 och QTL2 motsvarade troligen Ae-Ps4.3 (Hamon et al 2011).



Figur 4: Kopplingskarta hos ärt, baserat på 1000 SNP markörer. De sju största kopplingsgrupperna visas, vilka motsvarar de sju kromosomerna hos ärt.

Linjer från två olika stadier i förädlingsprocessen, generation BC1S1 och BC1S5, genotypades för fem av dessa 14 markörer med iPLEX eller sekvensering. De analyserade linjerna från BC1S5, men inte BC1S1, hade signifikant högre sjukdomsresistens mot ärtrottröta. Endast en markör från den additiva QTL1, 81344, kunde genotypas. Samtliga linjer var homozygota för P/P, redan i den tidigt selekterade generationen BC1S1 (Tabell 1). Fyra markörer från QTL2 kunde genotypas. Samtliga markörer var homozygota för L/L i den mer selekterade BC1S5 generationen, vilket inte var fallet i den tidigare generationen BC1S1 (Tabell 1).



Figur 5: Lokalisering av QTL1 och QTL2 på kromosom 4 hos ärt. Genotyp – fenotyp tabeller för den mest signifikanta markören från vardera QTL.

Tabell 1. Procentuell fördelning av genotyper i två olika förädlingspopulationer¹, BC1S1 och BC1S5.

Allel ²	Markörer									
	81344 (QTL1)		5538 (QTL2)		110541 (QTL2)		32041a (QTL2)		32041b (QTL2)	
	BC1S1	BC1S5	BC1S1	BC1S5	BC1S1	BC1S5	BC1S1	BC1S5	BC1S1	BC1S5
P/P	100%	100%								
P/L			65%		65%		65%		66%	
L/L			35%	100%	35%	100%	35%	100%	34%	100%

¹ De två förädlingspopulationerna representerar ett tidigt (BC1S1) och ett senare (BC1S5) stadium i förädlingsprocessen. Linjer i BC1S5, men inte i BC1S1, har signifikant högre sjukdomsresistens (66% i sjukdomsindex) än den mottagliga föräldern Linnea (81% i sjukdomsindex).

² P/P = homozygot för allel från PI180693, P/L = heterozygot för alleler från PI180693/Linnea, L/L = homozygot för allel från Linnea.

Diskussion

Resistens mot rötröta i ärt orsakad av *A. euteiches* har tidigare visats vara en polygent nedärvd egenskap i försök i Frankrike och USA (Hamon et al 2011, Hamon et al 2013), vilket stämmer med resultaten från denna studie som gjordes under svenska förhållanden och med svenska isolat av *A. euteiches*. Genom att stegvis selektera för individer med resistens mot ärttröta i kombination med goda produktionsegenskaper har vi redan under projektets tre år utvecklat linjer med signifikant högre resistens jämfört med den mottagliga föräldern Linnea. Vissa av dessa linjer klyver fortfarande för vissa egenskaper vilket indikerar en betydande potential för ytterligare förädling. Vi har också utvecklat en ny metod (RAD-Seq) för storskalig genotypning i ärt, vilket redan i detta begränsade projekt har genererat betydligt fler genetiska markörer än tidigare använda system såsom mikrosatelliter (Loridon et al 2005) och RAPDs (Laucou et al 1998). Användningen av denna metod ökar stadigt inom växtförädling (He et al 2014). Vi identifierade 14 stycken genetiska markörer, fördelade på två olika QTL regioner, som signifikant korrelerade med resistens mot ärttröta i korsningen mellan den partiellt resistenta PI180693 och den mottagliga Linnea under svenska förhållanden. Dessa två QTL motsvaras troligen av två tidigare identifierade QTL för resistens; Ae-Ps4.1 och Ae-Ps4.3 (Hamon et al 2011). Genom att följa allelfördelningen för fem av dessa loci under olika steg i förädlingsprocessen kan vi påvisa en gradvis ökning av gynnsamma allelkombinationer; homozygoti för P/P för den additiva QTL1 och homozygoti för L/L för QTL2 där heterozygoten P/L är känslig. Sammantaget tyder detta på att allelfördelningen hos dessa loci åtminstone partiellt bidrar till de högre resistensnivåer som påvisades för vissa selekterade linjer i projektets slutskede. De identifierade genetiska markörerna kan därför ingå som en del av det beslutsunderlag som framtida urval baseras på. Av särskilt intresse är att jämföra linjer som är P/P jämfört med L/L för loci i QTL2, då våra QTL resultat indikerar att P/P genotypen möjligen är mer resistent än L/L genotypen som idag är fixerad i de traditionellt framavlade linjerna.

Slutsatser

Vi har i detta forskningsprojekt utvecklat nya ärtlinjer som uppvisar resistens mot aphanomyces ärttröta, i kombination med önskvärda produktionsegenskaper. Vi har också utvecklat och testat tekniken RAD-Seq för att generera och identifiera genetiska markörer som segregerar med resistensen mot ärttröta. Dessa markörer kan nu ingå i beslutsunderlaget för att styra urvalet av avkommor under förädlingsprocessen.

Resultatförmedling

De genererade ärtlinjerna och genetiska markörerna ingår i Findus fortsatta förädling. Exakt i vilken form beror på de genomgående strukturella förändringar som företaget just nu genomgår. De genererade genetiska markörerna kommer också att publiceras i en vetenskaplig artikel som planeras till hösten 2017, med den preliminära titeln "QTL mapping

of resistance towards root rot caused by *Aphanomyces euteiches* in pea (*Pisum sativum*). Projektet presenterades av Magnus Karlsson på den nationella växtskyddskonferensen som hölls i Uppsala, 10-11 november 2015. Projektet presenterades också av Rolf Stegmark på BioSoM-konferensen (Biologisk markkartering i praktiken), 18-19 november, 2015, samt på odlaredagarna (där medlemmar från ärtodlarföreningen deltog), 16-17 februari, 2016. Projektet presenterades vidare i Vetenskapsradion under rubriken Växtförädling i Mendels spår (<http://sverigesradio.se/sida/avsnitt/511149?programid=412>) av Rolf Stegmark och Örjan Carlborg. Projektet presenteras även på hemsidan för Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, Sveriges Lantbruksuniversitet. Delar av projektet ingick också i en uppsats på kandidat-nivå vid SLU; studenten Ingeborg Zinger från Hanze University of Applied Sciences i Nederländerna publicerade 2016 uppsatsen Genomic and phenotypic analysis of *Aphanomyces euteiches* resistance in *Pisum sativum* (Zinger 2016).

Referenser

- Broman K, Wu H, Sen Ś, Churchill G (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889-890.
- Catchen J, Hohenlohe P, Bassham S, Amores A, Cresko W (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology* 22:3124–3140.
- Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, McGee RJ, Le Goff I, et al (2011) New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and Applied Genetics* 123:261-281.
- Hamon C, Coyne C, McGee R, Lesné A, Esnault R, et al (2013) QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC Plant Biology* 13:45.
- He J, Zhao X, Laroche A, Lu Z, Liu H, et al (2014) Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science* 5:484.
- Hosseini S, Heyman F, Olsson U, Broberg A, Funck Jensen D, et al (2014) Zoospore chemotaxis of closely related legume-root infecting *Phytophthora* species towards host isoflavones. *Plant Pathology* 63:708–714.
- Jones FR, Drechsler C (1925) Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches* (N. sp.). *Journal of Agricultural Research* 30:293-325.
- Laucou V, Haurigné K, Ellis N, Rameau C (1998) Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* 97:905-915.
- Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel M, et al (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111:1022-1031.

Peterson B, Weber J, Kay E, Fisher H, Hoekstra H (2012) Double digest RADseq: An inexpensive method for *de novo* SNP discovery and genotyping in model and non-model species. PLoS ONE 7:e37135.

Zinger I (2016) Genomic and phenotypic analysis of *Aphanomyces euteiches* resistance in *Pisum sativum*. B.Sc.-thesis, 1-35. Hanze University of Applied Sciences, The Netherlands.