***Nr zadania:***

***30***

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**

**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2021 roku**

**A. INFORMACJE OGÓLNE**

|  |
| --- |
| Tytuł zadania: **Badanie zróżnicowania interakcji ziemniak-*Phytophthora infestans* podczas reakcji odpornościowej bulw genotypów ziemniaka posiadających wybrane geny R.** |
| Numer zadania*:* 30 *(w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170. z późn. zmianami)* |
| Numer zadania w planach IHAR-PIB: **3-1-00-3-06** |
| Planowany okres realizacji zadania: **2021 r.** |
| Planowane nakłady w zł: **191 200** |
|

**B. DANE WNIOSKODAWCY**

|  |
| --- |
| Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)  **Dr inż. Michał Rokicki**  **Dyrektor IHAR-PIB**  **Radzików**  **05-870 Błonie**  **Tel.: 22/ 733 45 02**  **Fax: 22/ 733 45 05** |

**C. INFORMACJA O WYKONAWCACH**

1. Zespół badawczy

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| kierownik zadania | | |
| imię i nazwisko | stopień i tytuł naukowy | miejsce zatrudnienia |
| Jarosław Plich | dr | IHAR-PIB Oddział Młochów |
| wykonawcy zadania | | |
| imię i nazwisko | stopień i tytuł naukowy | miejsce zatrudnienia |
| Bogdan Flis | dr hab. | IHAR-PIB Oddział Młochów |
| Mirosława Łukasiewicz |  | IHAR-PIB Oddział Młochów |
| Irena Bazylak |  | IHAR-PIB Oddział Młochów |
| Danuta Skrzydlewska |  | IHAR-PIB Oddział Młochów |

2. Kierownik zadania

Jarosław Plich, dr

IHAR-PIB Oddział Młochów

ul Platanowa 19, 05-831 Młochów

tel. (22) 729 92 48 [mlochow@ihar.edu.pl](mailto:mlochow@ihar.edu.pl)

Bezpośredni kontakt do Kierownika:

[j.plich@ihar.edu.pl](mailto:j.plich@ihar.edu.pl)

tel. (22) 729 92 48 wew. 222

Kontakt w razie nieobecności Kierownika:

dr hab. Bogdan Flis, b.flis@ihar.edu.pl; (22) 729 92 48 wew. 222

**D. OPIS ZADANIA**

* + 1. Cele zadania

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Lp. | Cel | Czy cel został zrealizowany (tak/nie[[1]](#footnote-1)/częściowo1) |
| 1 | Dobór materiału badawczego, tj. grupy odmian/klonów ziemniaka o pożądanym zestawie genów R oraz grupy izolatów *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji. | TAK |
| 2 | Dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z liści ziemniaka, metodyki badania poziomu ekspresji genów oraz wybór genu referencyjnego do tych badań. | TAK |
| 3 | Dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z bulw ziemniaka. | TAK |

**2. Harmonogram realizacji zadania**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | Nazwa tematu badawczego | Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania | Przewidywane koszty realizacji tematu  badawczego |
| 1 | Ocena poziomu odporności roślin i bulw wybranych odmian/klonów ziemniaka na *P. infestans*. | 1-12 | 61 200 |
| 2 | Ocena poziomu ekspresji wybranych genów R w naci i bulwach roślin ziemniaka. | 1-12 | 65 000 |
| 3 | Analiza różnicowa ekspresji genów w bulwach wybranych form ziemniaka | 6-12 | 65 000 |
| Razem | | | 191 200 |

**3. Opis tematów badawczych**

**3. 1. Temat badawczy 1. Ocena poziomu odporności roślin i bulw wybranych odmian/klonów ziemniaka na *P. infestans*.**

**Cel tematu badawczego 1.** Głównym celem tematu w roku 2021 był dobór materiału badawczego do dalszych badań, tj. grupy odmian/klonów ziemniaka o pożądanym zestawie genów R oraz grupy izolatów *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji.

Zaplanowany cel został w całości osiągnięty.

**Materiały i metody**

Materiał badawczy stanowiła grupa 300 klonów (siewek) ziemniaka pochodzących z dwóch kombinacji krzyżówkowych donorów genu *R2/R2-like* (odmiany Bzura) oraz genu *Rpi-phu1* (odmiany Gardena i klonu TG 97-411). Wśród 300 badanych klonów 120 pochodziło z kombinacji krzyżówkowej Bzura × Gardena, a 180 z krzyżowania Bzura × TG 97-411.

Ponadto, w badaniach wykorzystano również grupę 11 testerów Black’a oraz 9 wzorcowych rodów hodowlanych i odmian ziemniaka, posiadających wybrane geny R lub ich kombinacje, które służyły do ustalenia profilu wirulencji izolatów *P. infestans*.

W badaniach wykorzystano 10 wytypowanych wcześniej izolatów *P infestans*: MP 324x, MP 1480, MP 1820, MP 1491, 213/20, 47/20, 55/20, 63/20, 136/20, 203/20. Na podstawie testów odporności klonów/odmian różnicujących (11 testerów Black’a oraz 9 wybranych odmian / klonów ziemniaka) spośród 10 badanych izolatów wybrano dwa, które wykorzystano do szerszych testów screeningowych 300 siewek ziemniaka. Izolaty te będą wykorzystywane także w kolejnych latach realizacji projektu.

W celu fenotypowej oceny odporności, a także dla ustalenia profilu wirulencji wykorzystywanych izolatów *P. infestans*, przeprowadzono laboratoryjne testy listkowe. Testy te przeprowadzono wg metodyki standardowo stosowanej w IHAR-PIB O/Młochów i opisanej między innymi przez Sobkowiaka i Śliwkę (2017), Brylińską i Śliwkę, Plicha i innych (2016). Do testów listkowych zostały wykorzystane dwa wybrane izolaty *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji (kompatybilne i niekompatybilne do badanych genów R). Stopień odporności każdego klonu (siewki) został określony na 3 listkach, a ocena stopnia nasilenia objawów chorobowych została przeprowadzona po 6 dniach inkubacji, uwzględniając powierzchnię zarodnikującej plamy i intensywność zarodnikowania. Ocenę porażenia dokonano w skali 9-stopniowej (9 - brak objawów porażenia; 1 - powierzchnia listka całkowicie porażona, intensywne zarodnikowanie *P. infestans*).

Wszystkie badane klony/odmiany zostały przebadane pod względem obecności genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* za pomocą markerów DNA sprzężonych z tymi genami. Ze świeżo pobranych i zamrożonych w ciekłym azocie liści wyizolowano DNA. Izolację przeprowadzono za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów, wg instrukcji dostarczonej przez producenta. Następnie przeprowadzono screening, mający na celu potwierdzenie obecności markerów DNA sprzężonych z genami *Rpi-phu1* (markery phu6 i phu1\_2069)i *R2/R2-like* (markery B10L i blb3\_305). Obecność tych markerów potwierdzono po przeprowadzeniu reakcji PCR, wg metodyki opisanej przez Stefańczyka i współautorów (2020) oraz Plicha i współautorów (2015, 2016). Produkty amplifikacji rozdzielono elektroforetycznie na żelu agarozowym, a obecność produktu o określonej wielkości potwierdzała obecność badanego markera DNA. Na podstawie wyników testów molekularnych i fenotypowych badane klony ziemniaka podzielono na 4 grupy, wg obecności genów: 1) *Rpi-phu1 + R2-like*, 2) *Rpi-phu1*,3) *R2/R2-like*, 4) brak genów R.

**Wyniki**

Na podstawie analizy profilu wirulencji badanych 10 izolatów *P. infestans* do dalszych badań wybrano dwa izolaty: 213/20 (wirulentny w stosunku do następujących genów: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R10, R11) oraz izolat MP 324x (wirulentny w stosunku do genów: R1, R3, R4, R5, R6, R7, R10, R11 i Rpi-phu1). Biorąc pod uwagę wyłącznie dwa badane przez nas geny *R2* i *Rpi-phu1* możemy powiedzieć, że izolat 213/20 był wirulentny w stosunku do genu *R2/R2-like* i jednocześnie awirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1*. Natomiast izolat MP 324x odwrotnie – był awirulentny w stosunku do genu *R2/R2-like*, natomiast wirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1*. Wytypowane izolaty zostały wykorzystane do dalszych badań w tym temacie.

Materiał badawczy (300 klonów ziemniaka) został oceniony pod względem odporności na *P. infestans* w teście listkowym przy użyciu dwóch wymienionych wyżej izolatów tego patogena. Przeprowadzone testy w zdecydowanej większości wyraźnie różnicowały badane klony ziemniaka na formy bardzo odporne (oceny w zakresie 7 – 9) i formy podatne (oceny <4), jednakże zdarzały się formy o niejasnym fenotypie. Na podstawie analizy wyników testów listkowych podzielono 300 badanych klonów (siewek) ziemniaka na 4 grupy zgodnie z posiadanymi genami odporności. Do pierwszej grupy klonów, które były odporne na oba izolaty, czyli posiadających zarówno gen *Rpi-phu1* jak i gen *R2/R2-like* zaliczono 74 osobniki. Do drugiej grupy klonów, które były odporne na izolat 213/20, lecz podatnych na MP 324x, czyli posiadających gen *Rpi-phu1* zaliczono 64 osobniki. Do grupy klonów podatnych na izolat 213/20, ale odpornych na MP 324x, czyli posiadających gen *R2/R2-like* zaliczono 76 osobników. Kolejna grupa 59 osobników była podatna na oba izolaty i nie posiadała żadnego z badanych genów R. Na podstawie przeprowadzonych testów 27 klonów nie udało się zakwalifikować do żadnej z ww. grup, ze względu na niejednoznaczny wynik dla co najmniej jednego izolatu *P. infestans*.

W badanym materiale przeprowadzono również screening obecności markerów DNA sprzężonych z genami *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*, w celu potwierdzenia ich obecności/braku w badanych klonach ziemniaka. Testy molekularne w pełni potwierdziły przynależność poszczególnych klonów do ww. grup ustalonych w oparciu o fenotyp. Ponadto pozwoliły na identyfikację obecności poszczególnych genów R w klonach, dla których uzyskano niejednoznaczne wyniki oceny fenotypowej. Spośród tych 27 klonów: 2 posiadały oba geny odporności, 10 klonów posiadało gen *Rpi-phu1*, 12 klonów posiadało gen *R2/R2-like* oraz 3 klony nie posiadały żadnego z badanych genów.

Ostatecznie, na podstawie wyników badań fenotypowych i testów molekularnych badane klony zostały podzielone na 4 grupy:

* grupa I – klony posiadające oba geny: *Rpi-phu1 + R2-like* (76 klonów)
* grupa II – klony posiadające tylko gen *Rpi-phu1* (74 klony)
* grupa III – klony posiadające tylko gen *R2/R2-like* (88 klonów)
* grupa IV – klony nieposiadające żadnego z badanych genów R (62 klony).

Do dalszych badań wstępnie wytypowano po 10 klonów z każdej grupy.

**Dyskusja**

Na podstawie przeprowadzonych badań fenotypowych i genotypowych udało się osiągnąć zakładane na 2021 rok cele.

Wytypowano dwa izolaty *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji: izolat 213/20 oraz MP 324x. Wytypowano także grupę 40 klonów, po 10 z każdej grupy różniącej się obecnością/brakiem genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*. Klony te, wraz ze swoimi formami rodzicielskimi będą stanowiły roślinny materiał badawczy w dalszych latach realizacji zadania. Wykorzystanie wytypowanych izolatów *P. infestans* (z których jeden jest wirulentny w stosunku do genu *R2* i jednocześnie awirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1* natomiast drugi odwrotnie – jest awirulentny w stosunku do genu *R2* i jednocześnie wirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1*) oraz grupy klonów ziemniaka należących do czterech ww. grup umożliwi wszechstronne zbadanie interakcji ziemniaka – *P. infestans* w przypadku kompatybilnej jak i niekompatybilnej reakcji odpornościowej warunkowanej genami *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*.

**Wnioski**

Przeprowadzenie opisanych badań pozwoliło na wybór odpowiedniego materiału badawczego do dalszych badań: dwóch izolatów *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji; grupy klonów ziemniaka należących do 4 grup: grupa I – klony posiadające oba geny: *Rpi-phu1 + R2-like*; grupa II – klony posiadające tylko gen *Rpi-phu1*; grupa III – klony posiadające tylko gen *R2/R2-like*; grupa IV – klony nieposiadające żadnego z badanych genów R.

**Mierniki dla tematu badawczego 1:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik[[2]](#footnote-2) | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 1.1 | Liczba siewek ziemniaka wytworzonych i prowadzonych w ramach tematu. | 300 | 300 |
| 1.2. | Liczba genotypów ziemniaka przetestowanych pod względem obecności wybranych genów R. | 320 | 320 |
| 1.3. | Liczba badanych izolatów *P. infestans*. | 10 | 10 |

**3.2 Temat badawczy 2. Ocena poziomu ekspresji wybranych genów R w naci i bulwach roślin ziemniaka.**

Cel tematu badawczego 2. Głównym celem tematu badawczego w roku 2021 był dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z liści ziemniaka i metodyki badania poziomu ekspresji genów oraz wybór genu referencyjnego do tych badań.

Zaplanowany cel został w całości osiągnięty.

**Materiały i metody**

Materiał badawczy w temacie stanowiły rośliny odmian Bzura (*R2-like*), Gardena (*Rpi-phu1*) i klonu TG 97-411 (*Rpi-phu1*). W celu uzyskania pożądanego materiału badawczego przeprowadzono test listkowy wg metodyki opisanej w poprzednim temacie. Podczas testu zebrano i zabezpieczono po dwa listki z trzech ww. genotypów/odmian ziemniaka, inokulowanych dwoma wybranymi izolatami *P*. *infestans* w trzech punktach czasowych (przed inokulacją oraz 24 i 72h po inokulacji) w sześciu powtórzeniach.

W celu wyboru optymalnej metodyki ekstrakcji do przyszłych badań, w roku 2021 sprawdzono 5 metod izolacji całkowitego RNA: cztery z wykorzystaniem różnych komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji (RNeasy Plant Mini Kit firmy QIAGEN; Spectrum Plant Total RNA Kit firmy Sigma-Aldrich; Total RNA Midi Plus firmy A&A Biotechnology; GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit firmy Thermo Scientific) oraz jedną w oparciu o metodykę opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987) z użyciem TRIzolu. We wszystkich metodach początkowa masa tkanki liściowej była równa 100 mg, a końcowa objętość uzyskiwanego RNA to 50 µl. Ilość (koncentracja) i jakość uzyskanego RNA została sprawdzona przy pomocy spektrofotometru NanoDrop Lite. Integralność uzyskanego RNA sprawdzono na żelu agarozowym.

Do dalszych etapów prac prowadzonych w 2021 roku w tym temacie badawczym, czyli do wstępnych prac nad genami referencyjnymi i poziomem ekspresji badanych genów R, wybrano RNA wyizolowane z wykorzystaniem Spectrum Plant Total RNA Kit firmy Sigma-Aldrich. Po izolacji zostało ono oczyszczone z pozostałości DNA przy użyciu On-Column DNase I Digestion Set firmy Sigma-Aldrich, a następnie przepisane na cDNA przy użyciu zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR firmy Fermentas wg metodyki podanej przez producenta. Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: inkubacja - 10 min w 25˚C; synteza cDNA - 15 min w temp. 50˚C; zakończenia reakcji – 5 min w 85˚C. Dalsze prace prowadzono na uzyskanej w ten sposób matrycy cDNA.

W ramach tematu rozpoczęto wstępne prace nad wyborem genu referencyjnego oraz nad badaniem poziomu relatywnej ekspresji genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* w listkach roślin odmian Bzura i Gardena oraz klonu TG97-411 po inokulacji kompatybilnym i niekompatybilnym izolatem *P. infestans*. W ramach wyboru genu referencyjnego przetestowano geny: Ef1-a, 18SrRNA, cyclophilin, 57-alfa-tubulin i beta-tubulin, zaproponowane przez Nicot i współautorów (2005) i Kramer i współautorów (2009), jako geny referencyjne odpowiednie do badania relatywnej ekspresji genów odporności w badaniach interakcji ziemniak-*P. infestans*. Badanie przeprowadzono wg zmodyfikowanej metodyki opisanej przez autorów tych prac i z użyciem starterów przez nich zaproponowanych.

Poziom ekspresji genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* był określany w reakcji qPCR, przeprowadzonej wg metodyki opisanej przez Stefańczyka i współautorów (2017) przy wykorzystaniu cyklera LightCycler 480 II firmy Roche Diagnostics. Reakcję przeprowadzono w 20 µl całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej, w skład której wchodziło 2 µl uzyskanego wcześniej i wystandaryzowanego cDNA (jako matryca), 10 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master, 0,5 µM każdego ze starterów i wody dopełniając do 20 µl. Warunki reakcji to: 95˚C – 5 min; 40 cykli: 95˚C – 10s, 65˚C – 20s, 72˚C – 30s.

**Wyniki**

Izolacja RNA wszystkimi testowanymi metodami ekstrakcji RNA okazała się skuteczne i pozwoliła na uzyskanie dużej ilości RNA o dobrej jakości. W przypadku izolacji z użyciem zestawu RNeasy Plant Mini Kit firmy QIAGEN uzyskano RNA o średniej koncentracji 0,69 mg/ml, a czystość mierzona spektrofotometrycznie i wyrażona współczynnikiem A260/A280 wynosiła 2,02. W przypadku izolacji z użyciem zestawu Spectrum Plant Total RNA Kit firmy Sigma-Aldrich uzyskano RNA o średniej koncentracji 0,73 mg/ml i współczynniku A260/A280 równym 1,93. W przypadku izolacji z użyciem zestawu Total RNA Midi Plus firmy A&A Biotechnology uzyskano RNA o średniej koncentracji mg/ml i współczynniku A260/A280 równym 1,82. W przypadku izolacji z użyciem zestawu GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit firmy Thermo Scientific uzyskano RNA o średniej koncentracji 0,62 mg/ml i współczynniku A260/A280 równym 2,07. W przypadku izolacji wg metody Chomczyńskiego RNA o średniej koncentracji 1,3 mg/ml, a współczynnik A260/A280 określający czystość uzyskanego RNA wynosił 2,01. Ze względu na bardzo dobre rezultaty ekstrakcji oraz stosunkowo łaty proces izolacji do dalszych etapów prac w tym temacie badawczym wybrano RNA wyizolowane z wykorzystaniem zestawu Spectrum Plant Total RNA Kit firmy Sigma-Aldrich. Po oczyszczeniu z pozostałości DNA otrzymane RNA zostało przepisane na cDNA, które posłużyło jako matryca w dalszych reakcjach qPCR.

Przeprowadzone badania nad wyborem genu referencyjnego wykazały wysoką powtarzalność wartości Cq (bez względu na punkt czasowy pobrania próbki) dla genu 57-alfa-tubulin (średnia wartość Cq – 25,3) i genu Ef1a (średnia wartość Cq – 22,3). Dla genów 18SrRNA, cyclophilin i beta-tubulin nie udało się uzyskać satysfakcjonujących wyników.

W 2021 roku w ramach tematu badawczego rozpoczęto również wstępne prace nad relatywną ekspresją genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1.* Wyniki przeprowadzonych dotąd prac potwierdzają prawidłowość wybranej metodyki, a uzyskane wyniki są zbliżone do wyników uzyskanych przez autorów metodyki. Zarówno prace laboratoryjne jak i analiza uzyskiwanych danych będą kontynuowane.

**Dyskusja**

Zgodnie z założeniami tematu do badań zabezpieczono listki 3 genotypów/odmian ziemniaka pobranych w trzech punktach czasowych: przed inokulacją oraz 24 i 72 godziny po inokulacji. Materiał ten służył głównie zweryfikowaniu i optymalizacji zaplanowanych metod badawczych, w tym metod izolacji RNA, wyboru genu referencyjnego i wstępnych badań poziomu ekspresji genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*.

Przeprowadzone porównanie efektywności metod izolacji RNA wykazało, że wszystkie testowane metody są bardzo skuteczne i mogą z powodzeniem zostać zastosowane w dalszych pracach nad realizacją Zadania. Wykorzystanie do izolacji komercyjnie dostępnych zestawów pozwala na łatwe i stosunkowo szybkie uzyskanie wystarczającej ilości RNA o dobrej jakości. Zastosowanie metody wg Chomczyńskiego i Sacchi jest nieco bardziej pracochłonne, lecz pozwala na uzyskanie dużej ilości dobrej jakości RNA nawet z trudnych do obróbki próbek roślinnych. W ramach tematu badawczego do dalszych badań nad ekspresją genów wybrano RNA wyizolowane przy użyciu zestawu Spectrum Plant Total RNA Kit firmy Sigma-Aldrich, lecz z powodzeniem można byłoby wykorzystać RNA uzyskane w wyniku ekstrakcji pozostałymi metodami.

W dalszym etapie prac ustalono, że jedynie dwa spośród pięciu badanych genów (57-alfa-tubulin i Ef1a) dają powtarzalne wyniki, jak miało to miejsce w publikacjach Nicot i współautorów (2005), Kramer i współautorów (2009) oraz Stefańczyka i współautorów (2017). Oba te geny mogą z powodzeniem zostać wykorzystane jako geny referencyjne w dalszych pracach nad realizacją Zadania. Dla pozostałych trzech genów wartości Cq były bardzo zróżnicowane, a w przypadku genu cyclophilin badanego u odmiany Bzura w dwóch punktach czasowych nie udał się uzyskać żadnych wyników.

W ramach tematu badawczego w 2021 roku rozpoczęto także prace nad poziomem ekspresji genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* w przypadku kompatybilnej i niekompatybilnej interakcji z *P. infestans*. Zgodnie z zaplanowanym harmonogramem przeprowadzono reakcje qPCR w celu wstępnego określenia relatywnego poziomu ekspresji tych genów, a uzyskane wyniki są zadowalające i wskazują, że zastosowanie wybranej metodyki pozwoli na zrealizowanie zaplanowanych w Zadaniu prac. Zarówno prace laboratoryjne jak i analiza uzyskanych danych będą dalej kontynuowane.

**Wnioski**

Zgodnie z planem zabezpieczono materiał badawczy do realizacji dalszych prac w temacie.

Wszystkie testowane metody izolacji RNA dostarczyły dużej ilości RNA u wysokiej jakości i mogą zostać wykorzystane do dalszych prac.

Spośród pięciu testowanych genów referencyjnych wybrano gen 57-alpha-tubulin proponowany przez Kramer i współautorów (2009) oraz Stefańczyka i współautorów (2017).

**Mierniki dla tematu badawczego 2:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik[[3]](#footnote-3) | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 2.1 | Liczba odmian/klonów ziemniaka wykorzystana w badaniu | 3 | 3 |
| 2.2 | Liczba metod izolacji RNA z liści ziemniaka weryfikowanych pod względem efektywności | 5 | 5 |
| 2.3. | Liczba testowanych genów referencyjnych | 5 | 5 |

**3.3 Temat badawczy 3. Analiza różnicowa ekspresji genów w bulwach wybranych form ziemniaka.**

**Cel tematu badawczego 3.** Celem tematu badawczego w 2021 roku jest dobór i optymalizacja metodyki izolacji RNA z bulw ziemniaka.

Zaplanowany cel został w całości osiągnięty.

**Materiały i metody**

Podobnie jak w poprzednim temacie badawczym materiał do badań stanowiły rośliny odmian Bzura, Gardena i klonu TG 97-411. Jednak nie były to listki, lecz plastry wycięte z bulw ww. genotypów/odmian i zainokulowane *P. infestans*. Aby umożliwić pobranie odpowiedniego materiału badawczego przeprowadzono test plastrowy wg metodyki standardowo stosowanej w IHAR-PIB Oddział Młochów i opisanej przez Zarzycką (2001). Podczas testu zabezpieczono po dwa plastry z trzech ww. genotypów/odmian ziemniaka, inokulowanych dwoma izolatami *P*. *infestans* (wybranymi w temacie badawczym nr 1) w trzech punktach czasowych (przed inokulacją, 24 i 72h po inokulacji) w sześciu powtórzeniach.

Podobnie jak poprzednim temacie badawczym sprawdzono pięć tych samych metod izolacji całkowitego RNA. Cztery z wykorzystaniem różnych komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji (RNeasy Plant Mini Kit firmy QIAGEN; Spectrum Plant Total RNA Kit firmy Sigma-Aldrich; Total RNA Midi Plus firmy A&A Biotechnology; GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit firmy Thermo Scientific) oraz jedną w oparciu o metodykę opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987) z użyciem TRIzolu. Jednak w przypadku tego tematu badawczego materiał do izolacji stanowiła tkanka bulwy ziemniaka, a nie jak poprzednio tkanka liścia. We wszystkich metodach początkowa masa tkanki była równa 100 mg, a pożądana końcowa objętość uzyskiwanego RNA to 50 µl. Ilość (koncentracja) i jakość uzyskanego RNA została sprawdzona przy pomocy spektrofotometru NanoDrop Lite. Integralność uzyskanego RNA sprawdzono na żelu agarozowym.

Do dalszych etapów prac prowadzonych w 2021 roku, czyli do wstępnych prac nad genami referencyjnymi i poziomem ekspresji badanych genów R, wybrano RNA wyizolowane w oparciu o metodykę opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Pozostałe elementy zastosowanej metodyki są takie same jak w poprzednim temacie badawczym. Po izolacji RNA zostało oczyszczone z pozostałości DNA przy użyciu On-Column DNase I Digestion Set firmy Sigma-Aldrich, a następnie przepisane na cDNA przy użyciu zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR firmy Fermentas wg metodyki podanej przez producenta. Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: inkubacja - 10 min w 25˚C; synteza cDNA - 15 min w temp. 50˚C; zakończenia reakcji – 5 min w 85˚C. Dalsze prace prowadzono na uzyskanej w ten sposób matrycy cDNA.

W ramach tematu rozpoczęto wstępne prace nad wyborem genu referencyjnego oraz nad badaniem poziomu relatywnej ekspresji genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* w listkach roślin odmian Bzura i Gardena oraz klonu TG97-411 po inokulacji kompatybilnym i niekompatybilnym izolatem *P. infestans*. W ramach wyboru genu referencyjnego przetestowano geny Ef1-a, 18SrRNA, cyclophilin, 57-alfa-tubulin i beta tubulin, zaproponowane przez Nicot i współautorów (2005) i Kramer i współautorów (2009).

Poziom ekspresji genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* był określany w reakcji qPCR, przeprowadzonej wg metodyki opisanej przez Stefańczyka i współautorów (2017) przy wykorzystaniu cyklera LightCycler 480 II firmy Roche Diagnostics. Reakcję przeprowadzono w 20 µl całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej, w skład której wchodziło 2 µl uzyskanego wcześniej i wystandaryzowanego cDNA (jako matryca), 10 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master, 0,5 µM każdego ze starterów i wody dopełniając do 20 µl. Warunki reakcji to: 95˚C – 5 min; 40 cykli: 95˚C – 10s, 65˚C – 20s, 72˚C – 30s.

**Wyniki**

W 2021 roku podjęto próbę izolacji RNA z tkanki bulw ziemniaka przy wykorzystaniu czterech różnych komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji (RNeasy Plant Mini Kit firmy QIAGEN; Spectrum Plant Total RNA Kit firmy Sigma-Aldrich; Total RNA Midi Plus firmy A&A Biotechnology; GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit firmy Thermo Scientific) oraz jedną w oparciu o metodykę opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Przy użyciu wszystkich komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji wystąpiły mniejsze lub większe problemy wynikające z rodzaju tkanki, przejawiające się głównie zatykaniem kolumienek ekstrakcyjnych. Utrudnienia te znacznie obniżyły atrakcyjność wykorzystania gotowych, komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji, dlatego po przeprowadzeniu wstępnych testów z tymi zestawami, zostały one wstępnie odrzucone jako potencjalne metody stosowane do rutynowej izolacji RNA z bulw ziemniaka w dalszych latach realizacji Zadania.

W przypadku izolacji wg metody Chomczyńskiego otrzymano RNA o średniej koncentracji 0,96 mg/ml i współczynniku A260/A280 równym 1,98. Po oczyszczeniu z pozostałości DNA otrzymane RNA zostało przepisane na cDNA, które posłużyło jako matryca w dalszych reakcjach qPCR. Zaplanowane wstępne badania nad wyborem genu referencyjnego zostały rozpoczęte dla wszystkich pięciu testowanych genów. Powtarzalne wyniki uzyskano dotąd dla genu 57-alfa-tubulin. Prace laboratoryjne i analiza uzyskanych danych są w toku. Podobnie jak w przypadku poprzedniego tematu badawczego prace nad relatywną ekspresją genów *R2/R2-like*  i  *Rpi-phu1* zostały rozpoczęte.

**Dyskusja**

Zgodnie z założeniami do badań zabezpieczono tkankę bulwową z plastrów 3 genotypów/odmian ziemniaka inokulowanych *P. infestans*, pobranych w trzech punktach czasowych: przed inokulacją oraz 24 i 72 godziny po inokulacji. Materiał ten służył głównie zweryfikowaniu przydatności metod izolacji RNA oraz rozpoczęciu prac nad wyborem genu referencyjnego i wstępnych badań poziomu ekspresji genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*.

Wyniki przeprowadzonych testów przydatności poszczególnych metod ekstrakcji RNA z tkanki bulw ziemniaka wskazują, że rodzaj wykorzystanej tkanki może spowodować utrudnienia dla wybranych przez nas komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji RNA. Trudności te przejawiały się głównie z zatykaniu kolumienek ekstrakcyjnych i spowodowały wstępne odrzucenie przez nas wszystkich testowanych zestawów do izolacji RNA z tkanki bule ziemniaka. Nie oznacza to jednak, że ich wykorzystanie nie jest możliwe, jednakże wymaga zmodyfikowania protokołu i dopracowania metody izolacji. Zastosowanie metody wg Chomczyńskiego pozwala na uzyskanie dużej ilości dobrej jakości RNA nawet z trudnych do obróbki próbek roślinnych. Metoda ta może być rekomendowana do stosowania w dalszych pracach nad realizacją Zdania.

**Wyniki**

W dalszym etapie prac ustalono, że jedynie dwa spośród pięciu badanych genów (57-alfa-tubulin i Ef1a) dają powtarzalne wyniki, jak miało to miejsce w publikacjach Nicot i współautorów (2005), Kramer i współautorów (2009) oraz Stefańczyka i współautorów (2017). Oba te geny mogą z powodzeniem zostać wykorzystane jako geny referencyjne w dalszych pracach nad realizacją Zadania. Dla pozostałych trzech genów wartości Cq były bardzo zróżnicowane, a w przypadku genu cyclophilin badanego u odmiany Bzura w dwóch punktach czasowych nie udało się uzyskać żadnych wyników.

W ramach tematu badawczego w 2021 roku rozpoczęto także prace nad poziomem ekspresji genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* w przypadku kompatybilnej i niekompatybilnej interakcji z *P. infestans*. Zgodnie z zaplanowanym harmonogramem przeprowadzono reakcje qPCR w celu wstępnego określenia relatywnego poziomu ekspresji tych genów, a uzyskane wyniki są zadowalające i wskazują, że zastosowanie wybranej metodyki pozwoli na zrealizowanie zaplanowanych w Zadaniu prac. Zarówno prace laboratoryjne jak i analiza uzyskanych danych będą dalej kontynuowane.

**Wnioski**

Zgodnie z planem zabezpieczono materiał badawczy do realizacji dalszych prac w temacie.

Do izolacji RNA z tkanki bulw ziemniaka inokulawanych *P. infestans* z powodzeniem wykorzystano metodę wg Chomczyńskiego i Sacchi.

Uzyskano wyniki wstępnych prac nad wyborem genu referencyjnego do dalszych badań oraz nad ekspresją genów *R2/R2-like*

**Mierniki dla tematu badawczego 3:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik[[4]](#footnote-4) | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 3.1 | Liczba odmian/klonów ziemniaka wykorzystana w badaniu | 3 | 3 |
| 3.2 | Liczba metod izolacji RNA z bulw ziemniaka weryfikowanych pod względem efektywności | 5 | 5 |
| 3.3. | Liczba testowanych genów referencyjnych | 5 | 5 |

**4. Prezentacja wyników badań**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Prezentacja wyników na konferencjach | | | |  |
| lp. | konferencja | prezentacja[[5]](#footnote-5) | Liczba prezentacji podana w opisie zadania | Liczba prezentacji zrealizowana |
|  | *Nie planowano* |  |  |  |
| Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych | | | |  |
| lp. | monografia/czasopismo | publikacja[[6]](#footnote-6) | Liczba publikacji podana w opisie zadania | Liczba publikacji zrealizowana |
|  | *Nie planowano* |  |  |  |

Załączniki[[7]](#footnote-7): brak

**5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:**

<http://bip.ihar.edu.pl/artykul/128/590/l-p-w-zal-do-rozporzadzenia-mrirw-30>

**6. Miernik zadania - stopień realizacji**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 *P. infestans* | 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% |
|  |  |  | **ŚREDNIA** | 100% |
|  |  |  | **% REALIZACJI ZADANIA** | 100% |

Sporządzono:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pieczęć jednostki | Osoba reprezentująca jednostkę | Kierownik zadania |
|  |  |  |
| data | podpis i pieczęć | podpis |

1. Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny [↑](#footnote-ref-1)
2. Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc. [↑](#footnote-ref-2)
3. Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc. [↑](#footnote-ref-3)
4. Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc. [↑](#footnote-ref-4)
5. Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster. [↑](#footnote-ref-5)
6. Podać, czy chodzi o publikację oryginalną, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografi etc. [↑](#footnote-ref-6)
7. Podać listę oraz dołączyć do sprawozdania kopie posterów/wyciągi z materiałów konferencyjnych/publikacje etc. W nawiasie podać, na której stronie sprawozdania znajdują się prezentowane wyniki. [↑](#footnote-ref-7)