

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
w 2021 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

**Personel pomocniczy IGR PAN, Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Stacja Hodowli Roślin
Wiatrowo, Stacja Doświadczalno-Badawcza UWM Tomaszkowo**

Cele zadania badawczego

1. Przygotowanie izolatów *Peyronella pinodes* do inokulacji roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (20 linii) w warunkach kontrolowanych. Testy pilotażowe w warunkach polowych. Cel został osiągnięty.
2. Ocena parametrów aktywności i sprawności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (20 linii) w warunkach kontrolowanych. Określenie korelacji ze stopniem porażenia. Cel został osiągnięty.
3. Optymalizacja metody qPCR, wybór genów referencyjnych, analiza genów referencyjnych w badanych materiałach. Cel został osiągnięty.
4. Izolacja patogenów z porażonych roślin w celu identyfikacji szczepów wywołujących zmiany nekrotyczne. Cel został osiągnięty.
5. Uzupełnienie liczby linii w populacjach mapujących przez skrócony cykl hodowlany. Cel został osiągnięty.

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, inokulacja, ocena stopnia porażenia
4. Testy inokulacyjne w warunkach polowych:
 - a) pole doświadczalne IGR PAN w Poznaniu (Wielkopolska)
 - b) pole doświadczalne SDB UWM w Tomaszkanie (Warmia)zaprawianie nitraginą, siew, pielęgnacja roślin, inokulacja, zamgławianie, liczenie wschodów, ocena stopnia porażenia, zbiór i oznaczenie elementów struktury plonu
5. Metody mykologiczne i fitopatologiczne w warunkach laboratoryjnych: przygotowanie pożywek płynnych i agarowych, izolacja grzybów z porażonych roślin, pasażowanie grzybów, przygotowanie zawiesiny zarodników do testów inokulacyjnych, identyfikacja morfologiczna
6. Identyfikacja molekularna: izolacja DNA z grzybni, powielenie fragmentu ITS 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, LiCOR).
8. Ilościowy PCR: Light Cycler Roche96. Jako geny referencyjne przebadano ACT aktywną, H3: histon, TUB: β -tubulinę, EF czynnik elongacyjny. Stabilność genów referencyjnych została sprawdzona za pomocą programów geNorm i RefFinder.
9. Metody statystyczne: korelacja Pearsona, analiza wariancji dla doświadczeń jednoczynnikowych.

Temat badawczy 1

Przygotowanie izolatów *Peyronella pinodes* do inokulacji roślin grochu.

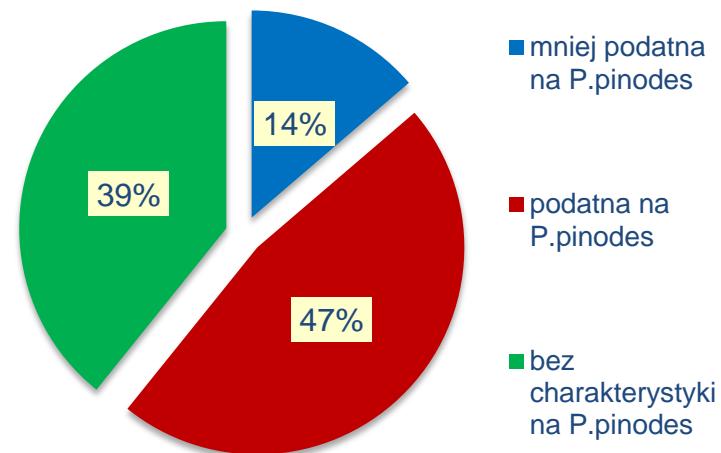
Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (20 linii) w warunkach kontrolowanych

Inokulacja izolatami *Peyronella pinodes* PIN-03 i PIN-05

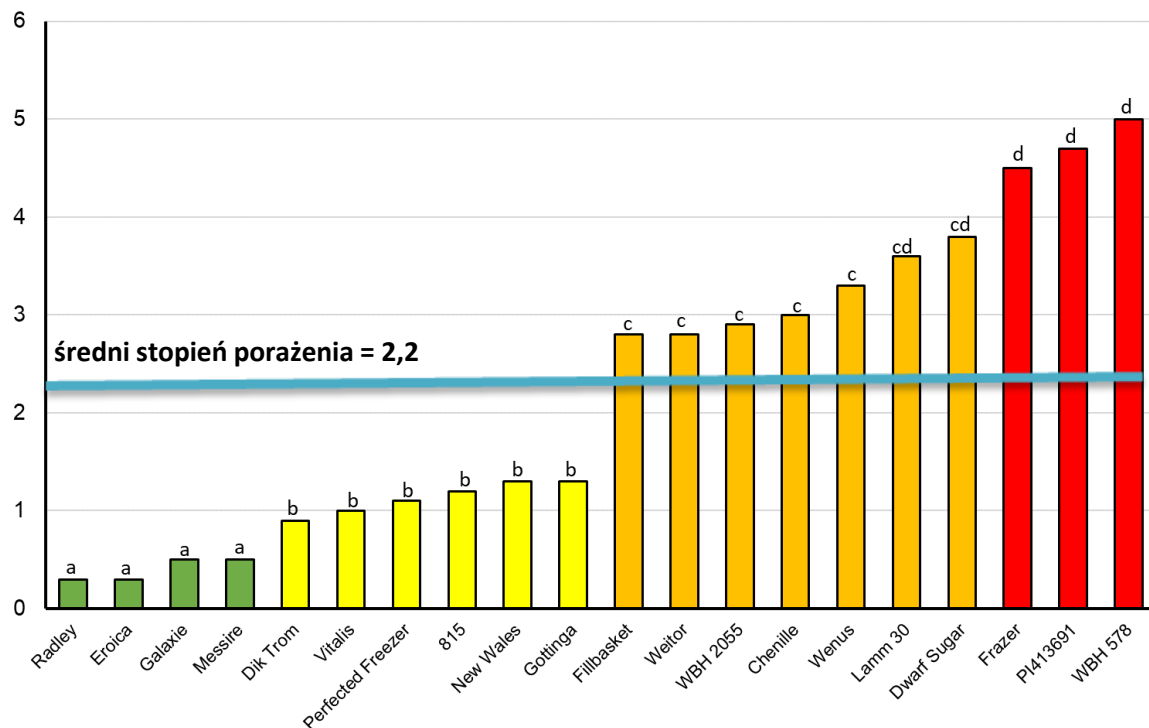
Ocena porażenia według skali (0-5) [Onfroy i in. 1999](#)

Bonitacja wg skali 0-9, [Xu i in. \(1996\)](#):

Charakterystyka linii wg katalogu John Innes Centre, Wielka Brytania



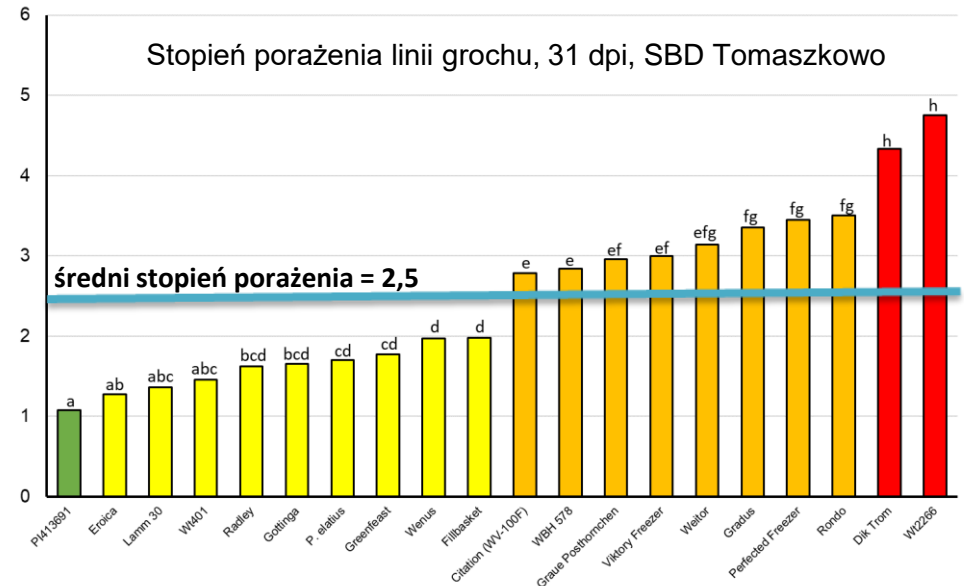
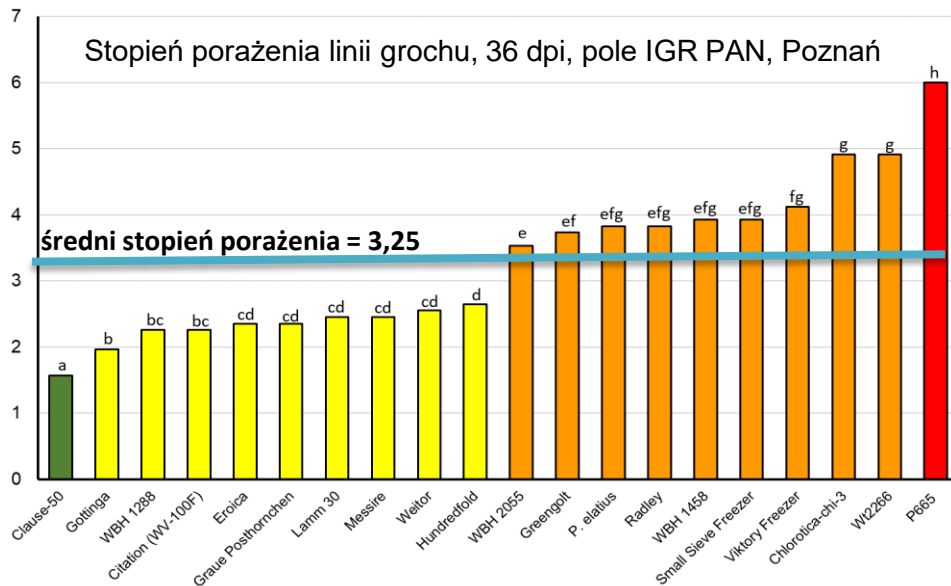
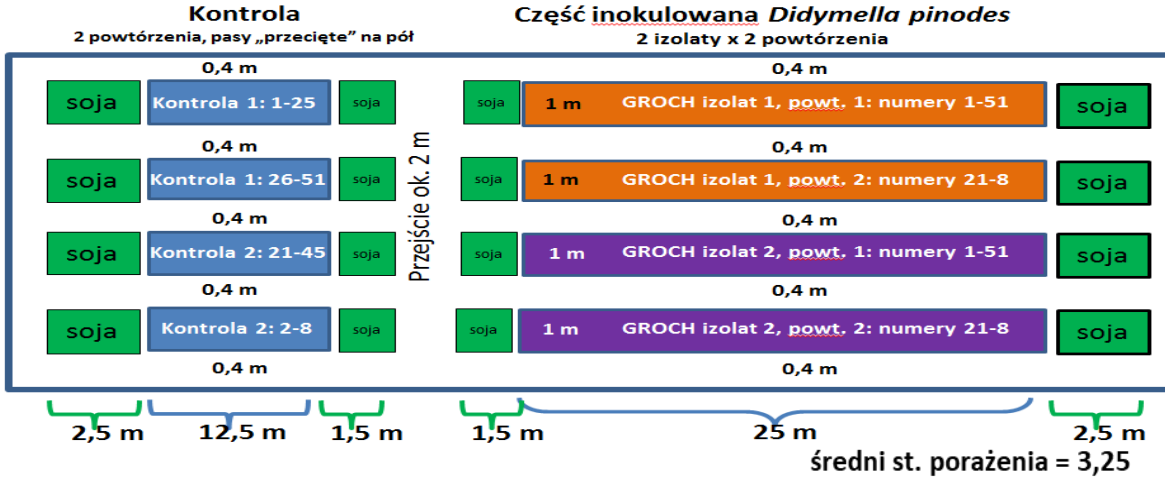
Stopień porażenia linii grochu grzybami *Peyronella pinodes* (askochytoza) 31 dpi, warunki kontrolowane (Centrum Uprawy Roślin PAN)



Temat badawczy 1

Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu w warunkach polowych

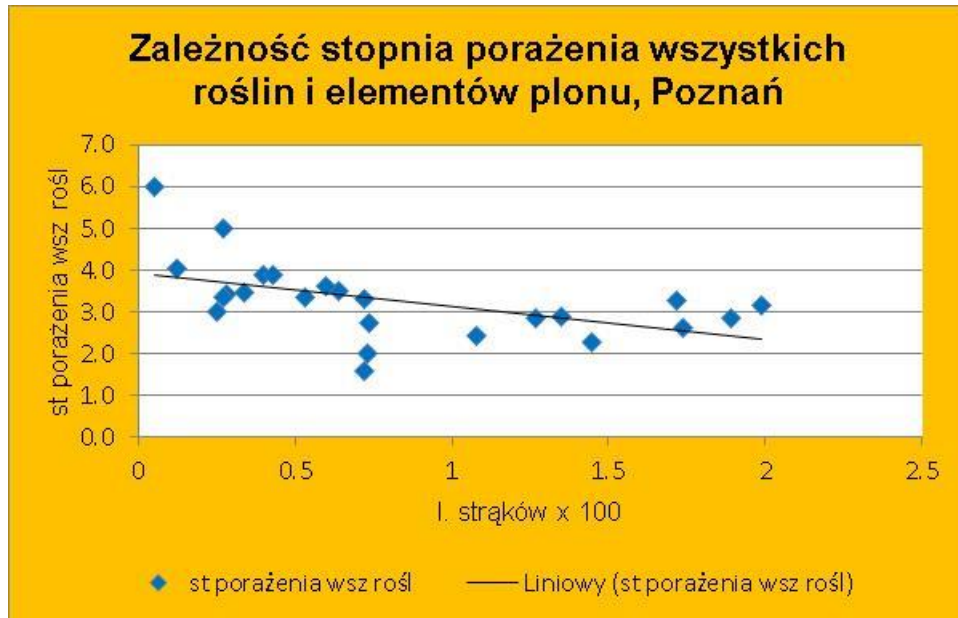
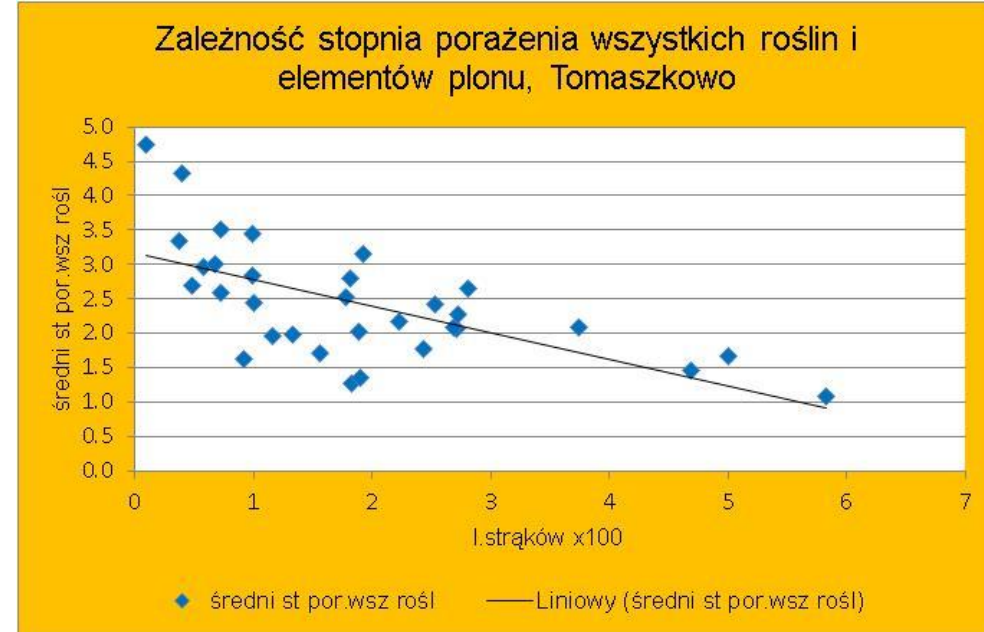
Tunel 6 m x 48 m



Temat badawczy 1

Korelacja stopnia porażenia linii grochu inokulowanych w warunkach kontrolowanych i na polu oraz elementów struktury plonu

Rośliny inokulowane TOMASZKOWO	Średni stopień porażenia roślin	% roślin poraż.	Średni st por. roślin poraż.	Liczba strąków	Liczba nasion
Średni st por. wszystkich roślin	1.00				
% roślin poraż.	0.83	1.00			
Średni st por. roślin por.	0.64	0.14	1.00		
L. strąków	-0.71	-0.70	-0.38	1.00	
L. nasion	-0.64	-0.67	-0.27	0.96	1.00



Rośliny inokulowane, POZNAŃ	Liczba strąków	Stopień porażenia roślin
Liczba strąków	1.00	
Stopień porażenia roślin	-0.67	1.00

Temat badawczy 2

Ocena parametrów aktywności i sprawności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (20 linii) w warunkach kontrolowanych (CUR). Określenie korelacji ze stopniem porażenia

CUR	st por. rośl wsz	% r. poraż	st por. rośl poraż	Photo	Cond	Ci	Tr	Area	SPAD	Pn/Tr	Pn/Ci	Pn/Cond
Rośliny kontrolne				5.1	0.21	233.1	1.2	11.8	37.6	4.5	0.021	57.4
Rośliny porażone	2.12	0.80	2.41	5.0	0.12	295.4	1.8	4.5	29.4	2.9	0.018	42.1

Rośliny po inokulacji CUR	Stopień porażenia roślin	% roślin porażonych	Stopień porażenia rośl por
stopień porażenia roślin	1.00		
% roślin porażonych	0.82	1.00	
Stopień porażenia rośl poraż	0.97	0.71	1.00
Photo	-0.21	-0.18	-0.21
Cond	-0.11	0.05	-0.16
Ci	0.09	0.18	0.06
Trmmol	-0.09	0.04	-0.12
Area	-0.35	-0.37	-0.34
SPAD	-0.13	-0.28	-0.07
Pn/Tr	-0.15	-0.21	-0.13
Pn/Ci	-0.21	-0.23	-0.18
Pn/Cond	-0.08	-0.19	-0.03

Przenośny system pomiarowy **Licor-6400X** (Li-Cor Inc., Lincoln, USA)

Pn – intensywność fotosyntezy (netto)

Tr – intensywność transpiracji

Cond – przewodnictwo szparkowe; miara dyfuzji CO₂

C_i – międzykomórkowe stężenie CO₂

Area – powierzchnia liścia

SPAD - względna zawartość chlorofilu w liściach w jednostkach SPAD

Pn/Tr – liściowy miernik efektywności transpiracji

Pn/Cond – efektywność wymiany gazowej liścia

Pn/C_i – miernik sprawności procesu karboksylacji RuBP

(1,5-bisfosforybulozy) w fotosyntetycznym cyklu Calvina-Bensona

Temat badawczy 2

Ocena parametrów aktywności i sprawności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (20 linii) w warunkach kontrolowanych. Określenie korelacji ze stopniem porażenia.

ID	SPAD	Fv/Fm	psi(Eo)	P.I.csm	ETo/CSo	ETo/RC	poraż
Rośliny kontrolne	38.05	0.792	0.605	7065.16	84.05	0.629	0.64
Rośliny porażone	36.45	0.791	0.577	4785.93	78.81	0.740	3.21

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

ET_o/CS –transport elektronów przez CS przy czasie t=0

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

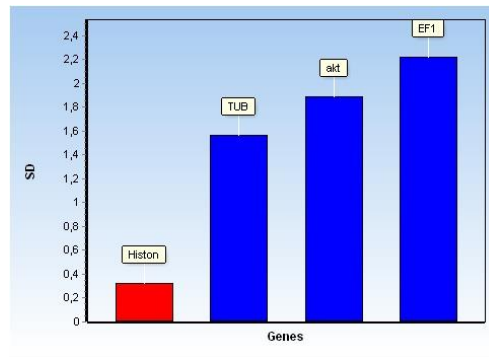
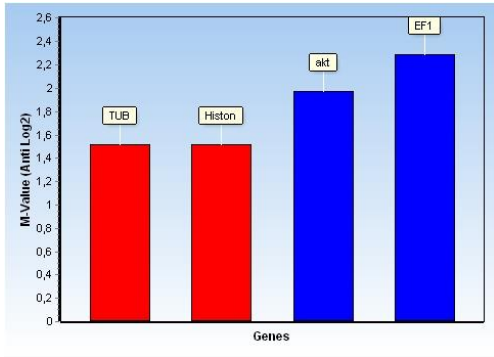
- **Korelacja wśród roślin porażonych była ujemna pomiędzy porażeniem, a wydajnością fotochemiczną PSII (P.I.csm).**
- **Wzrastała zawartość chlorofilu, malał przepływ elektronów na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki (ET_o/CS).**

	Średni stopień porażenia roślin	% roślin porażonych	Średni stopień porażenia roślin
Średni stopień porażenia roślin	1.00		
% roślin porażonych	0.34	1.00	
Średni stopień porażenia roślin	0.97	0.12	1.00
SPAD	-0.45	0.02	-0.48
Fv/Fm	0.02	0.12	0.01
psi(Eo)	-0.31	0.11	-0.34
P.I.csm	-0.41	0.11	-0.44
ETo/CSo	-0.37	0.06	-0.39
ETo/RC	0.05	-0.18	0.12

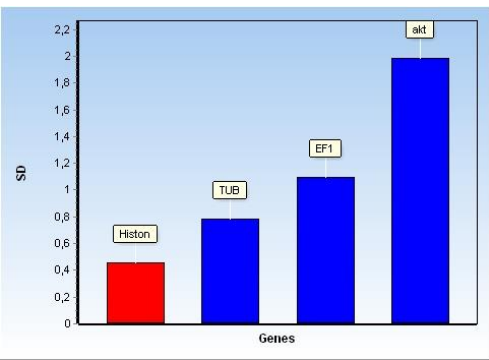
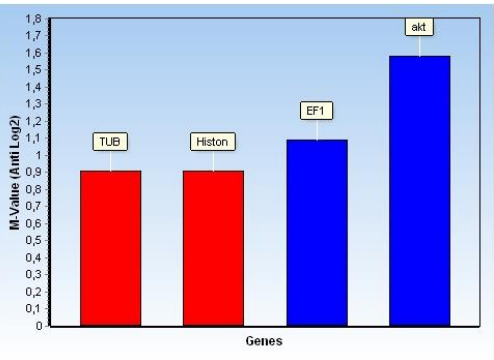
Temat badawczy 3

Optymalizacja metody qPCR, wybór genów referencyjnych, analiza genów referencyjnych w badanych materiałach

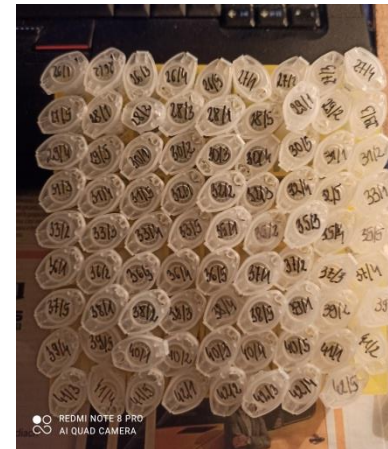
A



B



Próbki pobrane do izolacji RNA:
20 linii × 5 roślin, rośliny kontrolne i porażone,
przed inokulacją oraz 4godziny po inokulacji (4 hpi);
Łącznie: 400 próbek



Stabilność genów referencyjnych, oszacowana programem GeNorm i NormFinder, w liniach podatnych i mniej podatnych na askochytozę, próbki przed inokulacją (A) i 4h po inokulacji (B)

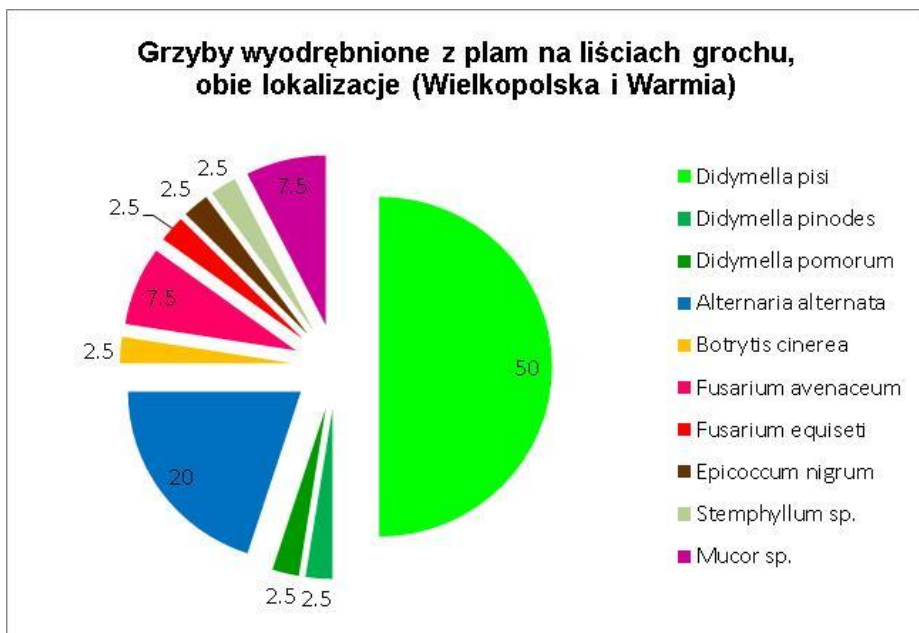
Jako geny referencyjne przebadano:

- ACT aktyne
- H3: histon
- TUB: β -tubulinę
- EF czynnik elongacyjny

- Najbardziej stabilnymi genami referencyjnymi dla prób kontrolnych (przed inokulacją) były **histon i tubulina**.
- Te same dwa geny zostały wskazane dla próbek zbieranych 4hpi.

Temat badawczy 4

Izolacja patogenów z porażonych roślin w celu identyfikacji szczepów wywołujących zmiany nekrotyczne



Nekrozy liści i łodyg grochu w warunkach naturalnych



Grzyby chorobotwórcze wyodrębnione z liści z nekrotycznymi zmianami

Temat badawczy 5

Uzupełnienie liczby linii w populacjach mapujących przez skrócony cykl hodowlany

Uzupełniono liczbę linii z pokoleń F4-F7 i wyprowadzono kolejne pokolenie F_n metodą SSD (*ang.* single seed descent) tj. wyprowadzenie pokoleń linii homozygotycznych metodą pojedynczego ziarna, modyfikacja klasycznego ramszu)



Rośliny pokoleń F4-F7 populacji mapującej **Wt11238 x Wt401** i pokoleń F3-F9 populacji mapującej **Wt 401 x Wt4807**