

Kompleksowe badania odporności owsa na choroby grzybowe ze szczególnym uwzględnieniem *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*

Numer zadania: 15

Okres realizacji: 2021 - 2027

Wykonawcy projektu:

dr hab. Edyta Paczos-Grzęda, prof. uczelni – kierownik projektu (edyta.paczos@up.lublin.pl)

dr inż. Sylwia Sowa

mgr inż. Aneta Koroluk

mgr inż. Joanna Toporowska

**Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii
Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**

dr hab. Maja Boczkowska, prof. IHAR

mgr Paulina Bolc

mgr Sylwia Kowalik

mgr Marta Puchta-Jasińska

**IHAR Radzików, Krajowe Centrum Roślinnych
Zasobów Genowych**

prof. dr hab. Edyta Skrzypek

dr Michał Dziurka

dr Katarzyna Juzoń

Instytut Fizjologii Roślin, PAN, Kraków



Lp.	Cele projektu:	Czy cel został zrealizowany
1	Opracowanie testu umożliwiającego kompleksową ocenę odporności APR owsa na <i>P. coronata</i> , <i>P. graminis</i> oraz <i>B. graminis</i> .	TAK
2	Testowanie markerów molekularnych dla genu odporności na rdzę koronową <i>Pc59</i> .	TAK
3	Sekwencjonowanie bibliotek uzyskanych dla linii bliskoizogenicznych <i>Pc39/pc39</i> po infekcji <i>P. coronata</i> i złożenie transkryptomu.	CZĘŚCIOWO*

* Nadal trwają szczegółowe analizy transkryptomyczne, które zakończą się w ciągu najbliższych 3 tygodni.



Materiał i metody

Temat badawczy 1

Materiał:

- Linie o podwyższonej odporności na *Puccinia coronata*, *Puccinia graminis* i *Blumeria graminis* w warunkach polowych i braku odporności w stadium siewki – potencjalnie posiadające APR (*adult plant resistance*)
- Scharakteryzowane pod względem wirulencji izolaty *Puccinia coronata*, *Puccinia graminis*, *Blumeria graminis*

Metody:

- Test żywiciel patogen na płytkach na fragmentach liści z roślin 10-dniowych, 5-tygodniowych i 8-tygodniowych
- Test żywiciel patogen na całych roślinach 10-dniowych, 5-tygodniowych i 8-tygodniowych

Temat badawczy 2

Materiał:

- populacje mapujące F_3 : 650 (Pc59K × Breton), 707 (Kasztan × Pc59K), 977 (Celer × Pc59K), 990 (Kasztan × Pc59K)
- populacja F_5 Kasztan × Pc60

Metody:

- Klasyczny PCR
- KASP - Kompetitive Allele Specific PCR
- System TaqMan

Temat badawczy 3

Materiał:

- Linie bliskoizogeniczne z/bez genu *Pc39*

Metody:

- Izolacja RNA
- Walidacja bibliotek do RNA-seq
- Sekwencjonowanie NovaSeq Illumina

Temat badawczy 1	Opracowanie testu umożliwiającego ocenę odporności warunkowanej genami APR owsa na <i>P. coronata</i>, <i>P. graminis</i> oraz <i>B. graminis</i>
<ul style="list-style-type: none"> Dobór fazy wzrostu roślin, odpowiednich izolatów oraz warunków testu umożliwiającego kompleksową ocenę odporności owsa warunkowanej genami APR na <i>P. coronata</i>, <i>P. graminis</i> oraz <i>B. graminis</i>. 	

Wyniki

Na podstawie profilowania wirulencji izolatów wyprowadzonych z populacji poszczególnych patogenicznych grzybów wyselekcjonowano 9 patotypów (3 – *Pc*, 3 – *Pg* i 3 – *Bg*), które wykorzystywano w testach żywiciel – patogen do identyfikacji APR (Tab. 1).

W pierwszej fazie doświadczenia mającego na celu opracowanie testu umożliwiającego ocenę odporności owsa warunkowanej genami APR na *P. coronata* w obrębie posiadanych materiałów wyselekcjonowano genotypy potencjalnie charakteryzujące się APR. Doboru dokonano w oparciu o dostępne informacje literaturowe lub obserwacje własne.

Tab. 1. Izolaty *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* wybrane do analiz

Gatunek patogenu	Skrót literowy	Nazwa izolatu
<i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Pc</i>	1. <i>Pc</i> _257
		4. <i>Pc</i> _1.94(63)
		5. 241/19
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Pg</i>	1. <i>Pg</i> _Cz_08/21 1/6
		2. <i>Pg</i> _Cz_1/6
		3. <i>Pg</i> _Pol 2.1 1/6
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Bg</i>	1. <i>Pm</i> _Cz_17/5a
		2. <i>Pm</i> _Pol_18 2/5
		3. <i>Pm</i> _Aber T <i>Pm</i> 5a

We wstępnym zestawie znalazły się 4 linie australijskie i 5 linii izraelskich oraz trzy genotypy *A. sterilis* CAV 1387 *Pc*69, PI 298129 *Pc*72, PI 309560 *Pc*73 potencjalnie posiadające APR (Tab. 2).

Tab. 2. Linie z potencjalnymi genami APR warunkującymi odporność na *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* i *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* wybrane do testu

Potencjalne APR vs.					
<i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i>			<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>		<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>
<i>Arab</i>	<i>LU 456</i>	<i>S48</i>	<i>LU 11</i>	<i>LU 480</i>	<i>Bufflo</i>
<i>D101</i>	<i>LU 478</i>	<i>S76</i>	<i>LU 323</i>	<i>LU 482</i>	<i>Canyon</i>
<i>D17</i>	<i>LU 499</i>	<i>S97</i>	<i>LU 389</i>	<i>LU 504</i>	<i>LU 11</i>
<i>D38</i>	<i>LU 503</i>	<i>S99</i>	<i>LU 448</i>	<i>LU 505</i>	<i>LU 386</i>
<i>D49</i>	<i>LU 505</i>	<i>RIL AUS 46</i>	<i>LU 451</i>	<i>LU 509</i>	<i>LU 478</i>
<i>D53</i>	<i>LU 548</i>	<i>RIL AUS 48</i>	<i>LU 452</i>	<i>LU 523</i>	<i>LU 482</i>
<i>D96</i>	<i>LU 552</i>	<i>RIL AUS 54</i>	<i>LU 470</i>	<i>LU 604</i>	<i>Quoll</i>
<i>LU 11</i>	<i>LU 555</i>	<i>RIL AUS 63</i>	<i>LU 478</i>	<i>LU 605</i>	<i>Pm9</i>
<i>LU 271</i>	<i>LU 579</i>	<i>RIL ISR 8</i>	<i>LU 479</i>	<i>Possum</i>	<i>Pm10</i>
<i>LU 272</i>	<i>LU 580</i>	<i>RIL ISR 22</i>			
<i>LU 326</i>	<i>LU 593</i>	<i>RIL ISR 37</i>			
<i>LU 354</i>	<i>NAM 6</i>	<i>RIL ISR 39</i>			
<i>LU 372</i>	<i>Ogle 1040</i>	<i>RIL ISR 44</i>			
<i>LU 380</i>	<i>P96</i>	<i>CAV 1387 Pc69</i>			
<i>LU 387</i>	<i>S33</i>	<i>PI 298129 Pc72</i>			
<i>LU 396</i>	<i>S36</i>	<i>PI 309560 Pc73</i>			
<i>LU 401</i>	<i>S39</i>				

Temat badawczy 1
**Opracowanie testu umożliwiającego ocenę odporności warunkowanej genami
APR owsa na *P. coronata*, *P. graminis* oraz *B. graminis***
Wyniki

Celem doświadczenia było określenie czy jest możliwa identyfikacja odporności typu APR w teście na fragmentach liści na płytkach lub na całych roślinach w warunkach fitotronowych. Kolejnym celem było stwierdzenie czy wyniki uzyskiwane w teście na płytkach są tożsame z wynikami uzyskiwanymi w teście na całych roślinach.

W doświadczeniu przeprowadzonym dla rdzy koronowej i 7 linii potencjalnie zawierających APR: RIL AUS 46, RIL AUS 48, RIL AUS 54, RIL AUS 63, RIL ISR 22, RIL ISR 37, i RIL ISR 44 wyniki uzyskane w teście na całych roślinach (Tab. 3) były porównywalne do otrzymanych w teście prowadzonym na fragmentach liści, niemniej jednak reakcja obserwowana na całej roślinie była bardziej wyraźna, aniżeli na fragmentach liści. Zgodnie z oczekiwaniami obserwowano różnice w porażeniu poszczególnych liści w zależności od ich położenia na roślinie, podobnie jak w teście na płytkach, niemniej jednak ocenie można było poddać również ogólną kondycję rośliny, co było niewykonalne w przypadku testów płytkowych. Kolejną zaletą testu na roślinie była bardziej wyraźna reakcja roślin 8-tygodniowych, która w przypadku linii RIL AUS 701354, RIL AUS 701363, RIL ISR 637.22 czy RIL ISR 637.44 była zdecydowanie różna i w skali Murphy'ego oceniona od 0 do 2, aniżeli roślin 5-tygodniowych, w przypadku których reakcję oceniono na 3 lub nawet 4, co wskazywałoby na dużą wrażliwość jeszcze na tym etapie wzrostu.

Tab. 3. Odpowiedź roślin reprezentujących linie z potencjalnymi genami APR warunkującymi odporność na rdzę koronową owsa na porażenie wybranymi izolatami *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Ocena reakcji na porażenie przedstawiona została jako dominujący typ reakcji obserwowany na 10 roślinach. Oznaczenia N i n są równoznaczne.

Linia	Izolat	254		194. (63)		241	
		1 powt.	2 powt.	1 powt.	2 powt.	1 powt.	2 powt.
RIL AUS 701346	10 dni	4	4	4	4	3	3
	5 tyg.	2;n	3;	4	4	3;N	2;N
	8 tyg.	2;	3;	3	2	2;n	1;N
	8 tyg.	2;	3;	2;N	2	1;N	1;N
RIL AUS 701348	10 dni	4	4	4	4	0	0
	5 tyg.	4	4	4;N	4;N	0	0;
	8 tyg.	2	2	3;N	2;N	0;N	0;N
	8 tyg.	2;	2;	3;N	2;N	0	0
RIL AUS 701354	10 dni	4	4	4	4	0;n	0;
	5 tyg.	4;	4	4	4/4C	0;	0;
	8 tyg.	2	2;	2	2;n	0N	0
	8 tyg.	2	2;	1;N	1;N	0	0;
RIL AUS 701363	10 dni	4	4	4	3	0;	0;
	5 tyg.	2	3;N	4;N	4;N	0;	0;
	8 tyg.	1;N	1;	1;N	1;	0N	0
	8 tyg.	1;N	1;n	1;	0;N	0	0
RIL ISR 637.22	10 dni	4	4	4	3	3	4;
	5 tyg.	3;N	3	3	3;	3;N	3;N
	8 tyg.	0;N	0;	1;N	1	1	1;N
	8 tyg.	0;N	0;N	1;N	1;N	1;N	1;
RIL ISR 637.37	10 dni	3	4	0;	0;	0;n	0;N
	5 tyg.	2;N	3	0;	0;N	0;N	0;N
	8 tyg.	0;N	1;N	0	0	0	0;
	8 tyg.	1;N	0;	0;N	0Z	0	0
RIL ISR 637.44	10 dni	0;N	0;	3;	4	3	3;
	5 tyg.	0;N	0;N	3	3	3;N	3;
	8 tyg.	0;N	0;N	1;N	1N	1;N	1;N
	8 tyg.	0;N	0;N	1;N	1;N	1;	1N

Temat badawczy 1
Opracowanie testu umożliwiającego ocenę odporności warunkowanej genami APR owsa na *P. coronata*, *P. graminis* oraz *B. graminis*
Wyniki

Aby zwalidować metodykę testu mającego na celu ocenę odporności owsa warunkowanej genami APR na *P. coronata* i określić jego przydatność do pracy z genami APR warunkującymi odporność na *P. graminis* i *B. graminis* przeprowadzono doświadczenie wykorzystując materiały o nieudokumentowanej obecności APR (Tab. 4).

Tab. 4. Linie z potencjalnymi genami APR warunkującymi odporność na *P. coronata* f. sp. *avenae*, *P. graminis* f. sp. *avenae* i *B. graminis* f. sp. *avenae* wybrane do testu

Potencjalne APR vs.					
<i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i>			<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	
LU 11	LU 552	S33	LU 11	LU 478	
LU 271	LU 555	S36	LU 389	Quoll	
LU 387	NAM 6	S 39	LU 478	Pm9*	
LU 478	Arab	S 76	LU 504	Firth*	

Tab. 5. Odpowiedź linii z potencjalnymi genami APR warunkującymi odporność na rdzę źdźbłową owsa na porażenie wybranymi izolatami *P. graminis* f. sp. *avenae*. Test przeprowadzono na fragmentach liści na płytkach. Ocena reakcji na porażenie przedstawiona została jako dominujący typ reakcji obserwowany na zestawie liści.

Linia	Faza wzrostu roślin	Liczba roślin	Izolat		
			Cz_08/21 1/6	Cz_1/6	Pol 2.1 1/6
LU 11	10 dni	10	4	4	3;n
	5 tyg.	10	2	2;n	0;N
	8 tyg.	10	1;n	1;n	0;N
LU 389	10 dni	10	4	4	3n
	5 tyg.	10	1	1;n	0N
	8 tyg.	10	0;n	0;n	0;N
LU 478	10 dni	10	4	3	3
	5 tyg.	10	1	0N	0
	8 tyg.	10	0;n	0;n	0;N
LU 504	10 dni	10	4	4	3;n
	5 tyg.	10	1n	0;n	0N
	8 tyg.	10	1n	0;n	0

Linia	Faza wzrostu roślin w trakcie porażenia	Liczba roślin	Izolat		
			Cz.17/5a	Aber T Pm5a	Pol.18 PK 2/5
LU 478	10 dni	10	3;	4;	4n
	5 tyg.	10	1	2	2
	8 tyg.	10	0;N	0;N	0;N
Firth	10 dni	10	3	3;	4
	5 tyg.	10	2;	2	2
	8 tyg.	10	0	1;	0
Pm9	10 dni	10	1;n	2;n	2;n
	5 tyg.	10	0	0	0
	8 tyg.	10	02	02	02
Quoll	10 dni	10	3	3	2;n
	5 tyg.	10	2	3	2
	8 tyg.	10	1	1	1;

Tab. 6. Odpowiedź linii z potencjalnymi genami APR warunkującymi odporność owsa na mączniaka prawdziwego na porażenie wybranymi izolatami *B. graminis* f. sp. *avenae*. Test przeprowadzono na fragmentach liści na płytkach.

Wyniki testu przeprowadzone dla odporności na *P. graminis* wskazują, że każda z badanych linii jest potencjalnym źródłem odporności na rdzę źdźbłową (Tab. 4). Wyniki testu na odporność rośliny dorosłej na *B. graminis* wskazują, że odmiana Firth oraz linia LU478 prawdopodobnie posiadają APR (Tab. 5). Nie można również wykluczyć obecności APR w australijskiej odmianie Quoll. Potwierdzenie obecności odporności APR testem na całej roślinie byłoby wskazane.

Wnioski

1. Odporność na porażenie warunkowaną genami APR należy badać w teście żywiciel – patogen na dwóch etapach rozwoju rośliny, 10-dniowej siewki oraz rośliny 8-tygodniowej.
2. Testy żywiciel-patogen prowadzone na fragmentach liści na płytkach, jak również testy na całych roślinach mogą być z powodzeniem wykorzystywane w teście mającym na celu identyfikację genów APR, ujawniających się u roślin dorosłych.

Temat badawczy 2
Testowanie selekcyjnych markerów molekularnych dla genu odporności na rdzę koronową *Pc59*

- Określenie fenotypu *Pc59/pc59* mieszańców F_2 na podstawie segregacji pokolenia F_3 .
- Testowanie selekcyjnych markerów molekularnych umożliwiających identyfikację genu odporności na rdzę koronową *Pc59*.
- Wyprowadzanie nowych kombinacji mieszańcowych i kontynuacja rozmnożeń materiałów do planowanej analizy transkryptomicznej genu *Pc60*.

Wyniki

W teście żywiciel - patogen na podstawie segregacji potomstwa w pokoleniu F_3 zostały określone fenotypy 300 roślin F_2 reprezentujących populacje: 650 (*Pc59K* × *Breton*), 707 (*Kasztan* × *Pc59K*), 977 (*Celer* × *Pc59K*), 990 (*Kasztan* × *Pc59K*) (Tab. 7).

W sumie, w obrębie badanych populacji zidentyfikowano 116 (117) odpornych homozygot dominujących (*Pc59Pc59*), 98 wrażliwych homozygot recesywnych (*pc59pc59*) i 86 (85) heterozygot (*Pc59pc59*). Po odrzuceniu roślin z populacji 650 liczba badanych form uległa redukcji do: 103 (102) odpornych homozygot dominujących, 98 wrażliwych homozygot recesywnych i 78 (79) heterozygot.

Tab. 7. Segregacja pokolenia mieszańców F_3 na podstawie oceny linii F_3 pod względem odporności warunkowanej genem *Pc59*

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	Fenotyp F_2 z testów na F_3						Liczba niezgodnych fenotypów <i>Pc_254</i> vs. <i>Pc_257</i>	Suma testowanych linii F_2
		<i>P. coronata</i> izolat <i>Pc_254</i>			<i>P. coronata</i> izolat <i>Pc_257</i>				
		odp.	por.	het.	odp.	por.	het.		
650	<i>Pc59</i> × <i>Breton</i>	13	-	8	15	-	6	3	21
707	<i>Kasztan</i> × <i>Pc59</i>	39	38	12	38	38	13	1	89
977	<i>Celer</i> × <i>Pc59</i>	36	33	30	36	33	30	0	99
990	<i>Kasztan</i> × <i>Pc59</i>	28	27	36	28	27	36	0	91
		Suma						4	300

W populacjach 707 i 990 do genotypowania za pomocą klasycznego PCR wykorzystano po sześć par starterów dla każdej linii, zaś dwie pary starterów użyto w populacji 977.

Tab. 8. Podsumowanie reakcji przeprowadzonych z wykorzystaniem klasycznego PCR i różnych kombinacji starterów do identyfikacji obecności alleli recesywnych (kolor czerwony) bądź dominujących (kolor zielony) genu *Pc59*.

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	127_F1a + 127_R1	821_F2 + 821_R2b	127_F2a + 859_R3	127_F2b + 127_R2	859_F2 + 859_R2	127_F1b + 859_R2	127_F2a + 127_R2	127_F1b + 859_R3	Liczba genotypów niezgodnych z fenotypem
707	<i>Kasztan</i> × <i>Pc59</i>	89	89	89	89	89	89			7
977	<i>Celer</i> × <i>Pc59</i>			48	18		48	56	41	9
990	<i>Kasztan</i> × <i>Pc59</i>	91	91	91	91	91	91			6
	Suma	180	180	228	198	180	228	56	41	22

Analizując wszystkie testowane kombinacje starterów w populacji 707, nieprawidłowa predykcja genotypu na podstawie obserwowanych markerów miała miejsce 7 razy (82 prawidłowe), w populacji 977 – 9 razy (90 prawidłowych), oraz w populacji 990 – 6 razy (85 prawidłowych odczytów). W sumie na 279 dokonanych odczytów 22 były nieprawidłowe i stanowiły 7,86% wszystkich odczytów. Najwięcej nieprawidłowych odczytów uzyskano w populacji 977.

Temat badawczy 2

Testowanie selekcyjnych markerów molekularnych dla genu odporności na rdzę koronową *Pc59*

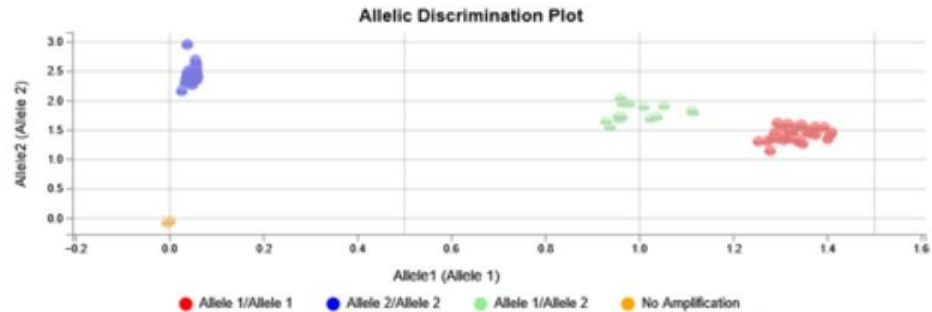
Z powodzeniem opracowano dwa markery KASP_350 i KASP_351 i wytypowano KASP_351 jako wysoce efektywny, mylnie przyporządkowujący zaledwie 5,3% analizowanych genotypów w trzech badanych populacjach z genem *Pc59* (Tab. 9). Marker ten przekonwertowano na sondę TaqMan_351, co poprawiło efektywność klasyfikacji badanych obiektów do 96,7% (3,3 % mylnie zakwalifikowanych linii F_2) (Tab. 10, Rys. 1). Dodatkowo system TaqMan wykorzystano do opracowania markera TaqMan_127, którego efektywność była porównywalna do TaqMan_351.

Tab. 9. Podsumowanie reakcji przeprowadzonych z wykorzystaniem KASP w celu identyfikacji obecności alleli recesywnych bądź dominujących genu *Pc59*.

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	Liczba odczytów			
		KASP_350		KASP_351	
		Zgodne	Niezgodne	Zgodne	Niezgodne
707	Kasztan × <i>Pc59</i>	81	8	81	7
977	Celer × <i>Pc59</i>	85	14	98	1
990	Kasztan × <i>Pc59</i>	78	13	85	6
Suma		244	35	264	14
% odczytów		85,66	14,34	94,70	5,30

Tab. 10. Podsumowanie reakcji przeprowadzonych z wykorzystaniem systemu TaqMan w celu identyfikacji obecności alleli recesywnych bądź dominujących genu *Pc59*.

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	Liczba odczytów			
		TaqMan_127		TaqMan_351	
		Zgodne	Niezgodne	Zgodne	Niezgodne
707	Kasztan × <i>Pc59</i>	83	6	83	6
977	Celer × <i>Pc59</i>	98	1	99	0
990	Kasztan × <i>Pc59</i>	87	4	88	3
Suma		268	11	270	9
% odczytów		95,90	4,10	96,67	3,33



Rys.1. Wykres przedstawiający rozkład genotypów w populacji 977 (Celer × *Pc59*) uzyskany przy udziale sond i starterów TaqMan_351. Allel 1 – odporny, allel 2 - wrażliwy.

Wnioski

1. Konwersja markerów typu PCR do systemu KASP i TaqMan jest wysoce efektywną metodą uzyskiwania markerów łatwych do wykorzystania w wysokoprzepustowej selekcji genotypów.
2. Systemy KASP i TaqMan wydają się być równie efektywne w genotypowaniu markerów molekularnych sprzężonych z odpornością u owsa. Efektywność obu systemów zależy w dużej mierze od stopnia sprzężenia markera z badanym genem.
3. W obu przypadkach pojedyncza reakcja typu KASP lub TaqMan umożliwia identyfikację homozygot dominujących lub recesywnych oraz heterozygot. W metodzie PCR należy przeprowadzić co najmniej dwie reakcje dla każdego allelu osobno.
4. Należy dążyć do identyfikacji pojedynczych markerów KASP lub TaqMan dla danej cechy, gdyż jak wykazano w prezentowanym doświadczeniu wiarygodność i powtarzalność obu systemów jest tak wysoka, że błędne przyporządkowanie genotypu wynika raczej z zanieczyszczenia próbki, mutacji lub crossing-over aniżeli z błędu systemu detekcji.

Temat badawczy 3

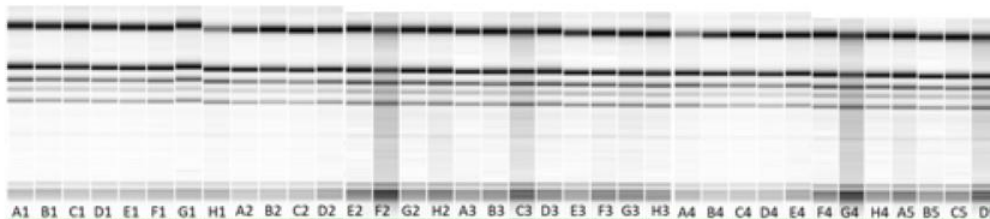
Analiza porównawcza transkryptomu linii bliskoizogenicznych Pc39/pc39 po infekcji *P. coronata*

- Sekwencjonowanie bibliotek uzyskanych dla linii bliskoizogenicznych Pc39/pc39 po infekcji *P. coronata* i złożenie transkryptomu

Wyniki

Wstępna ocena jakości bibliotek przeprowadzona w roku ubiegłym wskazywała na ich wysoką jakość, a testowe sekwencjonowanie wybranych próbek na platformie MiSeq potwierdziło parametry zgodne z wymaganiami dla bibliotek przeznaczonych do sekwencjonowania na platformach o wyższej pojemności typu NovaSeq. Tak przygotowane biblioteki zostały wysłane w celu sekwencjonowania do firmy Genomed. Przed sekwencjonowaniem biblioteki zostały sprawdzone przez firmę Genomed w celu określenia ich przydatności do sekwencjonowania. Jest to standardowa procedura testowania bibliotek dostarczanych przez klienta, aby w przypadku ich złej jakości uniknąć bardzo wysokich kosztów sekwencjonowania. Niestety pogłębiona i szczegółowa analiza bibliotek wykazała, że ich parametry jakościowe i ilościowe nie spełniają wymogów sekwencjonowania na platformie NovaSeq.

Z uwagi na to, że wyizolowane w roku poprzednim RNA nie mogło zostać wykorzystane do ponownej konstrukcji bibliotek po raz kolejny przeprowadzono procedurę izolacji i oznaczono parametry jakościowe i ilościowe RNA (Fot. 1).



Fot.1 Chromatogramy rozdziału całkowitego RNA użyciu Bioanalyzer.

Wyizolowane RNA wysłano do firmy Oxford Genomics w Wielkiej Brytanii w celu konstrukcji nowych bibliotek i sekwencjonowania na najnowszej platformie Illumina NovaSeq.

Wyniki sekwencjonowania uzyskano z opóźnieniem dlatego nadal trwają szczegółowe analizy transkryptomyczne, które zakończą się w ciągu najbliższych 3 tygodni.

Wyizolowane preparaty RNA poddano również odwrotnej transkrypcji na cDNA. W tym celu wszystkie preparaty rozcieńczono do jednakowego stężenia 60 ng/μl i przepisano stosując zestaw do odwrotnej transkrypcji Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase. Uzyskane preparaty będą wykorzystywane do analizy porównawczej ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź odpornościową roślin w roku następnym.

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania [%]
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Liczba genotypów wykorzystanych do walidacji opracowanego testu	1	1	100
temat badawczy 2				
2.1	Liczba linii F ₃ , dla których zostanie określony fenotyp <i>Pc59/pc59</i>	300	300	100
2.2	Liczba testowanych markerów KASP	2	2	100
2.3	Liczba testowanych markerów TaqMan	2	2	100
2.4	Liczba wyprowadzonych kombinacji <i>A. sativa</i> × <i>Pc60</i>	2	2	100
2.5	Liczba selekcionowanych linii bliskoizogenicznych	5	5	100
temat badawczy 3				
3.1	Liczba sekwencjonowanych bibliotek	36	36	75
			ŚREDNIA	96,43
			% REALIZACJI ZADANIA	91,67