

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**  
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej  
w 2022 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 *P. pinodes* do porażenia roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) w warunkach kontrolowanych i polowych. *Cel został osiągnięty.*
2. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (36 linii) w warunkach kontrolowanych i polowych. Określenie korelacji ze stopniem porażenia. *Cel został osiągnięty.*
3. Analiza RNAseq dla linii skrajnych pod względem porażenia przez *P. pinodes*. Analiza bioinformatyczna danych po RNAseq. *Cel został osiągnięty.*
4. Analiza metodą qPCR genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na porażenie, projektowanie markerów na sekwencje wskazane po analizie danych z RNAseq. *Cel został osiągnięty.*
5. Reizolacja patogenów z porażonych roślin w celu identyfikacji szczepów wywołujących zmiany nekrotyczne. *Cel został osiągnięty.*
6. Uzupelnienie liczby linii w populacjach mapujących przez skrócony cykl hodowlany. *Cel został osiągnięty.*

# Materiały i metody

1. Uprawa i rozmnażanie 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)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 Sangera, 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. Transkryptomika, badania RNAseq: 3 linie podatne i 3 linie odporne na askochytozę, biblioteka TruSeq mRNA stranded. Sekwencjonowanie wykonane na NovaSeq6000 w konfiguracji 2x150bp, 40M odczytów. Sekwencje odniesiono do genomu referencyjnego grochu programem HISAT2. Wyznaczone zostały geny o ekspresji zróżnicowanej w odpowiedzi na porażenie askochytozą (DEGs). Została wykonana analiza typu KEGG (the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).
9. Ilościowy PCR: Light Cycler Roche96. Jako geny referencyjne przebadano ACT aktywną, H3: histon, TUB:  $\beta$ -tubulinę, EF czynnik elongacyjny. Stabilność genów referencyjnych została sprawdzona za pomocą programów geNorm i RefFinder.
10. Metody statystyczne: korelacja Pearsona, analiza wariancji dla doświadczeń jednoczynnikowych.

# Temat badawczy 1

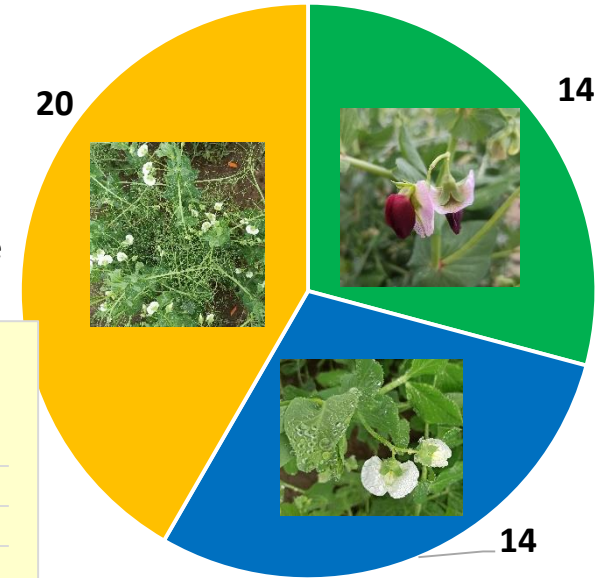
## Przygotowanie izolatów *Peyronella pinodes* do inokulacji roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) w warunkach kontrolowanych i polowych.

Inokulacja izolatami *Peyronella pinodes*

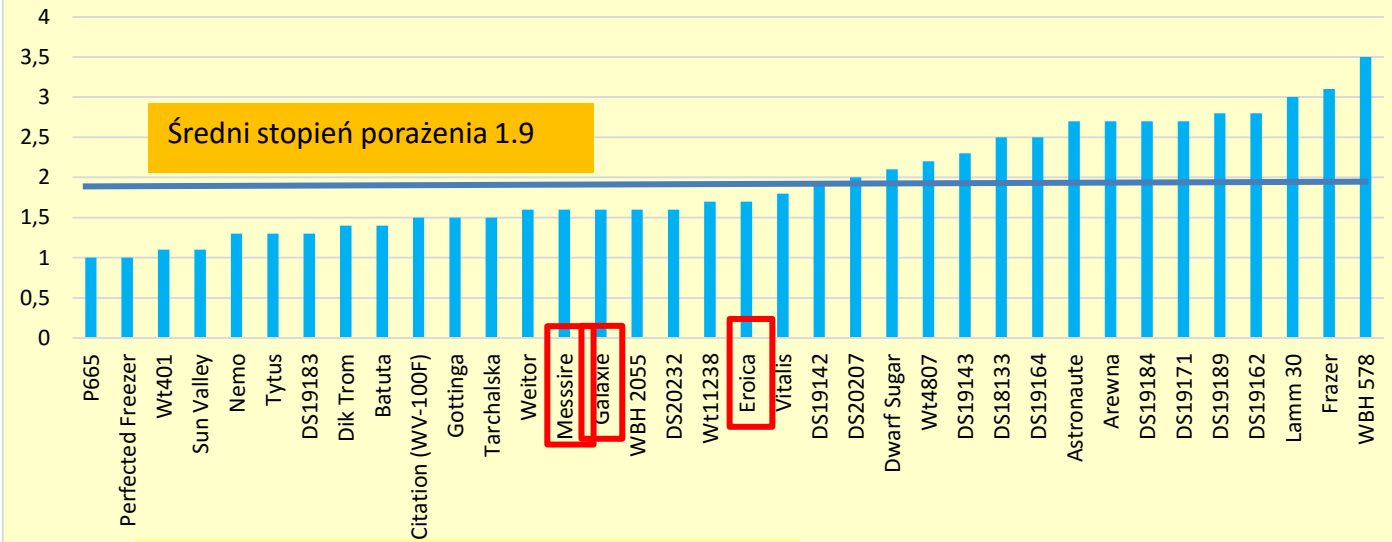
Ocena porażenia według skali (0-5) [Onfroy i in. 1999](#)

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

- linie z katalogu odporne
- linie z katalogu podatne
- linie hodowlane



Średni stopień porażenia grochu przez *Peyronella pinodes*, 8 dni po inokulacji, warunki kontrolne, CUR IGR PAN

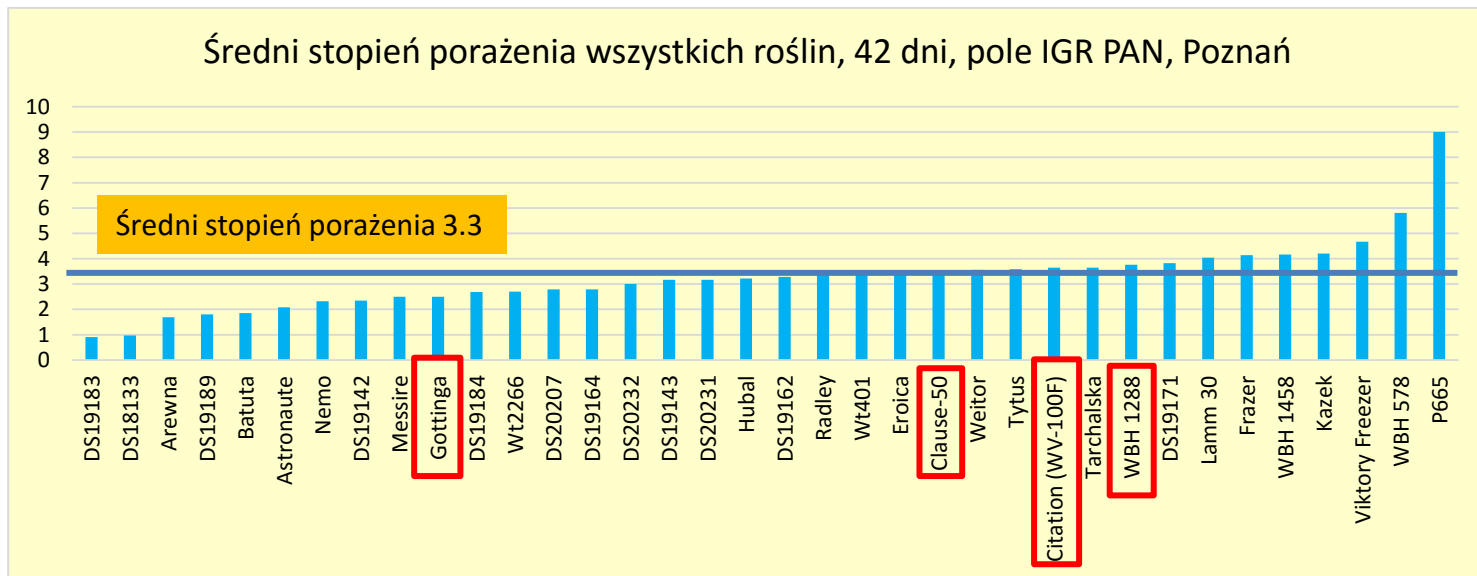


Linie najbardziej odporne CUR 2021

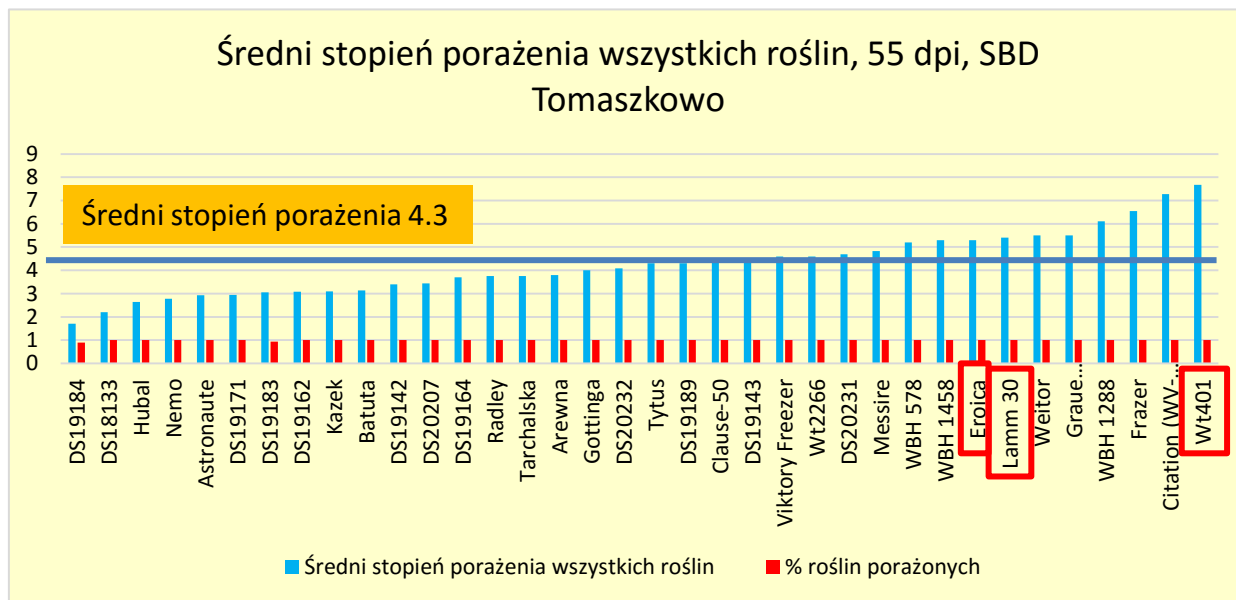


# Temat badawczy 1

## Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu w warunkach polowych



  Linie najbardziej odporne pole 2021

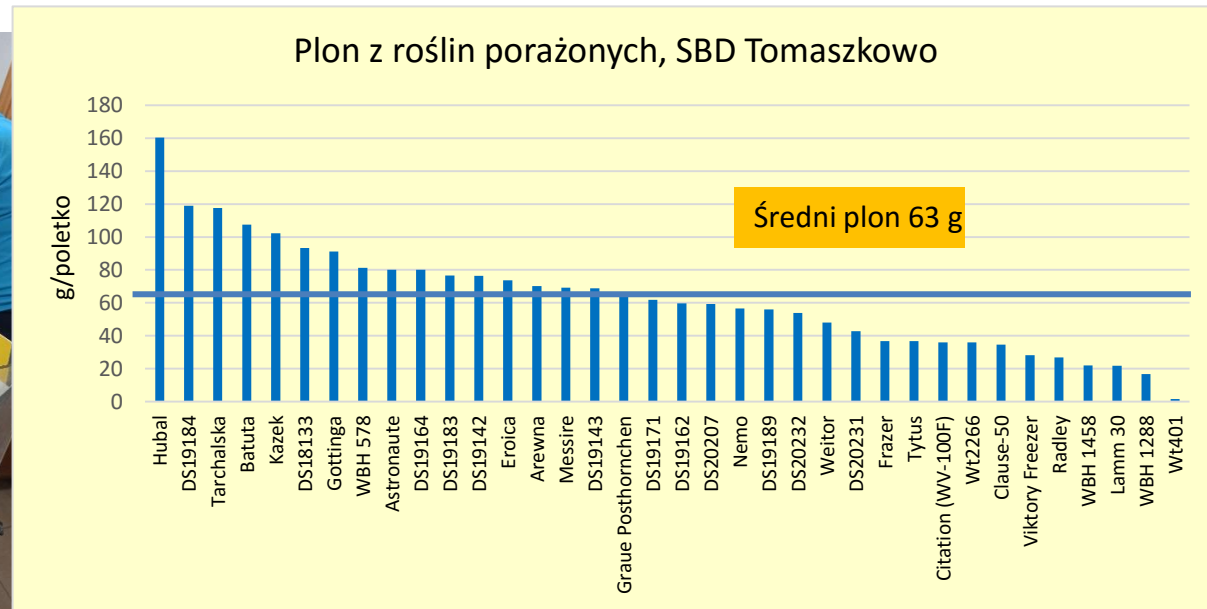
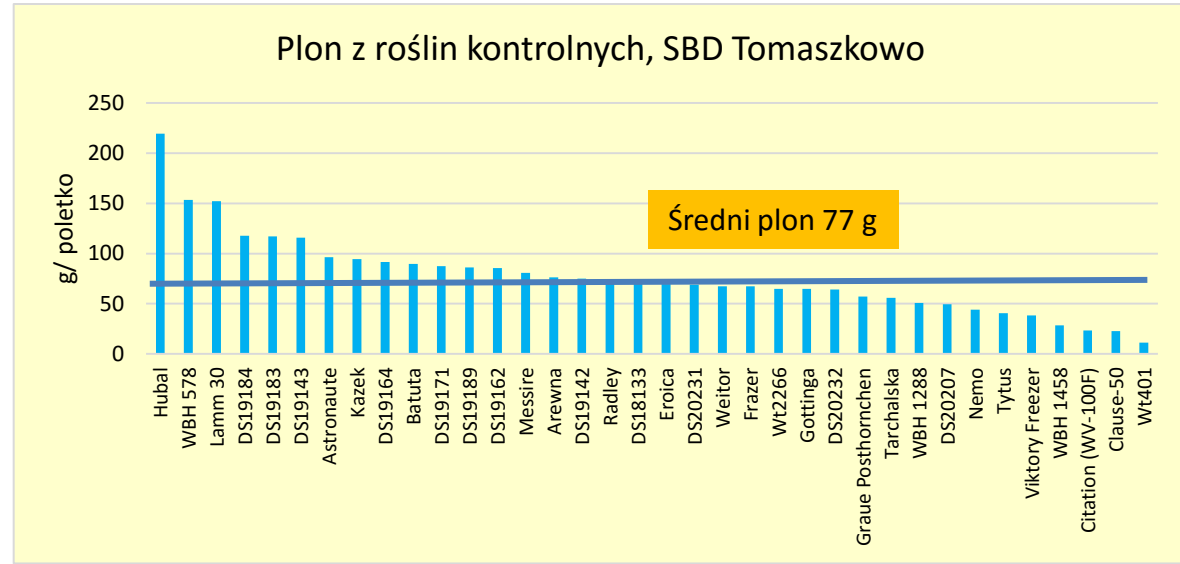




# Temat badawczy 1

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

rośliny inokulowane, Tomaszkowo	l. Roślin	l.strąków	l.nasion	plon	średni st porażenia wszystkich roślin
l. roślin	1.00				
l.strąków	0.55	1.00			
l.nasion	0.49	0.89	1.00		
plon	0.47	0.92	0.94	1.00	
średni st porażenia wszystkich roślin	-0.45	-0.60	-0.61	-0.67	1.00
% roślin porażonych	ns	ns	ns	ns	0.36
średni st porażenia roślin porażonych	-0.45	-0.60	-0.61	-0.67	1.00



## Temat badawczy 2

### Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (36 linii) w warunkach kontrolowanych i polowych. 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	38.05 ↑	0.771	0.764 ↓	18506 ↑	80.4 ↑	0.458 ↓	0.0 ↓
Rośliny porażone	41.26	0.767	0.818	11188	55.2	0.542	1.9

IGR Poznań	SPAD	Fv/Fm	psi(Eo)	P.I.csm	ETo/CSo	ETo/RC	średni st porażenia wszystkich roślin
Rośliny kontrolne	41,8 ↑	0.765	0.640 ↓	9650 ↓	100,2	0,535 ↓	0.84 ↓
Rośliny porażone	40.5	0.764	0.679	13 005	101.4	0.518	3.3

**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<sub>0</sub>/CS** –transport elektronów przez CS przy czasie t=0.

**ET<sub>0</sub>/RC** – szybkość transportu elektronów przez RC przy czasie t=0

Tomaszkowo	SPAD	Fv/Fm	psi(Eo)	P.I.csm	ETo/CSo	ETo/RC	średni st porażenia wszystkich roślin
Rośliny kontrolne	38.0	0.756 ↑	0.537 ↑	3514.7 ↑	73.9 ↑	0.636 ↑	1.3 ↓
Rośliny porażone	38.59	0.670	0.452	3182.7	60.9	0.558	4.3

- Wśród roślin porażonych korelacje pomiędzy porażeniem, a parametrami aparatu fotosyntetycznego były wyższe niż dla kontroli i ujemne dla terminu 42 dpi (najwyższa pomiędzy porażeniem, a parametrem Fv/Fm -0.51), zarówno na poletku IGR Poznań, jak i w Tomaszku.
- Wśród roślin porażonych mała przepływność elektronów na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki (CS) (ET<sub>0</sub>/CS) i wydajność fotochemiczna PSII (P.I.csm).

## Temat badawczy 3

### Analiza RNAseq dla linii skrajnych pod względem porażenia przez *Peyronella pinodes*.

### Analiza bioinformatyczna danych po RNAseq.

Linie, uznane za podatne na askochytozę i uznane za mniej podatne, z warunków kontrolowanych, wzięte do RANseq.

Sample ID	name on the list	ng/ul	RIN	group	wynik porażenia z CUR
1	Asc49_1pi24h	150 ng/ml	7.5	Res 1_asc	1.7
2	Asc4_4pi24h	150 ng/ml	6.6	Res 2_asc	1.0
3	Asc6_1_8pd	150 ng/ml	5.5	Res 3_asc	0.3
4	Asc46_1pi24h	150 ng/ml	6.3	Sus1_asc	3.5
5	Asc1_1pi24h	150 ng/ml	6.2	Sus2_asc	3.0
6	Asc7_1_8pd	150 ng/ml	6.0	Sus3_asc	4.7

Res - odporne, Sus – podatne,

Analiza statystyczna wyników sekwencjonowania.

sample	Library	raw reads	raw bases	clean reads	clean bases	error rate
Asc49_1pi24h	ERRA220019709-1a	89 014 894	13.35G	88 321 962	13.25G	0.03
Asc4_4pi24h	ERRA220019703-1a	88 708 586	13.31G	88 038 270	13.21G	0.03
Asc6_1_8pd	Asc6_1_8pd	100 196 358	15.03G	97 541 246	14.63G	0.03
Asc46_1pi24h	ERRA220019706-1a	100 495 464	15.07G	98 952 832	14.84G	0.03
Asc1_3k24h	ERRA220019714-1a	119 026 874	17.85G	118 202 382	17.73G	0.03
Asc7_3_8pd	Asc7_3_8pd	96 824 720	14.52G	95 380 904	14.31G	0.03

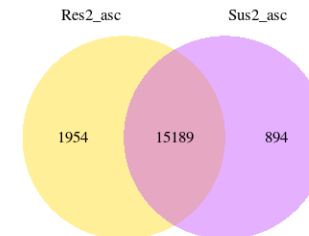
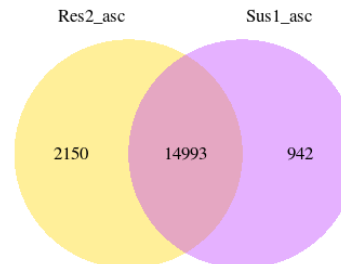


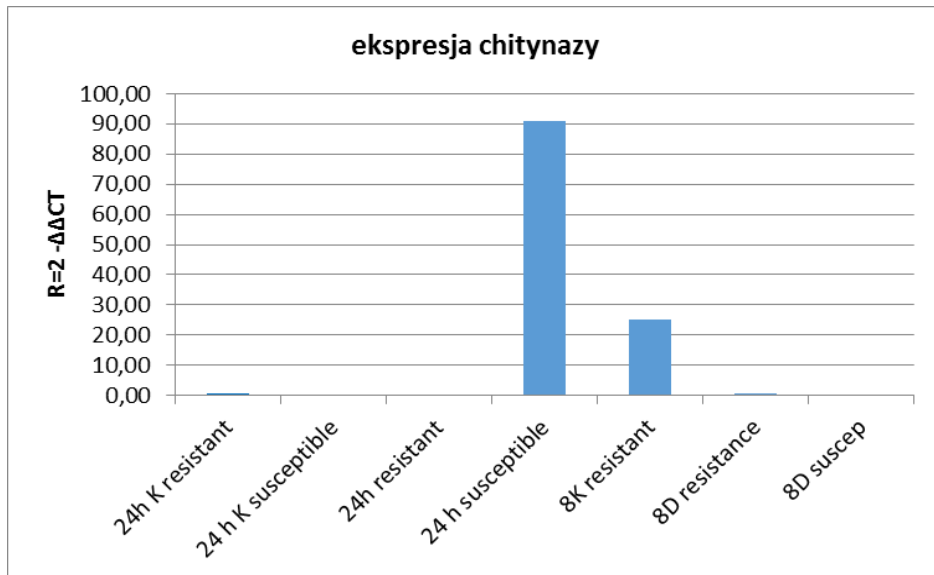
Diagram Venna, porównanie liczby sekwencji wspólnych i oddzielnych dla linii podatnych i mniej podatnych.



## Temat badawczy 4

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

Poziom ekspresji chitynazy i syntazy izoflawonowej w 20 liniach grochu z warunków kontrolowanych.



Najwyższy poziom ekspresji chitynazy stwierdzono 24h po inokulacji, natomiast poziom wyższy w odmianach odpornych w odniesieniu do podatnych 8 dni po inokulacji.

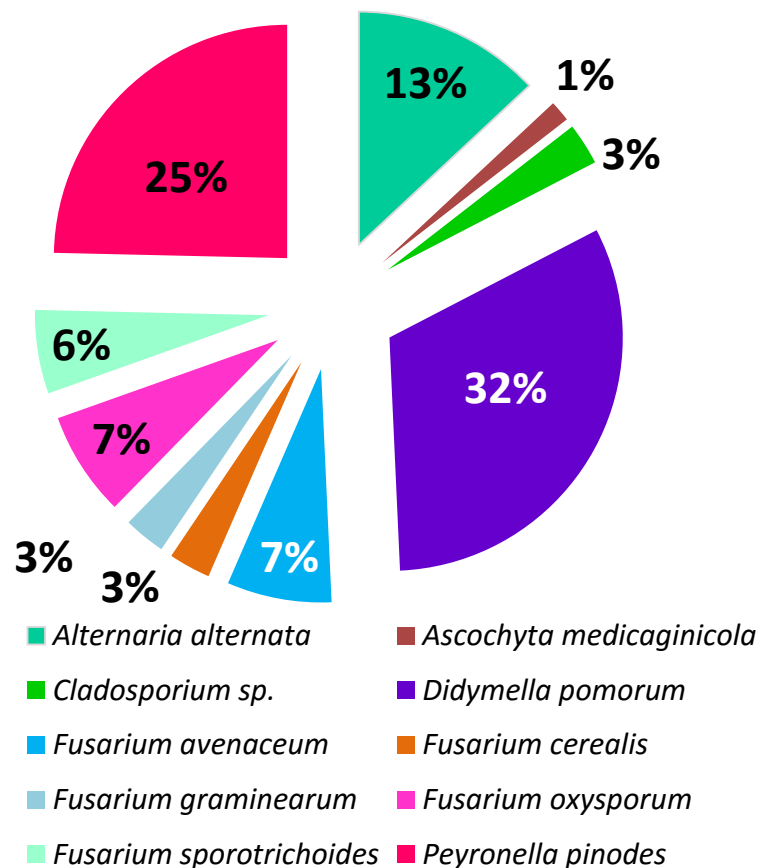


Najwyższy poziom ekspresji syntazy izoflawonowej stwierdzono 24h po inokulacji, natomiast poziom wyższy w odmianach odpornych w odniesieniu do podatnych 8 dni po inokulacji.

## Temat badawczy 5

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

Wykazano obecność gatunków *Didymella pomorum*, *Peyronella pinodes* oraz *Ascochyta medicaginicola*, które wywołują askochytozę.



## Temat badawczy 6

Uzupełnienie liczby linii w populacjach mapujących przez skrócony cykl hodowlany.

Rozmnożenia dwóch populacji mapujących grochu, warunki szklarniowe.

Tg 10/2022 (Wt11238 x Wt401)

lp.	nr pol	l.nasion zebranych	pokolenie
1	10/43	12	F6
2	10/55	108, 14	F4, F5
3	10/83	50	
4	10/94	150	F10

Tg 11/2022 (Wt401xWt4807)

lp.	nr pol	l.nasion zebranych	pokolenie
1	11/15	17, 20	F9, F10
2	11/50	1	F6
3	11/63	8, 5	F8, F9
4	11/105	1	F8
5	11/106	12	F11