***Nr zadania: 30***

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**

**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2022 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. zm.)* |
| Numer zadania w planach IHAR-PIB: **3-1-00-3-06** |
| Planowany okres realizacji zadania: **2022 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 |
| Beata Tatarowska | dr | IHAR-PIB, Oddział Młochów |
| Dorota Milczarek | dr | IHAR-PIB, Oddział Młochów |
| Mirosława Łukasiewicz |  | IHAR-PIB, Oddział Młochów |
| Irena Bazylak |  | IHAR-PIB, Oddział Młochów |
| Małgorzata Słomska |  | IHAR-PIB, Oddział Młochów |
| Kamila Tkaczyk |  | 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 Beata Tatarowska, tel. (0 22) 729 92 48 w. 222

**D. OPIS ZADANIA**

* + 1. **Cele zadania:**

Celem tego zadania jest poszerzenie wiedzy o interakcji ziemniak – *P. infestans* zachodzącej podczas reakcji odpornościowej w bulwach ziemniaka. Badania zostaną przeprowadzone w oparciu o dwa modele badawcze: pierwszy model bazuje na genie *R2/R2-like*, który w reakcji z kompatybilnymi rasami *P. infestans* warunkuje jedynie odporność naci, natomiast drugi model bazuje na genie *Rpi-phu1*, który warunkuje zarówno odporność naci, jak i bulw ziemniaka. W ramach zadania zostanie zbadany związek poziomu ekspresji genów *Rpi-phu1* oraz *R2/R2-like* w bulwach ziemniaka, z efektywnością odporności tych bulw w przypadku kompatybilnej i niekompatybilnej interakcji z *P. infestans*.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Lp. | Cel | Czy cel został zrealizowany (tak/nie[[1]](#footnote-1)/częściowo1) |
| 1 | Utrzymywanie i namnażanie materiału roślinnego do badań oraz przeprowadzenie testu odporności listków i plastrów bulw wybranych odmian/klonów ziemniaka przy wykorzystaniu izolatów *P. infestans* o określonych profilach wirulencji. | TAK |
| 2 | Zabezpieczenie materiału badawczego do analizy ekspresji wybranych genów R w liściach badanych klonów/odmian ziemniaka oraz określenie relatywnego poziomu ekspresji tych genów dla wybranych obiektów w dwóch punktach czasowych. | TAK |
| 3 | Uzyskanie i zabezpieczenie materiału badawczego do analizy ekspresji wybranych genów R w bulwach badanych klonów/odmian ziemniaka (metoda RT qPCR) oraz uzyskanie i zabezpieczenie materiału badawczego do przeprowadzenia różnicowej analizy ekspresji genów w wybranych formach ziemniaka (metoda RNA-seq). | 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 | 59 700 |
| 2 | Ocena poziomu ekspresji wybranych genów R w naci i bulwach roślin ziemniaka. | 1-12 | 68 000 |
| 3 | Analiza różnicowa ekspresji genów w bulwach wybranych form ziemniaka. | 1-12 | 63 500 |
| 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**

Głównymi celami tematu badawczego w roku 2022 było: utrzymywanie i namnożenie materiału roślinnego do badań oraz przeprowadzenie testu odporności listków i plastrów bulw wybranych odmian/klonów ziemniaka przy wykorzystaniu izolatów *P. infestans* o określonych profilach wirulencji.

Zaplanowany cel został w całości osiągnięty.

**Materiały i metody:**

Zasadniczy materiał badawczy stanowiła grupa 40 wytypowanych klonów ziemniaka pochodzących z dwóch kombinacji krzyżówkowych donorów genu *R2-like* (odmiany Bzura) oraz genu *Rpi-phu1* (odmiany Gardena i klonu TG 97-411) wraz z formami rodzicielskimi. Materiałem badawczym była również grupa 11 testerów Black’a służących ustalaniu profilu wirulencji izolatów *P. infestans* oraz grupa 26 rodów hodowlanych i odmian ziemniaka posiadających wybrane geny R lub ich kombinacje. Materiał badawczy do testów był namnażany na poletkach doświadczalnych (7, 15, 30 lub 60 krzaków w zależności od dostępności materiału sadzeniakowego) i/lub w rozmnożeniu szklarniowym.

W celu określenia reakcji badanych klonów/odmian ziemniaka na inokulację izolatami *P. infestans* o określonym profilu wirulencji, przeprowadzono test listkowy i plastrowy wg metodyki opisanej przez Plicha i współautorów (2016). Do testów listkowych i plastrowych wykorzystano dwa wytypowane w roku ubiegłym izolaty *P. infestans* MP 324x i 213/20, o pożądanym profilu wirulencji (kompatybilne i niekompatybilne do badanych genów R). Dodatkowo jako wzorzec użyto izolat MP 1480, który był awirulentny do obu badanych genów R. Koncentracja użytego inokulum wynosiła 50 000 sporangiów/ml. W przypadku testu plastrowego, dla części badanego materiału dodatkowo wykonano testy przy użyciu inokulum o koncentracji 25 000 i 12 500 sporangiów/ml. Stopień odporności każdego badanego klonu/odmiany ziemniaka oceniono na 5 listkach/plastrach w dwóch powtórzeniach, a ocenę stopnia nasilenia objawów chorobowych przeprowadzono po 6 dniach inkubacji (Fot. 1A i B), uwzględniając powierzchnię zarodnikującej plamy i intensywność zarodnikowania. Ocena porażenia została przeprowadzona w skali 9-stopniowej (9 - brak objawów porażenia; 1 - powierzchnia listka/plastra całkowicie porażona, intensywne zarodnikowanie *P. infestans*).

W teście listkowym oceniono łącznie 80 form ziemniaka (40 klonów hodowlanych ziemniaka; 3 formy rodzicielskie - odmiany Bzura, Gardena i klon TG 97-411; 26 bardziej zaawansowanych rodów hodowlanych i odmian ziemniaka posiadających określone zestawy genów R; oraz 11 testerów Blacka). W teście plastrowym oceniono poziom odporności 69 form ziemniaka (te same formy co w przypadku testu listkowego z wyjątkiem 11 testerów Blacka).

A)

**Obraz zawierający porządek

Opis wygenerowany automatycznie** Obraz zawierający liść, roślina

Opis wygenerowany automatycznie

B)   
**Obraz zawierający warzywo

Opis wygenerowany automatycznie** Obraz zawierający żywność, kratka wentylacyjna, gotowanie, stojak

Opis wygenerowany automatycznie

**Fot. 1.** A) Test listkowy; B) test plastrowy

**Wyniki**

***Odporność naci - testy listkowe.***

Przeprowadzone testy listkowe potwierdziły profil wirulencji wytypowanych w ubiegły roku izolatów *P. infestans*: 213/20 (wirulentny w stosunku do następujących genów: *R1, R2, R3, R4, R6, R7, (R8), R11*) oraz MP 324x (wirulentny w stosunku do genów: *R1, R3, R4, R6, R7, (R8), R11 i Rpi-phu1*). Ustalono również wirulencję dodatkowo użytego izolatu MP 1480, który był wirulentny w stosunku do genów *R1, R3, R4, R5, R6, R7, (R8), R10, R11*. Biorąc pod uwagę wyłącznie dwa badane przez nas geny *R2/R2-like* i *Rpi-phu1* można powiedzieć, że izolat 213/20 był wirulentny w stosunku do genu *R2/R2-like* i jednocześnie awirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1*; izolat MP 324x odwrotnie – był awirulentny w stosunku do genu *R2/R2-like* i wirulentny w stosunku do genu *Rpi-phu1*. Natomiast dodatkowy izolat MP 1480 był awirulentny w stosunku do obu badanych genów R.

Wyniki oceny odporności naci (test listkowy) badanych odmian Bzura, Gardena, TG 97-411 oraz ich klonów potomnych były zgodne z oczekiwaniami, tj. formy posiadające gen *R2/R2-like* były odporne w stosunku do izolatu MP 324x, a podatne w stosunku do izolatu 213/20; formy posiadające gen *Rpi-phu1* były odporne w stosunku do izolatu 213/20, natomiast podatne po inokulacji izolatem MP 324x; formy posiadające oba te geny były odporne na oba testowane izolaty; formy nie posiadające żadnego z badanych genów były podatne po inokulacji wszystkimi użytymi izolatami (Tabela 1.1). Analogiczne wyniki otrzymano dla 5 odmian wzorcowych posiadających gen *R2* (lub jego homologi)i 5 odmian posiadających gen *Rpi-phu1* (lub jego homologi). Grupa piętnastu odpornych wzorcowych odmian/klonów ziemniaka reprezentujących inne źródła odporności (lub kombinację różnych źródeł odporności) wykazała bardzo wysoki poziom odporności po inokulacji obydwoma izolatami *P. infestans*, natomiast podatna wzorcowa odmiana wykazała bardzo niski poziom odporności bez względu na użyty izolat *P. infestans* (Tabela 1.1). Dodatkowo badany izolat MP 1480 poraził jedynie podatną odmianę wzorcową, natomiast wszystkie klony/odmiany ziemniaka posiadające geny *R2/R2-like*, *Rpi-phu1* lub reprezentujące inne źródła odporności były odporne na ten izolat.

***Odporność bulw - testy plastrowe***

W roku 2022 wyniki oceny odporności bulw w testach odbiegały nieco od wyników uzyskanych w roku ubiegłym oraz od naszych wcześniejszych obserwacji.

***Koncentracja inokulum 50 000 sporangiów/ml.***Wszystkie badane formy rodzicielskie: Bzura (gen *R2/R2-like*), Gardena (*Rpi-phu1*), TG 97-411 (*Rpi-phu1*) okazały się bardzo podatne po inokulacji obydwoma wybranymi w roku ubiegłym izolatami (MP 324x i 213/20), a ich średnie oceny odporności były ≤ 1,2 (Tabela 1.1). Bardzo podatne lub podatne po inokulacji oboma izolatami okazały się również klony potomne z grupy II (*Rpi-phu1*), grupy III (*R2/R2-like*) i grupy IV (brak genów R). Natomiast klony z grupy I (*Rpi-phu1* + *R2/R2-like*) okazały się średnio odporne po inokulacji izolatami MP 324x i 213/20 (średnia ocen to odpowiednio 5,7 i 5,0). Również wzorcowe odporne klony/odmiany ziemniaka reprezentujące różne źródła odporności wykazały stosunkowo niski poziom odporności w teście plastrowym (Tabela 1.1), choć obserwowano tu duże zróżnicowanie w zależności od badanego źródła odporności. Po inokulacji dodatkowym izolatem MP 1480 (awirulentnym w stosunku do genu *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*) podatne były: Bzura (*R2/R2-like*), Gardena (*Rpi-phu1*), oraz klony z grupy III (*R2/R2-like*) i grupy IV (brak genów R). Odporne natomiast były klony z grupy I (*Rpi-phu1* + *R2/R2-like*) i grupy II (*Rpi-phu1*) oraz klon rodzicielski TG 97-411 (Tabela 1.1).

***Koncentracja inokulum 25 000 i 12 500 sporangiów/ml.***

Ze względu na rozbieżność otrzymanych wyników od zakładanego modelu w 2022 roku dla wybranych klonów/odmian ziemniaka założono dodatkowy test plastowy z użyciem niższych koncentracji inokulum: 25 000 i 12 500 sporangiów/ml zawiesiny inokulacyjnej. Wyniki testu plastrowego przeprowadzonego na formach rodzicielskich przy użyciu niższych koncentracji inokulum są zbliżone do wyników otrzymanych po inokulacji zawiesiną o koncentracji 50 000 sporangiów/ml. Odmiana Bzura była podatna po inokulacji wszystkimi użytymi izolatami ze średnią ocen odpowiednio: dla izolatu 213/20 średnia ocena odporności wynosiła 1,6 (zakres 1,0 – 3,0); dla izolatu MP 324x średnia ocena odporności wynosiła 3,0 (zakres 2,0 – 4,0); dla izolatu MP 1480 średnia ocena odporności wynosiła 3,3 (zakres 2,0 – 6,0). Odmiana Gardena była podatna po inokulacji izolatami 213/20 i MP 324x ze średnią ocen dla izolatu 213/20 równą 3,1 (zakres 1,0 – 5,0) a dla izolatu MP 324x średnią równą 2,7 (zakres 1,0 – 7,0), natomiast dla izolatu MP 1480 średnia ocena odporności była nieco wyższa i wynosiła 4,4 (zakres 3,0 – 7,0). Średnia ocena odporności dla klonu TG 97-411 wynosiła: po inokulacji izolatem 213/20 4,1 (zakres 1,0 – 8,0), po inokulacji MP 324x wynosiła 1,4 (zakres 1,0 – 2,0), po inokulacji MP 1480 wynosiła 6,0 (zakres 5,0 -8,0).

**Tabela 1.1** Wyniki oceny odporności poszczególnych grup materiału badawczego w teście listkowym i plastrowym po inokulacji wybranymi izolatami *P. infestans* o koncentracji inokulum 50 000 sporangiów/ml.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Grupa materiałów | n | Ocena odporności (średnia i zakres) | | | | | |
| Izolat MP 324x | | Izolat 213/20 | | Izolat MP 1480 | |
| Test listkowy | Test plastrowy | Test listkowy | Test plastrowy | Test listkowy | Test plastrowy |
| Formy rodzicielskie i klony potomne o określonych kombinacjach genów R | | | | | | | |
| Bzura (*R2*/*R2-like*) | 1 | 9,0  (9,0 - 9,0) | 1,0  (1,0 - 1,0) | 1,0  (1,0 – 1,0) | 1,0  (1,0 – 1,0) | 9,0  (9,0 - 9,0) | 4,7  (3,0 - 6,0) |
| Gardena (*Rpi-phu1*) | 1 | 2,0  (1,0 – 3,0) | 1,2  (1,0 – 2,0) | 8,0  (7,0 - 9,0) | 1,0  (1,0 - 1,0) | 9,0  (9,0 - 9,0) | 1,8  (1,0 - 3,0) |
| TG 97-411 (*Rpi-phu1*) | 1 | 3,8  (3,0 – 5,0) | 1,0  (1,0 - 1,0) | 9,0  (8,9 - 9,0) | 1,0  (1,0 - 1,0) | 9,0  (9,0 - 9,0) | 7,0  (6,0 - 8,0) |
| Grupa I  (*Rpi-phu1*, *R2*/*R2-like*) | 10 | 8,1  (7,0 – 9,0) | 5,7  (1,0 – 8,0) | 8,9  (8,0 – 9,0) | 5,0  (2,0 – 9,0) | 9,0  (9,0 - 9,0) | 8,0  (6,0 – 9,0) |
| Grupa II  (*Rpi-phu1*) | 10 | 2,8  (1,0 – 5,0) | 2,5  (1,0 – 6,0) | 8,8  (8,0 – 9,0) | 4,0  (1,0 – 8,0) | 9,0  (9,0 - 9,0) | 7,0  (5,0 - 8,0) |
| Grupa III  (*R2*/*R2-like*) | 10 | 8,8  (8,0 – 9,0) | 3,5  (1,0 – 8,0) | 1,3  (1,0 – 2,0) | 1,6  (1,0 – 6,0) | 8,9  (8,0 – 9,0) | 4,4  (2,0 – 9,0) |
| Grupa IV  (brak genów R) | 10 | 2,6  (1,0 – 4,0) | 1,8  (1,0 – 3,0) | 1,1  (1,0 – 3,0) | 1,5  (1,0 – 4,0) | 2,1  (1,0 – 4,0) | 1,1  (1,0 – 3,0) |
| Odmiany /klony wzorcowe | | | | | | | |
| Odmiany/klony ziemniaka posiadające gen *R2* | 5 | 8,9  (8,0 - 9,0) | 2,8  (1,0 - 7,0) | 1,6  (1,0 – 1,4) | 1,9  (1,0 – 5,0) | 9,0  (9,0 - 9,0) | 3,4  (1,0 - 6,0) |
| Odmiany/klony ziemniaka posiadające gen *Rpi-phu1* | 5 | 2,8  (1,0 – 4,0) | 1,9  (1,0 – 6,0) | 8,1  (7,0 - 9,0) | 1,5  (1,0 - 4,0) | 8,9  (8,0 - 9,0) | 6,0  (1,0 - 9,0) |
| Odmiany/klony ziemniaka posiadające inne źródła odporności | 15 | 8,6  (7,0 – 9,0) | 4,9  (1,0 – 9,0) | 8,3  (5,0 – 9,0) | 4,3  (1,0 – 9,0) | 8,8  (7,0 – 9,0) | 4,9  (1,0 – 9,0) |
| Wzorcowa odmiana podatna | 1 | 1,0  (1,0 – 1,0) | 1,0  (1,0 – 1,0) | 1,0  (1,0 – 1,0) | 1,0  (1,0 – 1,0) | 1,0  (1,0 – 1,0) | 1,0  (1,0 – 1,0) |

**Dyskusja**

Wyniki fenotypowej oceny odporności nadziemnej części roślin w teście listkowym w pełni potwierdziły nasze wcześniejsze obserwacje. W przeprowadzonych testach listkowych wszystkie badane formy ziemniaka zareagowały zgodnie z oczekiwaniami. Klony/odmiany ziemniaka posiadające gen *R2/R2-like* i/lub *Rpi-phu1* po inokulacji awirulentnym izolatem *P. infestans* wykazują pełną odporność (oceny w zakresie 7,0 – 9,0, w skali 1-9), a objawy (o ile są widoczne gołym okiem) ograniczają się jedynie do powstawania niewielkiej plamy nekrotycznej o średnicy 2-3 mm (Fot. 2 A). Natomiast po inokulacji izolatem wirulentnym patogen swobodnie rozprzestrzenia się kolonizując tkankę gospodarza (Fot. 2 B).Nasze obserwacje są w zgodzie z hipotezą, żew przypadku kompatybilnej reakcji odpornościowej, czyli gdy produkty tych genów R wchodzą w pośrednią lub bezpośrednią reakcję z produktami odpowiednich genów wirulencji patogena, następuje uruchomienie szybkiej reakcji nadwrażliwości (HR – hypersensitivity response), zlokalizowanie oraz zatrzymanie rozprzestrzeniania się patogena w obrębie niewielkiej liczby komórek gospodarza. Natomiast po inokulacji izolatami wirulentnymi, czyli takimi u których brak jest kompatybilnego genu awirulencji, nie następuje szybka reakcja HR, a patogen może swobodnie się rozprzestrzeniać (Jones i Dangal 2006, Chen i in. 2012).

**Fot. 2.** A) niewielka plama nekrotyczna powstała w wyniki reakcji HR po inokulacji kompatybilnym izolatem *P. infestans*; B) objawy porażenia   
*P. infestans*

Odporność bulw ziemniaka na *P. infestans* jest bardziej skomplikowana. Z rezultatów badań innych autorów oraz z badań prowadzonych od lat w IHAR-PIB Oddział w Młochowie wynika, że niektóre geny R warunkujące całkowitą odporność naci na infekcje *P. infestans*, nie spełniają takiej funkcji w bulwach. Dla przykładu, geny *R1, Rpi-phu1, Rpi-ber1* warunkują efektywną ochronę zarówno naci jak i bulw przed infekcjami kompatybilnymi izolatami *P. infestans*, natomiast efektywność genów *R2, R3a, R4,* oraz *Rpi-abpt* ogranicza się tylko do nadziemnej części roślin (Roer i Toxopeus, 1961; Śliwka i in., 2006; Mayton i inni 2011, Park i inni 2005, Plich i inni 2012, Plich i inni 2013, Plich i inni 2016). Bazując na tych wynikach do badań wybrano dwa geny R o odmiennej reakcji bulw na inokulację kompatybilnymi izolatami *P. infestans*: gen *R2/R2-like*, którego obecność nie powodowała odporności bulw oraz gen *Rpi-phu1*, który powodował odporność bulw. Otrzymane w 2022 roku wyniki potwierdzają fakt, że przy użyciu kompatybilnego izolatu, gen *R2/R2-like* warunkuje pełną odporność listków, lecz nie powoduje odporności bulw. Natomiast wyniki badań efektywności genu *Rpi-phu1* w warunkowaniu odporności na *P. infestans* są niejednoznaczne. Zgodnie z oczekiwaniami po inokulacji izolatem MP 324x (wirulentny w stosunku do *Rpi-phu1*) plastry bulw form ziemniaka posiadających gen *Rpi-phu1* były podatne. Natomiast po inokulacji izolatem 213/20 (awirulentnym w stosunku do genu *Rpi-phu1*) odmiana Gardena i TG 97-411 okazały się bardzo podatne, natomiast ich klony potomne posiadające gen *Rpi-phu1* (w pojedynkę lub w połączeniu z genem *R2/R2-like*) wykazały odporność na średnim poziomie (odpowiednio 4,0 i 5,0). Wyniki te są w sprzeczności z wynikami wcześniejszych badań prowadzonych w IHAR-PIB Oddział w Młochowie, w których poziom odporności warunkowanej genem *Rpi-phu1* mieścił się zazwyczaj w zakresie ocen 8,0 - 9,0. Oceny z zakresu 6,0 - 7,0 były rzadko odnotowywane (Fot 3). Po zastosowaniu inokulacji dodatkowym izolatem MP 1480 (awirulentnego do obu genów R) odmiana Bzura była średnio odporna, Gardena podatna, natomiast klon TG 97-411 był wysoko odporny. Wysoki poziom odporności wykazywały również klony potomne posiadające gen *Rpi-phu1* (w pojedynkę lub w połączeniu z genem *R2/R2-like*). Wyniki te są w zasadzie zgodne z założeniami o organo-specyficznym działaniu genu *R2/R2-like* i efektywnym działaniu genu *Rpi-phu1* we wszystkich organach rośliny (jedynie wysoka podatność plastrów odmiany Gardena jest całkowicie niezgodna z przyjętymi założeniami). Niemniej jednak obserwowana odporność bulw form ziemniaka posiadających gen *Rpi-phu1* nie była tak krańcowo wysoka jak obserwowano to w latach ubiegłych. Ponadto wyniki testów plastrowych z użyciem izolatu 213/20 są nieoczekiwane i stawiają cały szereg nowych pytań badawczych. Aby wyjaśnić otrzymane w tym roku wyniki i odpowiedzieć sobie na nowopowstałe pytania badawcze konieczne jest ponowne przeprowadzenie testów plastrowych w następnym sezonie wegetacyjnym (z użyciem szerszej puli materiałów i izolatów). Konieczne jest również określenie poziomu ekspresji poszczególnych genów awirulencji wykorzystanych izolatów i zbadanie związku pomiędzy nim a otrzymanymi wynikami na poziomie fenotypu (temat badawczy 2 i 3).

A) B)

Obraz zawierający stojak, kilka

Opis wygenerowany automatycznie Obraz zawierający pączek, wewnątrz, taca, patelnia

Opis wygenerowany automatycznie

**Fot. 3.** Porażenie klonu badawczego TG 97-411 (na obu zdjęciach dolny rząd) po inokulacji awirulentnym izolatem *P. infestans* w roku 2021 (A) i w roku 2022 (B).

**Wnioski**

* W roku 2022 namnożono materiał badawczy potrzebny do przeprowadzenia laboratoryjnych fenotypowych testów odporności naci i bulw po inokulacji dwoma wybranymi izolatami *P. infestans* o określonych profilach wirulencji.
* Przeprowadzono testy listkowe i plastrowe na całym zaplanowanym materiale badawczym z użyciem wybranych wcześniej izolatów *P. infestans*.
* Wyniki testów listkowych w pełni potwierdzają nasze założenia oraz przyjęty układ doświadczalny.
* Wyniki testów plastrowych przy użyciu wytypowanych w roku ubiegłym izolatów *P. infestans* o koncentracji 50 000 sporangiów/ml odbiegały nieco od wyników uzyskiwanych w latach ubiegłych – klony odmiany posiadające gen *Rpi-phu1* nie wykazywały krańcowo wysokiego poziomu odporności bulw po inokulacji kompatybilnym izolatem *P. infestans*.
* Wyniki testów plastrowych przeprowadzonych przy wykorzystaniu inokulum tych samych izolatów o koncentracji 25 000 i 12 500 sporangiów/ml nie różniły się znacząco od wyników uzyskanych przy koncentracji 50 000 sporangiów/ml.
* Wyniki testów plastrowych przy użyciu dodatkowego izolatu MP 1480 są w zgodzie z naszą hipotezą badawczą o organo-specyficznej ekspresji fenotypowej odporności warunkowanej genem *R2/R2-like*.
* Ze względu na nieoczekiwany wynik testu plastrowego planuje się powtórzenie części eksperymentu w kolejnym roku badań.

Mierniki dla tematu badawczego 1:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik[[2]](#footnote-2) | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 1.1 | Liczba klonów/odmian ziemniaka oceniana pod względem odporności naci (test listkowy) | 80 | 80 |
| 1.2. | Liczba klonów/odmian ziemniaka oceniana pod względem odporności bulw (test plastrowy) | 69 | 69 |
| 1.3 | Liczba izolatów *P infestans* o określonym profilu wirulencji wykorzystanych do badań odporności | 2 | 2 |

**3.2 Temat badawczy 2**

**Cel tematu badawczego 2**

Głównymi celami tematu badawczego w roku 2022 było: zabezpieczenie materiału badawczego do analizy ekspresji wybranych genów R w liściach badanych klonów/odmian ziemniaka oraz określenie relatywnego poziomu ekspresji tych genów dla wybranych obiektów w jednym lub dwóch punktach czasowych.

Zaplanowany cel został w całości osiągnięty.

**Materiały i metody**

Zasadniczy materiał badawczy stanowiły: rośliny odmiany Bzura (*R2-like*); Gardena (*Rpi-phu1*) i klonu TG 97-411 (*Rpi-phu1*); 12 spośród 40 wytypowanych uprzednio klonów ziemniaka pochodzących z dwóch kombinacji krzyżówkowych donorów genu *R2-like* oraz genu *Rpi-phu1*, które reprezentowały wszystkie możliwe kombinacje badanych genów R w tym potomstwie:

* 3 klony posiadające oba geny odporności *R2-like* i *Rpi-phu1*;
* 3 klony posiadające jedynie gen *R2-like*;
* 3 klony posiadające jedynie gen *Rpi-phu1*;
* oraz dodatkowo 3 klony nieposiadające żadnego z tych genów R (jako kontrola).

Listki wyżej wymienionych klonów/odmian zebrano z roślin namnażanych w warunkach polowych i przygotowano jak do standardowego testu listkowego. Przeprowadzono inokulację (Fot. 4) zawiesiną inokulum wybranych izolatów *P. infestans* (MP 324x i 213/20 oraz dodatkowo MP1480) o stężeniu 50 000 sporangiów/ml. Zgodnie z metodyką zainokulowane listki były utrzymywane w kuwetach przez 6 kolejnych dni. W trakcie trwania eksperymentu sukcesywnie pobierano i zabezpieczano tkankę liści do dalszych badań molekularnych.

A B C D

Obraz zawierający pościel

Opis wygenerowany automatycznie Obraz zawierający tort, wewnątrz, biały, pościel

Opis wygenerowany automatycznie Obraz zawierający wewnątrz, zielony

Opis wygenerowany automatycznie Obraz zawierający zielony, porządek, świeże

Opis wygenerowany automatycznie

**Fot. 4.** Przygotowanie materiału do tematu badawczego: A) zainokulowane listki odmiany Bzura; B) listki odmiany Bzura 24h po inokulacji; C) i D) listki odmiany Bzura 4 dni po inokulacji izolatami (odpowiednio) MP 324x i 213/20.

Do badań ekspresji genów R tkankę liściową pobrano i zabezpieczono przed przeprowadzeniem inokulacji, a następnie pobierano ją cyklicznie w pięciu punktach czasowych (24, 48, 72, 96 i 120 h po inokulacji). Listki niektórych odmian/genotypów ziemniaka mogą różnić się wielkością. Dlatego, w celu ujednolicenia ilości tkanki wykorzystanej do izolacji RNA, z każdego zainokulowanego listka przy pomocy korkoboru pobierano jednakowy wycinek tkanki liściowej o średnicy 20 milimetrów (Fot. 4). W każdym punkcie czasowym (terminie) z każdego badanego obiektu pobierano trzy powtórzenia biologiczne, na które składały się wycinki pobrane z dwóch zainokulowanych listków. Wycinki te wkładano do probówki typu eppendorf (2 ml objętości) i zamrażano w ciekłym azocie (Fot. 5). Tak przygotowane próbki przetrzymywano w temperaturze -80oC aż do czasu izolacji RNA.

Obraz zawierający wewnątrz

Opis wygenerowany automatycznie   Obraz zawierający kubek, wewnątrz

Opis wygenerowany automatycznie Obraz zawierający wewnątrz, plastikowy, kontener, torba

Opis wygenerowany automatycznie

**Fot. 5.** Przygotowanie materiału do tematy badawczego: pobieranie i zamrażanie w ciekłym azocie fragmentów zainokulowanej tkanki liściowej.

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów firmy ZymoResearch. Jakość i koncentrację uzyskanego RNA oceniano za pomocą spektrofotometru NanoDrop Lite oraz przy pomocy elektroforezy kapilarnej (aparat Qiaxcel Advanced). Poziom ekspresji genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* określono bazując na metodyce opisanej przez Stefańczyka i współautorów (2017). Otrzymane RNA zostało przepisane na cDNA przy użyciu zestawów Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR firmy Fermentas, wg metody zalecanej przez producenta. Na uzyskanej matrycy cDNA zmierzono ekspresję wybranych genów za pomocą metody RT-qPCR na aparacie Roche LC480. Jako gen referencyjny posłużył gen EF-1α. Do pomiaru poziomu ekspresji genu *Rpi-phu1* wykorzystano marker phu1 (Stefańczyk i inni 2017). Do pomiaru poziomu ekspresji genu *R2/R2-like* wykorzystano markery R2-686, R2-1137 i Rpi-blb3-305. Bazując na metodzie ΔΔCq obliczono relatywny poziom ekspresji genów R w stosunku do genu referencyjnego.

W 2022 roku zbadano poziom ekspresji genów *R2* oraz *Rpi-phu1* dla 3 form rodzicielskich (Bzura, Gardena i TG 97-411) oraz 12 klonów potomnych z próbek pobranych przed inokulacją. Dodatkowo dla 3 form rodzicielskich przeprowadzono ocenę poziomu ekspresji tych genów w 24 h po inokulacji.

**Wyniki**

W wyniku przeprowadzonych prac pozyskano i zabezpieczono materiał do badań zgodnie z założonym schematem doświadczalnym. Zabezpieczono materiał z trzech form rodzicielskich (Bzura, Gardena, TG 97-411) oraz z 9 klonów potomnych reprezentujących wszystkie możliwe kombinacje genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*. Ponadto zabezpieczono materiał z 3 klonów potomnych nieposiadających żadnych genów R. Fragmenty tkanki liściowej zostały pobrane i zabezpieczone w terminie bezpośrednio przed inokulacją oraz w pięciu terminach po inokulacji izolatem MP 324x oraz 213/20. Dodatkowo pobrano próbki zainokulowane wzorcowym izolatem MP 1480, który był awirulentny do obu badanych genów R. Materiał badawczy do badania relatywnego poziomu ekspresji genów R po inokulacji kompatybilnymi i niekompatybilnymi izolatami *P. infestans* został pobrany i zabezpieczony zgodnie z zaplanowanym schematem.

Wyizolowano RNA z fragmentów liści wszystkich badanych obiektów pobranych przed inokulacją oraz dla trzech form rodzicielskich (Bzura, Garden i TG 97-411) pobranych w 24h po inokulacji. Przy wykorzystaniu zestawów firmy ZymoResearch uzyskano RNA o bardzo wysokiej koncentracja (zakres średnich wartości 1239 – 1665 ng/µl) oraz jakości wyrażonej stosunkiem A260/A280 (zakres średnich wartości 1,8 – 2,3). Również oceny integralności wyizolowanego RNA przeprowadzone za pomocą aparatu Qiaxcel Adavnced (współczynnik RIS) były bardzo wysokie i wahały się w zakresie 5,9 – 6,8.

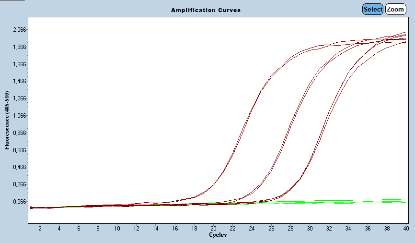
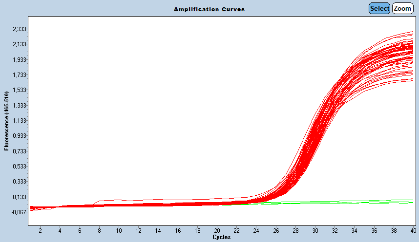
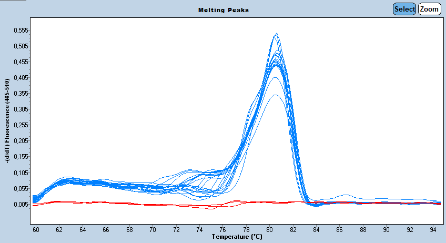
**Tabela 2.1.** Wyniki spektrofotometrycznej oceny ilości i jakości wyizolowanego RNA z próbek uzyskanych z trzech odmian oraz 12 klonów badawczych (wartości średnie).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | koncentracja RNA (ng/µl) | A260/A280 |
| Bzura | 1 290,53 | 1,92 |
| Gardena | 1 347,57 | 2,01 |
| TG 97-411 | 1 239,03 | 2,01 |
| 1 | 1 354,53 | 1,88 |
| 2 | 1 475,77 | 1,79 |
| 3 | 1 422,87 | 1,96 |
| 4 | 1 665,43 | 1,89 |
| 5 | 1 396,33 | 1,99 |
| 6 | 1 468,37 | 2,00 |
| 7 | 1 552,13 | 1,83 |
| 8 | 1 467,67 | 1,88 |
| 9 | 1 267,07 | 2,02 |
| 10 | 1 465,73 | 1,94 |
| 11 | 1 342,33 | 2,03 |
| 12 | 1 396,50 | 1,95 |

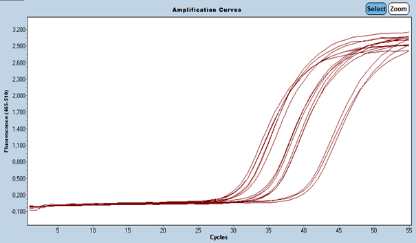
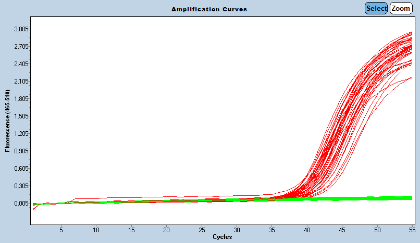
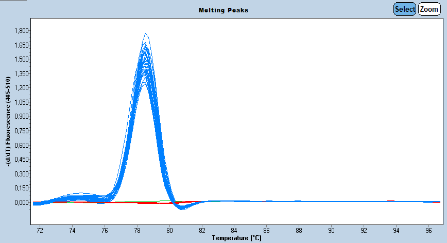
Przy zastosowaniu markera dla wybranego genu referencyjnego obserwowano jego amplifikację dla wszystkich badanych próbek. Średnia wartość współczynnika Cp wynosiła 27,05 przy zakresie 26,0 – 28,3. Nie obserwowano istotnych różnic w poziomie ekspresji tego genu w zależności od badanej odmiany/klonu ziemniaka ani w zależności od terminu pobrania próbki (Ryc. 1 A). Przy zastosowaniu wybranego markera genu *Rpi-phu1* amplifikację produktu obserwowano tylko dla form posiadających ten gen odporności, tj. dla odmiany Gardena, TG 97-411 oraz klonów z grupy I (*Rpi-phu1, R2/R2-like*) i II (*Rpi-phu1*) (Ryc. 1 B). Przy zastosowaniu wybranego markera genu *R2/R2-like* amplifikację produktu obserwowano tylko dla form posiadających ten gen odporności, tj. dla odmiany Bzura oraz klonów z grupy I (*Rpi-phu1, R2/R2-like*) i III (*R2/R2-like*) (Ryc. 1 C). Żaden z markerów nie powodował amplifikacji produktów w próbkach pobranych z klonów z grupy III (bez genów R). Krzywe topnienia produktów wszystkich zastosowanych markerów potwierdzają amplifikację pojedynczego produktu dla każdego z badanych markerów.

Porównanie poziomu relatywnej ekspresji genu *Rpi-phu1* w odmianie Gardena i klonie TG 97-411 w próbkach pobranych przed inokulacją oraz w 24 h po inokulacji wykazało spadek w poziomie ich ekspresji, niezależnie od użytego izolatu (średnie wartości współczynnika 2-ΔΔCt w zakresie 0,1 – 0,8). Natomiast w przypadku odmiany Bzura w przypadku inokulacji awirulentnym izolatem MP 324x stwierdzono spadek ekspresji genu *R2/R2-like* (średnia wartość współczynnika 2-ΔΔCt równa 0,8) natomiast po inokulacji wirulentnym izolatem 213/20 obserwowano wzrost ekspresji genu *R2/R2-like* (średnia wartość współczynnika 2-ΔΔCt wynosiła 1,9).

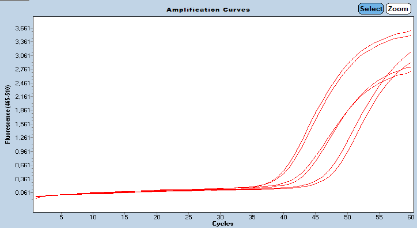
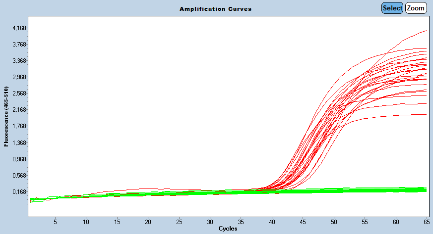
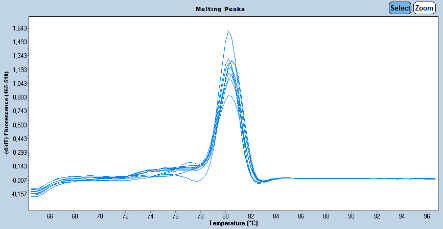
A

B

C

**Ryc. 1.** Wykresy krzywej wzorcowej, amplifikacji produktu dla wybranych form oraz krzywe topnienia produktów dla markerów A) genu referencyjnego, B) genu *Rpi-phu1*, C) genu *R2/R2-like*.

**Dyskusja**

Początkowo planowano rozpoczęcie pobierania próbek do badań w terminie 12 h po inokulacji, jednak nowe dane dostępne w literaturze wskazują, że uzasadnionym jest rozpoczęcie pobierania próbek w 24 h po inokulacji. Dlatego też zrezygnowano z pobierania prób z terminu 12h po inokulacji. W to miejsce dodano termin 120 h po inokulacji wydłużając czas badania. Liczba terminów pozostała bez zmian.

Opracowana na potrzeby tego tematu metodyka pobierania i zabezpieczania materiału roślinnego do badań jest w pełni zadowalająca. Zastosowana metoda izolacji RNA pozwoliła na uzyskanie dużych ilości RNA o bardzo dobrej jakości. Jakość ta pozwoliłaby na wykorzystanie tych próbek do tworzenia bibliotek i sekwencjonowanie RNA, bez dodatkowego oczyszczania. Wstępne próby wskazują, że ta sama metoda może zostać wykorzystana także do izolacji problematycznych prób z tkanki pobranej z bulw ziemniaka. Oba zastosowane markery spełniają swoje zadanie i amplifikują pojedynczy produkt wyłącznie w próbkach pobranych z obiektów badawczych posiadających odpowiednie geny. Porównanie poziomu relatywnej ekspresji badanych genów R w 24 h po inokulacji wskazuje na spadek poziomu ekspresji genu *Rpi-phu1*  po inokulacji wirulentnym i awirulentnym izolatem *P. infestans*. Natomiast w odmianie Bzura odnotowano spadek ekspresji genu *R2/R2-like* po inokulacji awirulentnym izolatem i wzrost po inokulacji wirulentnym izolatem *P infestans.* Z danych literaturowych wynika, że w pierwszym dniu po inokulacji obserwowane są zarówno spadki jak i wzrosty ekspresji badanych genów R (Stefańczyk i inni 2017, Śliwka i inni 2013, Pel 2010). Wskazana jest jednak weryfikacja tych wyników z użyciem innych markerów tych genów i/lub z użyciem innego genu referencyjnego.

**Wnioski**

* Zabezpieczono materiał badawczy do analizy ekspresji wybranych genów R w liściach badanych klonów/odmian ziemniaka, zaplanowanej w dalszych etapach realizacji projektu.
* Wyizolowano dobrej jakości RNA z wybranych form ziemniaka, zgodnie z zaplanowanym schematem doświadczalnym.
* Określono relatywny poziomu ekspresji genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* dla wybranych obiektów w jednym lub dwóch punktach czasowych.

Mierniki dla tematu badawczego 2:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik[[3]](#footnote-3) | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 2.1 | Liczba klonów/odmian ziemniaka zabezpieczonych do analizy ekspresji wybranych genów R | 15 | 15 |
| 2.2 | Liczba punktów czasowych po inokulacji, dla których zostanie zabezpieczony materiał badawczy do analiza ekspresji genów R klonów/odmian ziemniaka inokulowanych izolatami *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji | 5 | 5 |
| 2.3 | Liczba punktów czasowych, dla których zostanie przeprowadzona analiza ekspresji genów R dla wybranych klonów/odmian ziemniaka inokulowanych izolatami *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji | 2 | 2 |

**3.3 Temat badawczy 3**

**Cel tematu badawczego 3**

Główny celem tego tematu badawczego w roku 2022 było uzyskanie i zabezpieczenie materiału badwczego do analizy ekspresji wybranych genów R w bulwach badanych klonów/odmian ziemniaka (metoda RT qPCR) oraz uzysakanie i zabezpieczenie materiału badwczego do przeprowadzenia różnicowej analizy ekspresji genów w wybranych formach ziemniaka (metoda RNA-seq).

Zaplanowany cel został w całości osiągnięty.

**Materiały i metody**

Materiał badawczy stanowiły rośliny odmiany Bzura (*R2-like*), Gardena (*Rpi-phu1*) i klonu TG 97-411 (*Rpi-phu1*). Materiał badawczy stanowiło także 12 wytypowanych uprzednio klonów ziemniaka pochodzących z dwóch kombinacji krzyżówkowych donorów genu *R2-like* (odmiany Bzura) oraz genu *Rpi-phu1* (odmiany Gardena i klonu TG 97-411). Badane formy reprezentowały wszystkie możliwe kombinacje genów R w tym potomstwie:

* 3 klony posiadające oba geny odporności *R2-like* i *Rpi-phu1*;
* 3 klony posiadające jedynie gen *R2-like*;
* 3 klony posiadające jedynie gen *Rpi-phu1*;
* oraz dodatkowo 3 klony nieposiadające żadnego z tych genów R (jako kontrola).

Z bulw wytypowanych odmian/klonów wycinano równe plastry grubości ~9 mm. Następnie z plastrów powstałych z pocięcia całych bulw, za pomocą korkoboru wycinano okrągłe plastry o średnicy 27 mm (Fot 6). Następnie pomiędzy dwa tak uzyskane okrągłe plastry nanoszono kroplę zawiesiny inokulacyjnej o koncentracji 50 000 sporangiów/ml i następnie próby traktowano jak przy zwykłym teście plastrowym. Do inokulacji wykorzystano izolaty MP 324x oraz 213/20, oraz dodatkowo wzorcowy izolat MP 1480, który był awirulentny do obu badanych genów R. Z tak przygotowanych plastrów pobierano fragmenty tkanki do izolacji RNA niezbędnego do dalszych badań. Fragmenty te pozyskiwano również za pomocą korkoboru, lecz o średnicy 5 mm, po trzy fragmenty z każdego plastra (Fot. 6). Do dalszych badań zabezpieczano fragmenty tkanki bulw pozyskane przed przeprowadzeniem inokulacji oraz zabezpieczano ją cyklicznie w pięciu punktach czasowych po inokulacji (24, 48, 72, 96 i 120 h). W każdym punkcie czasowym (terminie) z każdego badanego obiektu pobierano trzy powtórzenia biologiczne, na które składały się wycinki pobrane z dwóch zainokulowanych plastrów. Wycinki te wkładano do probówki typu eppendorf (2 ml objętości) i zamrażano w ciekłym azocie (Fot. 6). Tak przygotowane próbki są przetrzymywane w temperaturze -80oC, aż do czasu izolacji RNA.

Ze względu na wyniki testów plastrowych przeprowadzonych w temacie badawczym 1 przeprowadzono podobną procedurę dla tych samych obiektów inokulowanych zawiesiną o koncentracji 25 000 sporangiów/ml (eksperyment w toku).

Obraz zawierający wewnątrz, taca, liniowany, zdobione

Opis wygenerowany automatycznieObraz zawierający osoba

Opis wygenerowany automatycznie

Obraz zawierający wewnątrz, zbiornik, wanna

Opis wygenerowany automatycznieObraz zawierający tekst, torba, plastikowy, zawinięte

Opis wygenerowany automatycznie

**Fot. 6.** Przygotowanie materiału do tematu badawczego: pobieranie i zamrażanie w ciekłym azocie fragmentów tkanki bulw ziemniaka z zainokulowanych uprzednio plastrów bulw.

**Wyniki**

Zgodnie z planem pobrano i zabezpieczono materiał do dalszych badań ze wszystkich wytypowanych genotypów w terminie przed inokulacją oraz w pięciu punktach czasowych (terminach) po inokulacji (24, 48, 72, 96 i 120 h). Przy okazji pobierania i zabezpieczania próbek tkanki zaobserwowano (podobnie jak w temacie badawczym 1) niższy od obserwowanego wcześniej poziom odporności bulw warunkowanej genem *Rpi-phu1*.

**Dyskusja**

Zabezpieczony materiał badawczy posłuży zarówno do określenia poziomu ekspresji genów *Rpi-phu1* i *R2/R2-like* w wyznaczonych punktach czasowych po inokulacji kompatybilnymi i niekompatybilnymi izolatami *P. infestans*, jak również do zaplanowanej analizy różnicowej transkryptomu (metoda RNA-seq). Fenotypowe objawy obserwowane na badanych formach ziemniaka po inokulacji zawiesiną o koncentracji 50 000 sporangiów/ml były zbliżone do tych otrzymanych w temacie badawczym 1, tzn. odporność bulw warunkowana genem *Rpi-phu1* nie była krańcowo wysoka (jak obserwowano to w latach ubiegłych). Dlatego, aby wykluczyć zbyt wysoką koncentrację zawiesiny inokulacyjnej, eksperyment powtórzono z obniżoną koncentracją zawiesiny inokulacyjnej (eksperyment w toku). Ponadto nie wyklucza się przeprowadzenia ponownej inokulacji w roku przyszłym z użyciem nieco innego materiału badawczego (w tym również innych izolatów *P. infestans*)

**Wnioski**

* Zabezpieczono materiał badawczy do analizy ekspresji wybranych genów R w bulwach badanych klonów/odmian ziemniaka (metoda RT qPCR) zaplanowanej w dalszych etapach realizacji projektu.
* Zabezpieczono materiał badawczy niezbędny do przeprowadzenia różnicowej analizy ekspresji genów w wybranych formach ziemniaka zaplanowanej w dalszych etapach realizacji projektu.

Mierniki dla tematu badawczego 3:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik[[4]](#footnote-4) | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 3.1 | Liczba klonów/odmian ziemniaka zabezpieczonych do analizy ekspresji wybranych genów R | 15 | 15 |
| 3.2 | Liczba punktów czasowych po inokulacji, dla których zostanie zabezpieczony materiał badawczy do analiza ekspresji genów R (metoda RT qPCR) klonów/odmian ziemniaka inokulowanych izolatami *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji | 5 | 5 |
| 3.3 | Liczba punktów czasowych po inokulacji, dla których zostanie zabezpieczony materiał badawczy do przeprowadzenia różnicowej analizy ekspresji genów w wybranych formach ziemniaka (metoda RNA-seq). | 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 |
|  |  |  |  |  |
| Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych | | | |  |
| lp. | monografia/czasopismo | publikacja[[6]](#footnote-6) | Liczba publikacji podana w opisie zadania | Liczba publikacji zrealizowana |
|  |  |  |  |  |

Załączniki[[7]](#footnote-7):

1. 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 klonów/odmian ziemniaka oceniana pod względem odporności naci (test listkowy) | 80 | 80 | 100% |
| 1.2 | Liczba klonów/odmian ziemniaka oceniana pod względem odporności bulw (test plastrowy) | 69 | 69 | 100% |
| 1.3 | Liczba izolatów *P infestans* o określonym profilu wirulencji wykorzystanych do badań odporności | 2 | 2 | 100% |
| temat badawczy 2 | | | | |
| 2.1 | Liczba klonów/odmian ziemniaka zabezpieczonych do analizy ekspresji wybranych genów R | 15 | 15 | 100% |
| 2.2 | Liczba punktów czasowych po inokulacji, dla których zostanie zabezpieczony materiał badawczy do analiza ekspresji genów R klonów/odmian ziemniaka inokulowanych izolatami *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji | 5 | 5 | 100% |
| 2.3 | Liczba punktów czasowych, dla których zostanie przeprowadzona analiza ekspresji genów R dla wybranych klonów/odmian ziemniaka inokulowanych izolatami *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji | 2 | 2 | 100% |
| temat badawczy 3 | | | | |
| 3.1 | Liczba klonów/odmian ziemniaka zabezpieczonych do analizy ekspresji wybranych genów R | 15 | 15 | 100% |
| 3.2 | Liczba punktów czasowych po inokulacji, dla których zostanie zabezpieczony materiał badawczy do analiza ekspresji genów R (metoda RT qPCR) klonów/odmian ziemniaka inokulowanych izolatami *P. infestans* o pożądanym profilu wirulencji | 5 | 5 | 100% |
| 3.3 | Liczba punktów czasowych po inokulacji, dla których zostanie zabezpieczony materiał badawczy do przeprowadzenia różnicowej analizy ekspresji genów w wybranych formach ziemniaka (metoda RNA-seq). | 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)