

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

Cele zadania.

1. Rozmnażanie w polu linii siewkowych z krzyżowań $4x \times 4x$, mających w swym pochodzeniu odporność na PVS z *S. tuberosum subsp. andigena*.
2. Ocena fenotypowa na wirus M ziemniaka rodów pochodzących z populacji $4x (Rm) \times 4x (Rm)$ oraz $4x (Gm) \times 4x (Gm)$ – inokulacja mechaniczna.
3. Kompleksowa ocena odporności na PVM wytypowanych rodów $4x$ ziemniaka prowadzona w dwóch temperaturach 20°C i 28°C z wykorzystaniem dwóch izolatów PVM:
 - ✓ inokulacja mechaniczna roślin i testy Elisa – porażenie pierwotne
 - ✓ inokulacja przez szczepienie i testy Elisa – porażenie pierwotne
 - ✓ identyfikacja PVM metodami molekularnymi – Real-Time-PCR

Materiały i metody.

W ramach tematu 1 wysadzono z każdej populacji po 110 linii siewkowych uzyskanych w poprzednim sezonie wegetacyjnym. Dla zebranych jesienią linii siewkowych przeprowadzono ocenę cech morfologicznych. Przeprowadzona została również selekcja form odpornych na PVS w potomstwie z krzyżowań $4x \times 4x$ z użyciem markera molekularnego sprzężonego z genem *Ns* (UBC811). W trakcie sezonu wegetacyjnego przeprowadzono również wstępną ocenę odporności na PVS populacji *Ns* – II i *Ns* – III z wykorzystaniem testów paskowych firmy Bioreba.

W ramach tematu 2 przeprowadzono ocenę odporności na wirus M ziemniaka 6 populacji tetraploidalnych. Rody zakażano mechanicznie w szklarni (po 5 roślin z każdego genotypu). W momencie kiedy osiągnęły stadium 3-4 liścia posypywano je karborundem i zakażano izolatami. Zakażenia wykonywano dwukrotnie w odstępach 2 dniowych, w warunkach szklarniowych. Źródło wirusa M stanowiły rośliny pomidora porażone silnym izolatami M-55_a. W 6 tygodniu od inokulacji określano zawartość PVM w próbce soku z liści badanych roślin na podstawie odczytów wartości A_{405} w teście Elisa. Do oceny porażenia pobierano czwarty w pełni wyrosnięty liść, licząc od wierzchołka rośliny. Z roślin badanych rodów jesienią zebrano bulwy, które w roku 2018 zostaną wysadzone i ocenione w porażeniu wtórnym. W roku 2017 w testach odpornościowych ocenionych zostało 665 rodów ziemniaka.

W ramach tematu 3 przeprowadzono szczegółową ocenę reakcji odpornościowej na wirus M ziemniaka wybranych rodów z 6 populacji $4x$. Z każdej populacji oceniano po 2 rody. Do oceny odporności na PVM wybranych rodów $4x$ stosowano metodę inokulacji mechanicznej oraz poprzez szczepienie. Źródłem wirusa M były rośliny pomidora porażone silnym izolatami M_{55a} oraz M-U. Po zakażeniu rośliny umieszczano w kamerach fitotronowych z kontrolowaną temperaturą 20°C i 28°C . Zawartość PVM w próbce soku określono za pomocą wartości absorbancji A_{405} w teście Elisa oraz metodą real time PCR.

Wyniki i dyskusja.

W ramach tematu 1 z populacji tetraploidalnych zebrano 218 linii siewkowych. Linie te po zbiorze zostały ocenione pod kątem cech użytkowych. Dla populacji *Ns* – II (PS-1723 \times PW – 363) średni plon bulw wyniósł 1,5 kg/krzak przy zakresie od 0,4 do 3,0 kg/krzak. Linie siewkowe z tej populacji charakteryzowały się bulwami okrągło-owalnymi o średniej wielkości (3,7), regularnym zarysie (6,2), płytkich oczkach (7,1) oraz średnio cienkiej skórce (5,2). Średni plon dla populacji *Ns* – III (PS-1769 \times PS – 1763) wyniósł 1,8 kg/krzak przy zakresie od 0,6 do 2,9 kg/krzak. Morfologia bulw linii z populacji *Ns* – III była bardzo podobna do populacji *Ns* – II: bulwy okrągło - owalne o średniej wielkości (6,7), zarysie regularnym (6,0), płytkich oczkach (6,9) oraz średnio cienkiej skórce (5,2). Z każdej populacji wybrano po 7 wyróżniających się linii siewkowych, które posiadały stosunkowo wysoki średni plon bulw (kg/ krzak) oraz poprawną morfologię bulw. W ramach tematu

w celu potwierdzenia w badanych populacjach form 4x z genem odporności na wirus S ziemniaka zastosowano marker molekularny sprzężony z genem *Ns* – *UBC811*. Z populacji *Ns* – II ocenie molekularnej poddano 109 linii siewkowych. Obecność markera *UBC811* związanego z obecnością genu *Ns* odnotowano dla 84 linii, natomiast nie stwierdzono amplifikacji tego markera dla 25 linii z tej populacji. Dla kolejnej populacji *Ns* – III liczącej 109 linii obecność markera *UBC811* odnotowano dla 80 linii, natomiast jego brak dla 29 linii. W trakcie sezonu wegetacyjnego przeprowadzono również wstępną ocenę odporności na PVS populacji *Ns* – II i *Ns* – III (zastosowano test paskowy firmy Bioreba). W żadnej linii siewkowej z populacji *Ns* – II i *Ns* – III nie stwierdzono obecności wirusa S ziemniaka.

W ramach tematu 2 w testach szklarniowych ocenie fenotypowej poddano w sumie 665 rodów tetraploidalnych pochodzący z 6 populacji. W grupie rodów należących do populacji M-III porażenie wirusem M odnotowano dla 26 rodów. Średnie porażenie w grupie rodów podatnych wyniosło 0,715. Zakres odczytów wartości A_{405} w teście Elisa dla podatnych form wyniósł od 0,066 do 1,849. W populacji M-IV liczącej 114 rodów porażeniu uległo 10 rodów, a średnia wartość A_{405} w teście Elisa wyniosła 0,756 przy zakresie od 0,228 do 2,239. Najmniej podatnych rodów wyróżniono w populacji M-V. Tutaj wartość A_{405} w teście Elisa dla grupy podatnych form wyniosła 0,730. Zakres odczytów wartości A_{405} dla podatnych form wyniósł od 0,097 do 1,764. Wśród rodów należących do populacji M-VI porażeniu uległo 26 rodów. Średnie porażenie w grupie rodów podatnych wyniosło 1,390. Zakres odczytów wartości A_{405} dla podatnych form wyniósł od 0,102 do 2,922. W populacji M-VII liczącej 89 genotypów porażenie wirusem M odnotowano dla 8 genotypów. Średnie porażenie w grupie form podatnych wyniosło 0,714 przy zakresie wartości A_{405} od 0,112 do 1,179. Wśród rodów należących do populacji M-VIII liczącej 85 genotypów porażeniu uległo 8 rodów. Zakres odczytów wartości A_{405} w teście Elisa dla podatnych form wyniósł od 0,206 do 1,292.

Na roślinach ziemniakach, które zakażano wirusem M obserwowano różne objawy fenotypowe: słabe i silne mozaiki, słabe i silne nekrozy, przebarwienia liści. Należy zauważyć, że tylko dla części genotypów z wysokimi wartościami A_{405} w teście Elisa można było zaobserwować objawy charakterystyczne dla wirusa M ziemniaka. Większość podatnych rodów na PVM nie wykazywała objawów fenotypowych w porażeniu pierwotnym

W ramach tematu 3 oceniano dwie grupy materiału:

A. Populacje z segregującym genem *Gm* (populacje VII i VIII)

Z populacji VII i VIII do wykonania kompleksowej oceny odporności na PVM wybrano po dwa rody ziemniaka. Wyboru dokonano po uzyskaniu ocen dla każdego genotypu po zakażeniu mechanicznym. Z populacji VII były to rody: M-VII-60 i M-VII-14, natomiast z populacji VIII: M-VIII-58 oraz M-VIII-69. Po zakażeniu mechanicznym w żadnym z zastosowanych wariantów doświadczalnych nie obserwowano objawów na roślinach. Jedynie na podatnej odm. Bzura widoczne były silne mozaiki we wszystkich wariantach doświadczenia. Po szczepieniu obserwowano na zakażonych roślinach różne objawy: top nekrozy, mozaiki, punktowe nekrozy. Dla rodu M-VII-14 w temp. 20°C, a dla rodu M-VIII-69 w temp. 28°C można było obserwować charakterystyczne dla reakcji odpornościowej top nekrozy.

Stosując zakażenia mechaniczne wysokie wartości A_{405} wskazujące na podatność uzyskano dla rodów M-VII-60 i M-VIII-58. Najwyższe średnie wartości A_{405} przy zastosowaniu szczepu M-55_a i M-U odnotowano dla rodu z populacji VII (M-VII-60). Silnemu porażeniu uległ również ród M-VIII-58. Pozostałe dwa rody M-VII-14 i M-VIII-69 nie uległy porażeniu.

Stosując metodę Real-Time PCR w celu ilościowego wykrycia wirusa dla rodów poddanych zakażeniom mechanicznym wirus został zidentyfikowany w dwóch rodach: M-VII-60 i M-VIII-58 oraz w podatnej odmianie wzorcowej. Największą liczbę kopii RNA wirusa odnotowano dla rodu M-VIII-58 (2.01E-03) zakażanego szczepem M-U i inkubowanego w temp. 20°C. Natomiast najmniejszą liczbę kopii RNA wirusa uzyskano dla rodu M-VII-60 (6.26E-05) zakażanego szczepem M-U i inkubowanego w temp. 28°C.

Dla rodów poddanych szczepieniu najwyższe średnie wartości A_{405} uzyskano dla rodu M-VIII-58 przy zastosowaniu szczepu M-55_a, natomiast najwyższe wartości przy użyciu szczepu M-U

odnotowano dla rodu M-VII-60. Pozostałe dwa rody M-VII-14 i M-VIII-69 nie uległy porażeniu, podobnie jak przy zakażeniach mechanicznych. Przy zastosowaniu szczepu M-55_a w temperaturze 28°C odnotowano o połowę niższą zawartość wirusa w liściach dwóch rodów: M-VII-60 i M-VIII-58 w porównaniu z inkubacją w temp. 20°C. Wzorce zastosowane w doświadczeniu zareagowały adekwatnie do przypisanego im poziomu odporności na PVM w ocenach katalogowych

Stosując metodę Real-Time PCR w celu ilościowego wykrycia wirusa dla rodów zakażanych poprzez szczepienie obecność wirusa M ziemniaka stwierdzono w dwóch rodach: M-VII-60 i M-VIII-58 oraz w podatnej odmianie wzorcowej. Największą liczbę kopii RNA wirusa odnotowano dla rodu M-VII-60 (5.66E-04) zakażanego szczepem M-55_a i inkubowanego w temp. 20°C. Natomiast najmniejszą liczbę kopii RNA wirusa uzyskano dla rodu M-VIII-58 (5.87E-07) zakażanego szczepem M-U i inkubowanego w temp. 28°C.

B. Populacje z segregującym genem *Rm* (populacje III, IV, V, VI)

Z populacji III, IV, V, VI do wykonania kompleksowej oceny odporności na PVM wybrano po dwa rody ziemniaka. Z populacji III były to rody: M-III-130 i M-III-96, populacji IV: M-IV-1 i M-IV-141, z populacji V: M-V-48 i M-V-9 oraz z populacji VI: M-VI-1 i M-VI-114. Objawy fenotypowe obserwowano tylko w przypadku rodu M-IV-141, we wszystkich wariantach doświadczenia. Po szczepieniu na roślinach obserwowano szersze spektrum objawów: silne mozaiki, nekrozy, karłowatość roślin, zwijanie liści, top nekrozy.

Stosując zakażenia mechaniczne wysokie wartości A_{405} wskazujące na podatność we wszystkich czterech wariantach doświadczenia uzyskano dla rodów: M-IV-141, M-V-9 i M-VI-1. Dla rodów z populacji III wysokie wartości A_{405} odnotowano wówczas kiedy zakażane rośliny inkubowano w temp. 20°C. Kiedy rody prowadzono w 28°C wirus nie był wykrywany.

Stosując metodę Real-Time PCR w celu ilościowego wykrycia wirusa dla rodów poddanych zakażeniom mechanicznym wirus M ziemniaka został zidentyfikowany we wszystkich wariantach doświadczenia w rodach: M-IV-141, M-V-9 i M-VI-1 oraz w podatnej odmianie wzorcowej. W przypadku rodów z populacji III obecność wirusa stwierdzono w roślinach inkubowanych w 20°C. Największą liczbę kopii RNA wirusa odnotowano dla rodu M-V-9 (1.58E-03) zakażanego szczepem M-55_a i inkubowanego w temp. 20°C. Natomiast najmniejszą liczbę kopii RNA wirusa uzyskano dla rodu M-VI-1 (1.77E-06) zakażanego szczepem M-55_a i inkubowanego w temp. 28°C.

Dla rodów poddanych szczepieniu wysokie wartości A_{405} wskazujące na podatność we wszystkich czterech wariantach doświadczenia odnotowano dla rodów M-IV-141 i M-V-9. Dla rodu M-VI-1 obecność wirusa w roślinie stwierdzono tylko po zakażeniu szczepem M – 55_a. Dla rodów z populacji III wysokie wartości A_{405} odnotowano wówczas kiedy zakażane rośliny inkubowano w temp. 20°C. W roślinach z populacji III rosnących w 28°C wirus nie był namnażany.

Stosując metodę Real-Time PCR w celu ilościowego wykrycia wirusa dla rodów zakażanych poprzez szczepienie wirus M ziemniaka został zidentyfikowany we wszystkich wariantach doświadczenia w rodach: M-IV-141, M-V-9 i M-VI-1 oraz w podatnej odmianie wzorcowej. W przypadku rodów z populacji III obecność wirusa odnotowano w roślinach inkubowanych w 20°C. Największą liczbę kopii RNA wirusa odnotowano dla rodu M-IV-141 (2.28E-03) zakażanego szczepem M-U i inkubowanego w temp. 20°C. Natomiast najmniejszą liczbę kopii RNA wirusa uzyskano dla rodu M-VI-1 (2.87 E-06) zakażanego szczepem M-U i inkubowanego w temp. 28°C.

Wnioski:

W ramach tematu 1

1. Cechy użytkowe linii siewkowych pochodzących z populacji *Ns* – II i *Ns* - III są na zadawalającym poziomie, co pozwala przypuszczać, że przyszłe rody hodowlane będą łączyły wysoki poziom odporności na PVS z dobrym zestawem cech użytkowych.
2. W populacjach *Ns* – II i *Ns* – III wyróżniono formy z markerem *UBC811* związanym z genem *Ns* znajdującym się na VIII chromosomie.
3. Pełna selekcyjność tego markera zostanie potwierdzona w przyszłym sezonie po przeprowadzeniu testów fenotypowych (zakażenia mechaniczne PVS, porażenie pierwotne).

W ramach tematu 2

1. W każdej z 6 ocenianych populacji 4x wyróżniono rody odporne i podatne.
2. W sumie wyróżniono 580 odpornych rodów na wirus M ziemniaka.
3. Pomimo wysokich odczytów wartości A_{405} w teście Elisa dla rodów podatnych, objawy fenotypowe na liściach roślin ziemniaka porażonego wirusem M nie zawsze były widoczne.
4. Najwyższy procent rodów odpornych (94%) na PVM obserwowano dla populacji M-V (07 – IX – 169 × PW – 375) ze źródłem odporności z *S. megistacrolobum*.

W ramach tematu 3

A. Populacje z segregującym genem *Gm* (populacje VII i VIII)

1. Dla rodów podatnych nie obserwowano zmienności w reakcji przy zastosowaniu różnych wariantów doświadczenia, zarówno po zakażeniu mechanicznym jak i po szczepieniu.
2. W rodach odpornych obserwowano reakcję HR, która zależała od temperatury inkubacji roślin po szczepieniu.

B. Populacje z segregującym genem *Rm* (populacje III, IV, V, VI)

1. W rodach podatnych wyższe wartości A_{405} oraz wyższe zawartości wirusa mierzone metodą Real Time PCR we wszystkich czterech wariantach doświadczenia uzyskiwano w temp. 20°C. Wielkość różnic pomiędzy wynikami otrzymywanymi w 20°C i 28°C zależała od genotypu.
2. W rodach odpornych obserwowano reakcję HR, która nie zależała ani od zastosowanego szczepu wirusa ani od zastosowanej temperatury inkubacji.
3. Odnotowano wystąpienie rodu odpornego, który nie wykazywał reakcji HR.