

## **Tytuł zadania**

Wyróżnianie form ziemniaka o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak przy wykorzystaniu metod konwencjonalnych i molekularnych. Charakterystyka nowego źródła odporności na *Globodera pallida* znalezionej w *Solanum gourlayi*.

## **Kierownik zadania**

mgr Dorota Milczarek

## **Cel zadania**

Celem zadania jest poznanie genetycznych uwarunkowań odporności na mątwiki zaobserwowanej w gatunku *S. gourlayi* oraz wyróżnienie w obrębie ziemniaka o różnych kierunkach użytkowania form o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak (patotypy mątwika ziemniaczanego - *Globodera rostochiensis* i mątwika agresywnego - *G. pallida*).

Celem tematów realizowanych w ramach zadania w 2015 roku było: a) ocena odporności wybranych form *Solanum gourlayi* na patotypy Pa1, Pa2 i Pa3 *Globodera pallida*; b) wyprowadzenie siewkowych populacji diploidalnych, z których zostanie wybrana populacja mapująca, która posłuży do zbadania podłoża genetycznego odporności na mątwika agresywnego (*Globodera pallida*) zidentyfikowanej w gatunku *Solanum gourlayi*; c) wyprowadzenie siewkowych populacji tetraploidalnych, które posłużą do zbadania możliwości selekcji polskich materiałów hodowlanych pod kątem odporności na patotypy Pa2 i Pa3 *G. pallida* przy użyciu markera HC. Finalnie zostaną z nich również wyselekcjonowane klony o złożonej odporności na mątwiki, posiadające markery genów odporności oraz wyróżniające się dobrym poziomem cech użytkowych.

## **Materiały i metody**

W 2015 roku w ramach tematu przeprowadzono ocenę odporności na patotypy mątwika agresywnego ośmiu klonów diploidalnych. Cztery klony, testowane w roku 2014, przetestowano powtórnie jedynie na te patotypy, dla których wykazały się odpornością w badaniu wykonanym w roku poprzednim. Trzy klony, nie testowane w roku 2014, przetestowano pod kątem odporności na wszystkie patotypy *G. pallida*. Do powtórnych testów odporności dołączono również podatną formę mateczną DW 94-4235, wykorzystaną w roku 2014 i przewidzianą do wykorzystania w krzyżowaniach uzupełniających. Klon ten przetestowano powtórnie pod kątem odporności na patotyp Pa3. Testy odporności zostały wykonane zgodnie z procedurą EPPO. Próby zostały przeprowadzone na pojedynczych bulwach w doniczkach o pojemności 1 litra z glebą zawierającą żywe cysty nicieni. Test przygotowano w piętnastu powtórzeniach dla kombinacji klon DG 06-28/patotyp Pa1, klon DG 90-1/patotyp Pa2, klon DG 92-227/patotyp Pa3 i klon DG 90-245/patotyp Pa3 i w dziesięciu powtórzeniach dla każdej kombinacji klon/patotyp dla klonów testowanych pod kątem odporności na wszystkie patotypy *G. pallida*. Rośliny po posadzeniu rosły w szklarni przez sześć tygodni. Po tym okresie liczone cysty z każdej doniczki. Stosunek liczby cyst z badanego klonu do liczby cyst z podatnej odmiany kontrolnej stanowi o stopniu odporności danego genotypu. Odporność na nicienie jest oceniana w skali 9-cio stopniowej, w której 9 oznacza najwyższy stopień odporności.

Wykonano również program diploidalnych krzyżowań uzupełniających z wykorzystaniem pięciu form rodzicielskich (podatna forma mateczna: DW 94-4235 i odporne formy ojcowskie: DG 00-908, 79-429, 79-1582 i Sg 2/7). Ze zdrowych bulw, przetestowanych na obecność patogenów kwarantannowych: PSTVd i CMS w poprzednim sezonie, przygotowano rośliny do krzyżowań w formie szczepień na podkładkach z psianki i pomidora. Pyłek klonu Sg 2/7, stanowiącego formę ojcowską w krzyżowaniach 2x, pozyskano z kolekcji zabezpieczonej w ciekłym azocie. W celu przedłużenia okresu kwitnienia rośliny prowadzono na 1-2 pędy. W trakcie kwitnienia pyłek zebrano, zabezpieczono oraz oceniono pod kątem płodności. Zabezpieczono również DNA wszystkich wykorzystanych form rodzicielskich.

W polu prowadzono 4 populacje siewkowe 2x i 3 populacje siewkowe 4x uzyskane z krzyżowań 2014. Wysiano do 300 nasion na populację. Nasiona wysiano do kuwet napełnionych ziemią z dodatkiem torfu, w uformowane rowki w rozstawie 0,5:3 cm i przysypano piaskiem. Uzyskane siewki przepikowano do doniczek i przeniesiono na zewnątrz w celu aklimatyzacji. Pod koniec maja siewki wysadzono w polu w rozstawie 28:62,5 cm. W trakcie trwania sezonu wegetacyjnego zebrano liście w celu zabezpieczenia materiału DNA. Po całkowitym zaschnięciu naci zebrano wszystkie klony 2x, które wytworzyły bulwy, oraz te klony 4x które wytworzyły minimum 5 bulw. Zebrane klony 4x opisano pod kątem cech morfologicznych bulw, takich jak: plon, wielkość bulw, kształt, regularność zarysu i głębokość oczek. Wybrane, wyróżniające się klony, przetestowano pod kątem obecności markera 57R związanego z genem *H1* (57R), nadającym roślinom ziemniaka odporność na patotypy Ro1 i Ro4 *G. rostochiensis*.

## Wyniki i dyskusja

Powtórne badanie czterech klonów testowanych w roku 2014 potwierdziło odporność trzech z nich odpowiednio na patotypy Pa2 (DG 90-1: stopień 6) i Pa3 (DG 92-227 i DG 90-245: stopień 7 i 6). Każdy z badanych w pierwszym teście klonów (DG 00-908, 79-429 i 79-1582) charakteryzował się podwyższoną odpornością na patotyp Pa3 (stopień odporności: 8, 8 i 6). Odnotowane zróżnicowanie odporności na różne patotypy mątwika agresywnego pomiędzy klonami oraz różny stopień tej odporności (6 - 8) może wskazywać na poligeniczny charakter odporności. Odporność na *G. pallida* w większości obecnie scharakteryzowanych źródeł odporności ma charakter ilościowy, przy odpowiednim połączeniu genów odporności o małych efektach można jednak uzyskać genotypy charakteryzujące się zwiększoną odpornością. Powtórne badanie klonu DG 06-28 wykazało jego podatność na patotyp Pa1, na który to patotyp w pierwszym badaniu na 5 bulwach klon wykazał odporność w stopniu 5. Potomstwo tego klonu zostanie więc wykluczone z dalszych badań. Ustalenie stopnia odporności na dany patotyp *G. pallida* wymaga wielu powtórzeń biologicznych oraz testów przeprowadzonych w co najmniej dwóch sezonach wegetacyjnych aby wyeliminować zmienność biologiczną osobników badanych (roślin uzyskanych z poszczególnych bulw) oraz zmienność wykorzystanej populacji mątwika. Szkodnik ten posiada bowiem pewne zdolności przystosowawcze, polegające na zdolności do produkcji wielu efektorów - białek biorących udział w relacji pasożyt-żywiciel, a wśród nich białek pozwalających wyciszyć reakcję odpornościową gospodarza.

Do mapowania genów odporności wykorzystuje się diploidalne populacje mapujące. Badania odporności na *G. pallida* klonów, wybranych jako formy rodzicielskie do przeprowadzenia krzyżowań uzupełniających 2x, potwierdziły ich przydatność jako form rodzicielskich do uzyskania populacji mapującej. Wybrane diploidalne klony ojcowskie

charakteryzowały się płodnością pyłku od 30% do 90%. Trzy z nich wytwarzają również ziarna pyłku o niezredukowanej liczbie chromosomów. W wyniku przeprowadzonego programu krzyżowań uzyskano łącznie 59 jagód. Liczba jagód uzyskanych z krzyżowań wyniosła od 3 do 50 dla poszczególnych kombinacji krzyżówkowych. Uzyskano jagody z następujących kombinacji: 6 jagód z krzyżowania DW 94-4235 x DG 00-908, 3 jagody z krzyżowania DW 94-4235 x 79-429 oraz 50 jagód z krzyżowania DW 94-4235 x Sg 2/7. Rośliny wyprowadzone z nasion uzyskanych z krzyżowania DW 94-4235 x DG 00-908 posłużą do uzupełnienia tej populacji uzyskanej z nasion pochodzących z krzyżowania 2014. Z kombinacji krzyżówkowej DW 94-4235 x Sg 2/7 otrzymano liczbę jagód wskazującą na możliwość otrzymania licznej populacji siewkowej w kolejnym sezonie. Z diploidalnych populacji siewkowych prowadzonych w polu w 2015r zebrano łącznie 250 klonów wytwarzających bulwy, co łącznie z nasionami uzyskanymi z krzyżowań uzupełniających 2015 pozwoli na wytypowanie populacji mapującej, która posłuży do zbadania podłoża genetycznego odporności zaobserwowanej w *Solanum gourlayi*. Liczba bulw uzyskanych dla poszczególnych rodów diploidalnych wyniosła od 3 do 40, co pozwoli na przeprowadzenie wstępnych testów odporności dla tych z nich, które wytworzyły ponad 7 bulw.

Liczba klonów zebranych z populacji siewkowych tetraploidalnych (199) pozwoli natomiast na przetestowanie możliwości selekcji form o podwyższonej odporności na *G. pallida* za pomocą markera HC, po wykonaniu dla tych materiałów fenotypowej oceny odporności. Ocena cech użytkowych siewek 4x wskazuje na dobry poziom plonowania i cech morfologicznych bulw klonów uzyskanych w wyniku krzyżowań form o złożonej odporności na *Globodera* spp. Populacje te posłużą do sprawdzenia możliwości wykorzystania markerów do selekcji form łączących odporność na *Globodera* spp. z dobrym poziomem cech użytkowych. Wykorzystanie markerów DNA w procesie selekcji w praktyce hodowlanej pozwala na potwierdzenie obecności genów odporności na bardzo wczesnym etapie hodowli. We wcześniejszych badaniach wykazano, że selekcja za pomocą markera 57R jest niezależna od poziomu cech użytkowych selekcionowanych klonów. 9 wybranych klonów, wyróżniających się wysokim poziomem cech użytkowych posiada marker 57R, co wskazuje na możliwość wytypowania spośród populacji siewkowych klonów o wysokim poziomie badanych cech połączonych z odpornością na patotypy Ro1 i Ro4 *G. rostochiensis*.

## Wnioski

1. Powtórne badanie czterech klonów testowanych w roku 2014 potwierdziło odporność trzech z nich: DG 90-1, DG 92-227 i DG 90-245. Odporność klonu DG 06-28 w powtórny teście została przełamana, z dalszych badań zostanie więc wykluczone potomstwo tego klonu.
2. Powtórne badanie formy matecznej DW 94-4235, wybranej do krzyżowań 2014 i 2015, potwierdziło jej podatność i zarazem przydatność do stworzenia w krzyżowaniach z formą odporną populacji mapującej.
3. Klony DG 00-908, 79-429 i 79-1582, wybrane do krzyżowań uzupełniających, charakteryzują się odpornością na jeden patotyp - Pa3, co potwierdza ich przydatność do stworzenia populacji mapującej odporność *S. gourlayi*.
4. Liczba klonów wybranych z populacji siewkowych pozwoli na przetestowanie możliwości selekcji form o podwyższonej odporności na *G. pallida* za pomocą markera HC, po wykonaniu dla tych materiałów fenotypowej oceny odporności na patotypy Pa i Pa3.
5. Ocena cech użytkowych siewek prowadzonych w polu w roku 2015 wskazuje na możliwość wytypowania spośród nich klonów o wysokim poziomie badanych cech połączonych z odpornością na patotypy *Globodera* spp.

6. 9 wybranych klonów, wyróżniających się wysokim poziomem cech użytkowych posiada marker 57R, co wskazuje na możliwość wytypowania spośród populacji siewkowych klonów o wysokim poziomie badanych cech połączonych z odpornością na patotypy Ro1 i Ro4 *G. rostochiensis* spp.
7. Z czterech populacji siewkowych 2015 z dalszych badań zostanie wykluczona populacja DW 94-4235 x DG 06-28, ze względu na przełamanie w testach 2015 odporności formy ojcowskiej DG 06-28.
8. Populacja DW 94-4235 x DG 00-908 będzie traktowana jako niepełna i zostanie uzupełniona siewkami uzyskanymi z nasion z krzyżowania uzupełniającego przeprowadzonego w roku 2015.
9. Uzyskano również 50 jagód z krzyżowania uzupełniającego DW 94-4235 x Sg 2/7, co pozwoli na przygotowanie dużej populacji siewkowej w kolejnym sezonie.
10. Otrzymana z populacji siewkowych 2015 liczba roślin oraz liczba jagód uzyskana z krzyżowań uzupełniających powinna być wystarczająca do wytypowania populacji mapującej, która posłuży do zbadania podłoża genetycznego odporności zaobserwowanej w *Solanum gourlayi*.
11. Liczba bulw otrzymana dla poszczególnych genotypów z populacji siewkowych pozwoli na przeprowadzenie wstępnych testów odporności dla tych z nich, które wytworzyły ponad 7 bulw.