

SELEKCJA HODOWLANA ODMIAN ODPORNÝCH NA ZARAZĘ ZIEMNIAKA Z WYKORZYSTANIEM MARKERÓW MOLEKULARNYCH

mgr inż. Piotr Kamiński
Hodowla Ziemniaka Zamarte Sp. z o. o. – Grupa IHAR
Zamarte 33, 89-430 Kamień Krajeński, e-mail: p.kaminski@zamarte.com

Zaraza ziemniaka, wywoływana przez organizm grzybobodobny *Phytophthora infestans*, powoduje co roku znaczne straty w zbiorach ziemniaków. Ochrona chemiczna jest kosztowna i dlatego w Polsce zabiegi stosuje się jedynie na ok. 40% plantacji. Częstotliwość oprysków w sezonie wegetacyjnym jest również niewielka i wynosi obecnie ok. 2 zabiegów (Pawińska 2009). W gospodarstwach nastawionych na produkcję towarową wykonuje się 5-6 zabiegów zróżnicowanymi fungicydami, natomiast w krajach Europy Zachodniej – nawet 25 (Kapsa 2011). Liczba zabiegów wynika z kalkulacji kosztów i opłacalności produkcji, dlatego w gospodarstwach prowadzących gospodarkę ekstensywną wykonuje się ich najmniej. Alternatywą jest uprawa odmian odpornych na zarazę ziemniaka. Nabiera ona szczególnego znaczenia w produkcji niskonakładowej, ekologicznej i integrowanej.

Hodowla odmian odpornych na zarazę jest trudna z powodu zarówno właściwości biologicznych i genetycznych ziemniaka, jak i samego patogenu. W szczególności wymaga poznania interakcji patogen-roślina, która w przypadku zarazy jest nader skomplikowana. *P.infestans* występuje w dwóch typach kojarzeniowych: A1 i A2, co zapewnia możliwość rozmnażania płciowego generującego zmienność. W procesie rozmnażania bezpłciowego patogen wytwarza w ciągu sezonu wegetacyjnego wiele pokoleń. Zarodniki łatwo rozprzestrzeniają się na plantacji, porażając w krótkim czasie wiele roślin.

Z drugiej strony rozpatrujemy aktywność systemu obronnego rośliny opartego na genach odporności. W zależności od rodzaju tych genów wyróżnia się odporność pionową, warunkowaną genami głównymi (R), i odporność poziomą, warunkowaną poligenicznie. Obecność genów R sprawia, że komórki roślinne, do których wnikają strzępki *P. infestans*, zamierają szybko wraz z patogenem (reakcja nadwrażliwości). Odporność ta działa specyficznie w stosunku do określonej rasy *P.infestans*. Zabezpiecza całkowicie roślinę przed atakiem patogenu, ale nie jest trwała, gdyż wytworzenie przez patogen nowych, bardziej wirulentnych, ras skutkuje jej przełamaniem.

Z literatury znane są przykłady, że odmiana z odpornością warunkowaną genami R po kilku latach uprawy na dużych plantacjach traciła swą odporność, np. szkocka Pentland Dell czy polska Epoka (Pietkiewicz 1976). Odporność pozioma, nazywana polową, jest bardziej trwała. Reakcja odpornej odmiany ziemniaka polega na wolniejszym rozwoju choroby w stosunku do tempa porażenia odmiany podatnej.

Źródłem genów odporności są dość liczne dzikie i prymitywnie uprawne gatunki *Solanum*. Pierwszymi gatunkami, z którymi hodowcy wiązali duże nadzieje zastosowania ich w hodowli odpornościowej, były *Solanum demissum* i *S. stoloniferum* (Black i in. 1953; Black, Gallegly 1957). Obecnie spośród ponad 30 dzikich gatunków ziemniaka ze zidentyfikowaną odpornością na zarazę w hodowli wykorzystuje się jedynie kilkanaście

(Tatarowska 2008). Największe znaczenie mają: *S. demissum*, *S. bulbocastanum*, *S. phureja*, *S. microdontum*, *S. berthaultii*. Wykorzystanie odporności z tych gatunków jest trudne z powodu występowania różnych barier krzyżowalności. Ponadto gatunki będące donorami odporności przekazują potomstwu także niekorzystne cechy, które trudno wyeliminować w procesie hodowlanym. Z reguły odporność na zarazę pochodząca z tych źródeł jest sprzężona z długim okresem wegetacji.

Cykl hodowlany ziemniaka obejmuje krzyżowanie kilkudziesięciu par form rodzicielskich, które dobiera się tak, aby ich cechy, ważne dla przyszłej odmiany, wzajemnie się uzupełniały. Następnie z wegetatywnie rozmnażanego potomstwa selekcjonuje się najlepsze klony. Jest to etap długotrwały i pracochłonny. Efektywność tego procesu może być znacznie poprawiona poprzez użycie markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi określone korzystne cechy, np. odporność na zarazę ziemniaka (tzw. selekcja wspierana markerami, czyli MAS – ang. marker assisted selection). Zastosowanie markerów pozwala zidentyfikować osobniki odporne już na wczesnych etapach pracy hodowlanej, bez pracochłonnych i długotrwałych testów opartych na ocenie fenotypu. Testy laboratoryjne i polowe są wykonywane tylko na rodach z uprzednio zidentyfikowanymi genami warunkującymi odporność w celu potwierdzenia odporności.

Badania nad zarazą ziemniaka od wielu lat są prowadzone w oddziałach IHAR-PIB w Boninie i Młochowie. Poszukuje się nowych źródeł odporności, charakteryzuje izolaty *P. infestans*, monitoruje występowanie *P. infestans* i doskonalą metodykę badawczą. Od kilku lat w Młochowie prace związane z nowymi źródłami odporności prowadzi się z użyciem metod molekularnych. W roku 2006 w potomstwie kombinacji *S. stenotomum* x *S. phureja* zidentyfikowano gen *Rpi-phu1* (Śliwka i in. 2006). Opracowano dwa markery tego genu: GP94 położony blisko genu 6,4 cM i phu6, umiejscowiony w sekwencji kodującej gen odporności. Gen *Rpi-phu1*, zmapowany na chromosomie IX, determinuje wysoką odporność zarówno części nad-

ziemnej, jak i bulw. Nie jest sprzężony z długim okresem wegetacji.

W Hodowli Ziemniaka Zamarte markery molekularne zaczęto wykorzystywać w roku 2006, najpierw do selekcji materiału otrzymanego z Młochowa, następnie do oceny własnych rodów. Co roku ok. 5 tys. siewek stanowi potomstwo 10-15 kombinacji krzyżówkowych, tzw. ekologicznych. Jednym z rodziców jest zawsze forma posiadająca gen *Rpi-phu1*, a drugim odmiana uprawna lub ród hodowlany o znanej, wysokiej zdolności kombinacyjnej pod względem cech użytkowych. Układając program krzyżowań, trzeba wziąć pod uwagę konieczność poprawienia wadliwych cech wnoszonych przez formy odporne, takich jak niski plon ogólny i handlowy, słaba regularność kształtu bulw, głębokie oczka, krótki okres spoczynku. Jednak formy z genem *Rpi-phu1* przekazują także dobre cechy użytkowe, jak dobry smak, co jest cechą pochodzącą od *S. phureja*.

Selekcja rodów rozpoczyna się na etapie ramszu. Ocenia się morfologię bulw i wyrównanie plonu. W następnym roku, w liniach ramszowych, ocenia się dodatkowo cechy kulinarne bulw. Z rodów wybranych z perspektywicznych kombinacji jest pobierany materiał roślinny w celu izolacji DNA i wykonania testów PCR dla identyfikacji markerów genu odporności na zarazę ziemniaka. W nowych i młodych rodach testy molekularne prowadzi się na rodach z pozostałych kombinacji z danego rocznika.

Rody, w których stwierdzono obecność genu *Rpi-phu1*, ocenia się pod względem odporności na zarazę ziemniaka w teście listkowym w laboratorium w Młochowie. Odporność rodów o najlepszych cechach agronomicznych jest oceniana w gospodarstwach ekologicznych. We współpracy z oddziałem IHAR-PIB w Młochowie prowadzi się także ocenę odporności tych rodów w warunkach naturalnego porażenia zarazą – w doświadczeniu polowym w Boguchwale k. Rzeszowa. Co tydzień wykonuje się obserwacje porażenia zarazą powierzchni liści i postępu choroby. Stosunek porażonej powierzchni do całkowitej powierzchni rośliny w czasie doświadczenia jest wyrażony jako rAUDPC (powierzchnia pod krzywą postępu choroby). Uzyskane w ten sposób wyniki utwierdzają w przekonaniu, że gen *Rpi-phu1*

warunkuje odporność w warunkach naturalnej silnej epifitozy zarazy. Ocenę odporności rodów zamieszczono w tabeli 1.

Innym sposobem na podwyższenie odporności odmian i zwiększenie jej trwałości jest **piramidyacja genów** polegająca na łączeniu w jednej odmianie różnych genów R. Można też łączyć dwa typy odporności warunkowanej genami głównymi i poligenicznie. Zabieg taki może spowodować opóźnienie procesu infekcji na polu i przez to zwiększyć odporność (Tan i in. 2010). W HZ Zamarte w tym celu wykorzystano formy z

genem *Rpi-phu1* oraz odmianę Sárpo Mira, która charakteryzuje się wysoką odpornością polową. Została ona wyhodowana i zarejestrowana przez rodzinę Sárvári na Węgrzech. Ma długi okres wegetacji, jest podatna na raka i mątwika ziemniaczanego, a skrajnie odporna na wirus Y ([The European Cultivated Potato Database, www.europotato.org](http://www.europotato.org)). Uprawia się ją głównie w gospodarstwach ekologicznych i ogródkach przydomowych w Wielkiej Brytanii. Jej walory smakowe ocenia się jako przeciętne, typ kulinarny lekko mączysty.

Tabela 1

Ocena odporności rodów z genem *Rpi-phu1* na zarazę ziemniaka w warunkach laboratoryjnych – w teście listkowym i polowym w Boguchwale k. Rzeszowa

Pochodzenie/nr rodu/wzorzec	Ocena w teście listkowym*	Wartość rAUDPC**
TG 97-403 x Felka		
3722	9	0,026
3730	9	0,033
3736	9	0,052
3755	9	0,029
TG 97-411 x Felka		
3757	9	0,021
TG 97-503 x Gracja		
3793	9	0,067
3804	9	0,036
TG 97-509 x Felka		
3816	9	0,019
3817	9	0,033
3827	9	0,048
3828	9	0,048
3829	9	0,033
Odmiany wzorcowe:		
Bintje	3,1	0,532
Escort	7,1	0,371
Gloria	3,2	0,512
Robijn	4,5	0,307
Sárpo Mira	9,0	0,029

*testy listkowe – skala 1-9: 9 – brak porażenia

**rAUDPC – relatywny wskaźnik postępu choroby; im niższa wartość, tym ród bardziej odporny

Pochodzenie tej odmiany i źródło wysokiej odporności na zarazę nie zostały przez hodowcę jak dotąd ujawnione. Naukowcy, pracując nad jej mapą genetyczną, udowodnili obecność trzech genów R z *S. demissum* i locus genów – *Rpi-Smira1* i *Rpi-Smira2* (Rietman 2012). Prawdopodobnie genów tych jest więcej, tak samo jak teorii na temat innych mechanizmów obronnych tej odmia-

ny, ale nie zostały one jeszcze do końca wyjaśnione. Efektywny QTL odporności na zarazę ziemniaka odmiany Sárpo Mira jest położony na chromosomie XI genomu ziemniaka, opracowano także markery molekularne pozwalające śledzić segregację tego locus w potomstwie (Śliwka i in., w przygotowaniu). Obecnie jest testowana przydatność tych markerów w masowych testach PCR.

W Zamartem skrzyżowano Sárpo Mira z formami Z-03.3817 i Z-03.3827 posiadającymi gen *Rpi-phu1*. Uzyskano 83 klony, które testowano markerami *phu6* i 45/XI. W laboratorium w Młochowie przeprowadzono fenotypowe testy listkowe polegające na zakażeniu odciętych listków z roślin badanych rodów dwoma izolatami *P. infestans*: MP324 i MP1353. Izolaty te zostały tak dobrane, by różnicowały odporność uzyskaną z obu źródeł, gdyż MP1353 przełamuje odporność odmiany Sárpo Mira, natomiast żaden z izolatów nie przełamuje odporności warunkowanej genem *Rpi-phu1*. W potomstwie obu kombinacji otrzymano łącznie 61 rodów ze zidentyfikowanym przynajmniej jednym markerem. W 10 rodach występują geny odporności z obu źródeł. Testy listkowe potwierdziły wysoką odporność tych rodów. Na podstawie obu testów wyróżniono 38 rodów o podwyższonej odporności na zarazę.

Następnym etapem pracy hodowlanej będzie sprawdzenie odporności rodów w warunkach polowych. Interesujące jest to, że krótki okres wegetacji otrzymanych rodów

połączony jest z odpornością. Średnia długość wegetacji rodów pochodzących z badanych kombinacji wynosi ok. 125 dni, to znaczy, że są to rody wczesne do średnio wczesnych.

Podsumowanie

Zastosowanie dwóch markerów molekularnych spowodowało powstanie swoistej piramidy genów i umożliwiło uzyskanie rodów hodowlanych o wysokiej odporności na zarazę ziemniaka. Potomstwo z kombinacji, w których źródłem odporności jest gen z *S. phureja*, cechuje się okresem wegetacji krótkim do średniego. Dzięki użyciu markerów w selekcji możliwe jest skrócenie cyklu hodowlanego, a w konsekwencji obniżenie sumarycznych kosztów hodowli. Istotnym elementem strategii opartej na markerach jest współpraca nauki z hodowlą. Posługiwanie się markerami nie jest tak trudne jak znalezienie odpowiedniego źródła genu, zmapowanie go, a następnie opracowanie markera. Schemat hodowli z wykorzystaniem markerów przedstawia tabela 2.

Tabela 2

Schemat selekcji hodowlanej odporności na zarazę ziemniaka z wykorzystaniem markerów molekularnych

Rok	Kategoria hodowlana	Liczba form	Rodzaj prowadzonych badań											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0	krzyżówka	15 komb.												
1	siewki	5000	X*											
2	ramsze	4500	X											
3	linie ramszowe	500	X	X	X									
4	nowe rody	70	X	X	X	X			X	X				
5	rody I	15	X	X			X	X			X			
6	rody II	10	X	X				X	X			X		
7	rody III	5	X	X				X	X			X		
8	d. rejestrowe	2	X	X				X		X			X	X
9	d. rejestrowe	1	X	X				X		X			X	X

1. ocena morfologii bulw – kształt, głębokość oczek, wyrównanie, *w siewkach tylko wielkość bulw; 2. ocena organoleptyczna: testy kulinarne; 3. testy molekularne; 4. testy listkowe; 5. badanie odporności polowej w gospodarstwie ekologicznym; 6. ocena odporności na raka ziemniaka; 7. ocena odporności na mątwika ziemniaczanego; 8. ocena w doświadczeniach stacyjnych; 9. ocena w doświadczeniach wstępnych; 10. badanie rodów w doświadczeniach rejestrowych; 11. badanie odporności na choroby wirusowe

Literatura

1. Black W., Mastenbroek C., Mills W. R., Peterson L. C. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes

controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. – Euphytica 2:173-178; 2. Black W., Gallegly M. E. 1957. Screening of *Solanum* species for resistance to physiologic races of *Phytophthora infestans*. – Am. Po-

- tato J. 34: 273-281; **3. Kapsa J. 2011.** Problem zwalczania zarazy na plantacjach ziemniaka w Polsce. – Ziemn. Pol. 3: 23-29; **4. Pawińska M. 2009.** Historia i kierunki ochrony plantacji ziemniaka przed głównymi agrofagami. – Prog. Plant Prot. 49 (4): 1637-1642; **5. Pietkiewicz J. 1976.** Charakterystyka odporności poziomej ziemniaka na zarazę *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Inst. Ziemn. Bonin; **6. Rietman H., Bijsterbosch G., Cano L. M., Lee H. R., Vossen J. H., Jacobsen E., Visser R. G., Kamoun S., Vleeshouwers V. G. 2012.** Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. – Mol. Plant Microbe Interact. 25: 910-919;
- 7. Śliwka J., Jakuczun H., Lebecka R., Marczewski W., Gebhardt C., Zimnoch-Guzowska E. 2006.** The novel major locus *Rpi-phu1* for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. – Theor. Appl. Gen. 113: 685-695; **8. Tan M. Y. A., Hutten R. C. B., Visser R. G. F., Eck H., van 2010.** The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes *Rpi-mcd1* and *Rpi-ber* in potato. – Theor. Appl. Genet. 121:117-125; **9. Tatarowska B. 2008.** Źródła odporności na zarazę ziemniaka i ich wykorzystanie w hodowli ziemniaka. – Ziemn. Pol. 3: 15-18; **10. The European Potato Cultivated Potato Database** (www.europotato.org)