

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 61.

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

Kierownik zadania: *dr B. Tatarowska*

Cele zadania:

1. Wybór form rodzicielskich $4x$ oraz $2x$ do programu krzyżowań tetraploidalnych $4x (Rm) \times 4x (Rm)$, $4x (Gm) \times 4x (Gm)$ i interploidalnych $4x (Ns) \times 2x (Ns)$.
2. Wybór efektywnego sposobu kolchicynowania wytypowanych diploidalnych form ziemniaka odpornych na PVS w celu podwojenia liczby chromosomów.
3. Uzyskanie populacji tetraploidalnych $4x \times 4x$, mających w swym pochodzeniu odporność na PVM pochodzącą z dwóch dzikich gatunków: *Solanum megistacrolobum* i *Solanum gourlayi* w celu poznania dodatkowych czynników genetycznych warunkujących tę odporność w różnych warunkach środowiskowych.
4. Uzyskanie populacji interploidalnej $4x \times 2x$ (obie formy rodzicielskie odporne na PVS, forma diploidalna zdolna do wytwarzania $2n$ gamet) w celu zbadania wpływu dawki genu *Ns* na odporność.

Materiały i metody:

W ramach tematu 1 przeprowadzono oceny fenotypowe i genotypowe 49 form rodzicielskich $4x$ i $2x$. Wykonano testy na obecność patogenów kwarantannowych: PSTVd i CMS. Test na obecność wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd) został wykonany wg. procedury zatwierdzonej jako Standard EPP0 w 2003-09. Test na obecność bakterii *Clavibacter michiganensis* (Cms) został wykonany zgodnie z procedurą dla testu immunofluorescencyjnego (IF). Wytypowane formy rodzicielskie zostały sprawdzone pod względem płodności pyłku. Pyłek wybarwiony w co najmniej 30% uznany został za płodny w stopniu wystarczającym do wykorzystania w krzyżowaniach. W testach laboratoryjnych oceniono poziom odporności na wirus M i S ziemniaka wybranych rodów $2x$ i $4x$. Badano obecność markerów typu CAPS sprzężonych z genem *Rm* (GP 283 i GP 250) i markera typu SCAR sprzężonego z genem *Gm* (SC811) w celu potwierdzenia obecności form odpornych na PVM w grupie rodów $4x$. Dla potwierdzenia obecności form odpornych na PVS w grupie rodów $4x$ i $2x$ zastosowano marker ISSR sprzężony z genem *Ns* (UBC811).

W ramach tematu 2 przeprowadzono kolchicynowanie wytypowanych diploidalnych form ziemniaka $2x$ odpornych na PVS (z genem *Ns*) w celu podwojenia liczby chromosomów. Zastosowano zmodyfikowaną metodę Dionne'a polegającą na kolchicynowaniu merystemów kątowych (pędów) ziemniaka. Zastosowano dwa stężenia roztworu kolchicyny: 0,5% oraz 0,1%, oraz dwa czasy kolchicynowania 24h i 48h. W każdym z czterech wariantów (0,1% - 24h, 0,1% - 48h, 0,5% - 24h, 0,5% - 48h) kolchicynowaniu poddano 10 roślin oraz zastosowano jedną roślinę kontrolną. Odrastające z kolchicynowanych kątów liściowych pędy były systematycznie ścinane i ukorzeniane w piasku. Ukorzenione pędy następnie przesadzano do doniczek w celu otrzymania z nich bulw. Proces kolchicynowania przeprowadzony został na trzech klonach diploidalnych (płodnych i posiadających $2n$ gamety), pochodzących z kolekcji *in vitro*.

W ramach tematu 3 i 4 przeprowadzono krzyżowania tetraploidalne $4x (Rm) \times 4x (Rm)$, $4x (Gm) \times 4x (Gm)$ oraz interploidalne $4x (Ns) \times 2x (Ns)$. Ze zdrowych bulw wycięto oczka, które po wstępnym podkiełkowaniu wysadzono w doniczkach w szklarni. Po czterech tygodniach wzrostu z roślin tych zostały pobrane zrazy, które zaszczepiono na przygotowanych uprzednio podkładkach z pomidora i psianki. Rośliny wysadzono następnie w foliowcach. W celu przedłużenia okresu kwitnienia rośliny prowadzono na 1-2 pędy. W trakcie kwitnienia z klonów $4x$ i $2x$ wytypowanych jako formy ojcowskie sukcesywnie zbierano pyłek do zapyleń.

Wyniki i dyskusja:

W ramach tematu 1 wstępnej ocenie poddano 22 formy rodzicielskie $4x$ mające w swym pochodzeniu źródło odporności na PVM z *S. megistacrolobum* oraz 7 form $4x$ z genem odporności na PVM z *S. gourlayi*. Po przeprowadzeniu oceny fenotypowej i genotypowej wytypowano 5 rodów tetraploidalnych ($4x$) z genem *Rm* oraz 5 rodów ($4x$) z genem *Gm* do krzyżowań $4x \times 4x$. Do programu krzyżowań $4x (Rm) \times 4x (Rm)$ wybrano rody posiadające oba markery genu *Rm*: GP 250 i GP 283 oraz

wykazujące odporność w testach fenotypowych po zakażeniu mechanicznym. Rody z wysoko płodnym pyłkiem (>60%) wykorzystano jako formy ojcowskie. Do programu krzyżowań $4x (Gm) \times 4x (Gm)$ wybrano rody posiadające marker genu *Gm*: SC878 oraz odporne w testach fenotypowych po zakażeniu mechanicznym. Rody z wysoko płodnym pyłkiem (>50%) wykorzystano jako formy ojcowskie. Do programu krzyżowań $4x \times 2x$ wytypowano 6 rodów tetraploidalnych i 2 diploidalne z genem *Ns* z *S. tuberosum* subsp. *andigena*. U wszystkich form stwierdzono obecność markera UBC811 oraz potwierdzono odporność na PVS w testach fenotypowych. W celu przeprowadzenia w przyszłym sezonie powtórnych krzyżowań interploidalnych dodatkowo wytypowano, oceniono i rozmnożono 10 diploidalnych klonów odpornych na PVS z genem *Ns*.

W ramach tematu 2 po kolchicynowaniu uzyskano tylko 9 roślin. Dla klonu diploidalnego DW-276 nie uzyskano pędów przybyszowych. Po próbie ukorzenia pędy zasychały i zamierały. Dla pozostałych dwóch klonów liczba ukorzenionych pędów była również niewielka: DW 83-3121 (5 roślin), DW 83-3127 (4 rośliny). W przyszłym roku zostanie sprawdzony poziom ploidalności osobników uzyskanych w wyniku kolchicynowania (na roślinach uzyskanych z ich pokolenia wegetatywnego). Doświadczenie wstępne przeprowadzone w 2014 roku pokazało wiele trudności jakich można spodziewać się przy podwajaniu liczby chromosomów u ziemniaka metodą kolchicynowania. W obecności kolchicyny, która jest inhibitorem wrzeczona kariokinetycznego, nie następuje rozdzielenie chromosomów siostrzanych na dwa jądra potomne. Powstaje jedno jądro z podwójną liczbą chromosomów. Jeżeli stężenie kolchicyny jest za wysokie lub jej działanie trwa zbyt długo następują dalsze podziały chromosomów, prowadzące do śmierci komórki na skutek przekroczenia poziomu ploidalności, przy którym może ona jeszcze zachować żywotność. Stężenie i okres działania kolchicyny muszą być tak dobrane, aby nie przekroczyć etapu podwojenia liczby chromosomów. Duży wpływ na wydajność procesu kolchicynowania ma interakcja genotyp \times stężenie \times czas kolchicynowania. Te zależności i obserwowana zmienność uzyskiwanych wyników została przedstawiona w wielu pracach. Autorzy publikacji pracując na różnych genotypach ziemniaka stosowali roztwory kolchicyny o różnych stężeniach (od 0,005% do 1,0%) oraz różne czasy kolchicynowania (od 24h do 92h), uzyskując bardzo rozbieżne wyniki. Praktycznie każdy genotyp ziemniaka poddawany procesowi kolchicynowania musi mieć dopracowane własne warunki i parametry, przy których frekwencja uzyskiwanych roślin o podwojonej liczbie chromosomów jest zadowalająca.

W ramach tematu 3 przeprowadzono 8 kombinacji krzyżówkowych $4x (Rm) \times 4x (Rm)$ oraz 8 kombinacji $4x (Gm) \times 4x (Gm)$. Dla 8 kombinacji $4x (Rm) \times 4x (Rm)$ uzyskano w sumie 217 jagód. Dla 2 z 8 kombinacji krzyżówkowych $4x (Gm) \times 4x (Gm)$ uzyskano w sumie 30 jagód. Celem zadania było uzyskanie populacji interploidalnych pochodzących ze skrzyżowania form o odporności pochodzącej z *S. megistacrolobum* $4x (Rm) \times 4x (Rm)$ oraz o odporności pochodzącej z *S. gourlayi* $4x (Gm) \times 4x (Gm)$. Uzyskanie takich materiałów pozwoli w kolejnych latach badań określić reakcję form z genem *Rm* lub *Gm* na nowe warianty wirusa M ziemniaka oraz poznać dodatkowe czynniki genetyczne warunkujące tę odporność w różnych warunkach środowiskowych przy zastosowaniu ilościowych metod molekularnych. W przypadku odporności warunkowanej genem *Rm* określona zostanie również zależność między odpornością, a występowaniem reakcji nekrotycznej. Badania te pozwolą na usprawnienie metodyki wyróżniania form odpornych na PVM.

W ramach tematu 4 przeprowadzono krzyżowania interploidalne $4x \times 2x$ (obie formy rodzicielskie odporne na PVS, forma diploidalna zdolna do wytwarzania $2n$ gamet). Z 12 kombinacji tylko dla jednej kombinacji PW-363 \times DW-276 uzyskano jagodę. Rody diploidalne wytwarzały dużą liczbę kwiatów. Natomiast kwiaty form macecznych po zapyleniu były zrzucane i nie dochodziło do zawiązywania jagód. Z tego powodu do dalszych badań wytypowane zostały w tym sezonie kolejne formy ojcowskie $2x$ z genem *Ns*. Klony wytypowane oceniono fenotypowo i genotypowo pod kątem odporności na PVS oraz rozmnożono. Pyłek z tych form został zebrany i zamrożony w ciekłym azocie. Wprowadzanie do materiałów hodowlanych odporności z dzikich gatunków *Solanum* odbywa się różnymi metodami, zależnie od poziomu ploidalności oraz występujących barier krzyżowalności. Jedną z metod jest krzyżowanie typu $4x \times 2x$, $2x \times 4x$ lub $2x \times 2x$ z wykorzystaniem gamet o niezredukowanej liczbie chromosomów. Duży wpływ na żywotność ziaren pyłku mają zaburzenia przebiegające w procesie mejozy. Zaburzenia podczas mikrosporgenezy i rozwoju ziaren pyłku roślin uprawnych, ozdobnych czy dziko rosnących mogą mieć bardzo różną etiologię łącznie z czynnikami

genetycznymi, cytoplazmatycznymi czy cytoplazmatyczno-genetycznymi. Należy również pamiętać, iż na jakość pyłku w dużym stopniu wpływają warunki zewnętrzne: długość fotoperiodu, temperatura, dostęp do niezbędnych substancji mineralnych, stresi fizjologiczne np. susza. Blokada rozwoju niezgodnego pyłku jaką obserwowaliśmy w przypadku przeprowadzonych krzyżowań $4x \times 2x$ jest procesem aktywnym, warunkowanym obecnością genetycznie zaprogramowanych mechanizmów. W tym sezonie nie udało się uzyskać jagód do dalszych badań mających na celu zbadanie wpływu dawki genu *Ns* na odporność. Program krzyżowań interploidalnych $4x \times 2x$ zostanie powtórzony w przyszłym sezonie, przy zwiększonej liczbie form ojcowskich $2x$.

Wnioski:

W ramach tematu 1 z puli posiadanych materiałów tetraploidalnych wbrano pięć form rodzicielskich odpornych na PVM z genem *Rm* i pięć form z genem *Gm* do krzyżowań tetraploidalnych $4x \times 4x$. Do krzyżowań interploidalnych $4x \times 2x$ z puli rodów tetraploidalnych z genem *Ns* wybrano sześć form oraz dwie formy diploidalne. Dodatkowo oceniono 10 klonów $2x$ z genem *Ns* w celu wykorzystania ich jako formy ojcowskie w powtórnych krzyżowaniach interploidalnych.

W ramach tematu 2 uzyskano po kolchicynowaniu 9 ukorzenionych roślin dla których w kolejnym sezonie sprawdzony zostanie poziom ich ploidalności. Do określenia poziomu ploidalności wykorzystana zostanie pośrednia metoda, polegająca na liczeniu chloroplastów w komórkach przyspawkowych aparatu szparkowego. Będzie można stwierdzić czy zastosowane stężenia roztworu kolchicyny i czasy kolchicynowania były właściwymi. Do dalszych badań w 2015 roku zostaną wykorzystane dwa diploidalne klony ziemniaka: DW 83-3121 i DW 83-3127, które najlepiej regenerowały. Niska wydajność procesu kolchicynowania wskazuje na konieczność wprowadzenia nowych modyfikacji w metodyce. Wprowadzone zostanie 24-godzinne chłodzenie roślin w temperaturze 4°C , poprzedzające moment nałożenia kolchicyny.

W ramach tematu 3 udało się uzyskać populacje tetraploidalne o odporności pochodzącej z *S. megistacrolobum* $4x$ (*Rm*) \times $4x$ (*Rm*) oraz odporności pochodzącej z *S. gourlayi* $4x$ (*Gm*) \times $4x$ (*Gm*). Liczba uzyskanych jagód w obu wariantach krzyżowań powinna być wystarczająca do kontynuowania badań w przyszłym sezonie.

W ramach tematu 4 nie udało się uzyskać populacji interaploidalnej o odporności pochodzącej z *S. tuberosum* subsp. *andigena* $4x$ (*Ns*) \times $2x$ (*Ns*), prawdopodobnie na skutek niedopasowania formy ojcowskiej $2x$ do formy matecznej $4x$, zaburzeń procesu mikrosperogenezy i rozwoju ziaren pyłku, czy też niekorzystnego wpływu warunków zewnętrznych. W celu powtórzenia krzyżowań interploidalnych w przyszłym roku wytypowano 10 nowych diploidalnych form ojcowskich z genem *Ns*.