

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

dr inż. Aneta Koroluk

mgr inż. Joanna Lech

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 hab. Piotr Waligórski

dr hab. Marzena Warchoń

Instytut Fizjologii Roślin, PAN, Kraków

Lp.	Cele projektu:	Czy cel został zrealizowany
1	Kompleksowa ocena odporności odmian i linii <i>A. sativa</i> , genotypów <i>A. sterilis</i> i <i>A. byzantina</i> na choroby grzybowe wywoływane przez <i>P. coronata</i> , <i>P. graminis</i> oraz <i>B. graminis</i> .	TAK
2	Testowanie markerów molekularnych dla genów odporności na rdzę koronową <i>Pc51</i> i <i>Pc101</i> .	TAK
3	Analiza porównawcza transkryptomu linii bliskoizogenicznych <i>Pc39/pc39</i> oraz <i>Pc60/pc60</i> po infekcji <i>P. coronata</i> .	TAK



Materiał i metody

Temat badawczy 1

Materiał:

- 200 genotypów *A. sterilis* sprowadzonych z National Small Grain Collection (USDA, Aberdeen) pochodzących z Hiszpanii i Turcji
- Scharakteryzowane pod względem wirulencji izolaty *Puccinia coronata*, *Puccinia graminis*, *Blumeria graminis*

Metody:

- Test żywiciel patogen na płytkach na fragmentach liści z roślin 10-dniowych

Temat badawczy 2

Materiał:

- Populacje mapujące F₃:
634 (Pc51U x Kasztan), 635 (Pc51U x Bingo),
632 (Pc51 U x Kanota), 848 (Kasztan x Pc101),
851 (Kasztan x Pc101)
- Populacje mieszańcowe z segregującym genem *Pc91*

Metody:

- Klasyczny PCR
- Real-time PCR, TaqMan

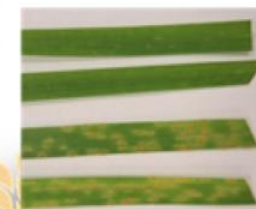
Temat badawczy 3

Materiał:

- Linie bliskoizogeniczne z genem *Pc39/pc39*
- Linie bliskoizogeniczne z genem *Pc60/pc60*

Metody:

- Test żywiciel-patogen na siewkach
- Sekwencjonowanie transkryptomu RNAseq
- Analiza DEG (differentially expressed genes)



Temat badawczy 1	Kompleksowa ocena odporności na choroby grzybowe odmian i linii <i>A. sativa</i>, genotypów <i>A. sterilis</i> i <i>A. byzantina</i>
<ul style="list-style-type: none"> Kompleksowa ocena odporności odmian i linii <i>A. sativa</i>, genotypów <i>A. sterilis</i> i <i>A. byzantina</i> na choroby grzybowe wywoływane przez <i>P. coronata</i>, <i>P. graminis</i> oraz <i>B. graminis</i>. Rozmnożenie w warunkach polowych mieszańców przeznaczonych do piramidyacji genów. 	

Wyniki

Na podstawie profilowania wirulencji izolatów wyprowadzonych z populacji poszczególnych patogenicznych grzybów wyselekcjonowano 18 izolatów (12 – *Pc*, 3 – *Pg* i 3 – *Bg*) o spektrach wirulencji reprezentatywnych dla obecnie występujących populacji, a jednocześnie umożliwiających postulowanie obecności konkretnych genów odporności R w badanych materiałach (tab. 1, fot. 1). Wyselekcjonowane izolaty *P. coronata*, *P. graminis* i *B. graminis* zostały wykorzystane do charakterystyki odporności 200 genotypów *Avena sterilis* sprowadzonych z banku genów National Small Grain Collection (USDA, Aberdeen) (ryc. 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. Pc_58 St18/5
		2. Pc_94(63)_241/18
		3. Pc_230
		4. Pc_257
		5. Pc_3.2
		6. Pc_Cz.09/22 2/5
		7. Pc_56
		8. Pc_241/19
		9. Pc_Chorwacja 22 2/6
		10. Pc_233
		11. Pc_Pol.23 9/10
		12. Pc_Pol.23 13/15
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Pg</i>	1. Pg_Fr.2/23
		2. Pg_Cz.23.5
		3. Pg_Cz.18/3
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	<i>Bg</i>	1. Pm_K.18.2
		2. Pm_Strz.23.3
		3. Pm_Spain 1

Tab. 2. Odporność genotypu PI 412448 *Avena sterilis* pochodzącego z Turcji na rdzę koronową, mączniaka prawdziwego i rdzę koronową jako przykład niejednorodnej reakcji oraz złożonej odporności na różne patogeny

Avena sterilis PI 412448 Turkey Hatay	Izolaty <i>Pc</i>												Izolaty <i>Pm</i>			Izolaty <i>Pg</i>		
	Isolate Pc1	Isolate Pc2	Isolate Pc3	Isolate Pc4	Isolate Pc5	Isolate Pc6	Isolate Pc7	Isolate Pc8	Isolate Pc9	Isolate Pc10	Isolate Pc11	Isolate Pc12	Isolate Pm1	Isolate Pm2	Isolate Pm3	Isolate Pg1	Isolate Pg2	Isolate Pg3
Plant No. 1	res	sus	res	res	res	res	res	res	sus	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 2	res	sus	res	res	res	res	res	res	sus	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 3	res	sus	res	res	res	res	res	res	sus	sus	res	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 4	res	sus	res	res	res	res	sus	res	res	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 5	res	res	res	res	res	res	sus	res	sus	sus	res	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 6	res	sus	res	res	res	res	sus	res	sus	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 7	res	res	res	res	res	res	sus	res	res	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 8	res	res	res	res	res	res	sus	res	res	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 9	res	res	res	res	res	res	res	res	sus	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus
Plant No. 10	res	sus	res	res	res	res	res	res	sus	sus	sus	sus	sus	sus	res	sus	sus	sus



Ryc. 1. Liczba genotypów charakteryzujących się określoną procentową odpornością roślin w obrębie genotypu na testowane izolaty *Puccinia coronata*, *Blumeria graminis* i *Puccinia graminis*. Średnią odporność genotypów w grupie zaznaczono ponad słupkami.

Temat badawczy 1

Kompleksowa ocena odporności na choroby grzybowe odmian i linii *A. sativa*, genotypów *A. sterilis* i *A. byzantina*

Wnioski:

1. Genotypy *A. sterilis* zachowane w bankach genów jako złożone populacje mogą być bardzo cennym źródłem odporności na rdzę koronową, rdzę żdźbłową i mączniaka prawdziwego (tab. 2).
2. Testowanie odporności genotypów reprezentujących dzikie populacje powinno być prowadzone na większej ilości roślin, co umożliwia zidentyfikowanie sublinii o wysokiej odporności.
3. Analizując odporność 200 genotypów *A. sterilis* pochodzących z Turcji i Hiszpanii stwierdzono, że większość analizowanych genotypów *A. sterilis* była wysoce podatna lub umiarkowanie podatna na rdzę koronową i mączniaka prawdziwego oraz wysoce podatna na rdzę żdźbłową.
4. Tylko dwa genotypy *A. sterilis* pochodzące z Hiszpanii charakteryzowały się odpornością wszystkich siewek na wszystkie testowane izolaty *Puccinia coronata* PI 367445 oraz PI 364760. Oba genotypy skolekcjonowano w prowincji Malaga.
5. Odporność na wszystkie testowane izolaty *P. graminis* stwierdzono w jednym z 200 badanych genotypów *A. sterilis* - PI 412486 pochodzącym z Turcji (Gaziantep).
6. Analizując odporność badanych genotypów na *B. graminis* stwierdzono całkowitą odporność wszystkich testowanych siewek na wszystkie testowane izolaty w jednym genotypie *A. sterilis* pochodzącym z Turcji PI 412917 (Diyarbakir) oraz jednym z Hiszpanii PI 367988 (Malaga).
7. Profile odporności zidentyfikowane w badanych genotypach nie odpowiadały profilom linii referencyjnych zawierających określone geny odporności. Może to wskazywać na obecność nowych genów lub kombinacji znanych genów odporności.
8. Rozmnożeniu w warunkach polowych poddano wybrane kombinacje mieszańcowe posiadające co najmniej dwa geny odporności na choroby grzybowe.



Fot. 1. Test żywiciel patogen na fragmentach liści z dziesięciu dwutygodniowych siewek przeprowadzony jednocześnie dla *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* i *Blumeria graminis* f. sp. *avenae*.

Temat badawczy 2	Testowanie selekcyjnych markerów molekularnych dla genów odporności na rdzę koronową <i>Pc51</i> i <i>Pc101</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Testowanie selekcyjnych markerów molekularnych umożliwiających identyfikację genów odporności na rdzę koronową <i>Pc51</i> i <i>Pc101</i>. • Kontynuacja rozmnożeń mieszańców z genem <i>Pc91</i> do testowania markerów dla tego genu. 	

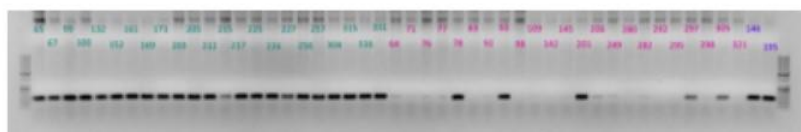
Wyniki

Do identyfikacji genotypu linii z genem *Pc51* zastosowano pary starterów opracowane dla mutacji punktowych w sekwencjach 5479210, 5474322 oraz 37076821. Amplifikację przeprowadzono dla 72 roślin z populacji 634, 74 roślin z populacji 635 oraz 94 roślin z populacji 632. W sumie analizie poddano trzy markery w 3 populacjach reprezentowanych łącznie przez 240 roślin (tab.3).

Tab. 3. Zgodność segregacji markerów PCR z fenotypem w populacjach z genem *Pc51*.

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	Suma linii testowanych PCR ze starterem 210	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Suma linii testowanych PCR ze starterem 322	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Suma linii testowanych PCR ze starterem 821	Zgodność w % fenotypu z genotypem
634	Pc51U x Bingo	72	50%	72	88%	72	71%
635	Pc51U x Kasztan	74	81%	74	87%	74	90%
632	Pc51U x Kanota	94	83%	94	77%	94	73%
Średnia		240	71%	240	78%	240	84%

Dla populacji 634 średnia zgodność segregacji wszystkich badanych markerów z genotypem wyniosła 69%, dla 635 – 86% i 632 – 78% (tab. 3). Dla populacji 634 najbardziej efektywny w prawidłowej identyfikacji genotypu był marker 322, dla 635 – marker 821, zaś dla populacji 632 – marker 210 (fot. 2).



Fot.2. Elektroforegram przedstawiający efekt amplifikacji uzyskany ze starterami zaprojektowanymi w oparciu o sekwencję DArTseq 5479210 w populacji 635.

Do identyfikacji genotypu linii z genem *Pc101* zastosowano pary starterów opracowane dla mutacji punktowych w sekwencjach 10781793, 166790087, 77970286 oraz 13782122. Amplifikację przeprowadzono dla 123 roślin z populacji 848 oraz 117 roślin z populacji 851. W sumie analizie poddano cztery markery w 2 populacjach reprezentowanych łącznie przez 240 roślin (tab. 4).

Tab. 4. Zgodność segregacji markerów PCR z fenotypem w populacjach z genem *Pc101*.

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	Suma linii testowanych PCR	Zgodność w % fenotypu z genotypem marker 793	Zgodność w % fenotypu z genotypem marker 087	Zgodność w % fenotypu z genotypem marker 286	Zgodność w % fenotypu z genotypem marker 122	Średnia
848	Kasztan x Pc101	123	88%	72%	85%	86%	82%
851	Kasztan x Pc101	117	81%	63%	90%	78%	78%
Średnia		240	84%	67%	87%	82%	80%

Dla populacji 848 średnia zgodność segregacji wszystkich badanych markerów z genotypem wyniosła 82%, a dla 851 – 78% (tab. 4). Dla populacji 848 najbardziej efektywny w prawidłowej identyfikacji genotypu był marker 793, dla 851 – marker 286 (fot. 3). Efektywność markerów 793, 286 i 122 była wysoka i porównywalna. Najniższą efektywnością charakteryzował się marker 087.



Fot.3. Elektroforegram przedstawiający efekt amplifikacji uzyskany ze starterami zaprojektowanymi w oparciu o sekwencję DArTseq 77970286 w populacji 848.

Temat badawczy 2

Testowanie selekcyjnych markerów molekularnych dla genów odporności na rdzę koronową *Pc51* i *Pc101*

Amplifikację z udziałem starterów i sond TaqMan mającą na celu identyfikację alleli *Pc51/pc51* przeprowadzono dla 240 roślin. Zgodność segregacji TaqMan 210 z fenotypem wynosiła średnio 44%, TaqMan 752 - 47% (ryc.2), a TaqMan 043 - 44% (tab. 5). Wszystkie TaqMany charakteryzowały się bardzo niską efektywnością identyfikacji genotypu, która średnio wyniosła zaledwie 45% i była niższa od efektywności uzyskiwanej w klasycznych reakcjach PCR.

Tab. 5. Zgodność segregacji markerów PCR z fenotypem w populacjach z genem *Pc51*.

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	Suma linii testowanych PCR ze starterem 793	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Suma linii testowanych PCR ze starterem 087	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Suma linii testowanych PCR ze starterem 286	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Średnia
848	Kasztan x <i>Pc101</i>	123	93%	123	82%	123	97%	91%
851	Kasztan x <i>Pc101</i>	117	89%	117	93%	117	95%	92%
Średnia		240	91%	240	87%	240	96%	92%

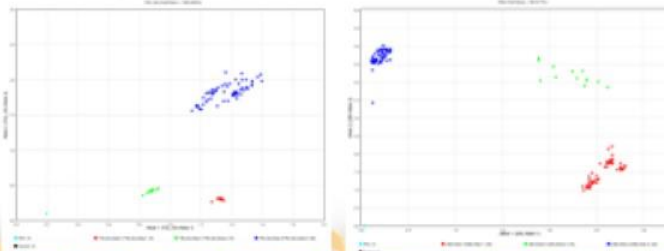
Dla populacji 848 z segregującym genem *Pc101* średnia zgodność segregacji wszystkich badanych markerów z genotypem wyniosła 91%, dla 851 – 92% (tab.6, ryc. 2). Wszystkie TaqMany charakteryzowały się bardzo wysoką efektywnością identyfikacji genotypu *Pc101/pc101*, która średnio wyniosła 92%. Najwyższą zgodnością identyfikacji charakteryzował się TaqMan 286 – 96%, a najniższą – 087, który identyfikował poprawnie 87% roślin.

Tab. 6. Zgodność segregacji markerów PCR z fenotypem w populacjach z genem *Pc101*.

Populacja	Kombinacja mieszańcowa	Suma linii testowanych PCR ze starterem 210	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Suma linii testowanych PCR ze starterem 752	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Suma linii testowanych PCR ze starterem 043	Zgodność w % fenotypu z genotypem	Średnia
634	<i>Pc51U</i> x Bingo	62	42%	62	42%	62	42%	42%
635	<i>Pc51U</i> x Kasztan	83	40%	83	49%	83	48%	46%
632	<i>Pc51U</i> x Kanota	95	51%	95	51%	95	42%	48%
Średnia		240	44%	240	47%	240	44%	45%

Wnioski

- Opracowane trzy kombinacje starterów umożliwiające identyfikację alleli genu *Pc51/pc51* po przetestowaniu na grupie 240 roślin reprezentujących trzy populacje mieszańcowe wykazały wysoką zgodność segregacji fenotyp-genotyp wynoszącą średnio 84%.
- Opracowane cztery kombinacje starterów inicjujące amplifikację produktów PCR umożliwiających identyfikację alleli genu *Pc101/pc101* po przetestowaniu na grupie 240 roślin reprezentujących dwie populacje mieszańcowe wykazały wysoką zgodność segregacji fenotyp-genotyp - średnio 80%.
- Zaobserwowano różnice w procentowej zgodności fenotyp-genotyp dla testowanych par starterów oraz dla różnych kombinacji mieszańcowych. Było to szczególnie widoczne w przypadku markerów opracowanych dla genu *Pc51* i dla populacji segregujących pod względem tego genu.
- Konwersja do systemu TaqMan sekwencji sprzężonych z genem *Pc51* spowodowała obniżenie zgodności genotypu z fenotypem w porównaniu z klasycznym PCR z 84% do zaledwie 45%.
- Konwersja do systemu TaqMan sekwencji sprzężonych z genem *Pc101* spowodowała wzrost zgodności genotypu z fenotypem w porównaniu z klasycznym PCR z 80% do 92%.
- Do identyfikacji alleli genu *Pc51* metodą z wyboru jest klasyczny PCR, zaś dla genu *Pc101* mogą być stosowane zarówno klasyczne markery PCR, jak i system TaqMan.

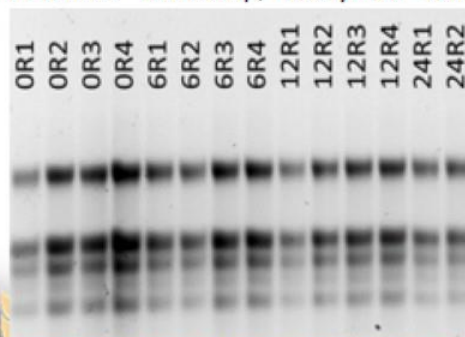


Ryc. 2. Rozkład alleli identyfikowanych sondą TaqMan dla SNP w obrębie sekwencji 2053752 w populacji 635 (*Pc51U* x Kasztan) (z lewej), 77970286 w populacji 848 (Kasztan x *Pc101*) (z prawej).

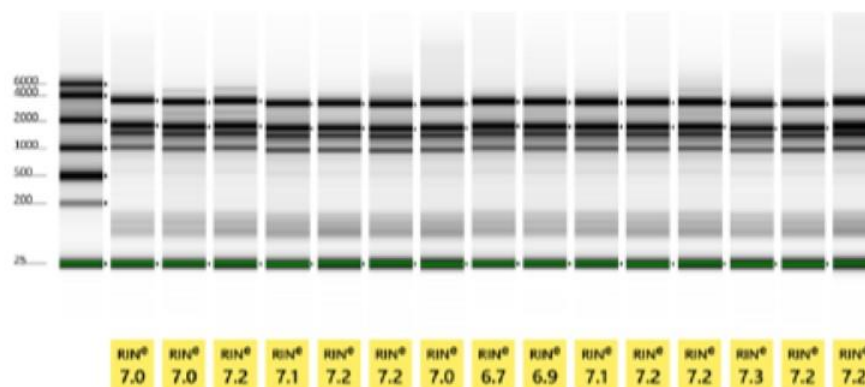
Temat badawczy 3	Analiza porównawcza transkryptomu linii bliskoizogenicznych Pc39/pc39 oraz Pc60/pc60 po infekcji <i>P. coronata</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Sekwencjonowanie transkryptomów linii bliskoizogenicznych Pc60/pc60 po infekcji <i>P. coronata</i>. • Analiza funkcjonalna transkryptów różnicujących linie bliskoizogeniczne Pc39/pc39 po infekcji <i>P. coronata</i> i wytypowanie genów do analiz ekspresji. 	

Wyniki

W celu przeprowadzenia analizy porównawczej transkryptomu linii bliskoizogenicznych Pc60/pc60 wyprowadzonych z populacji 660 (Kasztan x Pc60) przeprowadzono eksperyment, w którym linie poddano porażeniu izolatem CR257 *Puccinia coronata*. Tkankę do analiz kontrolnych pobrano z linii bliskoizogenicznych hodowanych w tych samych warunkach co rośliny testowe. Fragmenty liści do izolacji RNA pobierano po 6, 12, 24, 48 i 72 godzinach po porażeniu. Tkankę natychmiast po pobraniu umieszczano w temperaturze -80°C. Po pobraniu całości materiału tkankę rozcierano w moździerzach w temperaturze ciekłego azotu i przetrzymywano w suchym lodzie do czasu roztrarcia wszystkich próbek, następnie przeprowadzano procedurę izolacji odczynnikiem TRIZOL. Parametry jakościowe i ilościowe otrzymanych preparatów RNA określono elektroforetycznie (fot. 4), wykorzystując spektrofotometr Nanodrop, fluorymetr Qubit oraz TapeStation (ryc. 3).



Fot.4. Rozdział elektroforetyczny wybranych preparatów RNA wyizolowanych z linii NIL dla genu Pc60 po infekcji *Puccinia coronata*.



Ryc. 3. Wyniki analizy wybranych preparatów RNA na TapeStation umożliwiające określenie parametru RIN.

Wnioski:

1. Zmodyfikowana metoda izolacji RNA z wykorzystaniem TRIZOLU dostarcza RNA o parametrach umożliwiających jego sekwencjonowanie.
2. Wyizolowane preparaty RNA, reprezentujące linie bliskoizogeniczne dla genu Pc60 poddane infekcji *Puccinia coronata*, charakteryzowały się dobrą jakością ocenioną elektroforetycznie, spektrofotometrycznie oraz fluorymetrycznie.
3. Preparaty RNA, pomimo stosunkowo niskich wartości RIN (6,7-7,3) spełniły parametry wymagane do sekwencjonowania na platformie Illumina.
4. Uzyskane dane sekwencyjne stanowiąc będą podstawę dalszych analiz prowadzonych w projekcie ukierunkowanych na identyfikację transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w liniach bliskoizogenicznych Pc60/pc60.

Temat badawczy 3

Analiza porównawcza transkryptomu linii bliskoizogenicznych Pc39/pc39 oraz Pc60/pc60 po infekcji *P. coronata*.

Wyniki

Przeprowadzono analizę genów ulegających zróżnicowanej ekspresji po porażeniu grzybem *Puccinia coronata* linii bliskoizogenicznych z genem odporności *Pc39/pc39*. Poszukując transkryptów potencjalnie różnicujących linie odporne od porażonych oparto się na opracowanym w roku 2023 modelu trzecim. Model ten skupia się wyłącznie na zrozumieniu wpływu czynnika oporności na ekspresję genów, bez uwzględnienia zmian związanych z czasem. W modelu tym zidentyfikowano 243 geny o zróżnicowanej ekspresji (wartość $p < 0,05$, bezwzględna (lfc) > 1), a wśród nich geny których ekspresja w liniach wrażliwych uległa zwiększeniu (138 genów) i geny, których ekspresja uległa obniżeniu (105 genów). Zmiany w poziomie ekspresji wyselekcjonowanych 243 genów sięgały od -10,6 dla AVESA.00003a.r1.6AG04873300 do 10,27 dla AVESA.00003a.r1.4CG03002570 (ryc. 4).

Analizując lokalizację genów dla poszczególnych transkryptów stwierdzono, że najczęściej genów (109) zlokalizowanych było na chromosomie 4C w rejonie obejmującym około 15 Gb oraz na chromosomie 6C (68) w rejonie tego chromosomu również obejmującym obszar około 15 Gb. Wśród transkryptów znaleziono aż 62 pochodzące z więcej niż jednej lokalizacji w genomie. Transkryptów o podwójnych lokalizacjach było 52 i w 31 przypadkach geny dla tych transkryptów położone były na chromosomach 4C i 6A.



Ryc.4. Zmiany poziomu ekspresji wybranych genów w pięciu punktach czasowych eksperymentu prowadzonego w celu identyfikacji genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na porażenie *Puccinia coronata*.

Wnioski:

1. Analiza DEG umożliwiła identyfikację transkryptów ulegających zróżnicowanej ekspresji w liniach NIL Pc39/pc39 w trakcie porażenia *P. coronata*.
2. Analiza DEG z zastosowaniem modelu trzeciego umożliwiła identyfikację 243 transkryptów, zlokalizowanych głównie na niewielkim obszarze chromosomu 4C oraz na porównywalnym wielkościowo obszarze chromosomu 6A, których zmiany w poziomie ekspresji sięgały od -10,6 dla do 10,27.
3. Analizując lokalizację genów dla poszczególnych transkryptów stwierdzono, że najczęściej genów (109) zlokalizowanych było na chromosomie 4C w rejonie obejmującym ok 15 Gb oraz na chromosomie 6C (68) w rejonie tego chromosomu również obejmującym obszar około 15 Gb.

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 odmian i linii hodowlanych <i>A. sativa</i> , genotypów <i>A. sterilis</i> i <i>A. byzantina</i> poddanych kompleksowej ocenie odporności na choroby	200	200	100
1.1	Liczba kombinacji mieszańcowych poddanych rozmnożeniu, przeznaczonych do piramidyzacji genów	10	10	100
temat badawczy 2				
2.1	Liczba linii F ₃ , dla których zostanie określona zgodność segregacji markera z fenotypem <i>Pc51/pc51</i>	240	240	100
2.2	Liczba linii F ₃ , dla których zostanie określona zgodność segregacji markera z fenotypem <i>Pc101/pc101</i>	240	240	100
2.3	Liczba markerów sprzężonych z genem <i>Pc51</i> , które zostaną przetestowane na segregujących populacjach	3	3	100
2.4	Liczba markerów sprzężonych z genem <i>Pc101</i> , które zostaną przetestowane na segregujących populacjach	4	4	100
2.5	Liczba sekwencji DARtseq, dla których zostaną zaprojektowane sondy TaqMan	6	6	100
temat badawczy 3				
3.1	Liczba analizowanych preparatów RNA	60	60	100
3.2	Liczba przeprowadzonych analiz funkcjonalnych genów ulegających różnicowanej ekspresji	1	1	100
			ŚREDNIA	100
			% REALIZACJI ZADANIA	100