

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 owsa warunkowanej genami R na <i>P. coronata</i> , <i>P. graminis</i> oraz <i>B. graminis</i> .	TAK
2	Opracowanie selekcyjnych markerów molekularnych dla genu odporności na rdzę koronową <i>Pc59</i> w oparciu o analizy genomu.	TAK
3	Konstrukcja bibliotek do analizy porównawczej transkryptomu linii bliskoizogenicznych Pc39/pc39 po infekcji <i>P. coronata</i> .	TAK



Materiał i metody

Temat badawczy 1

Materiał:

- Linie referencyjne z genami *Pc*, *Pg* i *Pm*
- Izolaty *Puccinia coronata*, *P. graminis*, *Blumeria graminis*

Metody:

- Test żywiciel patogen



Temat badawczy 2

Materiał:

- populacje mapujące F2:
707 (Kasztan × Pc59K); 990 (Kasztan × Pc59K),
655 (Pc59U × Bingo); 656 (Pc59U × Kasztan)

Metody:

- Genotypowanie metodą DArTseq
- Opracowanie markerów allelospecyficznych
- Opracowanie markerów KASP dla genu *Pc59*

Temat badawczy 3

Materiał:

- Linie bliskoizogeniczne z/bez genu *Pc39*
- Specyficzne izolaty *P. coronata*

Metody:

- Izolacja RNA
- Przygotowanie i walidacja bibliotek do mRNAseq

Temat badawczy 1	Opracowanie testu umożliwiającego kompleksową ocenę odporności owsa warunkowanej genami R na <i>P. coronata</i>, <i>P. graminis</i> oraz <i>B. graminis</i>
1. Dobór warunków i fazy wzrostu roślin oraz odpowiednich izolatów do testu umożliwiającego kompleksową ocenę odporności owsa warunkowanej genami R 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 12 patotypów (6 – *Pc*, 3 – *Pg* i 3 – *Bg*) o spektrach wirulencji reprezentatywnych dla populacji występujących na terenie kraju (Tab. 1).

Tab. 1. Izolaty *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* i *Blumeria graminis* 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> _230 2. <i>Pc</i> _257 3. <i>Pc</i> _254 4. <i>Pc</i> _I.94(63) 5. <i>Pc</i> _56 6. <i>Pc</i> _13.1
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Pg</i>	1. <i>Pg</i> _Cz_18/3 2. <i>Pg</i> _St_20/1 3. <i>Pg</i> _Pr_20/2
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Bg</i>	1. <i>Pm</i> _Kn_20/1 2. <i>Pm</i> _Pol_18/6 3. <i>Pm</i> _Sul_19/6

Do testu ukierunkowanego na identyfikację genów R wybrano 18 linii referencyjnych z 3 silnymi i 3 słabymi genami *Pc*, *Pg* oraz *Pm* (Tab. 2).

Tab. 2. Linie z genami odporności na *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, *P. graminis* f. sp. *avenae* i *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* wybrane do analiz

Gatunek patogenu	Efektywność genu	Nazwa linii (posiadany gen)
<i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i>	wysoka	<i>Pc50</i> <i>Pc91</i> <i>Pc101</i>
	niska	<i>Pc14</i> <i>Pc39</i> <i>Pc40</i>
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	wysoka	<i>Pg4</i> <i>Pg10</i> <i>Pg12</i>
	niska	<i>Pg1</i> <i>Pg3</i> <i>Pg9</i>
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	wysoka	<i>Pm4</i> <i>Pm5</i> <i>Pm7</i>
	niska	<i>Pm1</i> <i>Pm3</i> <i>Pm6</i>

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

Celem doświadczenia było określenie czy obserwowana odpowiedź na porażenie patogenem we wszystkich badanych przypadkach będzie jednorodna, gdyż odporność warunkowana genami R objawia się na wszystkich etapach rozwoju rośliny.

W doświadczeniu przeprowadzonym dla rdzę koronowej i linii referencyjnych z genami odporności *Pc50*, *Pc91* i *Pc101* oraz *Pc14*, *Pc39* i *Pc40* nie stwierdzono różnic w reakcji na porażenie poszczególnych linii w zależności od warunków wzrostu roślin (Tab. 3 i 4). Różnice w reakcji na porażenie obserwowane na fragmentach liści pobranych w różnej fazie wzrostu rośliny również były nieistotne.

Tab. 3. Odpowiedź linii z genami odporności na rdzę koronową na porażenie wybranymi izolatami *Pc*. Wzrost linii z zachowaniem fotoperiodu.

Linia	Wiek rośliny	Pc_230	Pc_257	Pc_254	Pc_L94(63)	Pc_56	Pc_13.1
Pc14	10 dni	4	0:N	3	4	4	0
Pc14	5 tyg.	3;	0	3;;	3	3;	0
Pc14	8 tyg.	4	OZ	4	4	4	0
Pc39U	10 dni	4	4	3	0N	0N	0N
Pc39U	5 tyg.	4	4;	3;;	0;	0;	0;
Pc39U	8 tyg.	4	4	4	0;	0;	0;
Pc40U	10 dni	4	0:N	1	4	4	0
Pc40U	5 tyg.	4	0N	1	3	4;	0;
Pc40U	8 tyg.	4	0N	2	4	4	0:n
Pc50U	10 dni	0:N	0:N	0	0:N	1	0
Pc50U	5 tyg.	OZ	0	OZ	OZ	3;	0
Pc50U	8 tyg.	OZ	OZ	OZ	OZ	3	0:N
Pc91	10 dni	4	0:N	OZ	OZ	OZ	0
Pc91	5 tyg.	4;	0	OZ	OZ	OZ	0
Pc91	8 tyg.	4;	0	OZ	OZ	OZ	OZ
Pc101	10 dni	OZ	0:N	OZ	OZ	OZ	OZ
Pc101	5 tyg.	OZ	0	OZ	OZ	0:N	0
Pc101	8 tyg.	OZ	0	OZ	OZ	0:N	OZ

Tab. 4. Odpowiedź linii z genami odporności na rdzę koronową na porażenie wybranymi izolatami *Pc*. Wzrost linii bez fotoperiodu.

Linia	Wiek rośliny	Pc_230	Pc_257	Pc_254	Pc_L94(63)	Pc_56	Pc_13.1
Pc14	10 dni	3	0	3	3	3	0;
Pc14	5 tyg.	3	0;	4	4	4	0
Pc14	8 tyg.	4	0:N	3	3	4	0
Pc39U	10 dni	3	3	3	0N	0N	0;
Pc39U	5 tyg.	3	3	3	0N	0	0N
Pc39U	8 tyg.	4	4	3	0N	0:N	0;
Pc40U	10 dni	4	0:N	2	4	3	0N
Pc40U	5 tyg.	4	0N	2	4	3	0N
Pc40U	8 tyg.	4	0:N	2	3	3	0N
Pc50U	10 dni	0N	0N	0;	0N	2	0;
Pc50U	5 tyg.	0N	0N	0;	0;	1	0N
Pc50U	8 tyg.	0:N	0:N	0:N	0:N	2	0:N
Pc91	10 dni	3	0:N	0:N	0	0:N	0
Pc91	5 tyg.	3	0:N	0:N	0:N	0:N	0:N
Pc91	8 tyg.	4	0:N	0	0:N	0:N	0
Pc101	10 dni	0:N	0	0	0;	0;	0;
Pc101	5 tyg.	0	0:N	0	0;	0	0
Pc101	8 tyg.	0:N	0:N	0	0	0:N	OZ

Wnioski

1. Odporność na porażenie warunkowaną genami R można badać w teście żywiciel – patogen na każdym etapie rozwoju rośliny, niezależnie od jej warunków wzrostu.
2. Zastosowane warunki fitotronowe, zarówno do wzrostu linii referencyjnych, jak i testu żywiciel-patogen, nie wpływają negatywnie na przebieg doświadczenia i mogą być z powodzeniem wykorzystywane w teście mającym na celu identyfikację genów APR, ujawniających się u roślin dorosłych.

Temat badawczy 2	Opracowanie selekcyjnych markerów molekularnych dla genu odporności na rdzę koronową <i>Pc59</i> w oparciu o analizy genomu
<ol style="list-style-type: none"> Określenie fenotypu <i>Pc59/pc59</i> mieszańców F_2 na podstawie segregacji pokolenia F_3. Opracowanie selekcyjnych markerów molekularnych umożliwiających identyfikację genu odporności na rdzę koronową <i>Pc59</i>. 	

Wyniki

Genotypowaniu z wykorzystaniem metody DArTseq zostały poddane 32 linie reprezentujące populacje mapujące F_2 707 (Kasztan \times *Pc59K*) i 32 linie z populacji 990 (Kasztan \times *Pc59K*), 20 linii populacji 655 (*Pc59U* \times Bingo) i 20 z populacji 656 (*Pc59U* \times Kasztan) oraz formy rodzicielskie. W efekcie prowadzonych analiz uzyskano 85 653 markerów sekwencyjnych, w tym 43 640 markerów silicoDArT oraz 42 013 markerów DArTseq (Tab. 5).

Tab. 5. Charakterystyka markerów silicoDArT i DArTseq uzyskanych dla badanych populacji

Liczba markerów	DArTseq	silicoDArT
Sumaryczna	42 013	43 640
Zmapowanych do T3Oat	17 850	11 400
Niezmapowanych do T3Oat	24 163	32 240
Zmapowanych do genomu owsa v.2	36 414	33 268
Niezmapowanych do genomu owsa v.2	5 599	10 372

Na podstawie segregacji markerów DArTseq i silicoDArT zidentyfikowano sekwencje sprzężone z obecnością genu *Pc59*. Dla 10 najsilniej sprzężonych sekwencji o właściwej pozycji SNP zaprojektowano startery (Tab.6) i przeprowadzono reakcje PCR.

Tab. 6. Sekwencje sprzężone z genem *Pc59*

DArTseq	Sekwencja 5'-3'
13061614	TGCGGGCGCTGTCTTCTGGACGGCAGGCGCGGGCAGTGGAAAGCTGCCGCCGT
30222793	TGCGTTTGTCTCTGAAAAACAAGCTCGCAACTTTACCAAAGCAGCCA
30322188	TGCGCGACTTTATTTACTTCGACCTGCCTCACGT
30527756	TGCAGAAGAAATCAACAAGATTTAACCGTTCGACCTGCCTCACGT
30782499	TGCATGATCACCTCCCCGGCATCAACTTCGACCTGCCTCACGTCTCTCCG
3078499	TGCGATGATCACCTCCCCGCATCAACTTCGACCTGCCTCACGTCTCTCCG
30599021	TGCGCAGCAGCCAACACCATGCGTGCTCCCGCAGCTTCTGCACCGCACGGTTG
30584821	TGCGAAAAGGAAAAGCGGCGGAGGGTGAAATGAGCAAGGCATCTTGCCGAG
30164127	TGCTGGCACTTATAGAAGTATGTTGACACTTGAAATTTCTACTGCTCTAAGTTGT
302045853	TGCGGCTGCTTCAGCTGGAACATATTGAAGGCCGCTCGGCACTTTGGATAGCA
3079360	TGCGCGACGCTCGGCAGCTAGATAACGTGGGATGTTAGCGAGATCTGCA

Temat badawczy 2

Opracowanie selekcyjnych markerów molekularnych dla genu odporności na rdzę koronową *Pc59* w oparciu o analizy genomu

Dwa najsilniej sprzężone markery (m.in. 9360) adaptowano do systemu KASP i z ich wykorzystaniem poddano analizie DNA wyizolowane z roślin populacji F_2 707 i 990.

Wnioski

1. Metoda DArTseq umożliwiła uzyskanie dużej liczby markerów molekularnych użytecznych do identyfikacji rejonów genomu owsa związanych z odpornością warunkowaną genem *Pc59*.
2. Genotypowanie więcej niż jednej populacji z segregującym genem odporności istotnie wpłynęło na możliwości identyfikacji silnie sprzężonych z odpornością sekwencji.
3. Konwersja marekrów typu PCR do systemu KASP jest wysoce efektywną metodą uzyskiwania markerów łatwych do wykorzystania w wysokoprzepustowej selekcji genotypów.

Fot. 1. Elektroforegram przedstawiający efekt amplifikacji uzyskany z parą starterów zaprojektowaną w oparciu o sekwencję DArTseq 3079360.



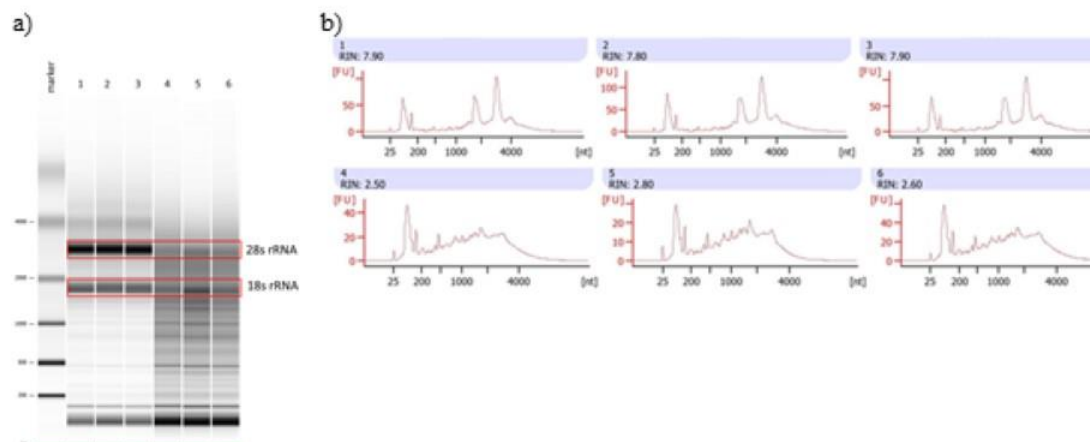
Temat badawczy 3

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

1. Konstrukcja bibliotek cDNA do porównawczych analiz transkryptomowych w oparciu o RNA linii bliskoizogenicznych Pc39/pc39 po infekcji *P. coronata*

Wyniki

Z pobranego do analiz materiału roślinnego uzyskano 36 wysokiej jakości izolatów RNA o koncentracji powyżej 1000 ng/μl i wartości współczynnika integralności RIN powyżej 7. W przypadku trzech próbek konieczne było powtórzenie procedury izolacji całkowitego RNA gdyż integralność uzyskanego RNA była zbyt niska tj. RIN<3 (Rys. 1.1 a,b) co wskazuje na degradację RNA w czasie izolacji. W obrazach elektroforetycznych próbek o wysokiej wartości współczynnika RIN wyraźnie widoczne są dwa prążki odpowiadające 28S and 18S rRNA. W przypadku próbek zdegradowanych prążki te były ledwo widoczne. Po wzbogacaniu frakcji mRNA i jednoczesnym usunięciu rRNA z wykorzystaniem kulek magnetycznych oligo-dT, koncentracja izolatów RNA wynosiła od 40 do 78 ng/μl., co wskazuje na efektywne usunięcie dominującej frakcji rRNA. Wynik potwierdzono przy użyciu elektroforezy automatycznej w aparacie Bioanalyzer. Uzyskany wynik potwierdził całkowity brak obecności prążków odpowiadających 28S and 18S rRNA (1.2c).



Rys.1.1 Przykładowe wyniki oceny RNA otrzymane przy użyciu Bioanalyzer.

- a) obraz rozdzielu całkowitego RNA po izolacji i usunięciu pozostałości DNA genomowego żelu uzyskany w czasie elektroforezy automatycznej, próbki 1-3 reprezentujące RNA o wysokiej integralności, próbki 4-6 reprezentujące zdegradowane izolaty RNA wymagające powtórzenia procedury izolacji;
- b) chromatogramy rozdzielu całkowitego RNA, próbki 1-3 o wysokiej integralności i RIN 7,8-7,9; próbki 4-6 zdegradowane RNA o wartości RIN 2,5-2,8;

Temat badawczy 3

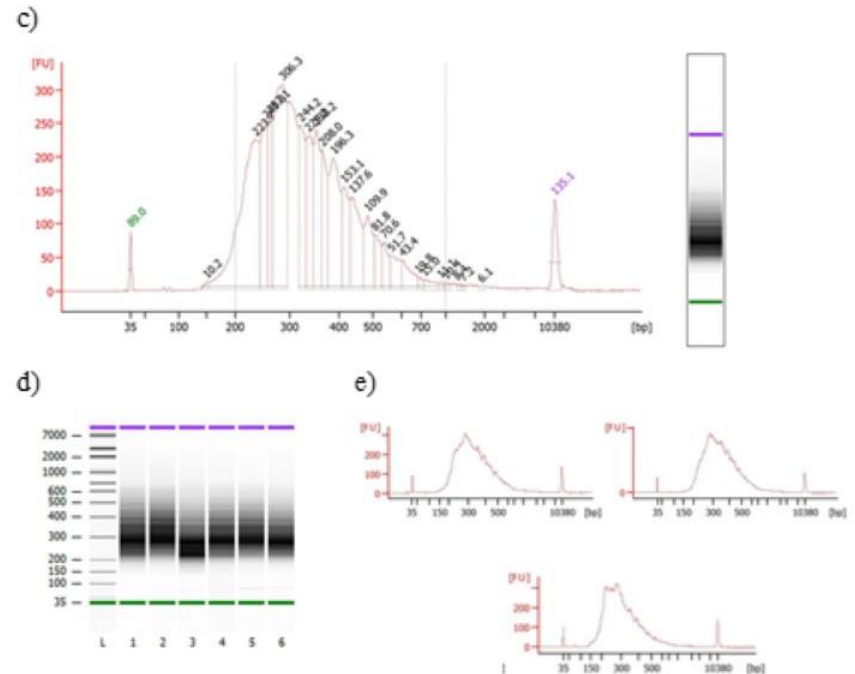
Analiza porównawcza transkryptomu linii bliskoizogenicznych Pc39/pc39 po infekcji *P. coronata*

Wyniki

W trakcie przygotowywania bibliotek poszczególne próbki zaindeksowano tak aby możliwe było ich zmieszanie i jednoczesna analiza przy użyciu sekwenatora Illumina NovaSeq. Prawdopodobność przygotowania bibliotek tj. obecność właściwych sekwencji adaptorowych umożliwiającą przyłączenie się do komórki przepływowej sekwenatora NGS, na której zachodzi sekwencjonowanie, potwierdzono poprzez wykonanie qPCR. Przygotowane biblioteki zmieszano tak aby finalnie ich stężenie było jednakowe.

Wnioski

1. Konieczne jest zachowanie możliwie jak najniższej temperatury w trakcie izolacji całkowitego RNA aby uniemożliwić jego degradację.
2. Usuwanie rRNA przy użyciu kulek magnetycznych z oligo-dT jest skuteczne.
3. Spadek koncentracji RNA w toku przygotowania bibliotek transkryptomowych jest wynikiem efektywnego usuwania frakcji rRNA z izolatów.



Rys.1.2 Przykładowe wyniki oceny RNA otrzymane przy użyciu Bioanalyzer.
 c) chromatogram i obraz żelu pojedynczej próbki po przeprowadzeniu procedury wzbogacania frakcji mRNA i usunięcia frakcji rRNA;
 d) ocena rozkładu długości fragmentów gotowych bibliotek do sekwenowania NGS widok żelu;
 e) chromatogram rozkładu długości fragmentów wchodzących w skład przykładowej biblioteki RNAseq

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 testów opracowanych dla genów R	1	1	100%
temat badawczy 2				
2.1	Liczba opracowanych markerów	2	2	100%
temat badawczy 3				
3.1	Liczba opracowanych bibliotek	36	36	100%
			ŚREDNIA	100%
			% REALIZACJI ZADANIA	100%

