**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 1 było stworzenie kolekcji rodów odpornych na wirus M ziemniaka ze źródłem odporności z *S. megistacrolobum* lub *S. gourlayi* oraz rozmnożenie w polu populacji mających w swym pochodzeniu odporność na PVS z *S. tuberosum subsp. andigena*.
2. Celem tematu było uzyskanie informacji o poziomie odporności na wirus S ziemniaka (w ocenie fenotypowej) genotypów pochodzących z 2 populacji tetraploidalnych w których źródłem odporności na wirus S ziemniaka jest *S. tuberosum subsp. andigena*.
3. Celem tematu było wyróżnienie rodów tetraploidalnych 4*x* wysoko odpornych na wirus M ziemniaka.
4. Celem tematu było docharakteryzowanie (poprzez ocenę porażenia wtórnego) reakcji odpornościowej wybranych rodów ziemniaka, ocenianych w poprzednim sezonie przy zastosowaniu różnych źródeł zmienności (szczep wirusa i temperatura inkubacji).

*Materiały i metody.*

*W ramach tematu 1* wysadzono 6 populacji 4x mających w swym pochodzeniu gen odporności na PVM pochodzący z *S. megistacrolobum* (*Rm*) lub *S. gourlayi* (*Gm*). Z każdej populacji wysadzono rody odporne, wytypowane w testach fenotypowych przeprowadzonych w poprzednim sezonie. Rody wysadzono na poletkach 2 krzakowych. Jesienią po przeanalizowaniu wyników z oceny porażenia wtórnego (testy ELISA), przeprowadzono dodatkową selekcję rodów i pozostawiono w kolekcji polowej rody wysoko odporne na PVM. W polu prowadzono również rozmnożenie 2 populacji tetraploidalnych mających w swym pochodzeniu źródło odporności na PVS pochodzące z *S. tuberosum subsp. andigena*. Z każdej populacji wysadzono po 100 rodów na poletkach 2 krzakowych.

*W ramach tematu 2* do oceny odporności na PVS zastosowano metodę inokulacji mechanicznej. Rody zostały wysadzone w szklarni (po 5 roślin z każdego genotypu). Dodatkowo wysadzone zostały formy rodzicielskie z każdej populacji oraz odporna katalogowo na PVS odmiana Sonda. Rody były zakażane w stadium 3-4 liścia, posypywano je karborundem i zakażano izolatem wirusa S. Zakażenia wykonywano dwukrotnie w odstępach 2 dniowych, w warunkach szklarniowych. Dla każdego rodu zastosowano po 2 niezakażane kontrole. Źródło wirusa S ziemniaka stanowiły rośliny pomidora porażone szczepem zwykłym S z odmiany Leona. W 6 tygodniu od inokulacji określono zawartość PVS w próbce soku z liści badanych roślin na podstawie odczytów wartości A405 w teście ELISA. Do oceny porażenia pierwotnego pobierano czwarty w pełni wyrośnięty liść, licząc od wierzchołka rośliny. Z roślin badanych rodów jesienią zebrano bulwy, w których w przyszłym sezonie zostanie ocenione porażenie wtórne. Ocenie poddanych zostało 200 rodów ziemniaka.

*W ramach tematu 3* ocenie porażenia wtórnego poddanych zostało 580 rodów ziemniaka. Z roślin badanych rodów, które w 2017 roku po zakażeniach mechanicznych wirusem M ziemniaka, wykazały średnie wartości absorbancji A405 na poziomie lub poniżej wartości granicznej, zostały zebrane bulwy. Aby ocenić porażenie wtórne, bulwy w 2018 roku, po okresie spoczynku i podkiełkowaniu, zostały wysadzone w szklarni. Po 6 tygodniach wykonany został test ELISA. Do testu pobierano czwarty w pełni wyrośnięty liść, licząc od wierzchołka rośliny.

*W ramach tematu 3* ocenie porażenia wtórnego poddanych zostało 960 roślin ziemniaka. Bulwy zebrane w 2017 roku po ocenie porażenia pierwotnego, w roku 2018 po okresie spoczynku i podkiełkowaniu zostały wysadzone w szklarniach. Po 6 tygodniach zebrano z tych roślin liście i przeprowadzono testy odporności (testy ELISA i RT-PCR). Do testów pobierano czwarty w pełni wyrośnięty liść, licząc od wierzchołka rośliny.

*Wyniki i dyskusja*.

*W ramach tematu 1* z sześciu populacji tetraploidalnych z segregujacym genem *Rm* i *Gm* powstała kolekcja wysoko odpornych rodów na wirus M ziemniaka. Genotypy te zostały szczegółowo przebadane pod kątem odporności na PVM w testach laboratoryjnych. Ocena tych rodów obejmowała ocenę porażenia pierwotnego i wtórnego. Dodatkowo rody te zostały scharakteryzowane pod kątem cech morfologicznych i wad zewnętrznych bulw. W kolekcji znalazło się 200 rodów odpornych na wirus M ziemniaka z genem *Rm* z *S. megistacrolobum* oraz 68 rodów odpornych z genem *Gm*   
z *S. gourlayi*. Do potwierdzenia obecności genu *Rm* w rodach odpornych wykorzystano markery selekcyjne GP – 250i GP – 283. Rody znajdujące się w kolekcji posiadają 1 lub oba markery.   
W ramach tematu rozmnażano w polu 2 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.

*W ramach tematu 2* ocenie fenotypowej poddano 200 rodów tetraploidalnych, pochodzących z 2 populacji. W grupie rodów należących do populacji *Ns*-II porażenie wirusem S ziemniaka odnotowano dla 20 rodów. Średnie porażenie w grupie rodów podatnych wyniosło 0,517. Zakres odczytów wartości A405 w teście ELISA dla podatnych form wyniósł od 0,058 do 1,651. Porażenia w populacji *Ns*-II nie odnotowano dla 80 rodów. Średnia wartości A405 w teście ELISA dla tej grupy wyniosła 0.007, a zakres odczytów od 0,001 do 0,042. W populacji *Ns*-III porażeniu uległo 26 rodów, a średnia wartość A405 w teście Elisa wyniosła 0,794 przy zakresie od 0,094 do 2,047. W każdej populacji uzyskaliśmy przewagę form odpornych, nad podatnymi. Połączenie w krzyżowaniu formy odpornej (matecznej) z odporną (ojcowską), pozwoliło uzyskać wysoki procent rodów odpornych. Z roślin badanych w roku 2018 (ocena porażenia pierwotnego) zostały zebrane bulwy, które w przyszłym sezonie będą oceniane w warunkach szklarniowych pod względem porażenia wtórnego (próba oczkowa). Ocena porażenia wtórnego, która zostanie przeprowadzona w 2019 roku, pozwoli nam potwierdzić odporność rodów wyróżnionych w tym sezonie. Z genotypów odpornych w roku 2019 zostaną wybrane formy do oceny wpływu dawki genu na poziom odporności na wirusa S ziemniaka.

*W ramach tematu 3* przebadano w sumie rośliny 580 genotypów ziemniaka pochodzących   
z 6 populacji 4*x*. W grupie genotypów podatnych znalazły się 42 rody, natomiast w grupie odpornej 538 rodów. W ocenianych populacjach, zarówno tych gdzie źródłem odporności na PVM był gen *Rm*   
z dzikiego gatunku *S. megistacrolobum*,jak i gen *Gm* z *S. gourlayi* otrzymano, wysoką frekwencję rodów odpornych. Dla 4 populacji uzyskano rozkład w potomstwie form odpornych do podatnych wtynoszący 3:1 (wykres 1). Zgodność wyników potwierdzono za pomocą testu chi – kwadrat( χ2). Dla populacji M-III po ocenie porażenia wtórnego wyselekcjonowano 113 rodów odpornych na PVM i 10 rodów podatnych. Średnia wartość absorbancji w grupie rodów odpornych wyniosła A405 = 0,006, natomiast dla form podatnych A405 = 0,421. W populacji M-IV wytypowano 97 rodów odpornych i 7 podatnych. Średnia wartość absorbancji w grupie rodów odpornych wyniosła A405 = 0,006, natomiast dla form podatnych A405 = 0,393. Dla populacji M-V do rodów odpornych zaklasyfikowano 101 genotypów, natomiast w grupie rodów podatnych znalazł się tylko 1 genotyp. Średnia wartość absorbancji dla genotypów odpornych wyniosła A405 = 0,008, dla podatnych A405 = 0,207.   
W populacji M-V wyróżniono 89 rodów odpornych na PVM i 5 podatnych. Średnia wartość absorbancji w teście Elisa wyniosła dla odpornych A405 = 0,006, dla podatnych A405 = 0,164.

W populacji M-VII wyróżniono 70 rodów odpornych i 10 podatnych. Średnia wartość w grupie rodów odpornych wyniosła A405 = 0,005, natomiast w grupie podatnych   
A405 = 0,400. W populacji M-VIII wirusa nie wykryto w 68 rodach, natomiast 9 rodów uległo prażeniu PVM. Średnie porażenie rodów odpornych wyniosło A405 = 0,011, podatnych A405 = 0,458.

*W ramach tematu 4* poddano szczegółowej ocenie odpornościowej na PVM 12 rodów należących do 4 populacji *Rm* i 2 populacji *Gm*. Porównywano wpływ genotypu, szczepu wirusa i temperatury na poziom porażenia wirusem roślin po zakażeniu mechanicznym i po szczepieniu. W roku 2018 przeprowadzono ocenę porażenia wtórnego genotypów z doświadczenia szczegółowego. Rody należące do populacji z segregującym genem *Rm* z *S. megistacrolobum*, w ocenie porażenia wtórnego uzyskały oceny, które potwierdziły ich poziom odporności na PVM, przypisany im po ocenie porażenia pierwotnego. Dla 2 rodów należących do populacji M-III zaobserwowano istotny wpływ temperatury inkubacji roślin i zastosowanego szczepu wirusa na namnażanie się wirusa w komórkach roślinnych. W rodach M-III-96 i M-III-130 w temperaturze 28oC wirus nie był wykrywany zarówno testami ELISA jak i w RT-PCR. Dla tych rodów obecność wirusa M ziemniaka stwierdzano tylko w temperaturze 20oC. Ród M-III-130 zarówno w porażeniu pierwotnym i wtórnym przy zastosowaniu do zakażeń szczepu M-U nie uległ porażeniu. Brak porażenia dla tego rodu odnotowano w obu latach w materiale z zakażeń mechanicznych i po szczepieniu. W naszych badaniach dla rodów, pochodzących z 5 populacji z segregującym genem *Rm* ta zależność również się potwierdziła, wyjątkiem jest ród należący do populacji M-III dla którego rodzaj zastosowanego szczepu PVM miał znaczenie w namnażaniu się wirusa w komórkach roślinnych.

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, należących do populacji VII i VIII, 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. W grupie genotypów podatnych, należących do populacji VII i VIII nie obserwowano istotnego wzrostu średnich wartości A405 i kopii komórek wirusa u roślin inkubowanych po zakażeniu w temp. 28oC, w porównaniu do roślin inkubowanych w temp. 20oC.

Genotypy odporne z genem *Gm,* należące do populacji VII i VIII, nie wykazywały objawów 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 A405 uzyskiwane dla tej grupy rodów były bardzo niskie we wszystkich wariantach doświadczenia. Po zastosowaniu metody RT 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.

*Wnioski:*

*W ramach tematu 1*

1. Uzyskano 200 rodów tetraploidalnych wysoko odpornych na wirus M ziemniaka, z genem odporności *Rm* oraz 68 rodów wysoko odpornych z genem *Gm*.
2. Wszystkie rody znajdujące się w kolekcji M zostały ocenione pod kątem odporności na PVM w testach laboratoryjnych, w porażeniu pierwotnym i wtórnym oraz uzyskały pełną charakterystykę cech morfologicznych.
3. Rody znajdujące się w kolekcji to formy, które mogą zostać wykorzystane w dalszych pracach hodowlanych, jako formy rodzicielskie w programach krzyżowań.
4. Z grupy 200 rodów ocenianych w testach laboratoryjnych, wytypowano 154 rody, które nie uległy porażeniu wirusem S ziemniaka w testach laboratoryjnych (porażenie pierwotne).

*W ramach tematu 2*

1. Z populacji *Ns-*II i *Ns-*III po ocenie porażenia pierwotnego wyróżniono rody, które nie uległy porażeniu wirusem S ziemniaka.
2. W sumie z obu populacji *Ns* wytypowano 154 rody wstępnie uznane za odporne na PVS.
3. Pomimo wysokich wartości A405 w teście ELISA dla rodów podatnych, objawy fenotypowe na liściach roślin ziemniaka nie zawsze były obserwowane.

*W ramach tematu 3*

1. W testach oceniających porażenie wtórne wyróżniono w każdej populacji rody odporne na wirus M ziemniaka.
2. W sumie wyselekcjonowano 538 rodów odpornych na wirus M ziemniaka.
3. Frekwencja form odpornych do podatnych dla 4 populacji była zgodna z oczekiwaną.
4. Rody odporne na PVM, z poprawną oceną cech morfologicznych, bez wad zewnętrznych i wewnętrznych bulw zostały umieszczone w kolekcji genotypów odpornych na wirus M ziemniaka.
5. Rody te mogą być wykorzystywane w przyszłych programach hodowlanych, jako formy rodzicielskie.

*W ramach tematu 4*

1. Rody należące do populacji *Rm* i *Gm* w ocenie porażenia wtórnego potwierdziły swój poziom odporności na wirus M ziemniaka uzyskany w porażeniu pierwotnym.
2. Dla genotypu M-III-130 odnotowano istotny wpływ temperatury i szczepu na namnażanie się wirusa w komórkach roślinnych.
3. Odporność na PVM pochodząca od *S. megistacrolobum*i warunkowana genem *Rm* w naszych badaniach nie była rasowo specyficzna. Wyjątek stanowił ród M-III-130.
4. Odporność na PVM warunkowana genem *Rm* dla dwóch genotypów z populacji M-III w dużym stopniu zależała od temperatury inkubacji.
5. Odporność na PVM pochodząca od *S. gourlayi* przejawia się w szerokiej skali temperatur, nie zależy od szczepu wirusa użytego do zakażeń oraz związana jest ze zjawiskiem tolerancji (brak objawów fenotypowych na roślinach i brak spadku wigoru roślin).
6. Rody odporne z genem *Gm* mogą stanowić doskonały materiał hodowlany i wprowadzać do programów hodowlanych wysoki poziom odporności na PVM.
7. Zakażania mechaniczne roślin wydają się być wystarczające do przeprowadzenia fenotypowej oceny poziomu odporności na PVM.