

**Podsumowanie badań przeprowadzonych w
latach 2021-2025 r. z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej**

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 *Didymella* do porażenia roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach kolekcji grochu i populacji mapujących [(Wt11238 x Wt401), (Wt401 x Wt4807)] w warunkach polowych i kontrolowanych (CUR).
2. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach kolekcji grochu i w liniach populacji mapujących [(Wt11238 x Wt401), (Wt401 x Wt4807)] w warunkach polowych i kontrolowanych CUR. Określenie korelacji ze stopniem porażenia.
3. Genotypowanie linii populacji mapujących, wyznaczenie rejonów w genomie warunkujących odporność na porażenie *Didymella pinodes*.
4. Analiza metodą qPCR genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na porażenie. Projektowanie markerów na sekwencje wskazane po analizie danych z RNAseq.
5. Reizolacja patogenów z porażonych roślin z warunków kontrolowanych i polowych w celu identyfikacji szczepów wywołujących zmiany nekrotyczne.

Cele osiągnięto.

Materiały i metody

1. Uprawa i namnażanie roślin w warunkach kontrolowanych i polowych
2. Testy inokulacyjne w warunkach polowych i kontrolowanych:
 - a) pole doświadczalne IGR PAN w Poznaniu (Wielkopolska)
 - b) pole doświadczalne SDB UWM w Tomaszowie (Warmia)siew, pielęgnacja roślin, inokulacja, zamgławianie, liczenie wschodów, ocena stopnia porażenia roślin, zbiór i oznaczenie elementów struktury plonu.
3. 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.
4. 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.
5. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego: oznaczenie ilości chlorofilu (SPAD). Badanie sprawności fotosystemu II (Handy Pea).
6. Genotypowanie linii populacji mapujących 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.
7. 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.
8. Metody statystyczne: korelacja Pearsona, analiza wariancji dla doświadczeń jednoczynnikowych.

Temat badawczy 1 (2021-2025)

Ocena stopnia porażenia w liniach populacji mapujących (Wt11238 x Wt401), (Wt401 x Wt4807)] w warunkach polowych i kontrolowanych.

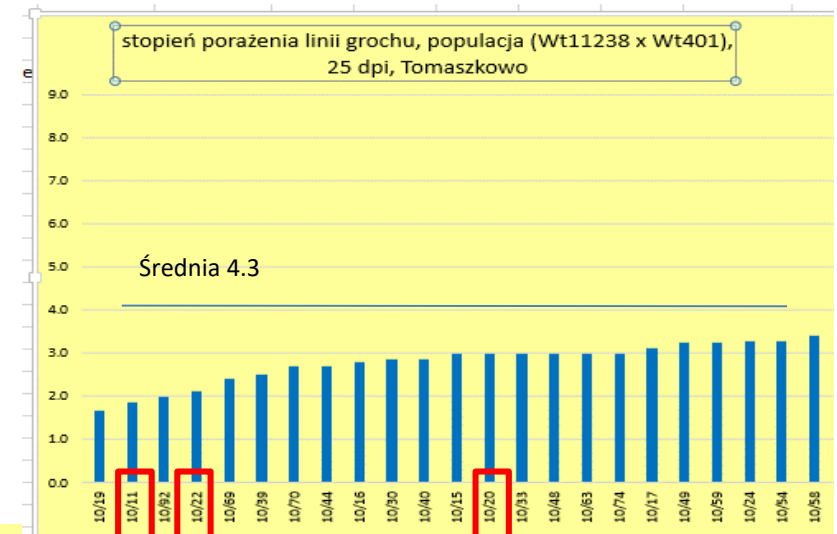
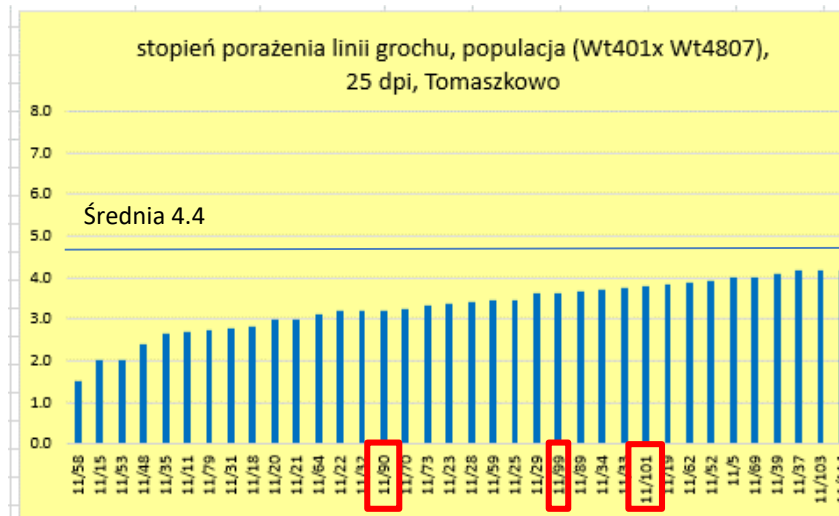
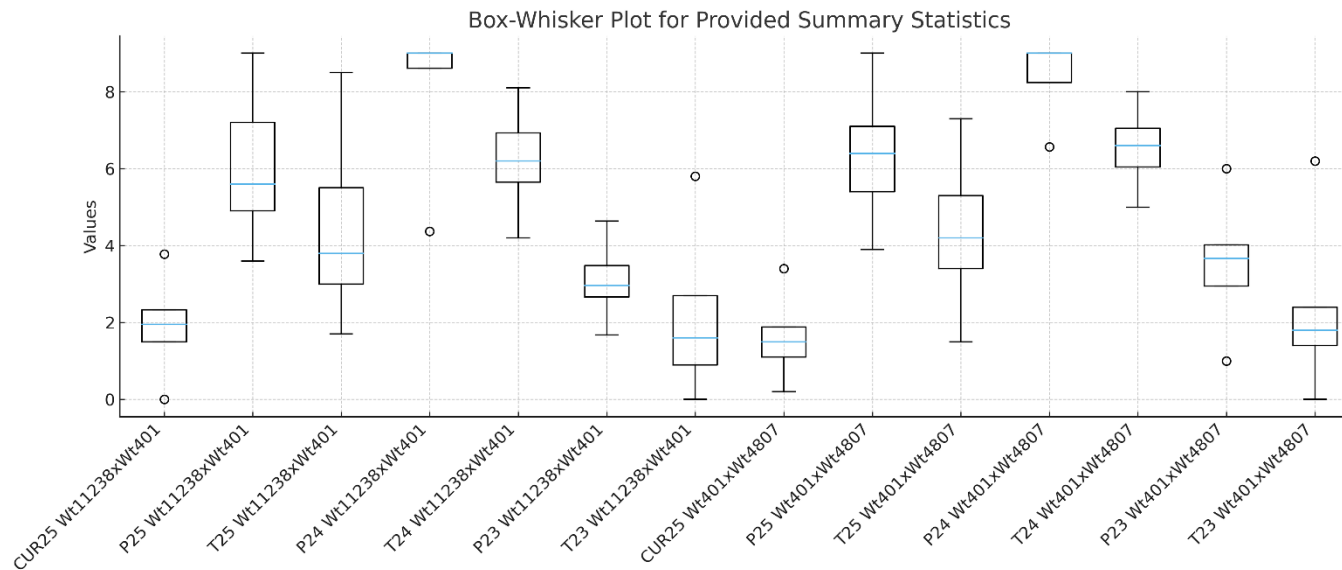
Inokulacja izolatem *D. pinodes*

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

Bonitacja wg skali 0-5. ([Onfroy i in. 1999](#)): warunki kontrolowane

Zakres zmienności porażenia w populacjach mapujących w latach, w warunkach polowych i kontrolowanych.

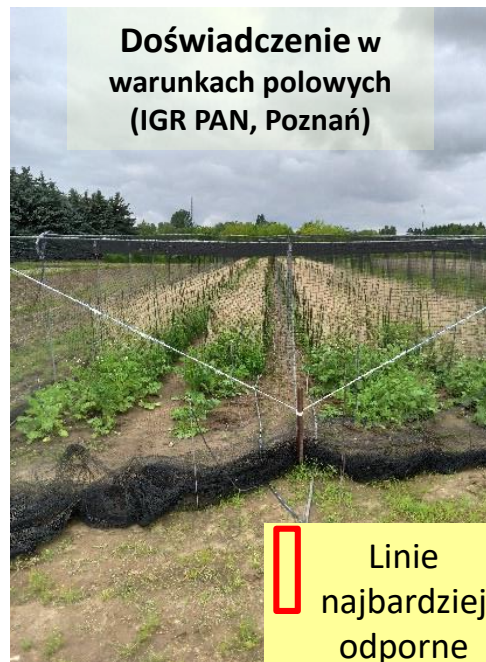
Stopień porażenia w Tomaszkanie był niższy niż na polu doświadczalnym w IGR PAN. O wyższym stopniu porażenia na poletkach IGR decydowały warunki pogodowe, dodatkowe zamgławianie i szczelne zabezpieczeniu namiotu po inokulacji roślin.



Linie najbardziej odporne w warunkach polowych badane w latach

Temat badawczy 1 (2021-2025)

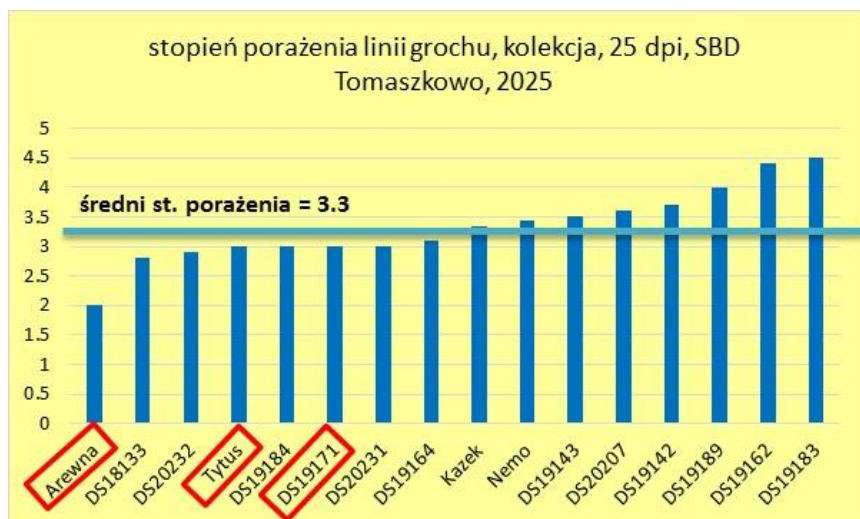
Ocena stopnia porażenia w liniach kolekcji grochu (doświadczenie polowe w dwóch lokalizacjach)



W testach wieloletnich na poletkach IGR, do linii najmniej porażonych z kolekcji należały **Arewna, DS19164, DS20232, DS19142**. Do linii najbardziej porażonych należały **Kazek, DS20231, DS20207**.



Doświadczenie w warunkach polowych (Stacja Badawczo-Dydaktyczna UWM) Tomaszko k/Olsztyna, Warmia



Do linii najmniej porażonych z badanej w wieloleciu kolekcji w Tomaszku, należały **Arewna, Tytus, DS19171, Tarchalska**. Do linii o najsilniejszym stopniu porażenia należał **Citation, Frazer**



Temat badawczy 1 (2021-2025)
Korelacja stopnia porażenia linii grochu inokulowanych na polu oraz elementów struktury plonu.

Kolekcja porażenie	St porażenia IGR	St porażenia Tomaszkowo
I strąków	-0.10	0.46
I nasion	-0.01	0.22
waga w g	0.05	0.21
st. porażenia	1	1

Wt401×Wt480 7 por	St poraż IGR	St poraż Tomaszkowo	Wt11238×Wt401 por	St poraż IGR	St poraż Tomaszkowo
I strąków	-0.39	-0.37	I str	-0.46	-0.44
I nasion	-0.42	-0.37	I nas	-0.47	-0.44
waga w g	-0.42	-0.26	waga w g	-0.41	-0.41
st porażenia	1	1	st poraż	1	1

Stwierdzono korelację (2 letnia tendencja) pomiędzy porażeniem roślin grzybem *D. pinodes* wywołującym askochytozę, a strukturą plonu w populacjach mapujących (IGR PAN i Tomaszkowo) i natomiast korelacji tej nie stwierdzono w kolekcji (IGR PAN i Tomaszkowo).

Temat badawczy 2 (2021-2025)
Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach kolekcji grochu i w liniach populacji mapujących [(Wt11238 × Wt401, Wt401 × Wt4807) doświadczenia polowego. Określenie korelacji ze stopniem porażenia.

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

kolekcja poraż	Fv/F _m	psi(Eo)	ET ₀ /RC	ET ₀ /CS ₀	P.I.csm	SPAD
st poraż	-0.17	-0.09	0.14	-0.24	-0.32	0.01
Wt11238×Wt401	Fv/F _m	psi(Eo)	P.I.csm	ET ₀ /CS ₀	ET ₀ /RC	SPAD
średni st por	-0.40	-0.31	-0.31	-0.48	-0.04	-0.43
Wt401×Wt4807	Fv/F _m	psi(Eo)	P.I.csm	ET ₀ /CS ₀	ET ₀ /RC	SPAD
st. poraż.	-0.08	-0.23	-0.37	-0.33	0.10	-0.52

Stwierdzono istotną, negatywną korelację pomiędzy stopniem porażenia w liniach populacji mapujących, a pozostałymi parametrami fotosyntetycznymi, z wyj. ET₀/RC w warunkach polowych. W warunkach kontrolowanych stwierdzono korelację pomiędzy stopniem porażenia, a Fv/Fm, psi(Eo), P.I.csm i SPAD dla roślin porażonych, w jednej populacji mapującej. Dla drugiej korelacja potwierdziła się korelacja stopień porażenia i Fv/Fm oraz psi(Eo).

Temat badawczy 3 (2022)

Analiza RNAseq dla linii skrajnych pod względem porażenia przez *D. 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		

Res - odporne, Sus – podatne,
Analiza statystyczna wyników sekwencjonowania.

sample	Library	raw_reads	raw_bases	clean_reads
Asc49_1pi24h	ERRA220019709-1a	89 014 894	13.35G	88 321 962
Asc4_4pi24h	ERRA220019703-1a	88 708 586	13.31G	88 038 270
Asc6_1_8pd	Asc6_1_8pd	100 196 358	15.03G	97 541 246
Asc46_1pi24h	ERRA220019706-1a	100 495 464	15.07G	98 952 832
Asc1_3k24h	ERRA220019714-1a	119 026 874	17.85G	118 202 382
Asc7_3_8pd	Asc7_3_8pd	96 824 720	14.52G	95 380 904

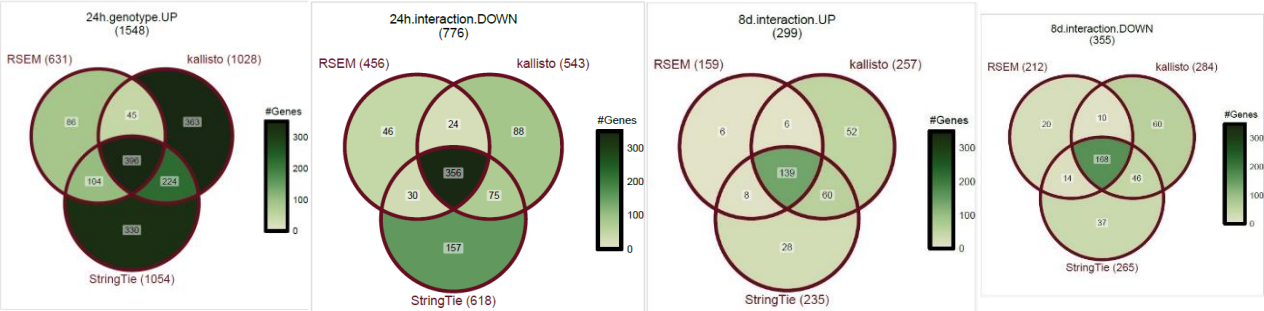
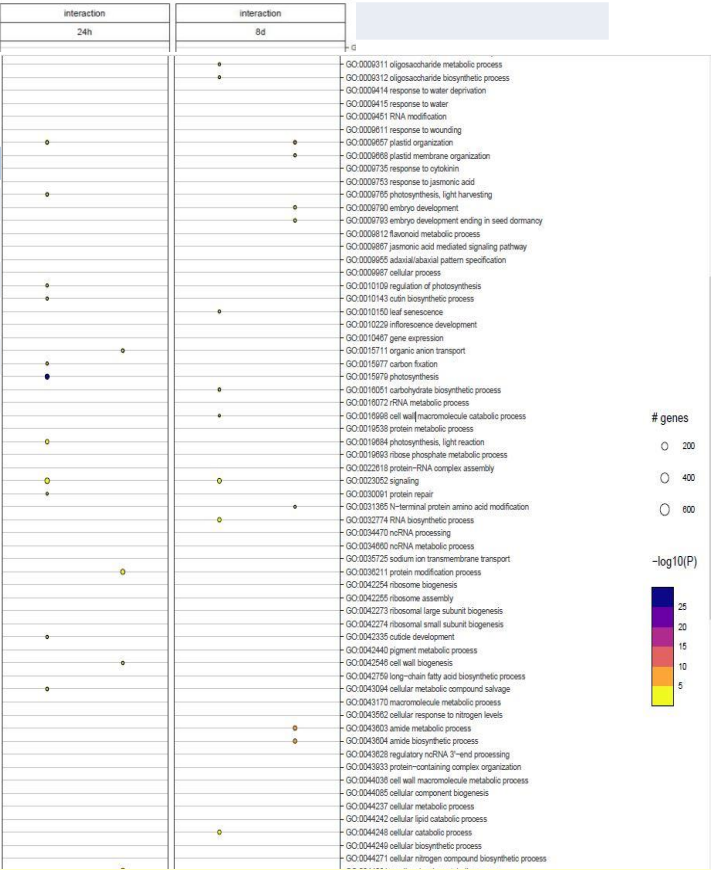


Diagram Venna, porównanie liczby sekwencji wspólnych i oddzielnych dla linii podatnych i mniej podatnych.

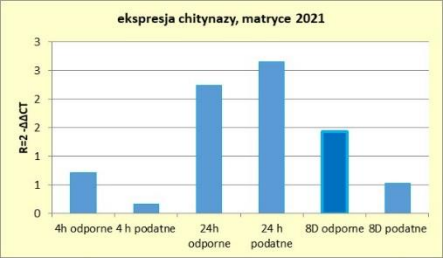
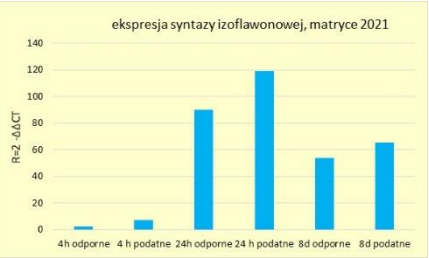


Istotne sekwencje i ich potencjalny udział w różnych szlakach metabolicznych.

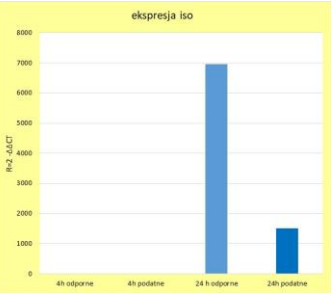
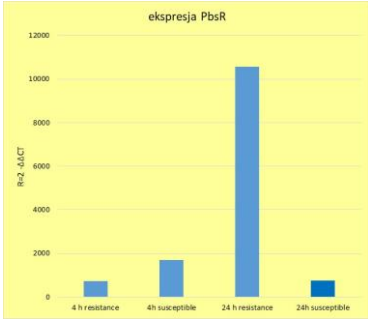
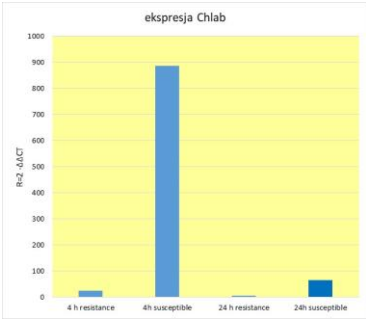
Temat badawczy 3 (2021, 2023, 2025), temat 4 (2022, 2024).
Analiza metodą qPCR genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na porażenie, projektowanie markerów na sekwencje wskazane po analizie danych z RNAseq.

Sekwencje z eksperymentu RNAseq, analizowane metodą qPCR

	sekwencja	funkcja	nazwa	Homologia z sekwencją wyjściową	grupa sekwencji
1	Psat7g118080	cam00943	Syntaza izoflawonowa	tak	
2	Psat3g189200	Modyfikacja ściany kom	chitynaza	tak	
3	Psat1g002320	fotosynteza	photo (PBsR), chloroplast thylakoid membrane photosystem II oxygen evolving complex	tak	24h, Interaction UP
4	Psat1g097880	fotosynteza	Pisum sativum chlorophyll a-b binding protein 6 (Chlab)	tak	24h, Interaction UP
5	Psat3g018680	biosynteza aminokwasów	Psat3g018	tak, ale produkt po 32 cyklu	24h interaction Up
6	Psat3g078160	metabolizm azotu	Psat 3g07		
7	Psat4g033080	metabolizm fosforu	Psat4g033		
8	Psat5g242400	odporność	Defensin-like protein 39	tak	24h interaction Up



Najwyższy poziom ekspresji sekwencji syntazy izoflawonowej, genu Def, genu PBsR, stwierdzono 24h po inokulacji.



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

Najwyższy poziom Chlab i największą różnicę pomiędzy liniami odpornymi i podatnymi stwierdzono 4hpi. Zarówno metoda qPCR, jak i RNAseq wskazały silniejszą reakcję odnośnie ekspresji genu w liniach podatnych.

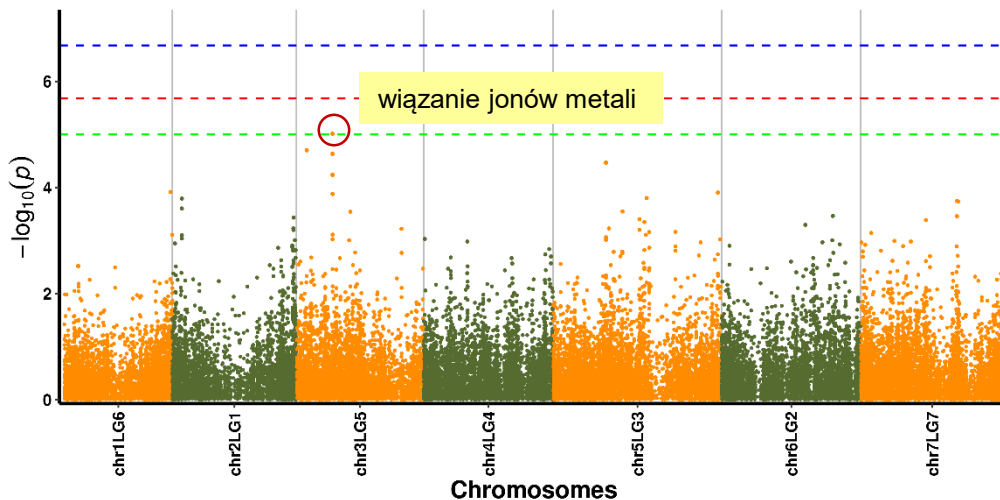


Temat badawczy 3 (2024), temat 4 (2025), temat 6 (2023)

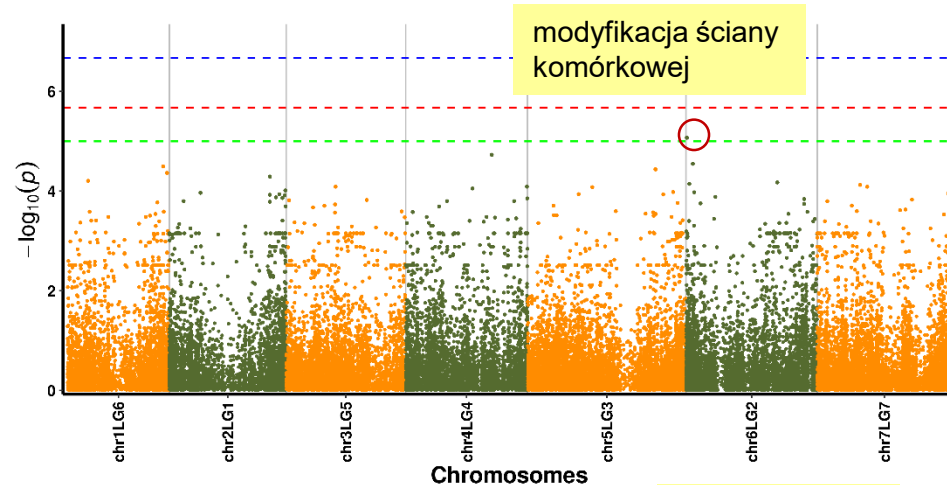
Genotypowanie linii populacji mapujących, wyznaczenie rejonów w genomie (GWAS) warunkujących odporność na porażenie *Didymella pinodes*.

→ sekwencje istotne również w eksperymencie RNAseq

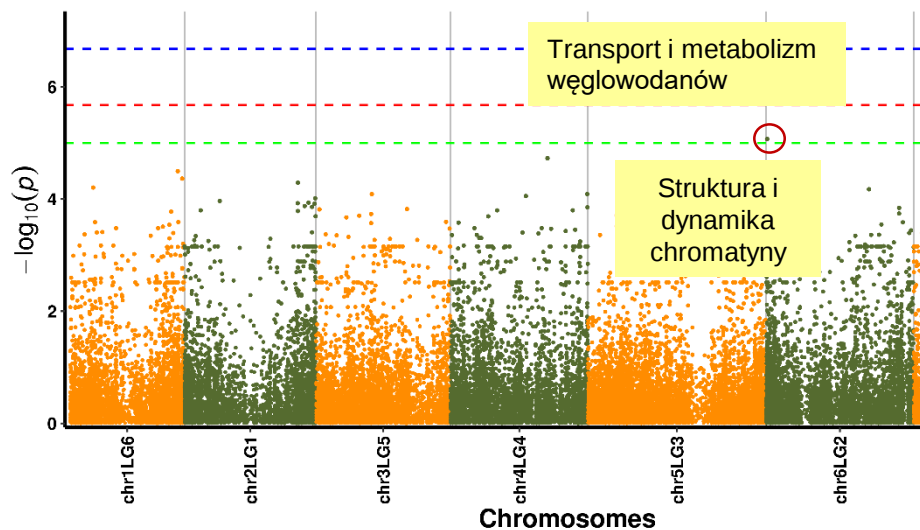
P24_inf_pole



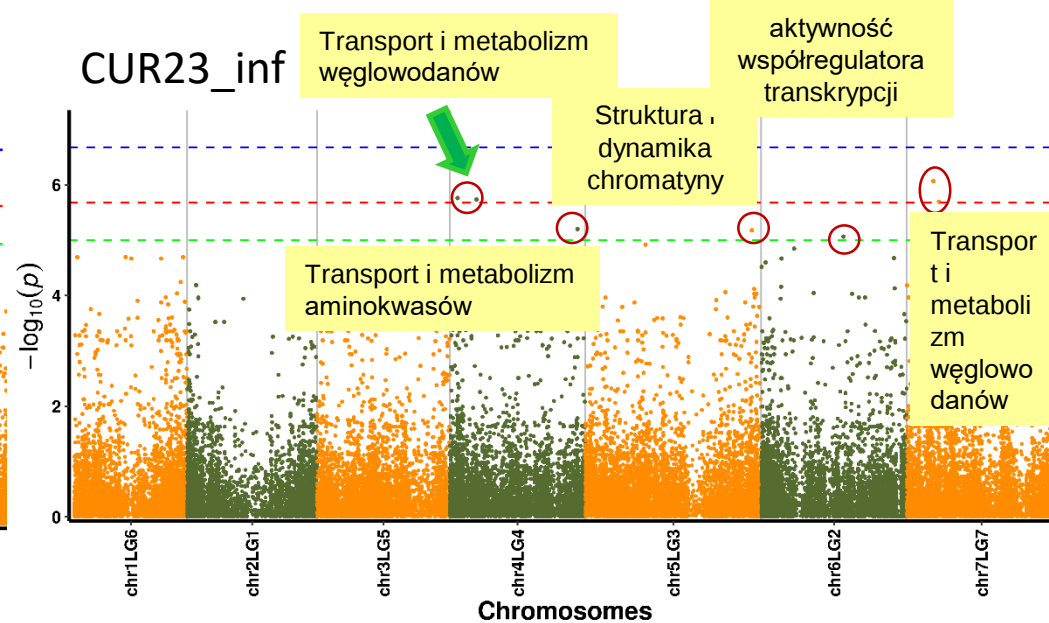
P22_inf_pole



T22_inf_pole



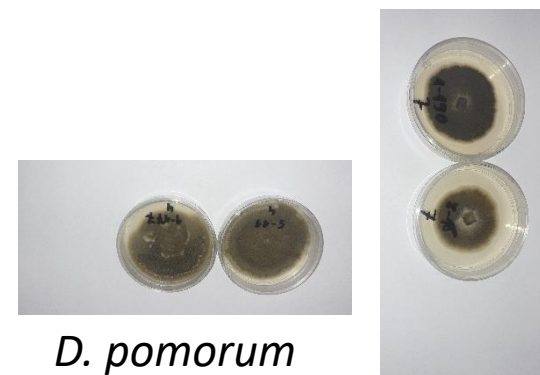
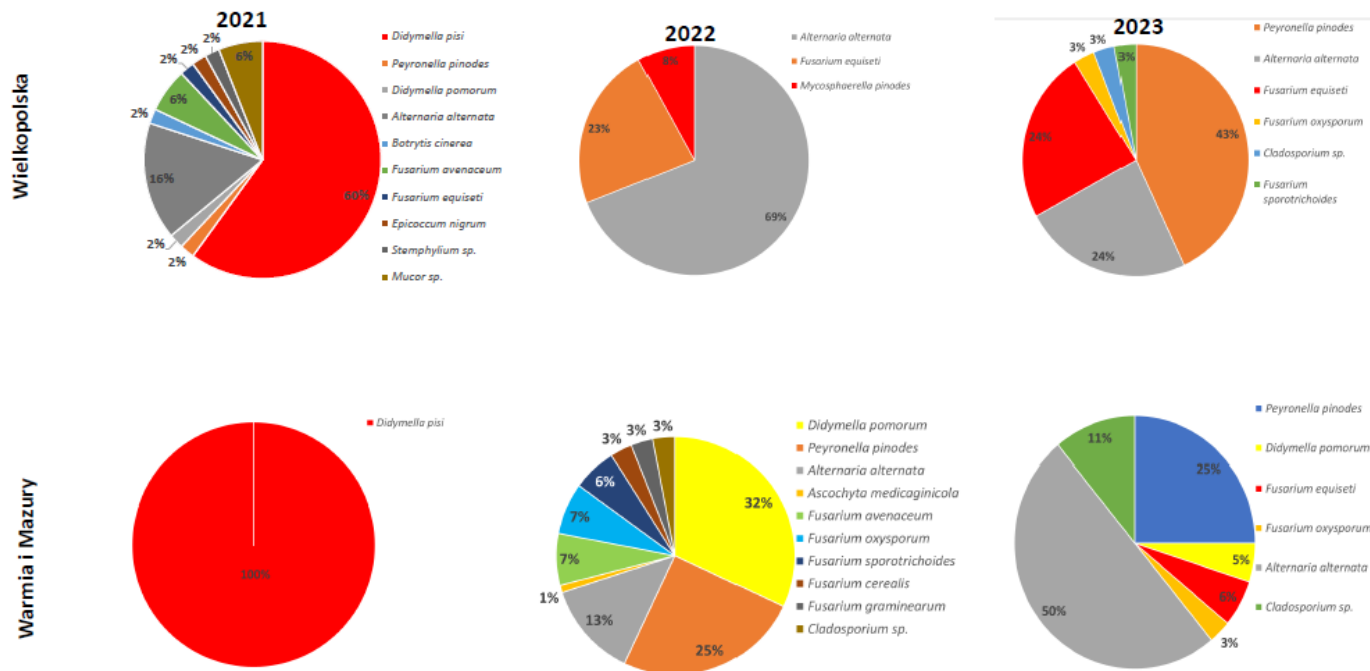
CUR23_inf



Temat badawczy 4 (2021, 2023), temat 5 (2022, 2024, 2025)

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

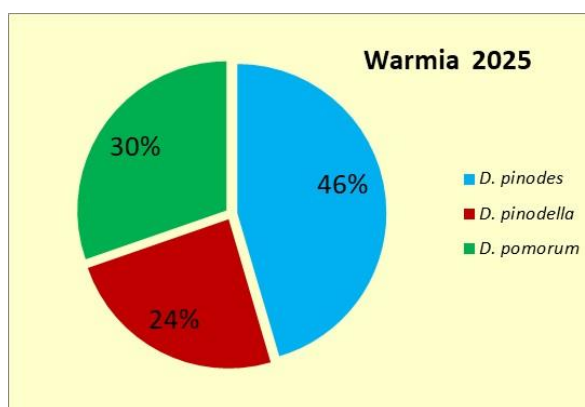
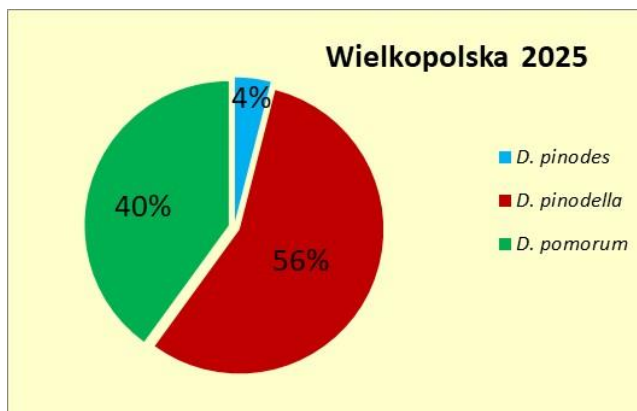
Gatunki grzybów wyizolowane z porażonych liści i łodyg grochu:



D. pomorum

D. pinodes

Identyfikacja gatunkowa sprawców plamistości liści może być pomocna w wyborze skutecznej ochrony fungicydowej.



Zidentyfikowano wyjątkowo dużą liczbę izolatów z rodzaju *Didymella*, w tym *D. pinodes*, *D. pinodella* oraz *D. pomorum* jednak nie wykryto gatunków *D. lethalis* i *D. pisi*, które były dość powszechne z lat ubiegłych