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

*Cele zadania.*

1. Celem tematu było wyróżnienie rodów 4*x* wysoko odpornych na wirus S ziemniaka.
2. Celem tematu było określenie reakcji odpornościowej rodów z genem *Ns* przy zastosowaniu dwóch izolatów wirusa S ziemniaka oraz dwóch temperatur inkubacji.
3. Celem tematu była ocena wpływu dawki genu *Ns* na poziom odporności i uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy uzasadnione jest tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns*.

*Materiały i metody.*

*W ramach tematu 1* w porażeniu wtórnym oceniono 154 rody ziemniaka. Z roślin badanych rodów, które w 2018 roku po zakażeniach mechanicznych wirusem S ziemniaka wykazały średnie wartości absorbancji A405 na poziomie lub poniżej wartości granicznej zostały zebrane bulwy. W 2019 roku bulwy z porażenia pierwotnego po okresie spoczynku i podkiełkowaniu wysadzono w szklarni. Po 6 tygodniach przeprowadzono testy ELISA, w celu identyfikacji obecności wirusa S ziemniaka. W ramach tematu 1 w polu wysadzono również rody wysoko odporne na PVM i PVS, wytypowane do kolekcji po przeprowadzeniu testów odpornościowych w latach wcześniejszych.

*W ramach tematu 2* do oceny odporności na PVS wybranych rodów 4*x* zastosowano metodę inokulacji mechanicznej roślin. Rośliny badanych rodów wysadzono w szklarni (po 6 roślin z każdego genotypu w dwóch powtórzeniach). Zakażenie przeprowadzano dwukrotnie w odstępach 2 dniowych. Źródło wirusa S ziemniaka stanowiły rośliny pomidora porażone szczepami PVS pochodzącymi z kolekcji IHAR-PIB w Młochowie (PVS-966 i PVS-Leon). Po zakażeniu rośliny przewożono do kamer fitotronowych z kontrolowaną temperaturą 20oC i 28oC. W 6 tygodniu od inokulacji określono zawartość PVS w próbce soku z liści badanych roślin na podstawie odczytów wartości A405 w teście ELISA. Do szczepień zrazy pobierano z zakażonych roślin pomidora. Szczepienia wykonano w warunkach szklarniowych w okresie wiosennym. Po szczepieniu rośliny umieszczano w foliowych budkach na 14 dni, a następnie w kamerach fitotronowych z kontrolowaną temperaturą 20oC i 28oC. Zawartość PVS w próbce soku określano za pomocą wartości absorbancji A405 w teście ELISA w 4 tygodniu po szczepieniu. Do testowania pobierano liście z pędu podszczepiennego.

*W ramach tematu 3* ocenie poddano rody pochodzące z teraploidalnej populacji *Ns* – II   
(PW – 363 × PS – 1723). Wzorcem formy duplex genu *Ns*, była diploidalna forma genotypu DW 83 – 3121, która w poprzednich latach została poddana kolchicynowaniu w celu podwojenia liczby chromosomów.

Ustalania dawki genu *Ns* na poziomie DNA przeprowadzano w oparciu o genomową sekwencję markera genu *Ns* o nr akcesyjnym w bazie GeneBank DQ415915.1 w reakcji real time PCR. Badania wykonane zostały na genomowym DNA, które wyizolowano z młodych liści z użyciem gotowych zestawów do izolacji roślinnego DNA opartych na grawitacyjnych membranach jonowymiennych. Stężenie i jakość otrzymanego DNA określono na spektrofotometrze NanoDrop Lite (Thermo Scientific) oraz na 1% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. We wszystkich przypadkach otrzymano dobrej jakości, niezdegradowane DNA w ilości ok. 4,8 µg. Próby następnie rozcieńczono i wyrównano do stężenia 0,1 µg/μl.

Dla badanego markera DNA allela dominującego genu *Ns* zastosowano startery o sekwencjach: F (5’– 3’): GCAATACATGTATTCTTACTCGG i R (5’– 3’): GACCTATATCAGTCCCTTCTAATCCACTAT. Amplifikują one produkt o długości 489 pz (par zasad). Dla określenia ilości produktu badanego markera wykorzystano gotowe zestawy mieszaniny do real – time Hot Start PCR z EvaGreen®. Reakcje przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o objętości 10 μl, z dodatkiem 100 ng matrycowego DNA oraz 5 μM każdego ze starterów. Amplifikację markera przeprowadzono w następujących warunkach temperaturowych: 95°C (3 min.), 40x ((95°C (20 sek.), 60°C (20 sek.), 72°C (30 sek.)), krzywa topnienia, 40°C.

*Wyniki i dyskusja*.

*W ramach tematu 1* w polu prowadzono kolekcję 268 rodów wysoko odpornych na wirus M ziemniaka, pochodzących z sześciu populacji tetraploidalnych z segregujacym genem *Rm* i *Gm*. Ocena tych rodów obejmowała ocenę porażenia pierwotnego i wtórnego. Dodatkowo rody te zostały scharakteryzowane pod kątem cech morfologicznych i wad zewnętrznych bulw. Dla potwierdzenia obecności genu *Rm* w rodach odpornych wykorzystano markery selekcyjne *GP* – 250i *GP* – 283. Rody znajdujące się w kolekcji posiadają jeden lub oba markery. Kolekcja rodów odpornych na wirus M ziemniaka stanowi doskonały zestaw genotypów, który może zostać wykorzystany w kolejnych latach przez hodowców w ich programach hodowlanych. W ramach tematu rozmnażano również w polu dwie populacje z segregującym genem *Ns* odporności na wirus S ziemniaka, pochodzącym z uprawnego gatunku *S. tuberosum subsp. andigena*. Po ocenie porażenia pierwotnego w grupie rodów, które nie uległy porażeniu wirusem S ziemniaka znalazły się 154 genotypy. Po przeprowadzeniu w warunkach szklarniowych oceny porażenia wtórnego, do grupy odmian odpornych wytypowano 125 rodów ziemniaka.

*W ramach tematu 2* oceniano w doświadczeniu szklarniowym odporność na wirus S ziemniaka 8 rodów z populacji *Ns*-II, dwa wzorce i formy rodzicielskie. Porównywano wpływ genotypu, szczepu wirusa i temperatury na poziom porażenia wirusem roślin po zakażeniu mechanicznym i po szczepieniu. Stosując zakażenia mechaniczne dla dwóch rodów (*Ns*-II-10 i *Ns*-II-40), odmian wzorcowych i form rodzicielskich nie stwierdzono istotnego wpływu temperatury inkubacji na poziom odporności i uzyskane wartości absorbancji A405 w teście ELISA. Dla pozostałych sześciu rodów rodzaj zastosowanej temperatury istotnie wpływał na namnażanie się wirusa w komórkach roślinnych. W wyższej temperaturze odnotowywano znacznie wyższy poziom wirusa S ziemniaka u wszystkich sześciu rodów.

Dla tych samych rodów (*Ns*-II-10 i *Ns*-II-40), odpornej odmiany Sonda i form rodzicielskich rodzaj zastosowanego szczepu do zakażeń mechanicznych, również nie miał wpływu na poziom porażenia PVS. Dla pozostałych sześciu rodów i podatnej odmiany Etola odnotowano istotny wpływ szczepu. Przy zastosowaniu szczepu 966 wysokie wartości absorbancji A405 odnotowano dla czterech rodów oraz podatnej odmiany Etola. Przy zastosowaniu szczepu Leon wysokie wartości absorbancji A405 odnotowano dla trzech rodów. Stosując inokulację przez szczepienie dla dwóch rodów *Ns*-II-10 i *Ns*-II-40, odpornej odmiany Sonda i form rodzicielskich, temperatura inkubacji nie miała wpływu na poziom porażenia PVS. Dla rodów i odmiany inkubowanych w obu temperaturach uzyskano bardzo niskie wartości absorbancji A405 w teście ELISA. Istotny wpływ temperatury inkubacji na uzyskane wartości absorbancji A405 odnotowano dla pięciu rodów oraz podatnej odmiany Etola. Rośliny inkubowane po szczepieniu w temperaturze 28oC uległy silniejszemu porażeniu wirusem S ziemniaka w porównaniu do temperatury 20oC. Przy temperaturze 28oC dla tych rodów uzyskano znacznie wyższe wartości absorbancji A405. Dla jednego rodu przy zastosowaniu obu temperatur odnotowano porażenie PVS na tym samym poziomie. Dla tych samych rodów *Ns*-II-10 i *Ns*-II-40, odpornej odmiany Sonda i form rodzicielskich rodzaj zastosowanego szczepu nie miała wpływu na poziom porażenia PVS. Istotny wpływ szczepu na uzyskane wartości absorbancji A405 odnotowano dla sześciu rodów oraz podatnej odmiany Etola.

*W ramach tematu 3* oceniono pod kątem odporności na wirus PVS rody z nieselekcjonowanej populacji *Ns* -II, pochodzące z krzyżowań mających na celu uzyskanie w potomstwach form o zwiększonej dawce genu *Ns*. Obserwowana w populacji *Ns* – II segregacja odporności rodów (3 : 1) wskazuje na posiadanie przez ich formy rodzicielskie genu *Ns* w formie simpleks. Uzyskane w ocenie fenotypowej wyniki odporności pozwoliły stwierdzić że wśród wyselekcjonowanych rodów odpornych na PVS można oczekiwać zarówno form typu simpleks jak i dupleks pod względem genu *Ns*. W badaniach wykorzystano czuły barwnik EvaGreen® do oszacowania amplifikacji markera genu *Ns* (o zmodyfikowanych na potrzeby reakcji qPCR sekwencjach starterów). Przeprowadzone analizy pozwoliły wśród ocenianych odpornych rodów na PVS wyróżnić 42 formy typu dupleks i 8 form typu simpleks. Po przeanalizowaniu wyników odpornościowych z testów fenotypowych dla rodów z obu grup stwierdzono, że w przypadku odporności na wirus S ziemniaka nie jest uzasadnione tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns*. Gen *Ns* w rodach odpornych w formie simpleks daje już pełną odporność na tego wirusa.

*Wnioski:*

*W ramach tematu 1*

1. Nowe rody odporne na wirus M ziemniaka znajdujące się w kolekcji mogą stanowić doskonały materiał dla hodowli jako przyszłe formy rodzicielskie w programach krzyżówkowych ukierunkowanych na wprowadzenie odporności na PVM do puli ziemniaka.
2. Nowe rody posiadają geny odporności na wirus M ziemniaka z dwóch dzikich gatunków: *S. megistacrolobum* (*Rm*) lub *S. gourlayi* (*Gm*).
3. Wszystkie rody znajdujące się w kolekcji zostały ocenione pod kątem odporności na PVM w testach laboratoryjnych, w porażeniu pierwotnym i wtórnym oraz uzyskały pełną charakterystykę cech morfologicznych.
4. Wyróżniono grupę 125 nowych rodów ziemniaka wysoko odpornych na PVS z genem *Ns* pochodzącym z *S. tuberosum subsp. andigena*.

*W ramach tematu 2*

1. Wyselekcjonowane rody wysoko odporne na wirus S ziemniaka, stabilnie zachowujące się w różnych temperaturach i przy zastosowaniu różnych szczepów PVS, mogą stanowić cenny materiał do dalszych prac hodowlanych.
2. Wysoka temperatura (28oC) inkubacji przełamuje odporność rodów tetraploidalnych na wirus S ziemniaka warunkowaną genem *Ns*.
3. Rodzaj zastosowanego szczepu PVS do zakażań jest ważnym elementem przy selekcji materiałów hodowlanych odpornych na PVS.
4. Uzyskane wyniki podkreślają ważną rolę profilu odporności odmian w wyjaśnianiu równowagi pomiędzy szczepami wirusów w uprawach ziemniaka .

*W ramach tematu 3*

1. W grupie ocenianych rodów odpornych na wirus S ziemniaka wyróżniono 42 formy typu dupleks i 8 form typu simpleks.
2. Uzyskane wyniki wskazują, że nie jest uzasadnione tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns*.
3. Gen *Ns* w rodach odpornych w formie simpleks zapewnia już pełną odporność na wirusa S ziemniaka.