

Sprawozdanie z Zadania na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej za rok 2023

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



Nr Zadania: 30; Nr zadania 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 2023 roku:

Jarosław Plich, Beata Tatarowska, Dorota Milczarek, Mirosława Łukasiewicz, Irena Bazylak, Małgorzata Słomska, Kamila Tkaczyk

## Cele projektu na 2023 rok

1. Utrzymywanie i namnażanie materiału roślinnego do badań oraz przeprowadzenie oceny odporności wybranych odmian/klonów ziemniaka w teście listkowym i plastrowym przy wykorzystaniu izolatów *P. infestans* o różnym profilu wirulencji.  
Cel zrealizowano
2. Izolacja RNA oraz ocena relatywnego poziomu ekspresji badanych genów R w liściach i bulwach badanych klonów/odmian ziemniaka.  
Cel zrealizowano
3. Izolacja RNA oraz przeprowadzenie analizy różnicowej ekspresji genów (sekwencjonowanie transkryptomu metodą RNA-seq).  
Cel zrealizowano

# Materiał i metody

## Temat badawczy 1

**a) Materiał:** 3 formy rodzicielskie / donory genów R: Bzura, Gardena, TG 97-411; 12 klonów ziemniaka pochodzących z krzyżowania donorów genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*; 11 testerów Black'a; 20 klonów/odmian ziemniaka; 3 izolaty *P. infestans* o różnym profilu wirulencji + 1 izolat dodatkowy

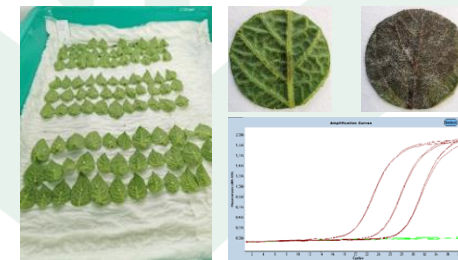
**b) Metody:** fenotypowa ocena odporności naci (test listkowy) i bulw (test plastrowy)



## Temat badawczy 2

**a) Materiał:** Próbkki tkanki liści 3 odmian ziemniaka (Bzura, Gardena, TG 97-411) oraz 12 klonów potomnych, inokulowanych wybranymi izolatami *P. infestans*, zabezpieczone w pięciu punktach czasowych po inokulacji

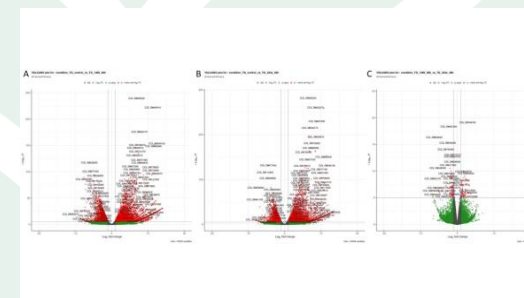
**b) Metody:** izolacja RNA, przepisanie RNA na cDNA (reverse transcription), Real Time qPCR,  $\Delta\Delta Ct$



## Temat badawczy 3

**a) Materiał:** Próbkki tkanki bulw 3 odmian ziemniaka (Bzura, Gardena, TG 97-411) oraz klonu potomnego DC-69, inokulowanych wybranymi izolatami *P. infestans*, zabezpieczone w pięciu punktach czasowych po inokulacji

**b) Metody:** izolacja RNA; sekwencjonowanie NovaSeq6000 (Illumina), PE 150, 20 mln par odczytów; obróbka bioinformatyczna i porównanie wyników wg zaplanowanego schematu



# Wyniki i wnioski

## Temat badawczy 1

### - Testy listkowe

#### - Potwierdzenie profilu wirulencji wytypowanych izolatów *P. infestans*:

- 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*
- Izolat MP 1480 (wzorzec) awirulentny w stosunku do obu genów *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*

#### - Weryfikacja efektywności badanych genów w warunkowaniu odporności naci:

- Bzura (i klony posiadające *R2/R2-like*): odporne na MP 324x i MP 1480, podatne na 213/20
- Gardena, TG 97-411 (i klony posiadające *Rpi-phu1*): odporne na 213/20 i MP 1480, podatne na MP 324x
- Klony posiadające *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*: odporne na trzy izolaty

### - Testy plastrowe

#### - Weryfikacja efektywności badanych genów w warunkowaniu odporności bulw:

- Bzura (i klony posiadające *R2/R2-like*): podatne na 213/20, MP 324x, średnio podatne na MP 1480
- Gardena: podatna na trzy izolaty
- TG 97-411 (i klony posiadające *Rpi-phu1*): podatne na MP 324x i 213/20, wysoka odporność na MP 1480
- Klony posiadające *R2/R2-like* i *Rpi-phu1*: średnio odporne na MP 324x i 213/20, wysoka odporność na MP 1480

### Po inokulacji kompatybilnym izolatem *P. infestans*

- *R2/R2-like*: liście – bardzo wysoki poziom odporności; bulwy – podatne
- *Rpi-phu1*: liście – bardzo wysoki poziom odporności; bulwy – zróżnicowany poziom odporności

# Wyniki i wnioski

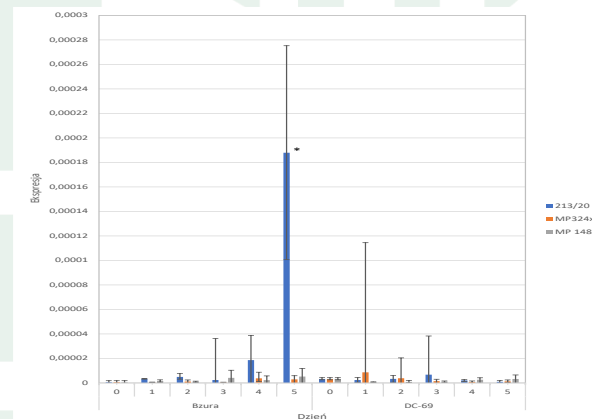
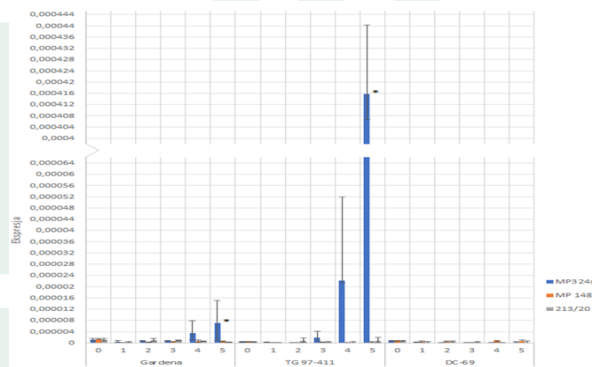
## Temat badawczy 2

### - Ekspresja genu *Rpi-phu1*:

- po inokulacji izolatami awirulentnymi (MP1480, 213/20)
  - **Gardena**: brak istotnych różnic w poziomie ekspresji we wszystkich punktach czasowych
  - **TG 97-411**: brak istotnych różnic w poziomie ekspresji we wszystkich punktach czasowych
  - **DC-69**: brak istotnych różnic w poziomie ekspresji we wszystkich punktach czasowych
- po inokulacji wirulentnym izolatem (MP 324x)
  - **Gardena**: wzrost poziomu relatywnej ekspresji w 4 i 5 dpi
  - **TG 97-411**: wzrost poziomu relatywnej ekspresji w 4 i 5 dpi
  - **DC-69**: brak istotnych różnic w poziomie ekspresji we wszystkich punktach czasowych

### - Ekspresja genu *R2/R2-like*

- po inokulacji izolatami awirulentnymi (MP 1480, MP 324x)
  - Bzura: brak istotnych różnic w poziomie ekspresji we wszystkich punktach czasowych
  - DC-69: brak istotnych różnic w poziomie ekspresji we wszystkich punktach czasowych
- po inokulacji wirulentnym izolatem (213/20)
  - Bzura: wzrost poziomu relatywnej ekspresji w 4 i 5 dpi
  - DC-69: brak istotnych różnic w poziomie ekspresji we wszystkich punktach czasowych



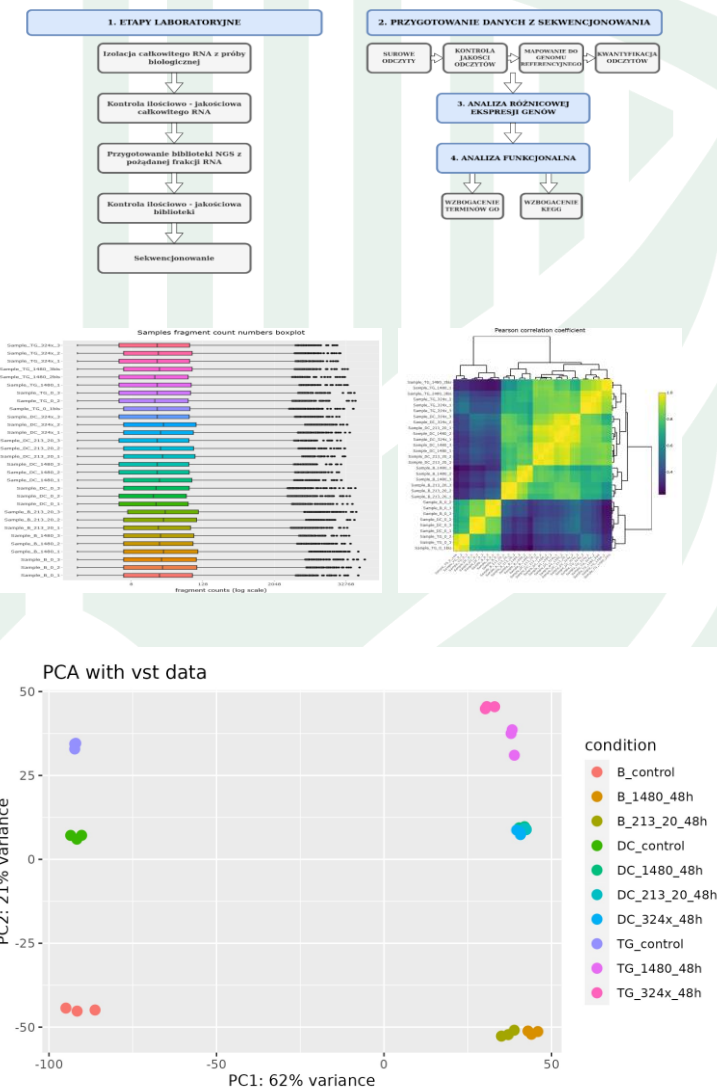
### ***Rpi-phu1* i *R2/R2-like***

- po inokulacji awirulentnymi izolatami - brak istotnych zmian poziomu relatywnej ekspresji;
- po inokulacji izolatami wirulentnymi - wzrost relatywnej ekspresji w 4 i 5 dniu po inokulacji;
- **DC-69 (*Rpi-phu1* i *R2/R2-like*)** - brak istotnych zmian ekspresji bez względu na użyty izolat.

# Wyniki i wnioski

## Temat badawczy 3

- Z powodzeniem przeprowadzono wszystkie etapy założonego schematu analizy RNA-seq
- Uzyskano wysokiej jakości wyniki sekwencjonowania, które pozwoliły na przeprowadzenie właściwej analizy bioinformatycznej. Przeprowadzono wstępne analizy dla całości uzyskanych danych oraz porównania profili ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi grupami próbek.
- Analiza PCA całości danych: dwie pierwsze składowe główne tłumaczą ponad 83% obserwowanej zmienności ekspresji genów pomiędzy badanymi próbkami.



# Wyniki i wnioski

## Temat badawczy 3

### BZURA

#### Schemat porównań

Próbki w trzech powtórzeniach	Zbiorcza nazwa próbek	Porównania	
Bzura_0_1	B_control		
Bzura_0_2			
Bzura_0_3			
Bzura_1480_48h_1	B_1480_48h	B_control	vs B_1480_48h
Bzura_1480_48h_2		B_control	vs B_213/20_48h
Bzura_1480_48h_3		B_1480_48h	vs B_213/20_48h
Bzura_213/20_48h_1	B_213/20_48h		
Bzura_213/20_48h_2			
Bzura_213/20_48h_3			

### TG 97-411

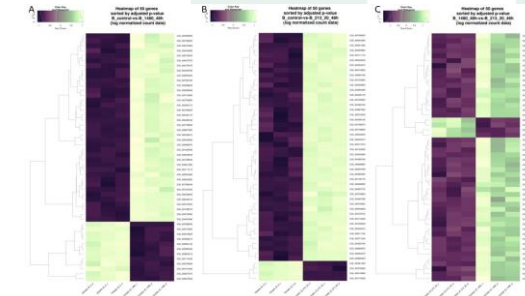
#### Schemat porównań

Próbki w trzech powtórzeniach	Zbiorcza nazwa próbek	Porównania	
TG_0_1	TG_control		
TG_0_2			
TG_0_3			
TG_1480_48h_1	TG_1480_48h	TG_control	vs TG_1480_48h
TG_1480_48h_2		TG_control	vs TG_324x_48h
TG_1480_48h_3		TG_1480_48h	vs TG_324x_48h
TG_324x_48h_1	TG_324x_48h		
TG_324x_48h_2			
TG_324x_48h_3			

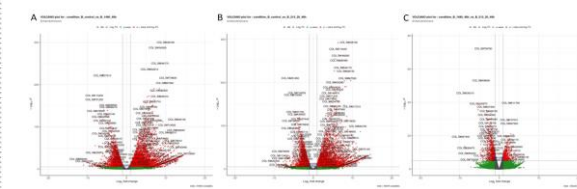
#### PCA



#### Heatmap



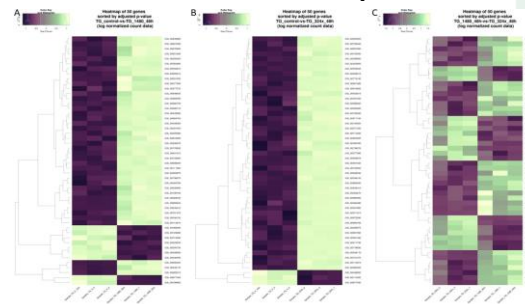
#### Volcano Plot



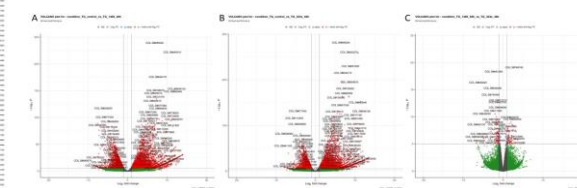
#### PCA



#### Heatmap



#### Volcano Plot



# Wyniki i wnioski

## Temat badawczy 3

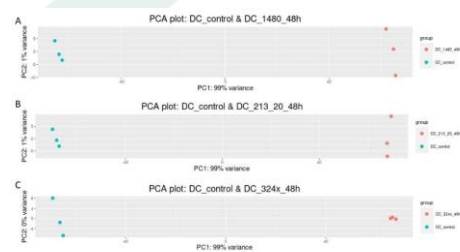
### DC-69

#### Schemat porównań

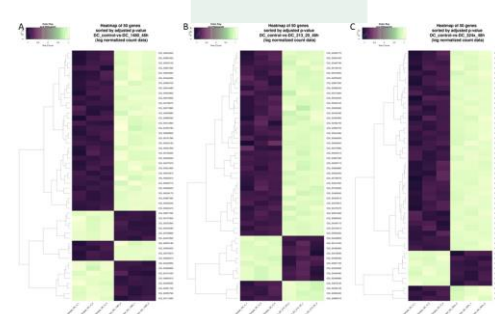
Próbki w trzech powtórzeniach	Zbiorna nazwa próbek	Porównania	
DC_0_1	DC_control		
DC_0_2			
DC_0_3			
DC_1480_48h_1	DC_1480_48h	DC_control	vs DC_1480_48h
DC_1480_48h_2		DC_control	vs DC_213/20_48h
DC_1480_48h_3		DC_control	vs DC_324x_48h

DC_213/20_48h_1	DC_213/20_48h	DC_1480_48h	vs DC_213/20_48h
DC_213/20_48h_2		DC_1480_48h	vs DC_324x_48h
DC_213/20_48h_3		DC_324x_48h	vs DC_213/20_48h
DC_324x_48h_1	DC_324x_48h		
DC_324x_48h_2			
DC_324x_48h_3			

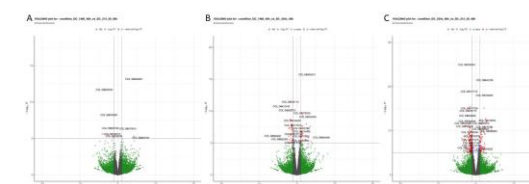
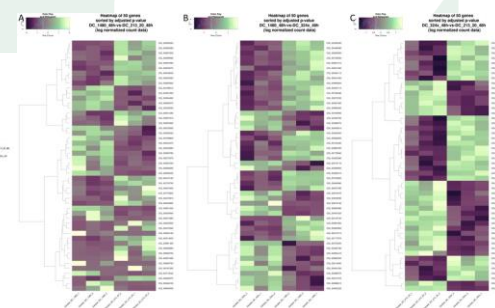
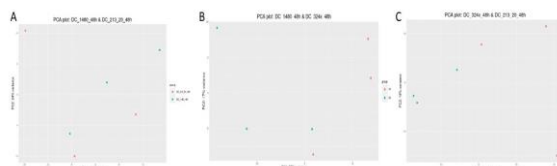
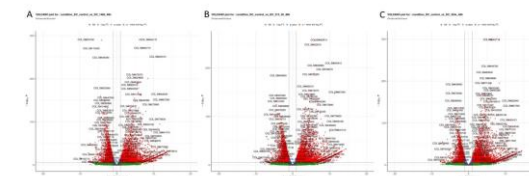
#### PCA



#### Heatmap



#### Volcano Plot



Wyniki wstępnej analizy porównawczej uzyskanych wyników wskazują na występowanie wyraźnych różnic w ekspresji pomiędzy próbkami pobranymi przed inokulacją, w porównaniu do próbek pobranych z bulw inokulowanych *P. infestans*. Nieco mniej wyraźne, lecz nadal istotne różnice występują pomiędzy próbkami bulw inokulowanych poszczególnymi izolatami *P. infestans*.



## Prezentacja wyników:

EAPR, Pathology & Pests Section Meeting, 3-6 września, 2023, Arras, Francja

Plich J., Milczarek D., Tatarowska B., Sobkowiak S.

**,Expression of selected potato *R* genes in compatible and incompatible interaction with *P. infestans* isolates' (Poster)**

Radzików  
05-870 Błonie  
tel. +48 22 733 45 00  
NIP: 5290007029  
REGON: 000079480  
e-mail: [postbox@ihar.edu.pl](mailto:postbox@ihar.edu.pl)  
[www.ihar.edu.pl](http://www.ihar.edu.pl)

**Jarosław Plich**

IHAR-PIB Odział w Młochowie  
Zespół Metodyki Hodowli  
tel. +48 22 729 92 48  
e-mail: [j.plich@ihar.edu.pl](mailto:j.plich@ihar.edu.pl)