

Wyróżnianie i charakterystyka tetraploidalnych form ziemniaka odpornych na wirusy M i S ziemniaka z wykorzystaniem selekcji metodami konwencjonalnymi i markerami molekularnymi.

Cele zadania.

1. Rozmnożenie form tetraploidalnych 4x mających w swym pochodzeniu odporność na PVM, pochodzącą z dwóch dzikich gatunków: *S. megistacrolobum* lub *S. gourlayi* oraz pełna charakterystyka cech użytkowych.
2. Uzyskanie siewek mających w swym pochodzeniu odporność na PVS pochodzącą z *S. tuberosum subsp. andigena*.
3. Potwierdzenie obecności w badanym materiale form 4x z genem odporności na wirus M ziemniaka poprzez zastosowanie markerów molekularnych sprzężonych z genami *Rm* (markery *GP 283* i *GP 250*) i *Gm* (marker *SC878*).

Materiały i metody.

W ramach tematu 1 z populacji tetraploidalnych 4x mających w swym pochodzeniu źródło odporności na PVM, pochodzące z *S. megistacrolobum* (*Rm*) posadzono po 150 linii, natomiast z populacji 4x × 4x mających w swym pochodzeniu źródło odporności na PVM pochodzące z *S. gourlayi* (*Gm*) po 110 linii. W sumie w doświadczeniach polowych prowadzono 820 linii siewkowych. Dla zebranych jesienią linii siewkowych z populacji 4x przeprowadzono ocenę następujących cech morfologicznych w skali 1-9: kształt bulw, regularność zarysu bulw, głębokość oczek, wielkość bulw oraz barwę i wygląd skórki. Po zbiorze oceniony został również plon bulw.

W ramach tematu 2 w szklarni wysiano po 250 nasiona 2 populacji 4x (*Ns*) × 4x (*Ns*). Z każdej populacji wysadzono w polu po 150 roślin w celu uzyskania materiału do dalszych badań. W trakcie sezonu wegetacyjnego z każdej populacji zebrano materiał roślinny w celu izolacji genomowego DNA. Po zbiorze przeprowadzono opis w skali 1-9 następujących cech morfologicznych: kształt bulw, regularność zarysu bulw, głębokość oczek, wielkość bulw, barwę i wygląd skórki oraz oceniono plon bulw.

W ramach tematu 3 ocenie molekularnej poddane zostały 4 populacje 4x × 4x, w których źródłem odporności na wirus M ziemniaka jest *S. megistacrolobum* (*Rm*) oraz 2 populacje ze źródłem odporności pochodzącym z *S. gourlayi* (*Gm*). W celu potwierdzenia w badanych 4 populacjach form 4x z genem odporności na wirus M ziemniaka pochodzącym z *S. megistacrolobum* (*Rm*) zastosowano 2 markery molekularne *GP 283* i *GP 250*. Aby potwierdzić w pozostałych 2 populacjach występowanie form 4x z genem odporności na wirus M ziemniaka pochodzącym z *S. gourlayi* (*Gm*) zastosowano marker *SC878*.

W ramach tematu 3 przeprowadzono również wstępne testy laboratoryjne pozwalające na ustalenie metodyki i warunków przeprowadzania reakcji Real-Time-PCR, mającej na celu ocenę zawartości wirusa M ziemniaka w zakażonym materiale. Do ustalenia metodyki oceny zawartości wirusa PVM metodą Real - Time PCR wybrano 5 rodów tetraploidalnych oraz wzorzec odporny. Rody wysadzone zostały w szklarni do doniczek. Kiedy miały 3-4 liście przeprowadzono zakażenia mechaniczne. Do zakażeń użyto szczepu *M_{55a}*. Po 4 tygodniach od zakażenia pobierano zakażone PVM próbki liści, zamrażano w -80°C, a następnie izolowano RNA i doczyszczano. Po uzyskaniu RNA wirusowego o odpowiednich parametrach jakościowych przeprowadzono szereg reakcji Real-Time PCR w celu ustalenia właściwych warunków amplifikacji. Reakcje Real-Time PCR prowadzono w termocyklerze, z wykorzystaniem barwnika SYBR Green. W celu wybrania najwłaściwszego genu referencyjnego w trakcie analiz przebadano cztery różne geny: *cox*, *18SrRNA*, *lf1á*, *L2*.

Wyniki i dyskusja.

W ramach tematu 1 z populacji tetraploidalnych 4x mających w swym pochodzeniu źródło odporności na PVM, pochodzące z *S. megistacrolobum* (*Rm*) zebrano od 131 do 149 linii siewkowych. Natomiast z populacji ze źródłem odporności z *S. gourlayi* (*Gm*) zebrano wszystkie genotypy. Dla populacji PW – 363 × PW – 375 średni plon bulw wyniósł 1,3 kg/krzak przy zakresie od 0,5 do 2,1 kg/krzak. Linie siewkowe z tej populacji charakteryzowały się bulwami owalnymi o średniej wielkości (3,6), regularnym zarysie (6,1), płtykich oczkach (6,7) oraz średnio cienkiej skórce (5,7). Średni plon dla populacji 07-IX-21 × PW – 375 wyniósł 1,4 kg/krzak przy zakresie od 0,4 do 2,5 kg/krzak. Morfologia bulw ocenianych linii była bardzo zbliżona do poprzedniej populacji: bulwy okrągłoowalne o średniej wielkości (4,9), regularnym zarysie (6,2), płtykich oczkach (6,5) oraz średnio cienkiej skórce (5,3). Średni plon bulw dla populacji 07-IX-169 × PW – 375 wyniósł 1,6 kg/krzak przy zakresie od 0,5 do 2,9 kg/krzak. Linie z tej populacji miały bulwy okrągłoowalne, średnio duże (5,4), o regularnym zarysie (6,5), płtykich oczkach (6,7) oraz średnio cienkiej skórce (5,5). W kolejnej populacji 07-VIII-83 × PW – 363 średni plon bulw wyniósł 1,3 kg/krzak przy zakresie od 0,6 do 2,3 kg/krzak. Bulwy uzyskanych linii były okrągłoowalne, średnio duże (5,3), o regularnym zarysie (6,5), płtykich oczkach (6,8) oraz średnio cienkiej skórce (5,5).

Populacja „*Gm*” PS – 1682 × PS – 1741 wyróżniała się od pozostałych wysokim średnim plonem bulw 1,7 kg/krzak przy zakresie od 0,3 do 3,3 kg/krzak. Linie z tej populacji charakteryzowały się bulwami okrągłoowalnymi o średniej wielkości (5,6), regularnym zarysie (6,3), płtykich oczkach (6,5) oraz średnio cienkiej skórce (5,5). Druga z populacji „*Gm*” PS – 1740 × PS – 1741 uzyskała również wysoki średni plon 1,7 kg/krzak przy zakresie od 0,6 do 2,7 kg/krzak. Bulwy uzyskanych linii były owalne, średnio duże (6,0), o regularnym zarysie (5,8), płtykich oczkach (6,0) oraz średnio cienkiej skórce (5,8). Niskie współczynniki korelacji Pearsona dla poszczególnych cech użytkowych pomiędzy ocenami uzyskanymi w 2015 roku dla siewek i ocenami uzyskanymi w 2016 roku dla linii siewkowych wskazują na duże zróżnicowanie w uzyskanych ocenach w poszczególnych latach obserwacji.

W ramach tematu 2 z populacji tetraploidalnych PS – 1723 x PW – 363 oraz PS – 1769 x PS – 1763 mających w swym pochodzeniu źródło odporności na PVS, pochodzące z *S. tuberosum subsp. andigena* (*Ns*) zebrano po 110 siewek. Dla populacji PS – 1723 x PW – 363 średni plon bulw wyniósł 1,6 kg/krzak przy zakresie od 0,8 do 3,0 kg/krzak. Siewki z tej populacji charakteryzowały się bulwami owalnymi o średniej wielkości (5,1), regularnym zarysie (6,1), płtykich oczkach (6,5) oraz średnio cienkiej skórce (5,2). Dla populacji PS – 1769 × PS – 1763 średni plon bulw wyniósł 1,6 kg/krzak przy zakresie od 0,6 do 3,1 kg/krzak. Siewki z tej populacji charakteryzowały się bulwami okrągło owalnymi o średniej wielkości (5,7), regularnym zarysie (6,2), płtykich oczkach (6,3) oraz średnio cienkiej skórce (5,2). Dla ocenianych siewek opisano również barwę skórki. W trakcie sezonu wegetacyjnego z każdej populacji zebrano materiał roślinny w formie liści i przeprowadzono izolację genomowego DNA.

W ramach tematu 3 ocenie molekularnej poddano 4 populacje 4x z genem *Rm* pochodzącym z dzikiego gatunku *S. megistacrolobum*. W celu potwierdzenia w badanych populacjach form 4x z genem odporności na wirus M ziemniaka zastosowano 2 markery molekularne *GP 283* i *GP 250*. Z populacji PW – 363 × PW – 375 ocenie molekularnej poddano 149 linii siewkowych. Obecność markera *GP 250* związanego z obecnością genu *Rm* stwierdzono dla 139 linii, natomiast nie stwierdzono amplifikacji tego markera dla 10 linii z tej populacji. Dla kolejnej populacji 07 – IX – 21 × PW – 375 liczącej 134 linii obecność markera *GP 250* stwierdzono w przypadku 118 linii, natomiast jego brak dla 16 linii. Dla trzeciej populacji 07 – IX – 169 × PW – 375 o liczebności 131 linii, marker *GP 250* identyfikowano w przypadku 126 linii, natomiast jego brak dla 5 linii. Dla populacji 07–VIII – 83 × PW – 363 liczącej 146 linii siewkowych, obecność markera *GP 250* stwierdzono dla 139 linii, a jego brak dla 7 linii.

Obecność drugiego markera selekcyjnego *GP 283* w przypadku pierwszej populacji PW – 363 × PW – 375 liczącej 149 linii siewkowych, stwierdzono dla 105 linii siewkowych, natomiast brak amplifikacji obserwowano dla 44 linii. Dla kolejnej populacji 07 – IX – 21 × PW – 375 liczącej 134 linii obecność markera *GP 283* obserwowano dla 105 linii, natomiast jego brak dla 290 linii. Dla trzeciej populacji 07 – IX – 169 × PW – 375 o liczebności 131 linii, marker *GP 283* identyfikowano w przypadku 101 linii, natomiast jego brak dla 44 linii. Dla populacji 07–VIII – 83 × PW – 363 liczącej 146 linii siewkowych, obecność markera *GP 283* odnotowano dla 106 linii, a jego brak dla 40 linii.

W ramach tematu 3 wykorzystując markery związane z genem *Rm* (*GP 283* i *GP 250*) wyróżniono formy 4x posiadające ten marker. Przy zastosowaniu markera *GP 250* we wszystkich czterech populacjach obserwowano przewagę form z markerem (od 88% do 96%) nad formami bez markera (od 4% do 12 %). Rozkład ilościowy form z i bez markera wskazuje, iż marker ten nie jest markerem selekcyjnym. Obserwujemy w tych populacjach zbyt dużą ilość form, które potencjalnie mogłyby być genotypami odpornymi. Drugi z markerów związany z genem *Rm* znacznie lepiej segregował oceniane genotypy. W każdej z populacji rozkład form z lub bez markera był zbliżony do rozkładu oczekiwanego 3:1. W każdej populacji obserwowano bowiem od 70% do 78% form z markerem *GP 283* i od 22% do 30% form bez tego markera. Po przeprowadzeniu w przyszłym roku oceny odporności testami fenotypowymi na wirus M ziemniaka będziemy mogli stwierdzić, czy marker *GP 283* jest faktycznie markerem selekcyjnym w naszych populacjach.

Marker *SC878* związany z genem *Gm* z *S. gourlayi* w naszych dwóch populacjach 4x nie amplifikował. Dla wszystkich przebadanych linii siewkowych nie obserwowano produktu amplifikacji tego markera. Marker ten w naszych materiałach był markerem niselekcyjnym.

Opracowana w tym roku metodyka izolacji i identyfikacji wirusa M ziemniaka metodą Real-Time PCR pozwoli w przyszłym sezonie ocenić wybrane genotypy pod względem zawartości wirusa w zakażanym materiale w porażeniu pierwotnym, a w kolejnych latach po porażeniu wtórnym.

Wnioski:

W ramach tematu 1

1. Cechy użytkowe linii siewkowych pochodzące z populacji 4x są na zadawalającym poziomie, co pozwala przypuszczać, że przyszłe rody hodowlane będą łączyły wysoki poziom odporności na wirus M ziemniaka z dobrym zestawem cech użytkowych.
2. Z puli uzyskanych linii siewkowych o zróżnicowanym tle genetycznym i odpornościowym w kolejnym roku będzie można wybrać formy do szczegółowych testów odpornościowych z wykorzystaniem metody Real-Time PCR.

W ramach tematu 2

1. Cechy użytkowe siewek pochodzących z populacji 4x są na zadawalającym poziomie, co pozwala przypuszczać, że przyszłe rody hodowlane będą łączyły wysoki poziom odporności na wirus S ziemniaka z dobrym zestawem cech użytkowych.
2. Liczba uzyskanych siewek z populacji 4x × 4x po wstępnej selekcji jest wystarczająca do prowadzenia badań w kolejnych latach.

W ramach tematu 3

1. Znaleziono formy z markerami *GP 283* i *GP 250* związanymi z genem *Rm*.
2. Po przeprowadzonych analizach molekularnych stwierdzono, iż marker *GP 283* może być markerem bardziej użytecznym w selekcji form odpornych.
3. W obu populacjach 4x nie obserwowano amplifikacji markera *SC878* związanego z genem *Gm* z *S. gourlayi*.
4. Opracowana metodyka warunków reakcji Real-Time PCR do badań nad zawartością wirusa M ziemniaka, zostanie wykorzystana w badaniach przyszłorocznych.