

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
w 2023 roku

Zadanie badawcze **21**

**Identyfikacja genów związanych z odpornością grochu
na askochytozę i jej wpływ
na sprawność fotosyntetyczną roślin**

Kierownik:

Prof. Małgorzata Jędrzycka, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu
mjed@igr.poznan.pl

Wykonawcy:

Dr Magdalena Gawłowska – Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Dr Joanna Kaczmarek – Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Mgr Witold Irzykowski – Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Dr Monika Kaszuba – Stacja Dydaktyczno-Badawcza UWM w Tomaszkanie

Personel pomocniczy IGR PAN oraz Stacji Dydaktyczno-Badawczej UWM Tomaszkanie

Cele zadania badawczego

1. Przygotowanie izolatów *Peyronellaea* do porażenia roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) (warunki kontrolowane i II rok doświadczenia polowego) i populacji mapującej (90 linii) [I rok doświadczenia. (Wt11238 x Wt401)] w warunkach polowych.
2. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (36 linii) (II rok doświadczenia polowego) i w liniach populacji mapującej (90 linii) [I rok doświadczenia. (Wt11238 x Wt401)] w warunkach polowych. Określenie korelacji ze stopniem porażenia.
3. Analiza metodą qPCR genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na porażenie. projektowanie markerów na sekwencje wskazane po analizie danych z RNAseq.
4. Reizolacja patogenów z porażonych roślin z warunków kontrolowanych i polowych w celu identyfikacji szczepów wywołujących zmiany nekrotyczne.
5. Uzupelnienie liczby linii w populacji mapującej przez skrócony cykl hodowlany.
6. Genotypowanie linii populacji mapujących.

Cele osiągnięto, badania zostaną ukończone zgodnie z planem pod koniec grudnia 2023 r.

Materiały i metody

1. Uprawa i namnażanie roślin w warunkach szklarniowych i polowych
2. Wyprowadzanie kolejnych pokoleń roślin mieszańcowych metodą SSD.
3. Testy inokulacyjne w warunkach kontrolowanych (Centrum Uprawy Roślin IGR PAN w Poznaniu): siew i pielęgnacja roślin, przygotowanie inokulum, inokulacja, ocena stopnia porażenia roślin.
4. Testy inokulacyjne w warunkach polowych:
 - a) pole doświadczalne IGR PAN w Poznaniu (Wielkopolska)
 - b) pole doświadczalne SDB UWM w Tomaszkanie (Warmia)siew, pielęgnacja roślin, inokulacja, zamgławianie, liczenie wschodów, ocena stopnia porażenia roślin, zbiór i oznaczenie elementów struktury plonu.
5. Metody mykologiczne i fitopatologiczne w warunkach laboratoryjnych: przygotowanie pożywek płynnych i agarowych. izolacja grzybów z porażonych roślin, identyfikacja morfologiczna, pasażowanie grzybów, przygotowanie zawiesiny zarodników do testów inokulacyjnych.
6. Identyfikacja molekularna: izolacja DNA z grzybni. powielenie fragmentu ITS i β -tubuliny metodą PCR, sekwencjonowanie fragmentu ITS metodą Sanger, porównanie sekwencji z bazą danych NCBI.
7. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego: oznaczenie ilości chlorofilu (SPAD). Badanie sprawności fotosystemu II (Handy Pea).
8. Genotypowanie linii populacji mapującej z wykorzystaniem sekwencjonowania przez genotypowanie (GBS). Materiał genetyczny linii trawiony enzymem restrykcyjnym ApeKI, przyłączanie krótkich sekwencji, powielanie otrzymanych fragmentów, a następnie sekwencjonowanie i analizowanie w celu odnalezienia zmian pojedynczych nukleotydów. Wykorzystanie sekwenatora NextSeq P2.
9. Ilościowy PCR: Light Cycler Roche96. Jako geny referencyjne przebadano ACT aktywną, H3: histon. TUB: β -tubulinę. EF czynnik elongacyjny. Stabilność genów referencyjnych sprawdzono za pomocą programów geNorm i RefFinder.
10. Metody statystyczne: korelacja Pearsona, analiza wariancji dla doświadczeń jednoczynnikowych.

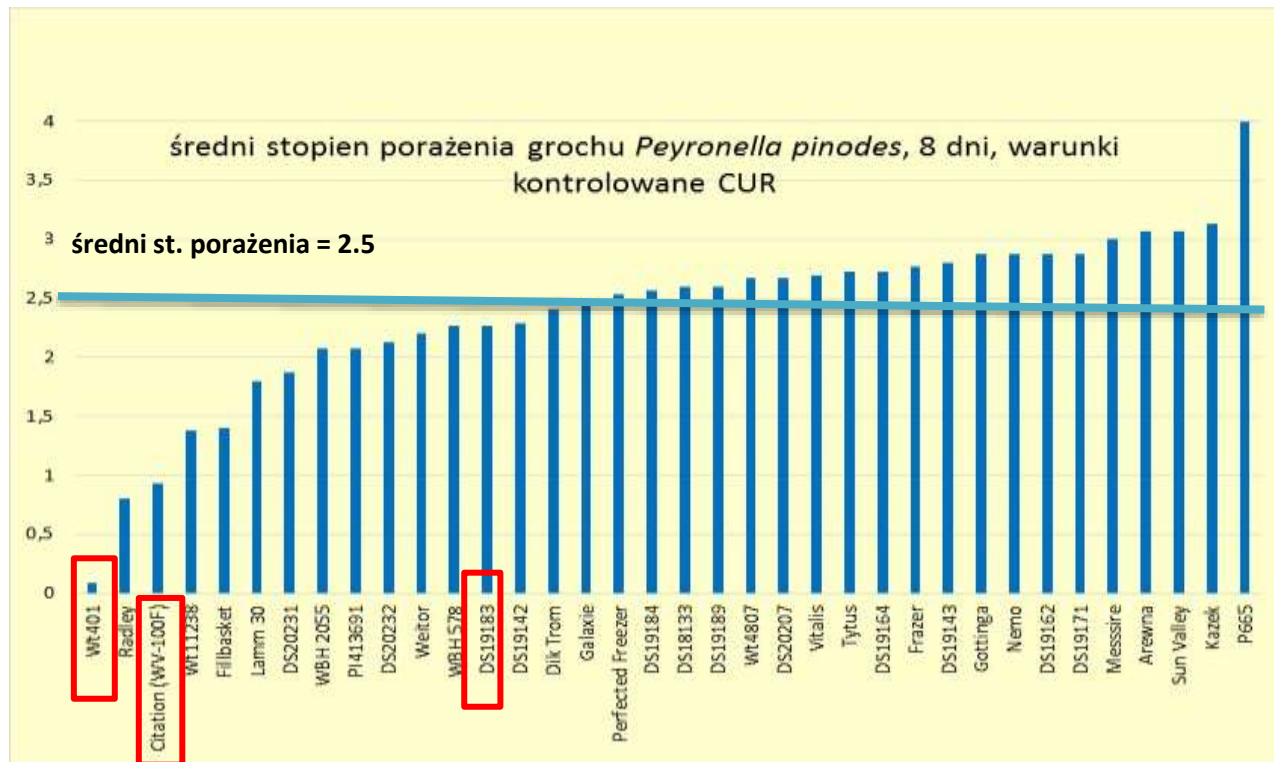
Temat badawczy 1

Przygotowanie izolatów *Peyronellaea pinodes* do inokulacji roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) (warunki kontrolowane i II rok doświadczenia polowego) i populacji mapującej (90 linii) [I rok doświadczenia (Wt11238 x Wt401)] w warunkach polowych

Inokulacja izolatem *P. pinodes*

Ocena porażenia według skali (0-5) Onfroy i in. 1999

Bonitacja wg skali 0-9. Xu i in. (1996):



Doświadczenie w warunkach kontrolowanych (Centrum Uprawy Roślin IGR PAN)

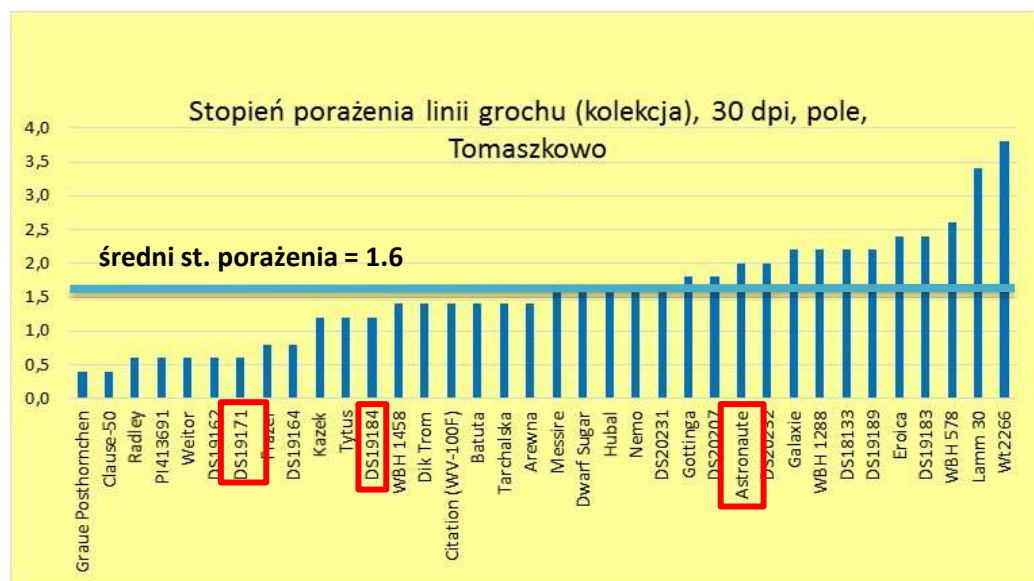
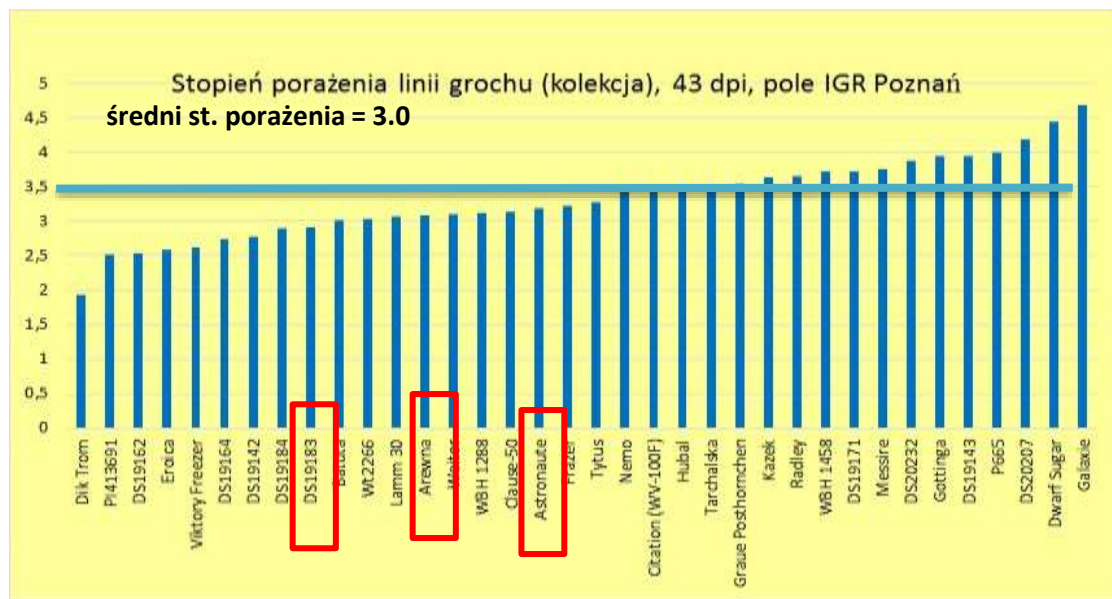
Linie najbardziej odporne warunkach kontrolowanych (CUR) w 2022 r.

Temat badawczy 1

Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) II rok doświadczenia polowego) i populacji mapującej (90 linii) [I rok doświadczenia (Wt11238 x Wt401)] w warunkach polowych.



Linie najbardziej odporne w 2022 r.



Temat badawczy 1

Korelacja stopnia porażenia linii grochu inokulowanych na polu oraz elementów struktury plonu.

Lp.	Stopień porażenia wszystkich roślin inokulowanych	% roślin porażonych	Stopień porażenia roślin porażonych
IGR	3.2	0.98	3.3
SBD	1.9	0.9	2.0

Najwyższy plon wśród roślin porażonych (kolekcja) uzyskały odmiany **DS18133**, **DS19189**, **Arewna**, **Hubal**, **DS19143**. Najwyższy plon wśród roślin kontrolnych uzyskały linie **Kazek**, **DS19184**, **DS20232**, **Hubal**, **DS20207**.

Linie z populacji mapującej uzyskały porównywalny plon z liniami z kolekcji w warunkach kontrolowanych, natomiast znacznie obniżony na poletkach porażonych (o **60%**). Linie z kolekcji uzyskały podobny plon na poletkach kontrolnych i porażonych. Uzyskany plon był niższy niż w 2022 roku.



Temat badawczy 2

Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (36 linii, II rok doświadczenia polowego) i w liniach populacji mapującej (Wt11238 × Wt401, 90 linii, I rok doświadczenia polowego). Określenie korelacji ze stopniem porażenia.

CUR	SPAD	Fv/Fm	psi(Eo)	P.I.csm	ETo/CSo	ETo/RC	średni st porażenia wszystkich roślin
Rośliny kontrolne	42.5	0.806	0.564	4689	91.5	0.677	0.0
Rośliny porażone	42.6	0.780	0.640	7051	92.6	0.547	2.5

Fv/Fm –maksymalna fotochemiczna wydajność kwantowa PSII

psi0 – część energii świetlnej przechwytywanej w centrum reakcji PSII..

P.I.csm – ogólna wydajność fotochemiczna PSII przy wysokim natężeniu światła.

ET₀/CS –transport elektronów przez CS przy czasie t=0.

ET₀/RC – szybkość transportu elektronów przez RC przy czasie t=0

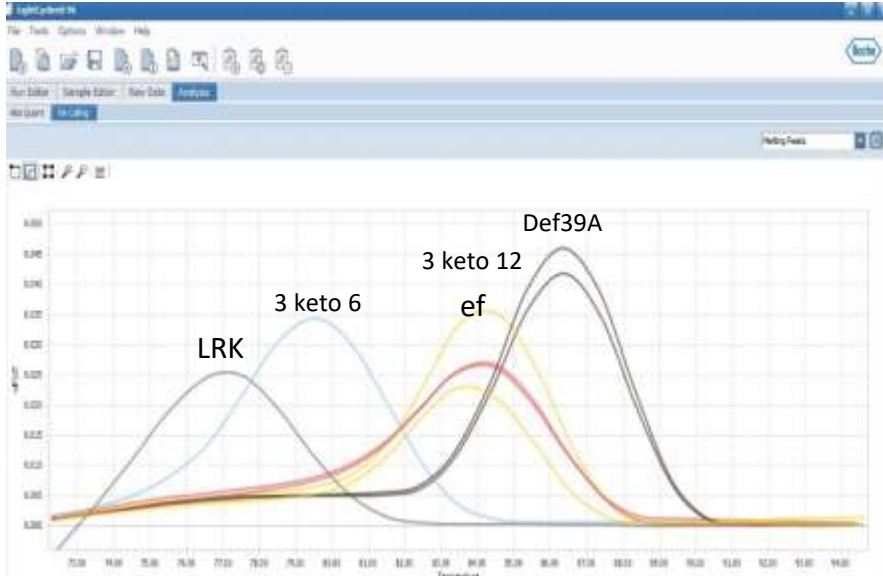
Rośliny po inokulacji CUR	Średni st. por. roślin
SPAD	0.19
Fv/Fm	-0.28
psi(Eo)	-0.02
P.I.csm	-0.12
ETo/CSo	0.16
ETo/RC	0.13

IGR PAN	Fv/Fm	psi(Eo)	P.I.csm	ETo/CSo	ETo/RC	średni st porażenia wszystkich roślin
Rośliny kontrolne	0.670	0.517	2480	57.3	0.623	1.3
Rośliny porażone	0.756	0.664	6239	74.8	0.719	3.0

- Wśród roślin porażonych korelacje pomiędzy porażeniem. a parametrami aparatu fotosyntetycznego były ujemne dla warunków kontrolowanych (najwyższa pomiędzy porażeniem a parametrem Fv/Fm: -0.28) podobnie jak w 2022 r.
- Wśród roślin porażonych wzrastał przepływ elektronów na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki (CS) (ETo/CS) i wydajność fotochemiczna PSII (P.I.csm).

Temat badawczy 3

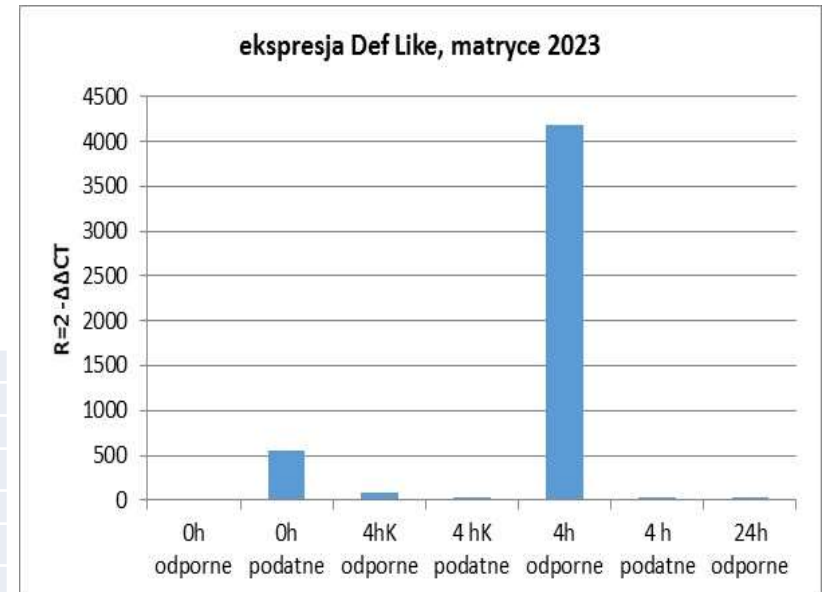
Analiza metodą qPCR genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na porażenie, projektowanie markerów na sekwencje wskazane po analizie danych z RNAseq.



Sekwencje z eksperymentu RNAseq, analizowane metodą qPCR

sequence	function
Psat3g189200	chitinase
Psat7g118080	cam00943 Isoflavonoid synthase
Psat2g168960	Isoflavonoid biosynthesis, Cytochrome P450 81E8
Psat5g242400	Defensin-like protein 39
Psat6g113040	cam04075 Indole-3-acetic acid-induced protein ARG4
Psat5g284160	cam00062 3-ketoacyl-CoA synthase 12
Psat6g228120	cam00062 3-ketoacyl-CoA synthase 6
Psat3g058400	Ethylene-responsive transcription factor ERF095
Psat2g111840	Full=Blight resistance protein B149

Analiza nowych markerów. zaprojektowanych przy wykorzystaniu biblioteki RNAseq



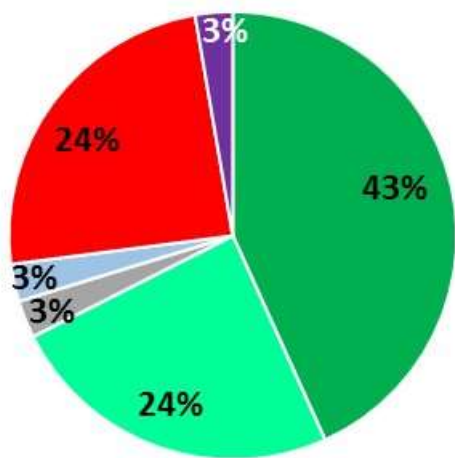
Najwyższy poziom ekspresji sekwencji Def like stwierdzono 4h po inokulacji

Temat badawczy 4

Reizolacja patogenów z porażonych roślin z warunków polowych w celu identyfikacji szczepów wywołujących zmiany nekrotyczne.

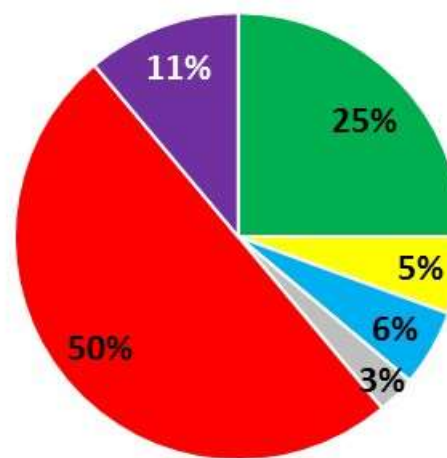
Wykazano obecność gatunków *Didymella pomorum* i *Peyronellaea pinodes*, które wywołują askochytozę.

Wielkopolska



- *Pyronella pinodes*
- *Fusarium equiseti*
- *Fusarium oxysporum*
- *Fusarium sporotrichioides*
- *Alternaria alternata*
- *Cladosporium cladosporioides*

Warmia i Mazury



- *Pyronella pinodes*
- *Didymella pomorum*
- *Fusarium equiseti*
- *Fusarium oxysporum*
- *Alternaria alternata*
- *Cladosporium cladosporioides*



Temat badawczy 5

Uzupełnienie liczby linii w populacji mapującej przez skrócony cykl hodowlany.

Uzyskano nowe materiały do badań w 2024 r.

Tg 10/2023 (Wt11238 x Wt401)

lp.	nr pol	I.nasion zebranych	pokolenie
1	10/23	23	F7

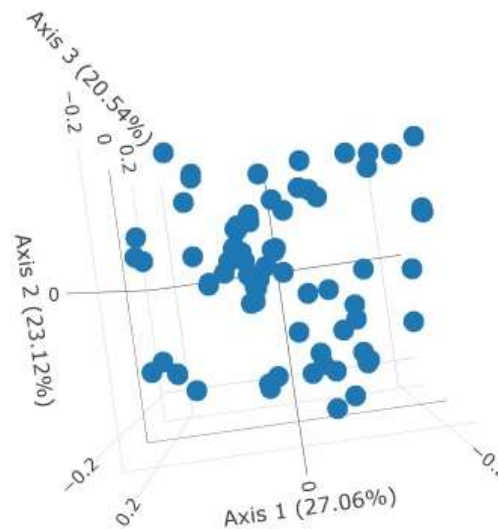
Tg 11/2023 (Wt401xWt4807)

lp.	nr pol	I.nasion zebranych	pokolenie
2	11/50	10	F7
3	11/63	39	F10
4	11/85	42	F11
5	11/93	56	F7

11921 markerów przypisano do Chr1, 12178 do Chr2, 12549 do Chr3, 13163 do Chr4, 14222 do Chr6, 15992 do Chr7, 18242 do Chr5. Po zastosowaniu filtra pozostało 16254 markerów (usunięto markery przy odczytach >50% brakujących genotypów lub <95% wszystkich linii lub gdy parametr maf (minor allele frequency) < 1%).

Temat badawczy 6

Genotypowanie linii populacji mapujących.



Analiza PCA (Principal Components Analysis) wykazała zmienność 27% wzdłuż osi 1, 23% wzdłuż osi 2 i 21% wzdłuż osi 3. Linia rodzicielska Wt401 znajdowała się najdalej od drugiej linii rodzicielskiej wzdłuż osi 1 i 2 (wraz z linią 10.30, 10.5_2 i 10.10). Druga linia rodzicielska Wt11238 znajdowała się najdalej od linii Wt401 wzdłuż osi 1 i 2 (wraz z linią 10.16II). Średnia głębokość odczytu wahała się od 8 do 22 na próbę. Frakcja odczytów brakujących genotypów w próbce wynosiła od 0,14 do 0,46%.

Chromosome length

