

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
w 2024 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 *Didymella* do porażenia roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) (III rok doświadczenia polowego) i **populacji mapujących** (90 linii) [II rok doświadczenia (Wt11238 x Wt401), (Wt401 x Wt4807)] w **warunkach polowych**.
2. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w wybranych liniach grochu (36 linii) (III rok doświadczenia polowego) i w liniach **populacji mapujących** (90 linii) [II rok doświadczenia (Wt11238 x Wt401), (Wt401 x Wt4807)] w warunkach polowych. Określenie korelacji ze stopniem porażenia.
3. **Genotypowanie** linii populacji mapujących.
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, badania zostaną ukończone zgodnie z planem pod koniec grudnia 2024 r.

Materiały i metody

1. Uprawa i namnażanie roślin w warunkach szklarniowych i polowych
2. Testy inokulacyjne w warunkach polowych:
 - 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.

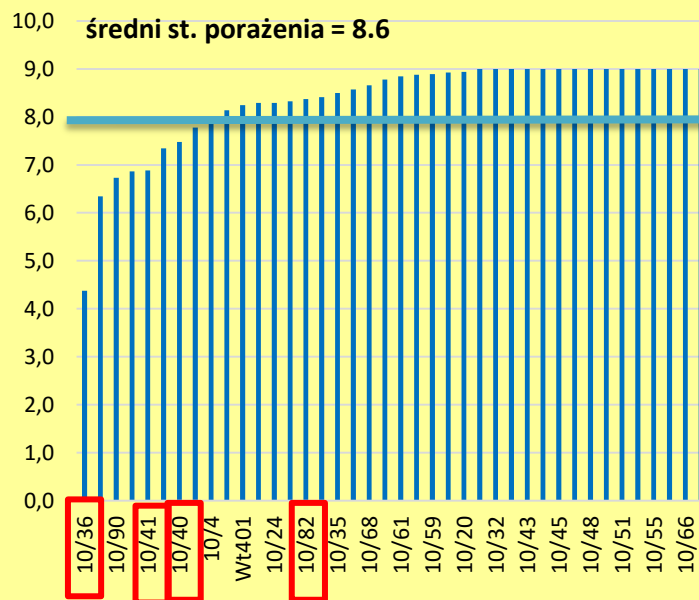
Temat badawczy 1

Przygotowanie izolatów *Didymella pinodes* do inokulacji roślin grochu. Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) (III rok doświadczenia polowego) i populacji mapujących (90 linii) [II rok doświadczenia (Wt11238 x Wt401), (Wt401 x Wt4807)] w warunkach polowych

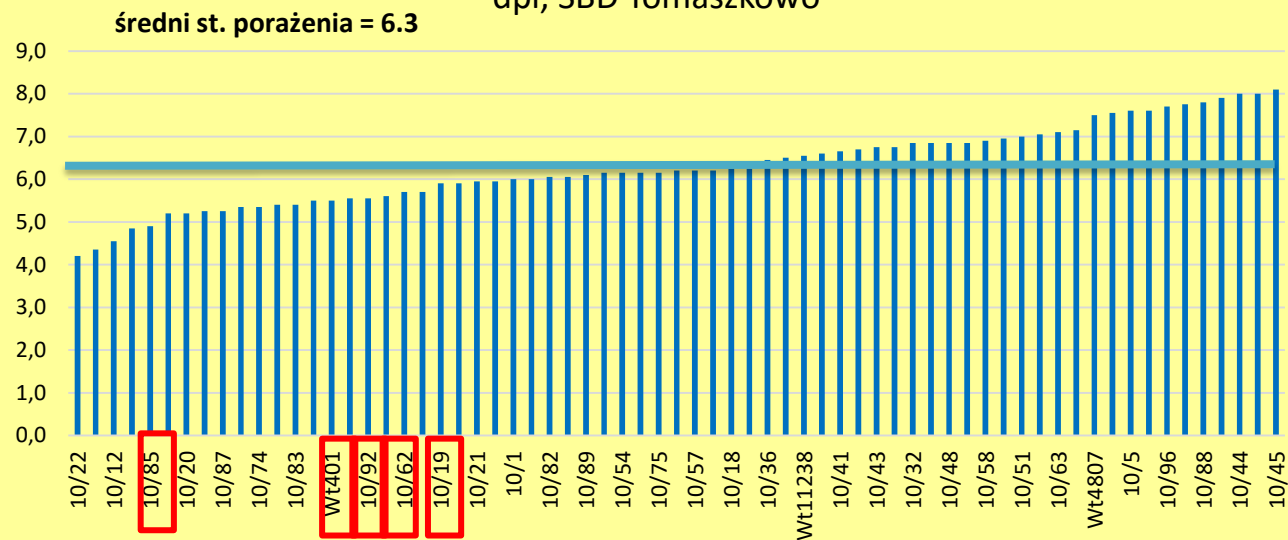
Inokulacja izolatami *D. pinodes*

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

stopień porażenia linii grochu, populacja (Wt11238 x Wt401), 33 dpi, IGR
PAN



stopień porażenia linii grochu, populacja (Wt11238 x Wt401), 27
dpi, SBD Tomaszkowo



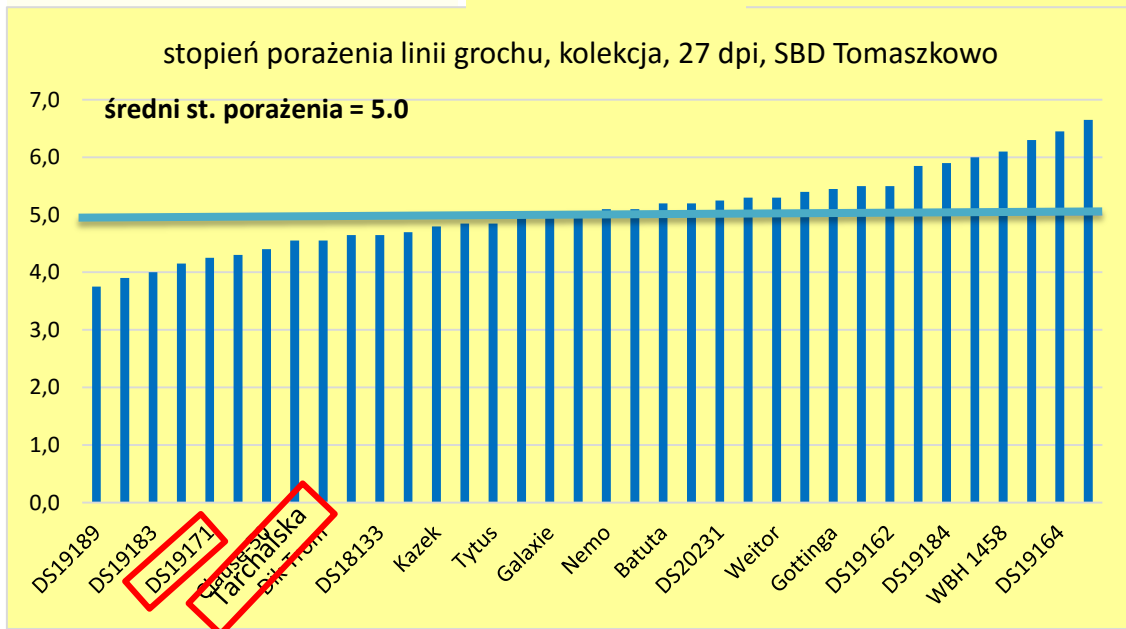
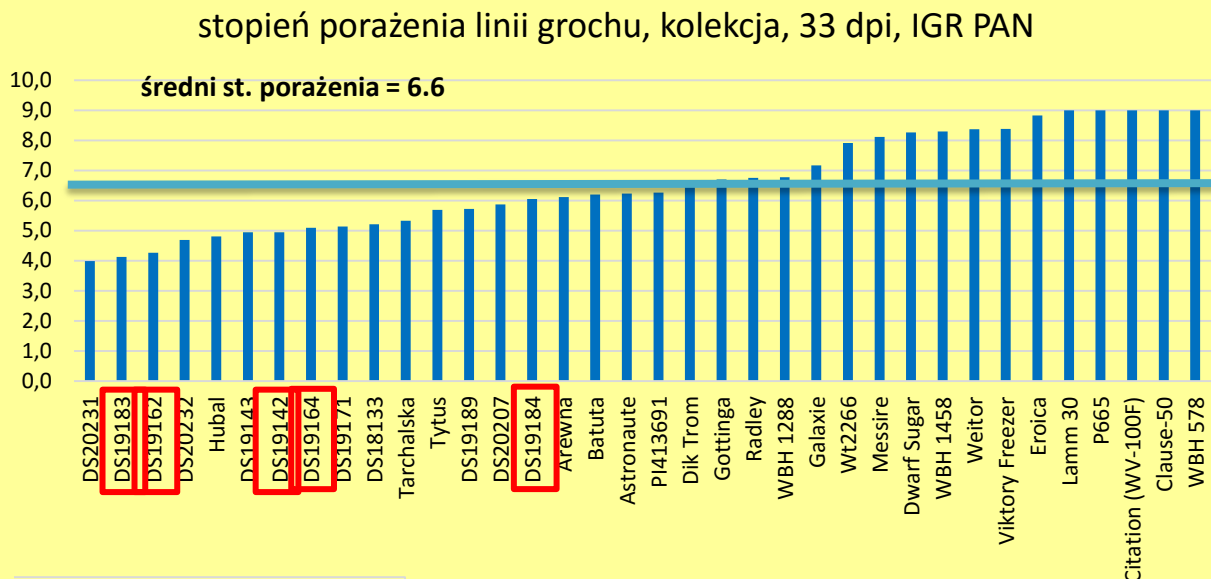
Linie najbardziej odporne w warunkach polowych w 2023 r.

Temat badawczy 1

Ocena stopnia porażenia w wybranych liniach grochu (36 linii) III rok doświadczenia polowego) i populacji mapującej (90 linii) [II rok doświadczenia (Wt11238 x Wt401, Wt401 x Wt4807)] w warunkach polowych.



Linie najbardziej odporne w 2023 r.

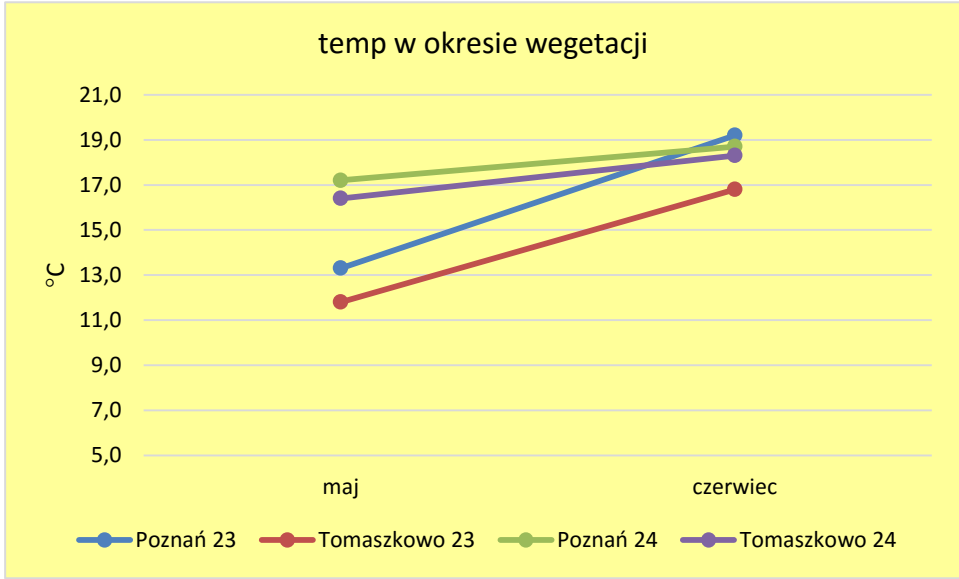


Doświadczenie w warunkach polowych
(Stacja Badawczo-Dydaktyczna UWM)
Tomaszkowo k/Olsztyna, Warmia

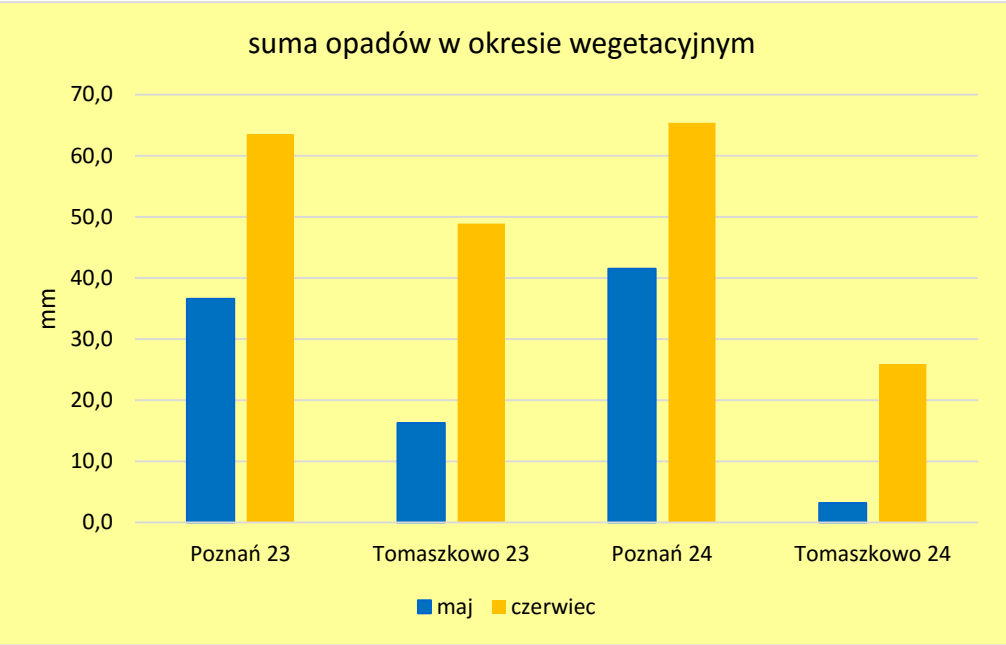


Temat badawczy 1

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



Kolekcja por IGR	liczba strąków	liczba nasion	waga w g
I strąków	1.00		
I nasion	0.91	1.00	
waga w g	0.92	0.97	1.00
st. porażenia	-0.18	-0.10	-0.13



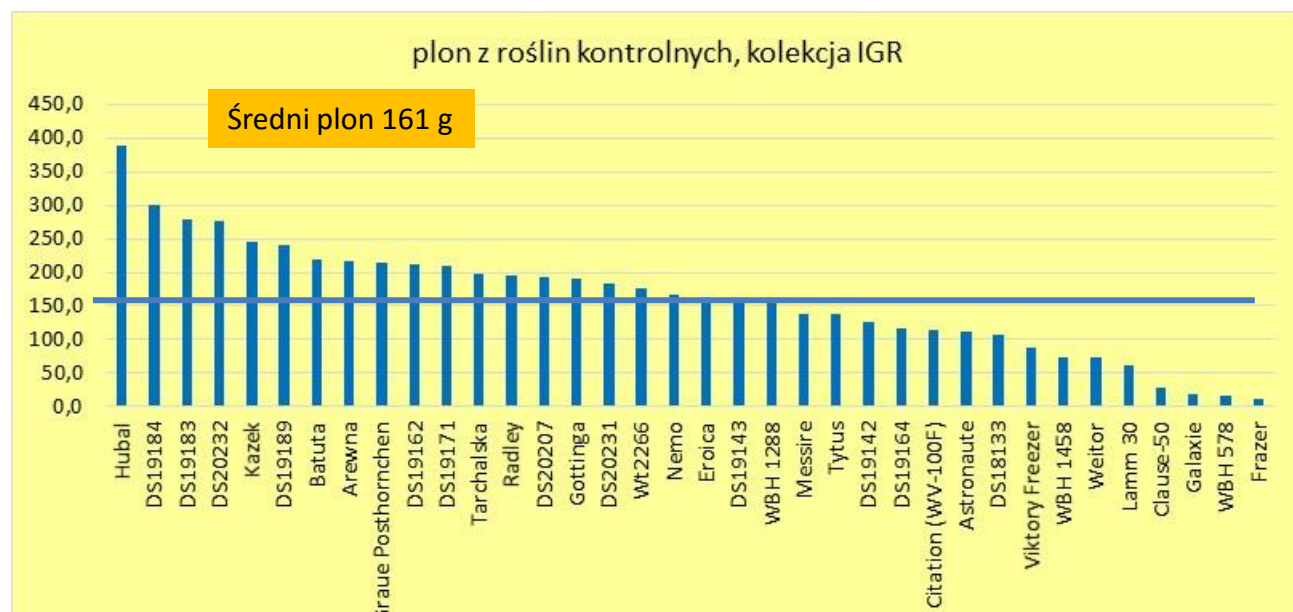
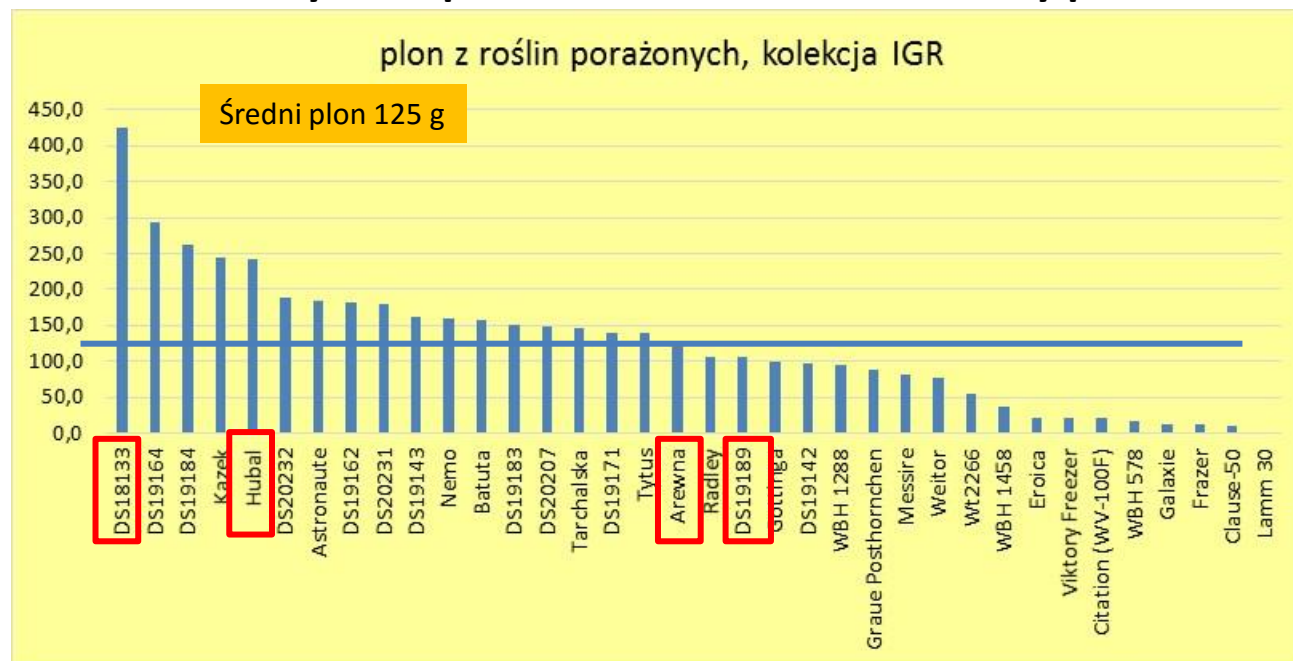
Wt401×Wt4807 por IGR	I strąków	I nasion	waga w g	Wt11238×Wt401 por IGR	I str	I nas	waga w g
I strąków	1.00			I str	1.00		
I nasion	0.71	1.00		I nas	0.87	1.00	
waga w g	0.80	0.92	1.00	waga w g	0.85	0.97	1.00
st porażenia	-0.27	-0.30	-0.29	st poraż	-0.36	-0.34	-0.36

Temat badawczy 1

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

Najwyższy plon wśród roślin porażonych (kolekcja) uzyskali odmiany DS18133, DS19189, Arewna, Hubal, DS19143. Najwyższy plon wśród roślin kontrolnych uzyskali linie **Hubal**, **DS19184**, DS19183, **DS20232**, **Kazek**, DS19189 (linie czcionka pogrubioną stanowiły najbardziej plenne linie w 2023).

Linie z populacji mapującej uzyskały niższy plon w porównaniu z liniami z kolekcji w warunkach kontrolnych (IGR PAN) i znacznie obniżony na poletkach porażonych (o 60%).



Temat badawczy 2

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

kole poraż IGR	Fv/Fm	psi(Eo)	P.I.csm	ET _o /CS _o	ET _o /RC
Fv/Fm	1.00				
psi(Eo)	0.70	1.00			
P.I.csm	0.70	0.78	1.00		
ET _o /CS _o	0.52	0.48	0.61	1.00	
ET _o /RC	0.30	0.47	0.08	0.46	1.00
st poraż	-0.36	-0.31	-0.33	-0.11	0.00

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

Wt11238× Wt401 IGR	Fv/Fm	psi(Eo)	P.I.csm	ET _o /CS _o	ET _o /RC
Fv/Fm	1.00				
psi(Eo)	0.57	1.00			
P.I.csm	0.63	0.54	1.00		
ET _o /CS _o	0.26	-0.02	0.34	1.00	
ET _o /RC	0.12	0.32	0.01	0.10	1.00
średni st por.wsz roślin	-0.10	-0.13	-0.07	0.12	0.06

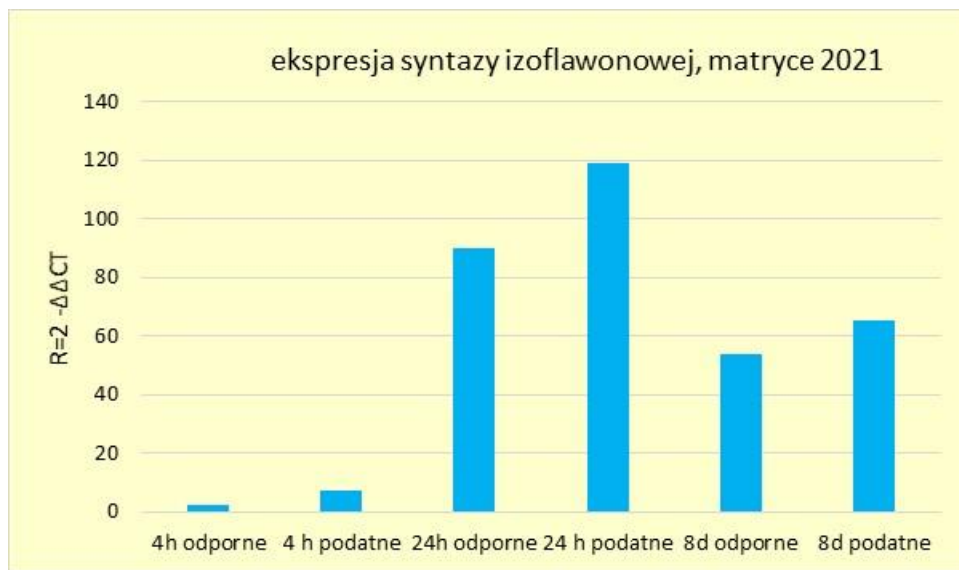
Stwierdzono istotną, negatywną korelację pomiędzy stopniem porażenia w kolekcji, a maksymalną fotochemiczną wydajnością kwantową Fv/Fm i ogólną wydajnością fotochemiczną P.I.csm. W populacji mapującej takich korelacji nie potwierdzono.

Temat badawczy 4

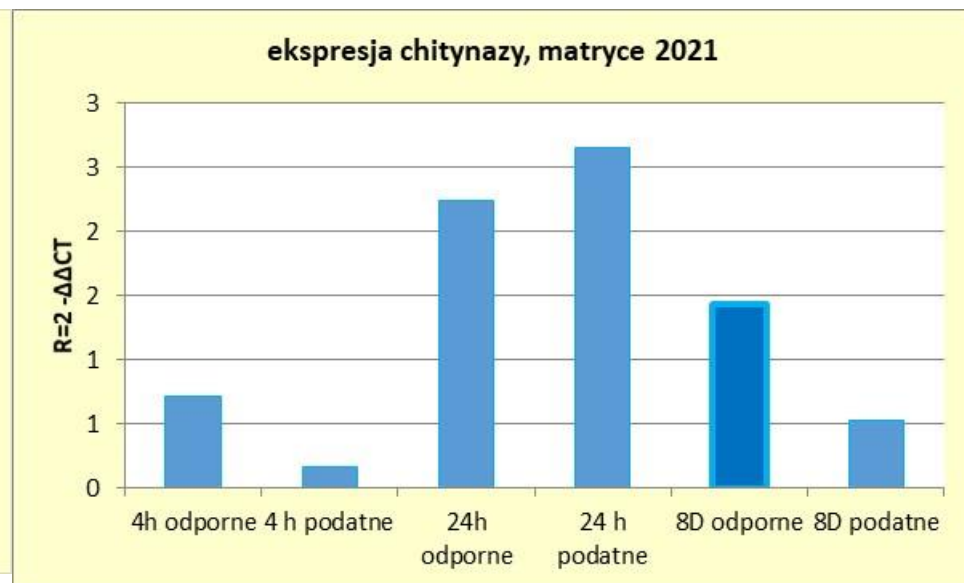
Analiza metodą qPCR genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na porażenie, projektowanie markerów na sekwencje wskazane po analizie danych z RNAseq.

Sekwencje z eksperymentu RNAseq, analizowane metodą qPCR

	sekwencja	funkcja	nazwa	Homologia z sekwencją wyjściową
1	Psat3g189200		chitynaza	Tak
2	Psat7g118080	cam00943	Syntaza izoflawonowa	Tak
3	Psat1g002320	fotosynteza	photo (PBsR)	
4	Psat1g097880	fotosynteza	Pisum sativum chlorophyll a-b binding protein 6	
5	Psat3g018680	biosynteza aminokwasów		



Najwyższy poziom ekspresji sekwencji syntazy izoflawonowej stwierdzono 24h po inokulacji



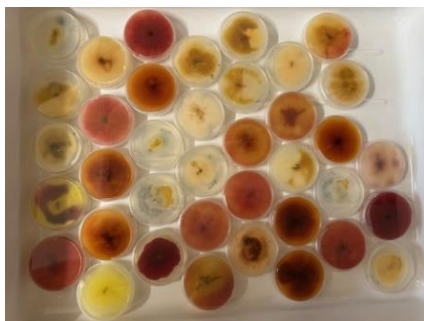
Najwyższy poziom ekspresji sekwencji chitynazy stwierdzono 24h po inokulacji

Temat badawczy 5

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

Wykazano obecność gatunków *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Epicoccum* spp., *Trichoderma* spp., *Didymella* spp., *Penicillium* spp.

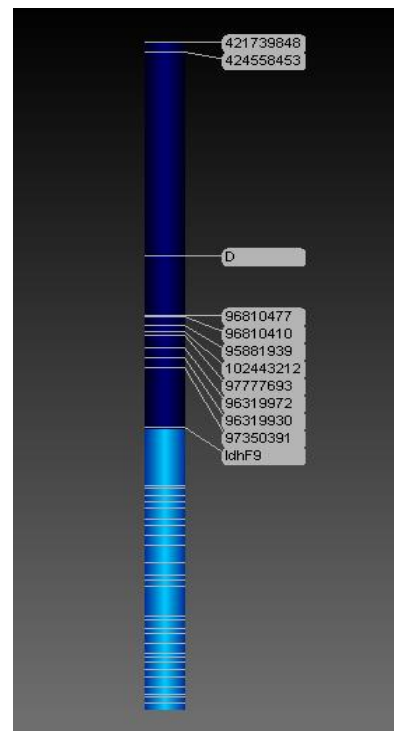
Wielkopolska



Warmia i Mazury



Ryc 5.1. Przykładowe gatunki grzybów wyizolowane z porażonych liści i łodyg grochu z terenu Warmii i Mazur oraz z Wielkopolski w 2024 roku- wygląd na pożywce PDA.



Temat badawczy 3

Genotypowanie linii populacji mapujących.

Ryc.3.2 Fragment mapy grupy Chr2LG1 z markerem morfologicznym *D* i izoenzymatycznym *Idh*.



Ryc. 3.1. Markery morfologiczne w liniach populacji Wt11238×Wt401.

Grzyby powodujące plamistości liści grochu siewnego w Polsce (2021-2023)

Witold Irzykowski, Joanna Kaczmarek, Magdalena Gawłowska, Małgorzata Jędrzycka



Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

jkac@igr.poznan.pl

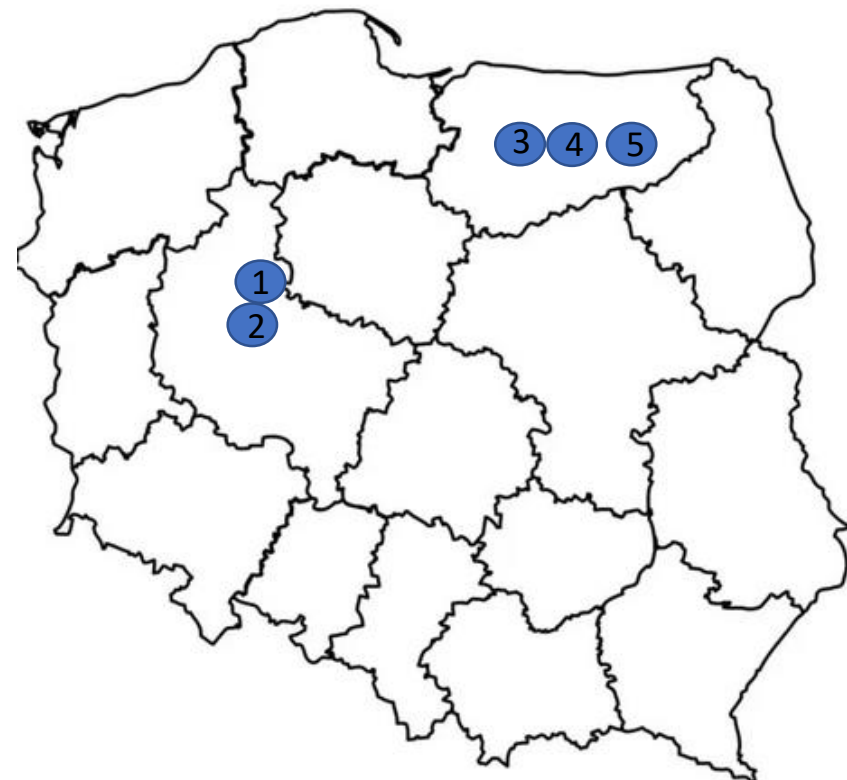
WSTĘP

Groch siewny (*Pisum sativum* L.) jest gatunkiem tradycyjnie uprawianym w celach konsumpcyjnych, paszowych, a także jako nawóz zielony. Podobnie jak inne bobowate grubonasienne, groch jest przedplonem, którego strukturotwórcze i fitosanitarne walory są bardzo cenne. W uprawie grochu wielkość strat spowodowanych występowaniem chorób szacuje się średnio na 15%. Celem badań było ustalenie składu gatunkowego grzybów chorobotwórczych wywołujących nekrozy liści i łodyg grochu siewnego w warunkach naturalnych w Polsce w latach 2021-2023 i ustalenie ich udziału w populacji grzybów odpowiedzialnych za objawy chorobowe.

MATERIAŁ I METODY

Rośliny grochu z objawami chorobowymi pobrano z regionów zróżnicowanych pod względem klimatycznym:

- Wielkopolska (Wiatrowo , Przebędowo)
- Warmia i Mazury (Łąjsy, Tomaszkowo, Łazdoje).



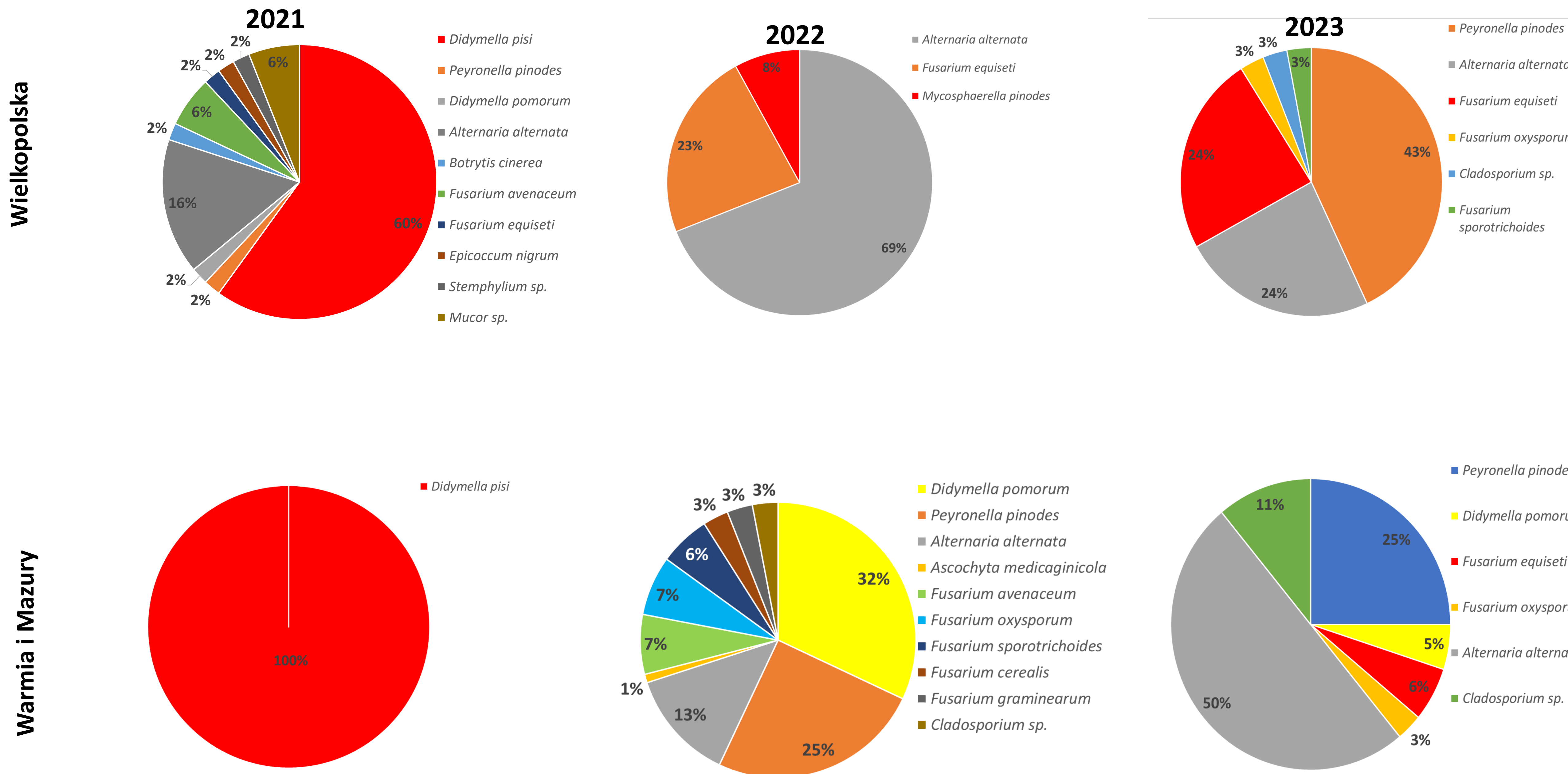
- 1- Wiatrowo
- 2- Przebędowo
- 3- Łąjsy
- 4- Tomaszkowo
- 5- Łazdoje



Fragmenty liści i łodyg z objawami makroskopowymi odkażano powierzchniowo, a następnie przenoszono na pożywkę PDA z dodatkiem siarczanu streptomycyny. Uzyskane kultury grzybów pasażowano na kolejne pożywki aż do uzyskania czystych izolatów wolnych od bakterii i innych patogenów. Następnie charakteryzowano je pod względem morfologicznym i oznaczano ich przynależność gatunkową na podstawie obserwacji makroskopowych oraz sekwencji ITS1 oraz ITS2.

WYNIKI

Gatunki grzybów wyizolowane z porażonych liści i łodyg grochu:



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

Badania prowadzono w ramach projektu Postęp Biologiczny (2020-2026) zadanie badawcze 21 „Identyfikacja genów związanych z odpornością grochu na askochytozę i jej wpływ na sprawność fotosyntetyczną roślin”, finansowanego przez MReR.

KONFERENCJA NAUKOWA

Zdrowie roślin w dobie aktualnych wyzwań

STRESZCZENIA

ABSTRACTS

Warszawa 24 – 26 września 2024



Komitet
Nauk
Agrochemicznych



SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO
W WARSZAWIE



InHort
INSTYTUT OGRÓDNICTWA



Geny uaktywniane w odpowiedzi na porażenie grochu (*Pisum sativum* L.) chorobotwórczym grzybem *Didymella pinodes* wywołującym askochytozę

Magdalena Gawłowska, Pankaj Kumar, Wojciech Świącicki, Grzegorz Koczyk, Witold Irzykowski, Joanna Kaczmarek, Małgorzata Jędrzycka

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

mgaw@igr.poznan.pl

Groch (*Pisum sativum* L.) jest rośliną strączkową, o wysokiej zawartości białka w nasionach (30%), większej niż u ciecierzycy (do 29%) i soczewicy (do 29%). Białko grochu jest łatwo strawne, o niskiej alergiczności i niskiej zawartości glutenu. Groch, jak wszystkie rośliny strączkowe, ma zdolność w interakcji z bakteriami symbiotycznymi do wiązania azotu atmosferycznego. Problemem w uprawie grochu są atakujące go choroby. Wśród nich, jedną z poważniejszych jest askochytoza wywoływana przez grzyby: *Didymella pisi*, *Didymella pinodella*, *Didymella pinodes*, *Didymella glomerata*, *Phoma herbarum* i *Ascochyta coolinga*. Celem badań była identyfikacja genów, uaktywnianych w roślinie podczas ich porażenia izolatami *Didymella pinodes*.

Doświadczenie prowadzono w warunkach kontrolowanych. Zainokulowano 36 linii grochu (z Polskiego Banku Genów Grochu w Wiatrowie oraz Stacji Hodowli w Szelejewie) izolatami PIN-03 *Didymella pinodes*. Do analiz RNAseq wybrano linie o opisanej małej i wysokiej podatności na porażenie patogenem na 24h po inokulacji. Przygotowano bibliotekę TruSeq mRNA stranded. Sekwencjonowanie wykonano przy zastosowaniu aparatu NovaSeq6000 w konfiguracji 2x150bp, 40M odczytów. Surowe dane odniesiono do referencyjnej sekwencji genomu grochu. Wyznaczono geny ulegające różnicowej ekspresji w odpowiedzi na porażenie (DEGs) i wykonano analizy wzbogacenia zestawów genów w oparciu o adnotacje funkcjonalne termami GeneOntology oraz KEGG/PATHWAY, które pozwoliły na identyfikację i charakterystykę funkcjonalną zbiorów genów o istotnie różnej ekspresji w odpowiedzi na inokulację u wrażliwych/odpornych linii. Ekspresję weryfikowano w oparciu o potwierdzenie reakcją qPCR w trzech punktach czasowych (4h, 24h i 8 dni po inokulacji).

W pierwszym doświadczeniu do linii najmniej porażonych należały: P665, Perfect Freezer, Wt401, Sun Valley i Nemo, a do najsilniej porażonych: Lamm 30, DS19162, Frazer i WBH 578. Średni poziom porażenia wyniósł 1.9, w skali 0-5. W kolejnym roku do linii najmniej porażonych ponownie należała linia Wt401 (średni poziom porażenia 2.5). Analizy transkryptomiczne w oparciu o narzędzia RSEM, StringTie i Kallisto wskazały zbiory odpowiednio 611 genów o ekspresji istotnie wyższej w odpowiedzi na inokulację roślin odpornych oraz 460 genów ulegających niższej ekspresji. Uzyskanym transkryptom przypisano funkcje w oparciu o porównania z bazami danych UniProt/SwissProt i RefSeq/Plants oraz mapowanie na zbiory eukariotycznych/roślinnych ortologów zgromadzone w bazie eggNOG.

W analizie transkryptomicznej wskazano sekwencje o największej różnicy ekspresji pomiędzy liniami podatnymi i mniej podatnymi na porażenie, w odpowiedzi na inokulację. Weryfikowano przypisanie funkcji wybranym sekwencjom kandydackim. Określono ich potencjalny udział w różnych szlakach metabolicznych m.in.: biosyntezy kutyny, interakcji roślina-patogen, transdukcji sygnału hormonalnego w roślinie. Testy wzbogacenia zbiorów genów wskazały, że wśród sekwencji najsilniej aktywowanych 24h po inokulacji dominowały kategorie funkcjonalne związane z m.in. fotosyntezą, wiązaniem węgla, biosyntezą kutyny, biosyntezą hormonów oraz odpowiedzią na bodźce w tym na drodze szlaku jasmonowego. Metodą qPCR przeanalizowano poziom ekspresji wybranych genów, wskazanych przez analizę RNAseq, jako zaangażowane w mechanizm odporności w przebiegu askochytozy.

Badania finansowane z projektu MRiRW PB21 „Identyfikacja genów związanych z odpornością grochu na askochytozę i jej wpływ na sprawność fotosyntetyczną roślin”