

Badanie zróżnicowania interakcji ziemniak-*Phytophthora infestans* podczas reakcji odpornościowej bulw genotypów ziemniaka posiadających wybrane geny R

Nr Zadania: 30; Nr zadanie w IHAR-PIB: 3-1-00-3-06

Okres realizacji projektu: 2021 - 2026

Kierownik Zadania: dr Jarosław Plich (j.plich@ihar.edu.pl)

Zespół wykonawców w 2021 roku:

- Dr hab. Bogdan Flis
- Mirosława Łukasiewicz
- Irena Bazylak
- Danuta Skrzydlewska

Cele projektu na 2021 rok

1. Dobór materiału badawczego, tj. grupy odmian/klonów ziemniaka o pożądanym zestawie genów R oraz grupy izolatów *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji.
 - Cel zrealizowano
2. Dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z liści ziemniaka, metodyki badania poziomu ekspresji genów oraz wybór genu referencyjnego do tych badań.
 - Cel zrealizowano
3. Dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z bulw ziemniaka.
 - Cel zrealizowano

Materiał i metody

- Ad 1. **a)** Materiał badawczy: 300 klonów ziemniaka pochodzących z krzyżowania donorów genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*; 20 klonów / odmian różnicujących; 10 izolatów *P. infestans* o różnym profilu wirulencji
- b)** Metody: laboratoryjny test na odciętych listkach (tzw. test listkowy)
- Ad 2. **a)** Materiał badawczy: listki 3 odmian/klonów będących donoramii genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* inokulowane wybranymi izolatami *P. infestans*
- b)** Metody: izolacja RNA (5 różnych metod); transkrypcja RNA na cDNA; wstępne badanie poziomu ekspresji genów referencyjnych i genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* za pomocą qPCR
- Ad 2. **a)** Materiał badawczy: plastry bulw 3 odmian/klonów będących donoramii genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* inokulowane wybranymi izolatami *P. infestans*
- b)** Metody: izolacja RNA (5 różnych metod); transkrypcja RNA na cDNA; wstępne badanie poziomu ekspresji genów referencyjnych i genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* za pomocą qPCR

Wyniki i wnioski

1. Dobór materiału badawczego, tj. grupy odmian/klonów ziemniaka o pożądanym zestawie genów R oraz grupy izolatów *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji.
 - a) Na podstawie wyników badań fenotypowych i testów molekularnych 300 klonów ziemniaka zostały podzielone na 4 grupy:
 - ✓ klony posiadające oba geny: *Rpi-phu1* + *R2/R2-like* (76 szt.)
 - ✓ klony posiadające tylko gen *Rpi-phu1* (74 szt.)
 - ✓ klony posiadające tylko gen *R2/R2-like* (88 szt.)
 - ✓ klony nieposiadające żadnego z badanych genów R (62 szt.)
 - b) Na podstawie analizy wyników fenotypowych testów z użyciem zestawu 11 testerów Black'a oraz 9 różnicujących odmian/klonów ziemniaka spośród 10 badanych izolatów wybrano:
 - ✓ Izolat 213/20 – wirulentny w stosunku do genu *R2/R2-like*; awirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1*
 - ✓ Izolat MP 324x – awirulentny w stosunku do genu *R2/R2-like*; wirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1*

Wyniki i wnioski

2. Dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z liści ziemniaka, metodyki badania poziomu ekspresji genów oraz wybór genu referencyjnego do tych badań.
 - a) Przetestowano 5 różnych metod izolacji RNA z liści ziemniaka. Wszystkie metody dały satysfakcjonujący wynik, tzn. uzyskano wystarczającą ilość RNA (koncentracja w zakresie 0,6 – 1,3 ng/ μ l) o dobrej jakości.
 - b) Przebadano przydatność 5 potencjalnych genów referencyjnych. Spośród nich dwa geny (57-alfa-tubulin i Ef1a) dały satysfakcjonujące i powtarzalne rezultaty i mogą zostać wykorzystane w dalszych badaniach.
 - c) Rozpoczęto prace nad metodyką badania względnej ekspresji genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*. Uzyskane wstępne wyniki potwierdzają przydatność wybranej metodyki do szerszego zastosowania w dalszych etapach realizacji Zadania.

Wyniki i wnioski

3. Dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z bulw ziemniaka.

- a) Przetestowano 5 różnych metod izolacji RNA z tkanki bulw ziemniaka. Ze względu na specyfikę materiału użytego do izolacji RNA najlepsze rezultaty dała metoda wg Chomczyńskiego i Sacchi. Uzyskano RNA o średniej koncentracji 0,96 ng/μl i współczynniku A260/A280 równym 1,98. Metoda ta może zostać wykorzystana w dalszych etapach realizacji Zadania.
- b) Rozpoczęto pracę nad przydatnością 5 potencjalnych genów referencyjnych. Wstępne wyniki wskazują na możliwość wykorzystania tych samych genów (57-alfa-tubulin i Ef1a) co w badaniach ekspresji w liściach.
- c) Wstępnie potwierdzono przydatność wybranej metodyki do szerszego zastosowania w dalszych etapach nad badaniem ekspresji genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* w bulwach ziemniaka.

Mierniki na 2021 rok

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
Temat badawczy 1				
1.1	Liczba siewek ziemniaka wytworzonych i prowadzonych w ramach tematu.	300	300	100%
1.2	Liczba genotypów ziemniaka przetestowanych pod względem obecności wybranych genów R.	320	320	100%
1.3	Liczba badanych izolatów <i>P. infestans</i>	10	10	100%
Temat badawczy 2				
2.1	Liczba odmian/klonów ziemniaka wykorzystana w badaniu	3	3	100%
2.2	Liczba metod izolacji RNA z liści ziemniaka weryfikowanych pod względem efektywności	5	5	100%
2.3	Liczba testowanych genów referencyjnych	5	5	100%
Temat badawczy 3				
3.1	Liczba odmian/klonów ziemniaka wykorzystana w badaniu	3	3	100%
3.2	Liczba metod izolacji RNA z bulw ziemniaka weryfikowanych pod względem efektywności	5	5	100%
3.3	Liczba testowanych genów referencyjnych	5	5	100%