Solanum gourlayi jako źródło odporności na PVM w tetraploidalnych rodach ziemniaka

B. Tatarowska, B. Flis, I. Wasilewicz-Flis

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Młochowie
ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów

Wprowadzenie i cel pracy

Analiza stanu zagrożenia poszczególnymi wirusami ziemniaka w Polsce wskazuje na coraz większe znaczenie wirusa M ziemniaka. Uprawa odmian ziemniaka o niskiej odporności na tego wirusa nastręcza wiele trudności w produkcji nasiennej. Na rynku brakuje form niosących wysoki poziom odporności na PVM. PVM występuje we wszystkich rejonach uprawy ziemniaka, ale problemem jest głównie w Europie Wschodniej i Południowo-Wschodniej. Straty w plonie bulw powodowane przez PVM sięgają 30%, a w skrajnych przypadkach nawet 75%[1]. W Polskiej hodowli odpornościowej wykorzystuje się miedzy innymi gen *Gm* pochodzący z dzikiego gatunku *Solanum gourlayi* warunkujący odporność związaną z reakcją nadwrażliwości, która ujawnia się jedynie w obecności dotąd niepoznanych dodatkowych czynników genetycznych[2,3,4]. Celem pracy było określenie reakcji rodów 4*x* na dwa różne szczepy wirusa M ziemniaka oraz określenie wpływu różnych źródeł zmienności na reakcję odpornościową.

Materiał i metody badań

INOKULACJA MECHANICZNA

- Oceniano 4 rody tetraploidalne i dwa wzorce
- Zakażano rośliny 4 tygodniowe
- Rośliny zakażano dwukrotnie
- Stosowano szczepy PVM: M-55$_a$ i M-U
- Temp. inkubacji: 20^{0}C i 28^{0}C
- Ocena po 6 tyg. - ELISA i Real-Time PCR
- Zakażano po 5 roślin w 2 powtórzeniach

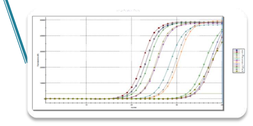
SZCZEPIENIE

- Oceniano 4 rody tetraploidalne i dwa wzorce
- Szczepiono rośliny 4 tygodniowe
- Stosowano szczepy PVM: M-55$_a$ i M-U
- Temp. inkubacji: 20^{0}C i 28^{0}C
- Ocena po 4 tyg. - ELISA i Real-Time PCR
- Szczepiono po 5 roślin w 2 powtórzeniach

Materiał badawczy	
Ród	Kombinacja krzyżówkowa
M–VII–60	PS – 1682 × PS – 1741
M–VII–14	PS – 1682 × PS – 1741
M–VIII–58	PS – 1740 × PS – 1741
M–VIII–69	PS – 1740 × PS – 1741
Wzorce	
DW 84–1457	
Bzura	

Real - Time PCR dla wirusa M ziemniaka

- Izolacja RNA wirusa (zestaw Total RNA Mini; A&A Biotechnology)
- Doczyszczanie RNA (zestaw Clean – up RNA Concentrator; A&A Biotechnology)
- Odwrotna transkrypcja (zestawTranScriba, A&A Biotechnology, użyto startera dN-heksamer)
- Real-Time PCR
  - Barwnik SYBR Green
  - Gen referencyjny 18SrRNA
  - 3 powtórzenia techniczne



WYNIKI

Porównywano wpływ genotypu, szczepu wirusa i temperatury inkubacji na poziom odporności roślin po zakażeniu mechanicznym i po szczepieniu PVM. Przeprowadzono ocenę poziomu odporności roślin w porażeniu pierwotnym (2017) i wtórnym (2018). Wybrane rody pochodziły z dwóch populacji 4*x*, gdzie źródłem odporności na PVM był dziki gatunek *Solanum gourlayi*.

Na wykresie 1 przedstawiono średnie wartości absorbancji A_{405} dla rodów i wzorców uzyskane dla roślin w porażeniu pierwotnym (dane z roku 2017) oraz w porażeniu wtórnym (dane z roku 2018). Przedstawione wyniki dotyczą oceny poziomu odporności na PVM przeprowadzanego w roślinach zakażanych mechanicznie. Wysokie wartości A_{405} uzyskano dla rodów: M-VII-60, M-VIII-58 oraz wzorcowej podatnej odmiany Bzura, niskie wartości dla rodów: M-VII-14, M-VIII-69 oraz diploidalnego klonu DW 84-1457. Współczynnik korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi w roku 2017 i 2018 wyniósł r = 0,96**.

Na wykresie 2 przedstawiono średnie wartości A_{405} z porażenia pierwotnego (2017) i wtórnego roślin (2018), uzyskane w doświadczeniach, gdzie zakażania wirusem M ziemniaka przeprowadzano poprzez szczepienia. Wysokie wartości A_{405} uzyskano dla rodów: M-VII-60, M-VIII-58 oraz wzorcowej odmiany Bzura. Niskie wartości A405 uzyskano dla rodu M-VII-14, M-VIII-69 oraz diploidalnego klonu DW.84-1457. Dla rodu M-VII-14 oraz M-VIII-69 wartości absorbancji były podwyższone w stosunku do wartości uzyskanych w doświadczeniu gdzie rośliny były zakażane mechanicznie (wykres 1). Współczynnik korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi w roku 2017 i 2018 wyniósł r = 0,94**.

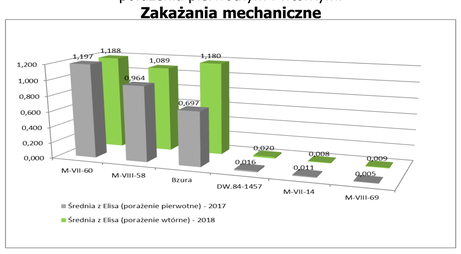
Na wykresie 3 przedstawione wyniki dotyczą oceny poziomu odporności na PVM przeprowadzanego w roślinach **zakażanych mechanicznie przy zastosowaniu dwóch szczepów wirusa: M-55$_a$ oraz M-U**. Zarówno dla rodów podatnych, odpornych oraz wzorców rodzaj zastosowanego szczepu nie miał istotnego wpływu na uzyskane wyniki. Porażeniu wirusem M ziemniaka w obu latach nie uległy rody: M-VII-14, M-VIII-69 oraz wzorzec DW 84-1457. Wysokie wartości A_{405} uzyskano dla rodów M-VII-60, M-VIII-58 oraz podatnej odmiany Bzura.

Na wykresie 4 przedstawione wyniki dotyczą oceny poziomu odporności na PVM przeprowadzanego poprzez **zakażenia mechaniczne roślin przy zastosowaniu dwóch temperatur inkubacji 20^{0}C i 28^{0}C.** Zarówno dla rodów podatnych, odpornych oraz wzorców temperatura inkubacji nie miała istotnego wpływu na uzyskane wyniki. Porażeniu wirusem M ziemniaka w obu latach nie uległy rody: M-VII-14, M-VIII-69 oraz wzorzec DW 84-1457. Wysokie wartości A_{405} uzyskano dla rodów M-VII-60, M-VIII-58 oraz podatnej odmiany Bzura.

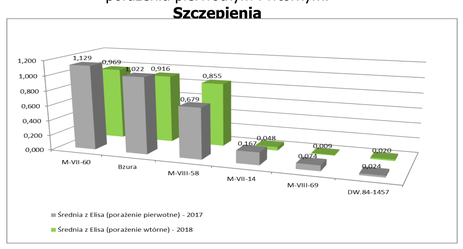
Na wykresie 5 przedstawiono wyniki uzyskane dla rodów poddanych **szczepieniu, przy zastosowaniu dwóch szczepów wirusa M ziemniaka: M-55$_a$ i M-U**. Dla rodów podatnych, odpornych oraz wzorców rodzaj szczepu wirusa nie miał istotnego wpływu na uzyskane wyniki. Porażeniu wirusem M ziemniaka w obu latach nie uległy rody: M-VII-14, M-VIII-69 oraz wzorzec DW 84-1457. Wysokie wartości A_{405} uzyskano dla rodów M-VII-60, M-VIII-58 oraz podatnej odmiany Bzura.

Na wykresie 6 przedstawiono średnie wartości A_{405} dla rodów i wzorców otrzymane po **szczepieniu roślin przy zastosowaniu dwóch temperatur inkubacji 20^{0}C i 28^{0}C**. Zarówno dla rodów podatnych, odpornych oraz wzorców temperatura inkubacji nie miała istotnego wpływu na uzyskane wyniki. Porażeniu wirusem M ziemniaka w obu latach nie uległy rody: M-VII-14, M-VIII-69 oraz wzorzec DW 84-1457. Wysokie wartości A_{405} uzyskano dla rodów M-VII-60, M-VIII-58 oraz podatnej odmiany Bzura.

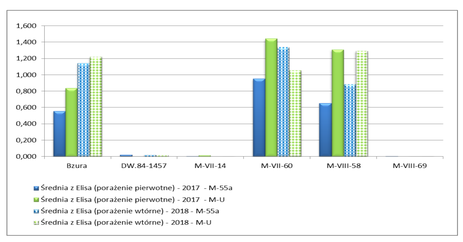
Wykres 1. Średni poziom absorbancji A_{405} dla rodów/odmian ocenianych w porażeniu pierwotnym i wtórnym.
Zakażania mechaniczne



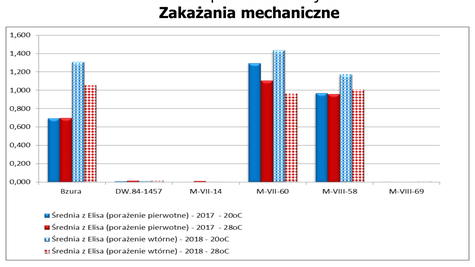
Wykres 2. Średni poziom absorbancji A_{405} dla rodów/odmian ocenianych w porażeniu pierwotnym i wtórnym.
Szczepienia



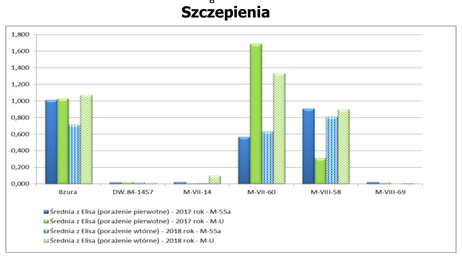
Wykres 3. Średni poziom absorbancji A_{405} dla rodów/odmian przy zastosowaniu dwóch szczepów wirusa M-55$_a$ i M-U.
Zakażania mechaniczne



Wykres 4. Średni poziom absorbancji A_{405} dla rodów/odmian przy zastosowaniu temperatur inkubacji 20^{0}C i 28^{0}C.
Zakażania mechaniczne



Wykres 5. Średni poziom absorbancji A_{405} dla rodów/odmian ocenianych w porażeniu pierwotnym i wtórnym przy zastosowaniu dwóch szczepów wirusa M-55$_a$ i M-U.
Szczepienia



Wykres 6. Średni poziom absorbancji A_{405} dla rodów/odmian ocenianych w porażeniu pierwotnym i wtórnym przy zastosowaniu dwóch temperatur inkubacji 20^{0}C i 28^{0}C.
Szczepienia

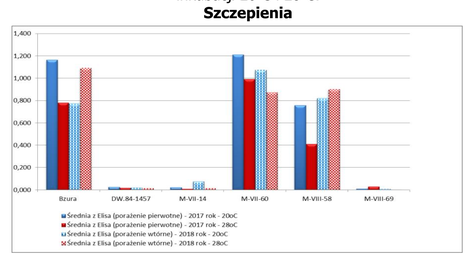


Tabela 1. Stosunek ilości kopii RNA wirusa M ziemniaka na jedną kopię genu referencyjnego 18SrRNA ziemniaka uzyskany w reakcji Real-Time PCR dla rodów/odmian ocenianych w porażeniu wtórnym.
Zakażania mechaniczne

Populacja	Ród/ odmiana	20^{o}C	28^{o}C	20^{o}C	28^{o}C
		szczep M - 55$_a$		szczep M - U	
VII	M-VII-60	7.24 E-03	2.63 E-03	5.51 E-03	3.64 E-03
	M-VII-14	-	śladowe ilości RNA wirusa	śladowe ilości RNA wirusa	-
VIII	M-VIII-58	4.19 E-03	1.68 E-03	5.30 E-03	1.35 E-02
	M-VIII-69	-	-	-	-
wzorzec odporny	DW 84-1457	-	-	-	-
wzorzec podatny	Bzura	9.59 E-03	1.20 E-02	1.31 E-02	1.27 E-02

Tabela 2. Stosunek ilości kopii RNA wirusa M ziemniaka na jedną kopię genu referencyjnego 18SrRNA ziemniaka uzyskany w reakcji Real-Time PCR dla rodów/odmian ocenianych w porażeniu wtórnym.
Szczepienia

Populacja	Ród/ odmiana	20^{o}C	28^{o}C	20^{o}C	28^{o}C
		szczep M - 55$_a$		szczep M - U	
VII	M-VII-60	2.35 E-03	1.88 E-02	1.14 E-02	1.31 E-02
	M-VII-14	-	-	2.70 E-07	-
VIII	M-VIII-58	8.57 E-03	2.00 E-03	5.69 E-03	3.73 E-03
	M-VIII-69	-	-	-	-
wzorzec odporny	DW 84-1457	-	-	-	-
wzorzec podatny	Bzura	2.88 E-03	3.64 E-03	4.70 E-03	1.18 E-02

W tabeli 1 przedstawiono wyniki uzyskany w reakcji Real-Time PCR dla rodów poddanych **zakażeniom mechanicznym**. W roku 2018 wirus M ziemniaka został zidentyfikowany we wszystkich kombinacjach w rodach: M-VII-60 i M-VIII-58 oraz w podatnej odmianie Bzura. RNA wirusa zostało również wykryte w rodzie M-VII-14 w dwóch układach doświadczenia (M-55$_a$; temp. 28^{o}C oraz M-U; temp. 28^{o}C). Największą liczbę kopii RNA wirusa odnotowano dla rodu M-VIII-58 (1.35E-02), najmniejszą dla rodu M-VII-14 (5.96 E-06).

W tabeli 2 przedstawiono wyniki uzyskane w reakcji Real-Time PCR dla rodów poddanych **zakażeniom poprzez szczepienie**. W roku 2018 wirus M ziemniaka został zidentyfikowany we wszystkich kombinacjach w rodach: M-VII-60 i M-VIII-58 oraz w podatnej odmianie Bzura. RNA wirusa zostało również wykryte w rodzie M-VII-14 po szczepieniu roślin szczepem M-U i inkubacji w temp. 20^{o}C. Największą liczbę kopii RNA wirusa odnotowano dla rodu M-VII-60 (1.88 E-02), najmniejszą dla rodu M-VII-14 (2.70 E-07).

WNIOSKI

Rody należące do populacji z segregującym genem *Gm* z *S. gourlayi* w ocenie porażenia wtórnego potwierdziły swój poziom odporności na PVM, jaki został im przypisany po ocenie porażenia pierwotnego. Na roślinach zainfekowanych nie obserwowano w porażeniu wtórnym żadnych objawów zewnętrznych, co wskazuje na brak interakcji między wirusem, a rośliną w komórkach chloroplastów. Typowe objawy mozaiki, którym towarzyszyły wysokie koncentracje wirusa M ziemniaka, obserwowano tylko na podatnej odmianie Bzura, zarówno wtedy kiedy oceniano w próbie oczkowej materiał po inokulacji mechanicznej jak i po szczepieniu. Podobnie Waś i in. (1980) oraz Miętkiewska (1999) w swoich badaniach na materiałach pochodzących od *S. gourlayi* nie obserwowały objawów porażenia PVM po inokulacji roślin. W naszych badaniach w grupie rodów podatnych nie obserwowano istotnego wzrostu średnich wartości A_{405} i kopii komórek wirusa u roślin inkubowanych po zakażeniu w temp. 28^{o}C, w porównaniu do roślin inkubowanych w temp. 20^{o}C.

Genotypy odporne z genem *Gm* nie wykazywały porażenia PVM zarówno po zakażeniu mechanicznym jak i po zastosowaniu szczepienia, niezależnie od warunków termicznych w jakich rosły rośliny po inokulacji i niezależnie od zastosowanego szczepu. Średnie wartości A_{405} uzyskiwane dla tej grupy rodów były bardzo niskie we wszystkich wariantach doświadczenia. Po zastosowaniu metody Real-Time PCR do identyfikacji wirusa w komórkach roślinnych, tylko w przypadku jednego rodu M-VII-14 stwierdzono śladowe ilości RNA. Dla odpornego rodu M-VIII-69 i odpornego diploidalnego klonu nie odnotowano obecności RNA wirusa. Uzyskane w pracy wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia[4,5], że odporność na PVM pochodząca od *S. gourlayi* przejawia się w szerokiej skali temperatur, nie zależy od szczepu wirusa użytego do zakażeń roślin oraz związana jest ze zjawiskiem tolerancji (brak objawów i brak spadku wigoru roślin).

1. Kostiw M. 2011. Ocena zagrożenia plantacji nasiennych ziemniaka przez choroby wirusowe. - Wieś Jutra 150/151: 27-29.
2. Dziewońska M. A., Ostrowska K. 1977. Necrotic reaction to potato virus M in *Solanum stoloniferum* and *S. megistacrolobum*. Phytopath. Z. 88: 172-179.
3. Świeżyński K. M., Dziewońska M. A., Ostrowska K. 1981. Inheritance of the resistance to Potato Virus M found in *Solanum gourlayi* Haw. Genet. Pol. 22:1-8.
4. Miętkiewska E. 1999. Współdziałanie dwóch typów odporności na wirus M ziemniaka (PVM), pochodzący od *Solanum gourlayi* i *S. megistacrolobum* w ziemniakach tetraploidalnych. Biul. IHAR 209: 125-135.
5. Waś M., Dziewońska M.A., Ostrowska K., Kowalska A. 1980. Reaction of *Solanum gourlayi* and its hybrids with *S. tuberosum* to Potato Virus M (PVM). Phytopath. Z. 97: 186-191.

Przedstawione badania zostały sfinansowane w ramach badań podstawowych na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej w latach 2014-2020.