

# Kartoffelafgiftsfonden

## Ansøgning om tilskud i 2017

### 1. Markør-assisteret indkrydsning af brokresistens

#### 2. Ansøger og projektsvarlig

- a. Navn og adresse: Danespo A/S, Ryttervangen 1, 7323 Give
- b. CVR-nummer: 10440831
- c. web-adresse: [www.danespo.com](http://www.danespo.com)
- d. Navn og e-mail på projektleder: Hanne Grethe Kirk, hgk@lkfvandel.dk
- e. Pengeinstitut, registrerings- og kontonummer: Sydbank . 7030 0001555705

Projektet er oprindeligt bevilget til LKF Vandel, der nedlægges og overgår til Danespo. For nærmere beskrivelse se Bilag 1.

#### 3. Sammendrag af projektet

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 Aventra er den ene forælder, til at finde disse gener og lave markører, der kan bruges til at sortere i materialet.

#### 4. Projektperiode

2016-2020

#### 5. Formål

Projektets formål er at sætte hastigheden af forædlingen for brokresistens kraftigt i vejret, set på baggrund af, at brok nu igen er fundet i Danmark

#### 6. Baggrund for projektet

Baggrunden for projektet er den kritiske situation, der er opstået for kartoffelerhvervet med fundet af brok i Danmark. I skrivende stund ved man, at der er mere end en brokrace, og at en af dem er race 8; den eller de andre er ikke endeligt bestemt. Det vigtigste rent forædlingsmæssigt er, at det ikke drejer sig om den gammelkendte type 1, hvor et enkelt gen er tilstrækkeligt til at give resistens, og som en del sorter har resistens overfor.

Der er indtil nu fundet over 30 typer af brok globalt, hvor type 2, 6, 8 og 18 er de mest udbredte i Europa. Resistensen mod disse typer er mere kompliceret og kræver flere samvirkende gener.

Der findes enkelte hollandske sorter med bred brokresistens, men meget få blandt afkommet fra disse sorter får en tilstrækkelig høj resistens. Da knoldtesten er meget dyr vil pcr-markører for bare to af de gener, der skal være der samtidig, kunne betale sig ved at indsnævre feltet af potentielt resistente sorter. KAF bevilgede i efteråret 2014 et tilskud til LKFs deltagelse i et europæisk projekt, der dels skal udvikle DNA-teknikker til identificering af brokracer, dels finde resistensgener i to små krydsningsfamilier og udvikle markører for disse gener. I det projekt skal forædlingsdelen med nye krydsninger og nye resistenskloner først starte i 2016.

Derudover blev der i vinteren 2015 bevilget et et-årigt projekt, der udnytter den eksisterende krydsningspopulation, der er lavet i forbindelse med projektet: "MAShed Potato: Moving potato breeding into the post genome era (MASPot)". Denne population indeholder bl.a. markknolde af 576 kloner, hvor den ene forælder er den brokresistente stivelsessort Aventra, se tabel 1. Disse kloner er sendt til test i Polen for resistens mod brok, og resistente, middelresistente og modtagelige kloner skal grupperes og DNA-sekventeres for at finde markører for resistensgener. Resultaterne af resistenstesten foreligger nu, og i løbet af efteråret skal DNA-sekventeringen foregå. Projektbevillingen var ikke stor nok til at muliggøre analyserne af sekventeringsresultatet på AAU, så det indgår i ansøgningen til indeværende projekt. Aventra indgår som resistensdonor i projektet, men kommer ikke ud som resistent i de polske tests (IHAR; Tabel 1). I de hollandske tests (HLB) kommer både Aventra og 4 andre sorter ud som resistente

# Kartoffelafgiftsfonden

mod brok 18. Netop kombinationerne mellem Aventura og disse fire sorter giver afkom, der også klarer den hårde polske test. Disse sorter må derfor have gener, der supplerer Aventras gener og sammen giver en højere resistens.

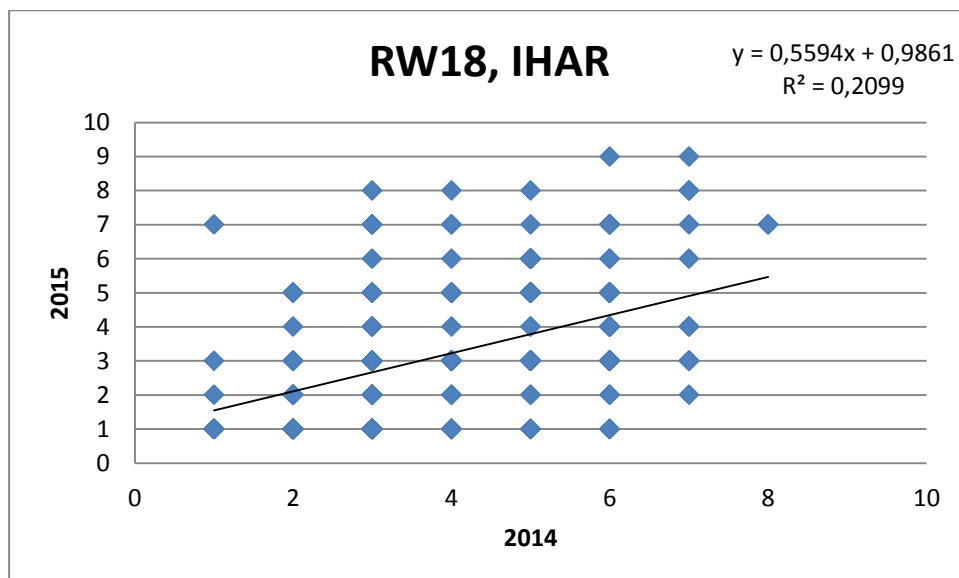
Man må forvente, at der er et stort overlap af resistensgener mellem de resistente sorter, der er på markedet, da de er ret tæt beslægtede, og markører for Aventras gener kombineret med LKF-klonernes vil være et rigtig godt udgangspunkt for en effektiv resistensforædling.

Tabel 1. Brokresultater for sorter anvendt som forældre i projektet

SOR	Brok 18			Brok 6			Brok 8
	HLB 15	IHAR 14	IHAR 15	HLB 15	IHAR 14	IHAR 15	IHAR 15
Desiree	1	1	1		3	5	1
Kuras	1	2	1		1	1	1
96-BYM-8	3	2	1		1	1	1
Shepody		1	1		2	3	3
04-GIV-03	6	5	4		4	1	4
Aventura	8	3	1		4	7	3
05-GQE-02	9	1	7		3	5	5
Rywal	9	2			1		
07-LJE-1	9	2	5		2	3	5

## 7. Status for projektet (kun relevant, hvis det er et igangværende projekt støttet af Fonden)

På basis af brokresultaterne fra IHAR 2014 blev udvalgt resistente og modtagelige bulks til sekventering. Disse bulks samt alle øvrige kloner med resistens blev gentestet. Som forventet var korrelationen mellem årene dårlig (Figur 1). Broktesten er en vanskelig biologisk test, der let kan mislykkes, og hvor man vil forvente en del escapes. Det understreger både vigtigheden af gode genetiske markører for resistens og vanskeligheden ved at finde dem med tilstrækkelig sikkerhed.



Figur 1. Korrelation mellem to forsøgsår for brok 18

På LKF er der i 2016 sået frø af brokresistente sorter, ligesom der er lavet nye krydsninger. De nyudviklede markører skal anvendes til at sortere i materialet og dels finde potentielle brokresistente sorter, dels finde sorter, forældrelinjer, med så mange resistensgener som muligt, der vil være de bedste til at videregive brokresistensen.

588 kloner fra MASPOT populationen blev testet for brok. 199 kloner stammende fra kryds mellem 7 forældre havde resistens mod brok pathotype 6 og 18. Aventura som er kendt som donor af

# Kartoffelafgiftsfonden

Genomisk DNA blev ekstraheret fra alle 199 kloner og forskellige pools af resistente og modtagelige kloner blev dannet og sekventeret. Bulk Segregant Analyse af de resulterende 392 millioner DNA sekvensreads afslørede ikke mindre end 9 QTLs på Kromosom 1, 2, 4, 5, 6, to på 9, 10 og 11. Altså en noget mere kompleks genetik end oprindeligt forventet. To af disse QTLs på kromosom 5 og på kromosom 9 (1. top) er observeret for første gang i dette studie.

Næsten alle kloner er resistente både mod 6 og 18 og kun meget få kun for den ene af de to pathotyper. Dette efterlader ikke meget statistisk styrke til at identificere hvilke af de 9 QTLs som er specifikke for en pathotype. Dog er der indikationer, at den ene QTL på kromosom 9 (~2Mb) er specifik for pathotype 6 og den på kromosom 2 muligvis specifik for pathotype 18.

Hvis man prøver at undersøge hvilke gener som stammer fra hvilke forældre, der donerer hvilke gener fås flg. Tabel:

	Ch01	Ch02	Ch04	Ch05	Ch06	Ch09.1	Ch09.2	Ch10	Ch11
Aventra				x		x			
CAQ	x				x			x	
Desiree	x				x			x	x
GIV			x						
GQE					x			x	
Rywal		x	x				x	x	
LJE					x		x		

Altså er der sammenfald mellem de "to nye" QTL og dem som kommer fra Aventra!

PCR primere blev lavet således at ca. 250 bp områder på toppen af disse QTLs kunne ampliceres og sekventeres. Ud fra disse sekvenser kan vi angive en genotype for alle kloner i QTL områderne og identificere antallet af observerede haplotyper (alleler) i populationen. Vi kan herefter korrelere genotypen med fænotypen og identificere hvilke haplotyper som har størst betydning for fænotypen.

Her er det helt klart, at netop Aventra QTL på kromosom 5 er den allermest signifikante i denne population. Men det skal fortolkes i lyset af, at Aventra jo er den ene forældre til alle kloner i populationen og derfor vil alleler stamme fra Aventra også være mest betydningsfulde for netop denne population. Dette er ikke nødvendigvis gældende for andre kartoffelpopulationer. Yderligere analyse viser også at genet er ikke dominant og at resistens bliver bedre med højere alleldosis.

Ud fra de bestemte genotyper og deres korrelation til fænotypen kan man lave en prædiktiv algoritme, som kan forudsige fænotypen ud fra genotypen. Når vi gør det får vi en prædiktions sensitivitet på 81% og en specificitet på 79% og en samlet præcision på 80%. Det skal dog understreges, at det er indenfor populationen og meget afhængig af resistensen fra Aventra og skal udvides med flere data fra andre populationer for at have bredere relevans. Det er dog sandsynligt at algoritmen vil have god prædiktiv styrke i kryds med Aventra.

Altså har vi 1) bestemt 9 QTL regioner, heraf 2 nye, som er af betydning for brok resistens i kartoffel. 2) Disse to nye kommer alene fra Aventra. 3) Hovedgenet for Aventra sidder på kromosom 5. Vi har en funktionel markør (en PCR med efterfølgende sekventering) der kan følge denne resistens. 4) Vi kan forudsige resistens i Aventra kryds med 80% præcision.

## 8. Beskrivelse af projektets aktiviteter

På AAU er der sekventeret en pool af resistente, delvis resistente og modtagelige sorter, resultaterne herfra skal analyseres og markører for resistensgener defineres. Ifølge litteraturen er de tilgængelige markører meget afhængige af den genetiske baggrund, til dels fordi resistensgenerne sidder yderligt på kromosomerne, hvor overkrydsningsaktiviteten er stor, så markørerne skal sidde meget tæt ved generne for at kunne bruges i en anden genetisk baggrund end der, hvor de er fundet.

Denne meget nøjagtige kortlægning sker ved hjælp af en statistisk metode, som er udviklet på AAU i forbindelse med STF projektet MASPot til at identificere hvilke dele af genomet som er utilfældigt fordelt

# Kartoffelafgiftsfonden

mellem grupperne og som derfor repræsenterer områder på genomet som er associeret med resistens. Gener som er bestemmende for resistens vil ligge i disse områder. Ved yderligere analyse af DNA sekvenserne i disse områder kan man identificere præcis hvilken genetisk variation som forårsager denne forskel. Denne information kan bruges som genetisk markør til effektivt at kunne følge resistens i senere krydsninger.

## Effektvurdering af de forventede resultater

Forældrene i MAS-populationen er normale sorter, så afkommet har direkte sortspotentiale. Derudover vil de nyudviklede markører muliggøre en tidlig test, måske allerede på frøplanteniveau, så pladsen i marken kan reserveres til sorter med stærkt øget sandsynlighed for brokresistens. Slutresultatet er hurtigere forædling af gode brokresistente sorter. Dette arbejde vil også bidrage til en generelt udvidet forståelse af, hvilke gener, der er af betydning for brokresistens og en øget forståelse af denne vigtige sygdoms patologi og planternes resistensmekanisme. På langt sigt vil det bidrage til en bedre forståelse af sygdommens virkemåde og udbredelse og dermed også hvordan man bedre kan bekæmpe sygdommen i fremtiden.

## Hvordan formidles resultater

Ud over rapporten til KAF formidles viden om de nye sorter på avlermøder og lignende. AAUs del af arbejdet vil blive publiceret i et internationalt videnskabeligt tidsskrift.

## 11. Projektets budget og finansiering

### 11.1 Projektets samlede udgifter i hele projektperioden

År	Projektets samlede tilskudsgrundlag regnskab og budget 1.000 kr.	Tilskud fra Fonden regnskab / bevilget / ansøgt / forventet ansøgt 1.000 kr.	Tilskuddets andel af det samlede tilskudsgrundlag %
2016	464	400	86
2017	281	281	100
2018	285	285	100
2019	290	290	100
2020	291	291	100
<b>I alt</b>	<b>1611</b>	<b>1547</b>	<b>96</b>

# Kartoffelafgiftsfonden

## 11.2 Projektets budget og finansiering i 2017

### Projektets samlede budget i tilskudsåret 1. januar - 31. december 2017

					Budget 2017 1.000 kr.
Interne lønudgifter	Antal timer	Timeløn uden overhead	Overhead Max 20 %-tillæg	Timeløn med overhead	
1. <Angiv medarbejder- / løngruppe>	175	391	20.0	469	68
2. <Angiv medarbejder- / løngruppe>	200	273	20.0	328	55
3.					
4.					
5.					
6.					
Interne lønudgifter i alt (uden overhead)					123
Ekstern bistand					90
Udstyr	Værdi før afskrivning		Værdi efter afskrivning		0
Øvrige projektudgifter					43
<b>Udgifter før administrative omkostninger / overhead</b>					<b>256</b>
Adm. omkostninger/OH, tillæg til intern løn (max 20 pct)					25
<b>Projektets samlede udgifter</b>					<b>281</b>
Indtægter					
<b>Projektets samlede tilskudsgrundlag</b>					<b>281</b>
Overheads andel af projektets samlede tilskudsgrundlag					9%

### Projektets samlede finansiering i tilskudsåret 1. januar - 31. december 2017

			Budget 2017 %	1.000 kr.
<b>Det ansøgte tilskud fra Fonden</b>			100%	<b>281</b>
Eget bidrag			0%	0
Andre offentlige tilskud		ansøgt	bevilget	
1.				
2.				
3.				
Andre private tilskud:		ansøgt	bevilget	
1.				
2.				
<b>I alt</b>			<b>100%</b>	<b>281</b>
kontrollinje - skal være 0			0%	0

#### Opgørelse af udgifter med eller uden moms - sæt kryds

1. Ansøger er momsregistreret, og udgifter er opgjort uden moms:

x
---

2. Ansøger er ikke momsregistreret, og udgifter er opgjort med moms:

--

# Kartoffelafgiftsfonden

## 3.3. Bemærkninger til projektets finansiering

## 3.4. Specifikation og bemærkninger til de enkelte hovedposter i budgettet

### Intern løn

### Ekstern bistand

Broktest 90.000

### Udstyr

### Øvrige projektudgifter

Laboratorieforbrugsvarer 30.000, markleje og fordelbare markudgifter og drivhusudgifter 5.000, rejser og kørsel 5.000, Revisor 3000.

### Administrative omkostninger / overhead som finansieres af projektet

El, vand, varme, kontorhold, husleje, bogholderi, regnskab, administration.

.

# Kartoffelafgiftsfonden

## Bilag 1.

### **Beskrivelse af samarbejde mellem LKF-Vandel, Danespo og KMC vedrørende projekter med tilskud fra Kartoffelafgiftsfonden (KAF) i forbindelse med afviklingen af Landbrugets Kartoffelfond.**

Bestyrelsen i Landbrugets Kartoffelfond har i foråret 2016 besluttet at afvikle fonden og har derfor indgivet ansøgning om opløsning af fonden til NaturErhvervstyrelsen.

Dette betyder ikke, at forædlingen nedlægges. Tværtimod vil indsatsen i dansk sortsudvikling blive forøget og drevet videre af Danespo. I den forbindelse ses det som essentielt at relevante understøttende projekter fortsat videreføres

Danespo og KMC har et ansvar for afvikling af fonden, der sikrer, at det forskningsarbejde, der er udført i fonds regi, ikke går tabt, og dette gælder også for igangværende projekter, hvor fonden har forpligtet sig over for erhvervet eller anden tredje mand.

Herunder gælder også projekter med tilskud fra Kartoffelafgiftsfonden, hvoraf dette projekt er et af dem. Vi ansøger derfor samlet med LKF-Vandel som den, der fortsat udfører arbejdet indtil fonden nedlægges, hvorefter Danespo overtager de administrative og forædlingsmæssige forpligtigelser.

Pt. forventes fonden at være afviklet med udgangen af 1 halvår 2017, hvorfor vi gerne vil ansøge KAF om tilladelse til at projektet ansøges med Danespo som ansvarlig ansøger og LKF - Vandel (indtil lukning) og KMC som ansvarlige samarbejdspartnere omkring projektet.

Danespo og KMC går ind og overtager den forpligtigelse, som fonden tidligere har haft og vil derigennem sikre at projektet færdiggøres videnskabeligt korrekt.

Fondens nuværende direktør, Jens Kristian Ege Olsen, Souschef Lars Næsted, Danespo og Agrochef Christian Feder, KMC står til Kartoffelafgiftsfondens disposition hvis man ønsker yderligere information og uddybning.