**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* znalezionego w *Solanum gourlayi.*

**Kierownik zadania**

dr 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 2019 roku było: a) Przeprowadzenie oceny odporności wybranych klonów tetraploidalnych na patotypy *G. rostochiensis*;
b) Przeprowadzenie doświadczenia polowego z udziałem wybranych klonów tetraploidalnych: ocena plonu bulw, ich morfologii oraz zawartości skrobi. Selekcja form
o złożonej odporności na mątwiki będzie częściowo prowadzona z wykorzystaniem diagnostycznych markerów molekularnych. Przeprowadzenie krzyżowań interploidalnych mających na celu wprowadzenie odporności ze źródła *Solanum gourlayi* na poziom tetraploidalny; c) stworzenie mapy genetycznej i przeprowadzenie analizy QTL, co pozwoli na poznanie genetycznych uwarunkowań odporności na mątwiki zaobserwowanej w gatunku *S. gourlayi* oraz namnożenie materiału bulwowego wybranej populacji mapującej.

**Materiały i metody**

W 2019 roku w ramach tematu przeprowadzono ocenę wybranych 50 tetraploidalnych (4x) klonów ziemniaka pod kątem odporności na patotypy Ro1-5 *Globodera rostochiensis*. Test przygotowano w 10 powtórzeniach dla kombinacji klon/patotyp.

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. Rośliny po posadzeniu rosły w szklarni przez trzy miesiące. Po tym okresie liczono 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.

Przeprowadzono również doświadczenie polowe z udziałem klonów tetraploidalnych. Oceniano cechy takie jak: plon, zawartość skrobi, plon skrobi, wielkość bulw, kształt, regularność zarysu, głębokość oczek i intensywność występowania wad bulw. Dla klonów tych wykonano również analizę molekularną obecności fragmentów diagnostycznych markera GP122 genu *Ry-fsto*, warunkującego odporność na wirus Y ziemniaka oraz markera Nl25 genu *Sen1*, warunkującego odporność na raka ziemniaka. Ponadto wybrane wyróżniające się klony oceniono pod kątem cech kulinarnych.

Wykonano także program krzyżowań interploidalnych mające na celu wprowadzenie odporności z *Solanum gourlayi* na poziom tetraploidalny. Wykorzystano dwie formy mateczne 4x (klony 4x: PW 363 i 11-VIII-86). Jako formy ojcowskie (2x) wykorzystano 3 klony potomne klonu Sg 2/7 – wybrane spośród diploidalnej populacji mapującej: Sg 13/32, Sg 13/41 i Sg 13/124). Ze zdrowych bulw przygotowano rośliny do krzyżowań w formie szczepień na podkładkach
z psianki i pomidora. W celu przedłużenia okresu kwitnienia rośliny prowadzono na 1-2 pędy. W trakcie kwitnienia pyłek zebrano, zabezpieczono oraz oceniono pod kątem płodności.

Stworzono mapę genetyczną oraz przeprowadzono analizy QTL. Analizy QTL przeprowadzono stosując mapowanie interwałowe. QTL wykrywano przyjmując wartość LOD = 3, za krytyczną. Wykorzystano programy: Van Oojien JW (2006) JoinMap®4 oraz Van Ooijen JW (2009) MapQTL®6. W polu namnożono również materiał bulwowy wybranej populacji mapującej DW 94-4235 x Sg 2/7.

**Wyniki i dyskusja**

W praktyce hodowlanej korzystne jest łączenie genów odporności. Kumulacja genów odporności (łączenie genów nadających odporność na różne patogeny) zapewnia odporność na szerokie spektrum szkodników. Natomiast piramidyzacja genów odporności (łączenie genów nadających odporność na ten sam patotyp) utrudnia powstawanie wirulentnych ras patogenów. Wybrane na podstawie amplifikacji markerów genów *H1*, *Gro1-4* i *GpaVvrn* klony tetraploidalne, charakteryzujące się odpornością n apatotypy Pa2,3 *G. pallida*, przetestowano pod kątem odporności na wszystkie patotypy *G. rostochiensis*. Spośród 50 klonów tetraploidalnych, przetestowanych pod kątem odporności na patotypy *G. rostochiensis* 48 było odpornych na patotyp Ro1, 36 klonów było odpornych na patotyp Ro2, 48 było odpornych na patotyp Ro3, 46 klonów było odpornych na patotyp Ro4 a 32 klony wykazały się odpornością na patotyp Ro5. 31 spośród badanych klonów charakteryzowało się odpornością na wszystkie patotypy *G. rostochiensis*. Wyselekcjonowane klony, pochodzące z krzyżowań łączących odporność na *G. rostochiensis* z odpornością na *G. pallida*, łączące geny *H1*, *Gro1-4* i *GpaVvrn* stanowią grupę materiałów na której zbadana zostanie zależność pomiędzy kumulacją genów odporności na mątwiki a jakością plonu ziemniaka.

Ocena plonowania klonów tetraploidalnych, uzyskanych w wyniku krzyżowań form
o złożonej odporności na *Globodera* spp., wskazuje na porównywalny poziom ich plonu bulw i plonu skrobi w porównaniu do wykorzystanych w doświadczeniu odmian wzorcowych. Również cechy morfologii bulw badanych klonów były na poziomie porównywalnym do wartości uzyskanych dla odmian wzorcowych.

Przeprowadzono porównanie średnich wartości cech pomiędzy grupą klonów charakteryzujących się amplifikacją markerów genów *H1*, *Gro1-4* i *GpaVvrn*. Klony posiadające wszystkie markery charakteryzowały się najwyższym plonem bulw. Badane klony nie wykazywały zróżnicowania w ramach pozostałych badanych cech. Klony posiadające markery HC, Gro1-4 i 57R charakteryzowały się dobrym poziomem cech agronomicznych, co wskazuje na możliwość wytypowania spośród populacji tetraploidalnych klonów o dobrym poziomie badanych cech połączonych z odpornością na patotypy Ro1, Ro4 i Ro5 *G. rostochiensis* oraz Pa2/3 *G. pallida*.

Prezentowana praca wskazuje na możliwość kreowania materiałów hodowlanych
o złożonych opornościach oraz materiałów, które wnoszą odporność na szkodniki od niedawna szerzące się w Europie, jak *G. pallida*. Ponadto wyselekcjonowano 6 klonów łączących odporność na patotypy mątwika ziemniaczanego i agresywnego z odpornością na wirus Y ziemniaka i na raka ziemniaka (potwierdzone amplifikacja markerów genów odporności: *H1*, *Gro1-4*, *GpaVvrn*, *sen1*i *Ry-fsto*).

W wyniku przeprowadzenia programu krzyżowań interploidalnych uzyskano 55 jagód,
a z nasion uzyskanych z krzyżowań interploidanych 2018 zebrano 8 klonów, które wytworzyły bulwy. Wskazuje to na możliwość wprowadzenia odporności z *Solanum gourlayi* na poziom tetraploidalny.

Gatunek *S. gourlayi* (*grl*) jest jednym z dzikich diploidalnych gatunków *Solanum* wykazującym, odporność na *Globodera pallida*. W puli genetycznej *S. gourlayi* stwierdzono obecność form zarówno odpornych jak i podatnych na *G. pallida*. Podłoże genetyczne tej odporności nie zostało jak dotąd ustalone. Do mapowania genów odporności wykorzystuje się diploidalne populacje mapujące, które uzyskuje się poprzez krzyżowanie formy odpornej z formą podatną. W ramach tematu przeprowadzono krzyżowania diploidalnej formy
*S. gourlayi* (formy Sg) odpornej na patotypy Pa2 i Pa3 *G. pallida* z diploidalną formą podatną
DW 94-4235 uzyskując populację, która posłużyła do stworzenia mapy genetycznej
z wykorzystaniem markerów DArTseq. Uzyskana mapa genetyczna liczy 1316 loci i mierzy łącznie 1021 cM. Na podstawie utworzonej mapy przeprowadzono analizę QTL dla odporności na patotypy Pa2 i Pa3 mątwika agresywnego (*G. pallida*). Analiza została przeprowadzona osobno dla każdego zbioru danych (liczba cyst i ocena odporności w latach) oraz na wartościach średnich a następnie porównano uzyskane wyniki. Dla danych dotyczących odporności na mątwika agresywnego patotyp Pa2 wyznaczono 69 pozycji
o LOD > 3, na chromosomach II, V, VIII, IX, X, XI i XII. Żadna z tych lokalizacji nie była jednak powtarzalna w latach. Dla danych dotyczących odporności na mątwika agresywnego patotyp Pa3 wyznaczono 212 pozycji o LOD > 3, na chromosomach IV, V, VI, VII, X, XI
i XII. Powtarzalne w latach, ocenie vs liczbie cyst, było 5 lokalizacji uzyskanch dla chromosomu XI. Lokalizacje 13,21 i 13,211cM oraz lokalizacje 14,211 i 14,219 cM mogą być tożsame – tak niewielkie różnice umiejscowienia na chromosomie (3-cie miejsce po przecinku) mogą być wynikiem braku danych dla jednego analizowanego klonu, dla jednego spośród analizowanych 1434 markerów DArTseq wykorzystanych do konstrukcji mapy genetycznej. Uzyskane wyniki wskazują, że badana cecha (odporność na *G. pallida*) jest warunkowana wieloma genami o sumujących się efektach. Różne wyniki uzyskane w latach sugerują natomiast modyfikujący wpływ środowiska na tą cechę.

Ze względu na różnorodność genów awirulencji w populacjach nicieni oznaczonych jako patotypy Pa2/Pa3, jak dotąd nie udało się zidentyfikować źródła pojedynczego genu oporności, który oferuje całkowitą oporność na te szkodniki. Zasadna jest więc piramidyzacja genów o mniejszych efektach w celu zapewnienia podniesionego poziomu odporności
w materiałach hodowlanych. Zasadne jest również poszukiwanie nowych źródeł odpornosci
i włączanie ich do puli genetycznej ziemniaka uprawnego.

**Wnioski**

1. Ocena odporności wybranych klonów tetraploidalnych potwierdza wysoką złożoną odporność klonów pochodzących z krzyżowań łączących odporność na *G. rostochiensis* z odpornością na
*G. pallida*. Grupa wybranych klonów będzie więc mogła posłużyć do zbadania zależności pomiędzy odpornością na mątwiki a jakością bulw ziemniaka.
2. Wyniki doświadczenia polowego wskazują, że klony łączące odporności na różne patotypy mątwika ziemniaczanego i agresywnego nie odbiegają do odmian wzorcowych pod względem badanych cech agronomicznych (plon, skrobia, morfologia bulw). Nagromadzenie odporności na mątwiki nie ma więc negatywnego wpływu na te cechy.
3. Wyselekcjonowano 6 klonów charakteryzujących się amplifikacją markerów 5 genów odporności: *H1*, *Gro1-4*, *GpaVvrn*, *sen1* i *Ry-fsto*.
4. Uzyskano łącznie 24 jagody z krzyżowania form Sg z klonem 11-VIII-86 oraz 30 jagód
z krzyżowania z udziałem klonu PW363, a z nasion uzyskanych z krzyżowań interploidanych 2018 zebrano 8 klonów, które wytworzyły bulwy co wskazuje na możliwość wprowadzenia odporności z *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny.
5. Bazując na danych uzyskanych z analizy DArTseq dla populacji mapującej stworzono mapę genetyczną *Solanum gourlayi*. Uzyskana mapa genetyczna liczy 1316 loci i mierzyła łącznie 1021 cM. Na jej podstawie przeprowadzono analizę QTL.
6. Analizę QTL przeprowadzono wyznaczając loci na chromosomie XI tłumaczące średnio od 12,9 do 14,8% zmienności w przypadku oceny odporności na patotyp Pa3 *G. pallida*.