

Asystent

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Oddział w Młochowie, Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka  
Pracownia Metodyki Hodowli  
Plant Breeding and Acclimatizations Institute - National Research Institute  
Młochów Research Center, Laboratory of Parental Lines and Breeding Methods

**Streszczenie rozprawy doktorskiej**  
**pt.: Zastosowanie technik molekularnych w selekcji ziemniaka uprawnego**  
**odpornego na mątwiki (*Globodera* spp.)**

dla uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych; dziedzina: nauki rolnicze, dyscyplina: agronomia

*Promotor: dr hab. Bogdan Flis, prof. IHAR-PIB*

Uprawa odpornych odmian ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) jest najbezpieczniejszą dla środowiska i jednocześnie najskuteczniejszą metodą ochrony przed szkodnikami i chorobami. Dotyczy to szczególnie mątwików (*Globodera* spp.) - pasożytniczych nicieni glebowych, do zwalczania których brak skutecznych, selektywnych środków chemicznych. Historia hodowli odpornościowej ziemniaka sięga połowy XX wieku. Rozwój technik molekularnych dostarczył hodowcom narzędzi umożliwiających selekcję form odpornych na poziomie DNA. Wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji (MAS – ang. marker-assisted selection) w porównaniu do testów fenotypowych pozwala na ocenę obecności genów odporności na bardzo wczesnym etapie hodowli, bo już w fazie siewki. Pozwala również ograniczyć koszty i czas potrzebny do przeprowadzenia oceny odporności. Wdrożenie MAS do praktyki hodowlanej wymaga jednak przeprowadzenia analizy związku pomiędzy poszukiwaną cechą i markerem, uzupełnionej analizą związków ‘markerowanej’ cechy z innymi ważnymi cechami agronomicznymi.

Celem pracy było zbadanie możliwości wykorzystania markerów molekularnych do usprawnienia selekcji form ziemniaka uprawnego odpornego na mątwiki. W szczególności: a) wyróżnienie markerów molekularnych przydatnych do selekcji form posiadających geny odporności na mątwiki; b) poprawa efektywności selekcji form odpornych na mątwiki na drodze zwiększenia wydajności procesu detekcji genów odporności oraz genetyczne charakteryzowanie form rodzicielskich o zwiększonej dawce genu odporności, w których potomstwie można oczekiwać zwiększonej frekwencji genotypów odpornych; c) ocena wpływu prowadzenia wczesnej, ukierunkowanej na odporność selekcji z użyciem markerów molekularnych na poziom najważniejszych cech użytkowych oraz d) wyselekcjonowanie klonów ziemniaka charakteryzujących się wysoką, złożoną odpornością na różne patotypy *Globodera* spp.

Materiał badawczy stanowiły odmiany ziemniaka, zaawansowane rody hodowlane oraz klony z nieselekcjonowanych potomstw pochodzących z krzyżowań rodów i odmian. Do badań wybrano odmiany o zróżnicowanej odporności na mątwiki na podstawie danych katalogowych. Poziom odporności na patotypy *G. rostochiensis* i *G. pallida* zaawansowanych rodów hodowlanych oraz klonów z nieselekcjonowanych potomstw oceniano w testach laboratoryjnych.

Genetyczną analizę odporności klonów i odmian ziemniaka przeprowadzono z wykorzystaniem markerów DNA sprzężonych z genami odporności na mątwiki zidentyfikowanymi w gatunkach *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, *S. vernei* i *S. spegazzini*. Badano markery genów: *H1* (TG689, 57R, CP113 i 239E4left), *Gpa2* (GP34 i 77R), *Gro1-4* (*Gro1-4*), *GroVI* (X02 i U14), *GpaV<sub>vm</sub>* (HC), *Grp1* (TG432) oraz marker SPUD1636 związany z QTL z *S. vernei*. Na potrzeby niniejszej pracy gen ten nazwano *Gpa5-like* zgodnie z sugestią Bryan i innych (2002), że może to być gen tożsamy z genem *Gpa5*. W ramach molekularnych analiz odporności odmian sprawdzono również możliwość identyfikacji kilku markerów zgodnie z procedurą tzw. multipleks PCR. Ponadto w oparciu o amplifikację wybranych markerów DNA w klonach z nieselekcjonowanych potomstw zweryfikowano możliwość ustalenia na poziomie DNA dawki genu *H1* w charakteryzowanych formach rodzicielskich. Poziom cech agronomicznych klonów z nieselekcjonowanych potomstw oraz zaawansowanych rodów hodowlanych o zróżnicowanej amplifikacji wybranych markerów DNA i o zróżnicowanym poziomie odporności na mątwiki oceniano w doświadczeniach polowych.

Wykazano, że charakterystyka odporności odmian pod kątem obecności wybranych genów odporności pozwala zweryfikować introdukcję genów odporności z takich źródeł jak *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. vernei* oraz *S. spegazzini*. Dla czterech odmian użycie markerów pozwoliło zweryfikować istniejące dane o źródle odporności. Były to odmiany Fox, Panda, Jasia i Nadine.

Scharakteryzowano selektywność wybranych markerów w stosunku do poszukiwanych genów odporności w odmianach i rodach hodowlanych. Ustalono, że markery TG689 i 57R, *Gro1-4* oraz SPUD1636 są dobrymi narzędziami diagnostycznymi do oceny obecności odpowiednio genów *H1*, *Gro1-4* i *Gpa5-like*. Natomiast markery CP113, U14 i X02, TG432 oraz GP34 nie są przydatne do oceny obecności w badanych materiałach odpowiednio genów *H1*, *GroVI*, *Grp1* i *Gpa2*. Ustalenie przydatności markerów 77R i HC do oceny obecności genów *Gpa2* i *GpaV<sub>vm</sub>* wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań dla większej liczby materiałów. Można stwierdzić, że weryfikacja przydatności danego markera molekularnego do selekcji powinna być prowadzona dla wszystkich wykorzystywanych

w hodowli form rodzicielskich, w celu ustalenia możliwości przeprowadzenia selekcji ich potomstw z wykorzystaniem danego markera DNA.

W celu poprawienia efektywności selekcji prowadzono prace nad zastosowaniem techniki multiplex PCR umożliwiającej identyfikację kilku genów w pojedynczej reakcji PCR. Ustalono warunki reakcji multiplex PCR umożliwiające amplifikowanie w jednej reakcji markerów genów *HI* (TG689) i *Gro1-4* (Gro1-4) oraz *HI* (TG689) i *Gpa5-like* (SPUD1636).

W ramach badań związanych z efektywnością selekcji prowadzono identyfikację heterozygot typu dupleks pod względem genu *HI* na podstawie segregacji występowania markerów genu *HI* (57R i TG689) w nieselekcionowanych potomstwach. Określenie dawki genu *HI* na podstawie poziomu fluorescencji uzyskanej w wyniku reakcji Real Time PCR z wykorzystaniem markera TG689 i barwnika niespecyficznego SYBR Green nie przyniosło pożądanych rezultatów. Zidentyfikowane formy simpleks i dupleks stanowią przydatny materiał do dalszych badań nad możliwością określenia dawki genu *HI* za pomocą techniki Real Time PCR z wykorzystaniem sond TaqMan specyficznych dla produktu amplifikacji markera TG689 i/lub 57R.

Przeprowadzona analiza wpływu selekcji ukierunkowanej na odporność i rozpoczętej na wczesnych etapach hodowli na poziom cech jakościowych nie wykazała negatywnych związków pomiędzy obecnością markerów genu *HI* a cech agronomicznych. Dla większości cech wykazano duże zróżnicowanie ocen w kolejnych latach. Istotne różnice pomiędzy klonami z genem i bez genu pojawiły się na etapie siewki polowej: siewki ze zidentyfikowanymi markerami genu *HI* charakteryzowały się istotnie wyższym plonem i większymi bulwami, ale o istotnie słabszej regularności zarysu i głębszych oczkach. W późniejszych rozmnożeniach bulwowych nie stwierdzano żadnych negatywnych związków pomiędzy obecnością markerem a cechami jakościowymi. Można więc stwierdzić, że w przypadku markera związanego z genem *HI* jego użycie powinno być stosowane na późniejszych niż siewka etapach hodowli.

Ocena poziomu cech agronomicznych zaawansowanych rodów hodowlanych łączących odporności na wiele patotypów *Globodera* spp. wykazała, że nagromadzenie genów odporności na mątwiki nie wpływa negatywnie na poziom cech agronomicznych. Wyselekcjonowano grupę 14 rodów ziemniaka o wysokiej do bardzo wysokiej złożonej odporności na wszystkie patotypy *Globodera* spp., oraz dobrych cechach agronomicznych. Stanowią one cenny materiał hodowlany jako materiał wyjściowy dla polskiej hodowli ziemniaka.

**Summary PhD thesis:**  
**“The use of molecular techniques in selection of cultivated potato  
resistant to nematodes (*Globodera* spp.)”**

to obtain the degree of PhD in agricultural sciences, field of knowledge: Agricultural Science,  
discipline: agronomy

*Doctoral supervisor: dr hab. Bogdan Flis, prof. IHAR-PIB*

Cultivation of resistant cultivars is the most effective and environmentally the safest method of disease and pest protection of potato. The potato cyst nematodes (PCN) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* are the most important pests feeding on potato roots of which chemical control involves unspecific and harmful pesticides. Therefore, the resistance to *Globodera* spp. is among major goals of potato breeding. Breeding for resistance to nematodes started in second half of 20<sup>th</sup> century and nowadays the development of molecular techniques provides tools for selection of resistant individuals based on DNA information. Unlike the phenotypic assessment of resistance to nematodes, marker-assisted selection (MAS) can be applied at early stages of selection and it is a fast and cost-effective technology. However, the transfer of molecular markers from research to practical applications requires the validation of their effectiveness in non-related populations with various genetic background. Such a validation will indicate the marker usefulness in routine MAS. Equally important is to evaluate the relationship between the presence of resistance genes and the level of quality characteristics.

The main goals of this thesis were: a) to examine the suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp.; b) improving the efficiency of selection of potatoes resistant to nematodes by increasing the efficiency of detection of resistance genes and genetic characterization of the parental forms with increased dose of resistant gene which can be used as parents to originate progenies with high frequency of resistant clones; c) to evaluate the impact of early marker-assisted selection of resistant clones to quality characteristics and d) to select clones with high multiple resistance to various pathotypes of *Globodera* spp. (practical goal).

Plant materials included susceptible and resistant potato varieties (with declared catalogue resistance), advanced tetraploid breeding lines and individuals from non-selected progenies. Nematode resistance of breeding lines and clones was evaluated in laboratory tests.

Genetic analysis of resistance to nematodes in tested materials was performed using DNA markers linked to resistance genes identified in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, *S. vernei* and *S. spegazzini*. Among investigated markers were markers of *HI* gene (TG689, 57R, CP113 and 239E4left), *Gpa2* gene (GP34 and 77R), *Gro1-4* (Gro1-4), *GroVI* (X02 and U14), *GpaV<sub>vrn</sub>* (HC), *Grp1* (TG432) and marker SPUD1636 linked to not named QTL mapped in *S. vernei* (Bryan et al, 2002). For the purposes of this study this gene was named

*Gpa5-like* because it may be a gene identical to the gene *Gpa5*, as suggested by Bryan et al (2002).

It was demonstrated that molecular analysis of presence of the chosen resistance genes allow to confirm the introduction to the breeding pool of resistance genes from such sources of resistance as *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. vernei* and *S. spagazzini*. Four varieties (Fox, Panda, Jasia and Nadine) were found to have another resistance source than declared in their pedigree.

Furthermore, the marker Gro 1-4 of *Gro1-4* gene and two markers of *H1* gene (57R and TG689) proved to be a good tool to select clones resistant to pathotypes Ro1 and Ro4 of *G. rostochiensis*. Marker SPUD1636 turned out to be useful for the selection of individuals resistant to pathotypes Pa2 and Pa3 of *G. pallida*. Other evaluated markers (CP113, U14 and X02, TG432 and Gp34) proved to be inefficient in selecting clones with genes *H1*, *GroVI*, *Grp1* and *Gpa2* respectively. More materials are needed to determine usefulness of markers 77R and HC linked to genes *Gpa2* and *GpaV<sub>vm</sub>*, respectively. This high level of allelic variation hampers the ability to transfer markers from mapping populations to breeding lines, and hence, marker validation in breeding germplasm is critically important.

To minimize the time and work amount needed to verify the presence of resistance genes, the multiplex PCR reactions were developed. A simple multiplex PCR method was developed for detection of *H1* and *Gro1-4* genes conferring resistance to *G. rostochiensis*. Another multiplex PCR method was developed for markers TG689 of *H1* gene and SPUD1636 linked to *Gpa5-like* conferring resistance to *G. pallida*.

The effectiveness of selection might be improved by using genotypes, which are heterozygotes of duplex type. In this study clones with a double dose of gene *H1* have been identified based on segregation of markers TG689 and 57R in their progenies. The determination of *H1* gene dosage on the basis of the level of fluorescence obtained in the reaction of Real Time PCR using the marker TG689 and non-specific dye SYBR Green have not produced the desired results. However, the simplex and duplex clones identified in this study could be useful for further research on quantitative TaqMan assays used to the determination of *H1* gene dosage with the marker TG689 and/or 57R. Moreover, the duplex clone for the *H1* allele can be used as parent to originate progenies with about 80% of resistant individuals.

The impact of selection focused on nematode resistance started at early stages of breeding on level of quality traits was analyzed. The durable and negative relationship between the presence of markers of *H1* gene and other traits was not observed. Although, tubers of seedlings with marker TG689 or 57R were more irregular in shape and had deeper

eyes as compared with seedlings without the marker, this relationship was not observed for successive clonal generations. Therefore marker-assisted selection of *HI* gene at early generations (first or second clonal generation) does not influence on the phenotypic selection.

Moreover, the results of this study indicate that there is no negative relationship between combined resistances to pathotypes of *G. rostochiensis* and *G. pallida* and the level of quality traits. 14 clones with high level of resistance to all pathotypes of *Globodera* spp. and a high level of quality traits were selected. They could be useful as potentially valuable breeding material for Polish potato breeding.

*mgr inż. Dorota Milczarek*