

KARTULI MERIKLOONIDE RESISTENTSUS KVM-LE JA SELLE SÕLTUVUS OPEREERITAVA MERISTEEMI LOKALISATSIOONIST TAIMEL

M. Agur, V. Rosenberg

SUMMARY: *Resistance of potato meristemic clones to PVM and its dependence from the localisation of the operated meristem in the plant. The susceptibility/resistance to the potato virus M (PVM) and the intensity of PVM biosynthesis in the meristemic clones of the same cultivar as well as in the meristemic clones regenerated from the meristems operated from different parts of the same plant (apical and lateral buds of shoot, immature bud of flower) were studied. The named resistance characteristics to PVM in 27 meristemic clones of 4 potato cultivars (Premiere, Eba, Kondor, Vigri) was compared. The differences in the degree of susceptibility and intensity of virus biosynthesis in meristemic clones of the same cultivar, i.e. of genetically homogeneous material, were established. The most resistant meristemic clone-virus combinations for each cultivar studied were selected to get the prospective initial material for seed potato production. The highest relative resistance to PVM was found in meristemic clones Eba 1000, Kondor H, Premiere 356, and Vigri 918.*

The dependence of virus resistance of the potato meristemic clones on the location of operated meristem in the plant was established. 13 meristemic clones of four cultivars (Kondor, Eba, Premiere, Varane kollane) have been analysed. All varieties showed the highest degree of the intensity of virus biosynthesis and susceptibility to PVM in the meristemic clones obtained from an apical bud of shoot, and the lowest one in the clones from a lateral bud of shoot. As a source for an initial material for producing seed potato more resistant to PVM, the meristemic clones regenerated from meristems operated from lateral bud of shoot were recommended.

In both experiments the inoculated plants (1st year) and their second generation (2nd year) were analysed. In the 2nd year the degree of the intensity of virus biosynthesis and susceptibility to virus infection were higher than in the 1st year, however, the relative differences between the meristemic clones of the cultivar remained the same.

In our earlier experiments analogous differences in the characteristics of resistance of the potato meristemic clones infected with PVX were established. It means, the differences in susceptibility/resistance and virus biosynthesis intensity in the meristemic clones of the same variety and dependence the degree of these characteristics on the localisation of the operated meristem in the plant is typical at least to two potato viruses (PVM, PVX).

Eestis väljatöötatud seemnekartuli tervendamise süsteemi (Rosenberg, 1984; Rosenberg, Kotkas, 1989) funktsionaalseks ühikuks on merikloon, s.t. ühe meristeemi järglaskond, mis on saadud meristeemilõigust regenereeritud algtaime vegetatiivse paljundamisega mikrokloonimise abil. EPMÜ Taimebiotehnoloogia Uurimiskeskuse EVIKA teadlased on kindlaks teinud, et ühe ja sama sordi merikloonid erinevad oma majanduslikelt omadustelt (saagikus, tärglisesaldus, resistentsus kartuli-lehemädanikule), mis võimaldab allutada nad valikule ja parandada sellega sordi omadusi (Rosenberg, 1994, 1997; Rosenberg, Talvoja, 1995). EPMÜ Eksperimentaalbioloogia Instituudi (EBI) taimeviroloogia osakonnas on uuritud kartuli merikloonide viirusresistentsust. On tehtud kindlaks, et ühe ja sama sordi merikloonide resistentsusnäitajad kartuliviirusele X (KVM) erinevad (Agur, 1994; Agur, 2000), seejuures on näidatud, et selle erinevuse üheks põhjuseks on opereeritava meristeemi lokalisatsioon taimel. Nimetatud erinevused olid püsivad, avaldades nii inokuleeritud taimedel kui nende muguljärglastel (Agur, Rosenberg, 1998).

Käesolevas artiklis tuuakse kartuli merikloonide viirusresistentsusanalüüsi andmed kartuliviiruse M (KVM) suhtes, kusjuures analüüsile allutati nii ühe ja sama sordi merikloonid kui ka sama sordi samalt taimelt erineva lokalisatsiooniga meristeemidest regenereeritud merikloonid. Artiklisse on koondatud meie sellasuunalised uuringud, nii varasemad (Agur,

Rosenberg, 1999) kui neid täiendavad. Töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas eelnimetatud erinevused sama sordi merikloonide resistentsuses avalduvad ainult ühe kartuliviiruse nakkuse puhul või on see nähtus üldisema iseloomuga.

Materjal ja meetodika

Uurimisobjektiks olid samalt kartulisordilt regeneereeritud merikloonide viirusresistent- suse võrdluskatsetes neli sorti ja nende 27 meriklooni ('Eba' – 4, 'Premiere' – 7, 'Kondor' – 6, 'Vigri' – 10) ning sama kartulitaimede erineva lokalisatsiooniga (võrsetipp, lehekaenal, õie- alge) meristeemist regeneereeritud merikloonide võrdluskatsetes neli sorti ja nende 11 meri- klooni ('Ando' – 2, 'Eba' – 4, 'Kondor' – 2, 'Varane kollane' – 3). Materjal saadi katseklaa- sitaimedena EVIKA-st. Taimede mikrokloonimine, potistamine, nakatamine ja analüüs viidi läbi EBI taimeviroloogia osakonnas. Potistatud taimed kasvatati kasvahoone tingimustes ja nakatati (à 12 taimet) 7–8 lehe staadiumis mahlinokulatsiooni meetodil kartuliviirusega M (tüvi KVM_{Eba}, isoleeritud kartulisordist 'Eba'). Merikloonidel määrati viirusvastuvõtlikkuse aste (VVA), väljendatud vastuvõtlike taimede %-na, ja viiruse biosünteesi intensiivsus (VBSI) väljendatud viirusantigeeni kontsentratsioonina (KVM-AG), mis määrati ELISA-testi abil (Clark, Adams, 1978). Analüüsile allutati inokuleeritud taimed 3 nädalat ja 2 kuud pärast inokulatsiooni (1. katseaasta) ja nende muguljärglased õiepungade faasis (2. katseaasta).

Katsetulemused

Uuritud sortide 27 meriklooni KVM resistentsusnäitajate, viirusvastuvõtlikkuse astme (VVA) ja viiruse biosünteesi intensiivsuse (VBSI) taseme võrdlustulemused on toodud tabe- lis 1. VVA analüüsi andmetest selgus, et kõik katses olnud neli sorti olid KVM-le vastuvõtli- kud, kusjuures sortide 'Kondor' ja 'Premiere' kõigi merikloonide VVA oli 100%, sordi 'Eba' merikloonidel 58,3...66,6%, sordi 'Vigri' merikloonidel 16,6...80%. VBSI analüüsi tulemus- test selgus, et viiruse antigeeni kontsentratsioon erines sorditi ja sama sordi meriklooniti. Uuritud sortidest oli VBSI tase kõrgem sortides 'Kondor' ja 'Premiere' ning madalam sortides 'Eba' ja 'Vigri'. Sama sordi merikloonide VBSI võrdlusest selgus, et kõige kõrgem oli KVM-AG tase merikloonidel 'Eba' 996, 'Kondor' H 1065, 'Premiere' 804 ja 'Vigri' 923/1272 ning kõige madalam merikloonidel 'Eba' 1000, 'Kondor' H, 'Premiere' 356 ja 'Vigri' 918. Kõige suuremaid erinevusi sama sordi merikloonide VBSI tasemete vahel (max/min) märgiti sordil 'Vigri' (inokuleeritud taimedes 5,20 korda ja nende muguljärglastes 3,13 korda), seejärel sordil 'Kondor' (4,13 ja 1,68 korda), väiksemaks jäid need erinevused sortidel 'Eba' (2,33 ja 1,36 korda) ja 'Premiere' (2,47 ja 1,34 korda). VBSI erinevused meriklooniti olid seotud infektsiooni dünaamikaga taimes. Suuremad olid erinevused infektsiooni algperioodil (3 nädalat pärast inokulatsiooni) ja väiksemad teisel katseaastal, inokuleeritud taimede muguljärglastes. Kahe katseaasta andmete võrdlus näitas, et kõikide sortide puhul viiruse VBSI tase oli madalam 1. katseaastal inokuleeritud taimedes ja tõusis 2. katseaastal nende muguljärglastes, kusjuures sama sordi merikloonide vahelised erinevused jäid püsima samasuunalistena. Samu seaduspärasusi on varem märgitud KVX puhul (Agur, 1994; Agur, 2000).

Seega võib väita, et sama sordi merikloonide resistentsusnäitajate erinevus ei ole omane ainult ühele viirusele, vaid iseloomustab vähemalt kahte kartuliviirust, KVX ja KVM. Sama sordi merikloonide resistentsusnäitajate erinevus võimaldab merikloonide hulgast välja valida kartuli sordiaretusele ja seemnekasvatusele perspektiivseid viirus-merikloon kombinatsioone. Eriti hinnaliseks tuleb lugeda merikloone, mis on mittevastuvõtlikud rohkem kui ühele viiru- sele või milles rohkem kui ühe viiruse biosünteesi intensiivsus on madal. Katses olnud nelja sordi puhul selliseid merikloone sedastada ei õnnestunud. KVX ja KVM biosüntees kulges neis erinevalt, saavutades maksimaalse ja minimaalse taseme sama sordi erinevates merikloo- nides, kusjuures KVM nakkuse puhul olid VBSI tasemete erinevused meriklooniti tunduvalt suuremad kui KVX nakkuse puhul (Agur, Rosenberg, 1999).

Sama sordi merikloonide viirusresistent- suse/vastuvõtlikkuse erinevuste põhjusi ja mehhanisme ei tunta. Püstitasime hüpoteesi, et need erinevused võivad olla tingitud meri- klooni päritolust, selle regeneerimiseks kasutatud meristeemi lokalisatsioonist taimel. See hüpotees leidis KVX puhul ka kinnitust (Agur, Rosenberg, 1998).

Tabel 1. KVM biosünteesi intensiivsuse võrdlus kartuli merikloonides
Table 1. Comparison of PVM biosynthesis intensity in the potato meristemic clones

Merikloonid <i>Meristemic clones</i>	3 nädalat pärast inokulatsiooni <i>3 weeks after inoculation</i>	Max/min	2 kuud pärast inokulatsiooni <i>2 months after inoculation</i>	Max/min	Inokuleeritud taimede muguljärglased <i>In the plants of second generation</i>	Max/min
'Eba'						
996	0,145		0,303		0,721	
999	0,120		0,188		0,698	
1000	0,062		0,167		0,530	
3/3373	0,087	2,33	0,257	1,81	0,687	1,36
'Kondor'						
H	0,120		0,197		0,444	
H 622	0,490		0,476		0,702	
H 1065	0,496		0,570		0,750	
H 1067	0,182		0,234		0,698	
H 1068	0,135		0,220		0,623	
H 1071	0,263	4,13	0,264	2,89	0,625	1,68
'Premiere'						
353	0,179		0,221		0,760	
356	0,151		0,161		0,661	
796	0,185		0,193		0,785	
802	0,319		0,308		0,869	
804	0,373		0,387		0,889	
914	0,171		0,181		0,769	
915	0,304	2,47	0,321	2,40	0,872	1,34
'Vigri'						
1J/242	0,112		0,161		0,631	
1J/260	0,147		0,149		0,272	
1a/268	0,132		0,138		0,337	
284	0,128		0,131		0,378	
289	0,226		0,265		0,561	
918	0,104		0,106		0,241	
920/1219	0,122		0,187		0,483	
920/1221	0,221		0,223		0,756	
920/1225	0,349		0,359		0,697	
923/1272	0,531	5,10	0,552	5,20	0,720	3,13

ELISA-testi andmed (A_{490}), viirusantigeeni suhteline kontsentratsioon
Data of ELISA-test (A_{490}), the relative concentration of virus antigen

Opereeritava meristeemi lokaliseerimise mõju väljaselgitamiseks KVM-resistentsusnäitajatele (VVA, VBSI) viidi läbi neljal sordil sama taime võrsetipu, lehekaenla ja õiealge meristeemist saadud merikloonide võrdlev analüüs. Katsete tulemused on toodud tabelis 2. Selgus, et mõlemad uuritud näitajad erinesid sorditi ja meriklooniti, olenedes meriklooni saamiseks kasutatud meristeemi lokaliseerimise taimel. Kõik neli sorti olid KVM-le vastuvõtlikud. VVA tase oli kõige kõrgem sordil 'Ando' ja madalaim sordil 'Kondor'. Kõikide sortide puhul leiti, et VVA tase oli kõrgem merikloonides, mis olid regenereeritud võrsetipust, ja madalam merikloonides, mis olid regenereeritud lehekaenlast. Katses olnud merikloonide viiruse biosünteesi intensiivsuse (VBSI) võrdlus näitas, et selle tase oli kõrgem võrsetipu ja madalam lehekaenla meristeemist regenereeritud merikloonides, s.t. näidates samasuunalist sõltuvust meristeemi lokaliseerimisest kui VVA-gi. Õiealgest regenereeritud merikloonidel jäid uuritud resistentsusnäitajad vahepealsele tasemele. Kõige suuremad olid võrsetipust ja lehekaenlast regenereeritud merikloonide VBSI erinevused sordi 'Eba' puhul (inokuleeritud taimedel 2,79- ja nende muguljärglastel 2,26-kordne), kõige väiksemad olid need erinevused sordi 'Kondor' merikloonidel (vastavalt 1,14 ja 1,08). Mõlema uuritud resistentsusnäitaja

erinevused meriklooniti jäid püsivaks sama sordi kahe põlvkonna taimedes, s.t. nii inokuleeritud taimedes kui nende muguljärglastes.

Viiruse akumulatsioonitase taimes on näitaja, millega iseloomustatakse kvantitatiivselt suhtelise viirusresistentsuse astet (Hunger, Sherwood, 1985; Kürzinger, Neitzel, 1985; Kuhn *et al.*, 1986). Seega võib väita, et lehekaenlast regeneeritud merikloonid 'Kondor' 1065/263 ja 1065/275, 'Eba' 3373/329 ja 996/427, 'Ando' 189 ja 'Varane kollane' 4/117/137 on KVM suhtes suurema viirusresistentsusega kui ülejäänud sama taime katses olnud merikloonid. Samad merikloonid olid kõrgresistentsed ka K VX-le (Agur, Rosenberg, 1998, 1999). Nimetatud merikloone tuleb lugeda sordiaretuse ja seemnekasvatuse seisukohalt perspektiivseteks.

Meie katsete tulemusel on selgunud, et sama sordi merikloonide resistentsusnäitajad erinevad ka kartuliviiruse, KVM ja K VX nakkuse puhul ja selle erinevuse tingib meriklooni regenereerimiseks kasutatud meristeemi lokalisatsioon taimel. Nimetatud erinevused olid suuremad KVM ja väiksemad K VX nakkuse korral. Seega võib mõlemat kirjeldatud fenomeni lugeda mitte juhuslikuks, vaid üldisema iseloomuga nähtuseks.

Tabel 2. Vastuvõtlikkusastme ja viiruse biosünteesi intensiivsus KVM-ga nakatatud merikloonides, regeneeritud erineva lokalisatsiooniga meristeemidest (1. katseaasta – inokuleeritud taimed, 2. katseaasta – inokuleeritud taimede muguljärglased)

Table 2. Comparison of degree of susceptibility and virus biosynthesis intensity of meristemic clones infected with PVM regenerated from meristems with different location (1st year – inoculated plants, 2nd year – tuber reproduction of inoculated plants)

Merikloon <i>Meristemic clones</i>	Meristeemi lokalisatsioon <i>Localisation of the meristem</i>	VVA%	VBSI	Max/min	VVA%	VBSI	Max/min
		<i>Degree of susceptibility%</i>	<i>Intensity of virus biosynthesis</i>		<i>Degree of susceptibility%</i>	<i>Intensity of virus biosynthesis</i>	
		1. aasta <i>1st year</i>	1. aasta <i>1st year</i>		2. aasta <i>2nd year</i>	2. aasta <i>2nd year</i>	
'Kondor' 1065/268 1065/263	võrsetipp / AB	33,3	0,499	1,14	35,0	0,114	1,08
	lehekaenal / LB	31,6	0,436		35,0	0,108	
'Eba' 3373/335 3373/329 996/435 996/427	võrsetipp / AB	50,0	0,456	2,79	66,6	0,203	1,44
	lehekaenal / LB	41,6	0,322		58,3	0,141	
	õisiku alge / IB	25,0	0,206		33,3	0,172	
	lehekaenal / LB	18,3	0,163		16,6	0,076	
'Ando' 191 189	võrsetipp / AB	83,3	0,509	1,65	85,0	0,120	1,51
	lehekaenal / LB	68,3	0,308		66,6	0,079	
'V. kollane' 4/117 144 4/117 139 4/117 137	võrsetipp / AB	58,0	0,280	1,49	75,0	0,172	2,38
	õisiku alge / IB	16,6	0,214		18,3	0,090	
	lehekaenal / LB	50,0	0,187		18,0	0,072	

*ELISA-testi andmed (A_{490}) / *Data of ELISA-test (A_{490})*

AB – *apical bud of shoot*

LB – *lateral bud of shoot*

IB – *immature bud of flower*

Läbiviidud uurimuste tulemused lubavad väita, et merikloonide viirusresistentsuse taset on võimalik suunata. Seemnekartuli algmaterjali tervendamisel apikaal-meristeemmeetodil ning KVM- ja K VX-resistentse materjali valikul on soovitatav toota merikloone kartulitaime lehekaenla meristeemi baasil. Perspektiivis nähakse ette läbi viia merikloonide viirusresistentsuse ja majanduslike omaduste võrdlev analüüs ning merikloonide valik mõlema näitaja alusel.

Taime viirusresistentsuse/vastuvõtlikkuse määrab genotüüp (Kegler, Kleinhempel, 1987). Viiruse biosünteesi intensiivsust määravad tegurid on siiani problemaatilised. Meie uuringute tulemustest selgus, et kahe kartuliviiruse, nii K VX kui ka KVM biosünteesi intensiivsus erineb mitte ainult sorditi, vaid ka sama sordi meriklooniti, s.t. geneetiliselt homogeenses materjalis. See lubab järeldada, et genotüüp ei ole ainus faktor, mis määrab VBSI taseme

taimes. Pigem on VBSI kujunemisel olulise tähtsusega taime metabolismi aktiivsus. Vastuse leidmine sellele probleemile on tuleviku ülesanne.

Käesoleva uuringu tulemustest järeldub:

1. Sama kartulisordi merikloonide viirusresistentsnäitajad – vastuvõtlikkuse aste (VVA) ja viiruse biosünteesi intensiivsus (VBSI) – KVM-le erinevad. Merikloonid 'Eba' 1000, 'Kondor' H, 'Premiere' 356 ja 'Vigri' 918 olid KVM-le suhteliselt suure resistentsusega.

2. Sama kartulisordi sama taime erineva lokaliseerimisega meristeemidest regenereeritud merikloonide viirusresistentsnäitajad (VVA, VBSI) erinevad. Lehekaenlast opereeritud meristeemist regenereeritud merikloonid 'Ando' 189, 'Eba' 3373/329 ja 996/427, 'Kondor' 1065/263, 'V. kollane' 4/117-137 olid suhteliselt suurema resistentsusega KVM-le kui võrsetipust ja õiealgest regenereeritud merikloonid.

3. Viirusresistentsnäitajate erinevus sama sordi merikloonidel ja selle sõltuvus opereeritava meristeemi lokaliseerimisest taimel on iseloomulik vähemalt kahe kartuliviiruse (KVM, KVV) nakkusele.

4. Merikloonide viirusresistentsnäitajate erinevus võimaldab suunata seemnekartuli meristeemtervendust ning selekteerida kartuli seemnekasvatusele ja sordiareetusele perspektiivseid viirus-merikloon kombinatsioone.

Kirjandus

- Agur, M. A comparative study on the susceptibility/resistance of the meristemic clones of potato cultivars (Premiere, Eba, Kondor) to potato virus X. – *Plant Science*, Sofia, XXXI, 7–10: 184...187, 1994.
- Agur, M., Rosenberg, V. Kartuli merikloonide KVV-resistentsuse sõltuvus opereeritava meristeemi lokaliseerimisest taimel. – *Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi toimetised* 6, lk. 5...6, 1998.
- Agur, M., Rosenberg, V. Viiruste (KVV, KVM) biosüntees kartuli merikloonides. – *Taimekoekultuurid*. Harku, lk. 194...204, 1999.
- Agur: Агур М. О. Интенсивность размножения X-вируса картофеля в мериклонах различных сортов картофеля. – *С/х биология*, Москва, № 1, с. 92...97, 2000.
- Clark, M. F., Adams, A. N. Characteristik of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. – *J. Gen. Virol.*, vol. 34, p. 475...483, 1978.
- Hunger, R. M., Sherwood, J. L. Use of symptomatology and virus for concentrating for evaluating resistance to wheat soilborn mosaic virus. – *Plant Disease Reporter*, 69, 10, p. 848...850, 1985.
- Kegler, H., Kleinhempel, H. Virusresistenz der Pflanzen. – *Akademie-Verlag Berlin*, 1987. – 187 S.
- Kuhn, C. M., Benner, C. P., Hobbs, H. A. Resistance responses in cowpea to southern bean mosaic virus based on virus concentration and symptomatology. – *Phytopathology*, 76, 8, p. 795...799, 1986.
- Kürzinger, B., Neitzel, K. Untersuchungen zur Konzentration der Kartoffel-X-Virus (PVX) in primärinfizierten Kartoffelpflanzen mit ELISA als Basis zur Ermittlung der relativen Virusresistenz. – *Arch. Züchtungsforsch.* 15, 6, S. 389...393, 1985.
- Rosenberg: Розенберг В. Р. Технология оздоровления и размножения семенного картофеля, разработанная в Эстонском НИИ Земледелия и Мелиорации. Защита растений. Научные труды ЭстНИИЗиМ, Таллин, Валгус, с. 53...89, 1984.
- Rosenberg, V. Results, showing possibilities of meristem method for improving some characteristics of potato varieties. – *8th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Firenze, F. & F. Parretti Grafiche, p. 205, 1994.
- Rosenberg, V. Research on yield capacity of meristem clones. – *EAPR Joint Agronomy-utilization Conference*, Halmstad, Sweden, p. 34...35, 1997.
- Rosenberg, V., Kotkas, K. The technique of disease eradication and rapid propagation of seed potato. – *The New Tehnologies of Potatoes Production*. Poprad - Svit, p. 159...165, 1989.
- Rosenberg, V., Talvoja, P. Differences between potato meristem clones. – *Conference of the European Association for Potato Research*. Vila Real, Portugal, p. 54...55, 1995.