

Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej

Zadanie nr 39

Okres realizacji: 01.01.2023 - 31.12.2023



Poznanie molekularnych podstaw mechanizmów odpowiedzi fasoli na wybrane stresy biotyczne i abiotyczne

Kierownik zadania: dr Marzena Nowakowska; marzena.nowakowska@inhort.pl

Wykonawcy: prof. dr hab. Joanna Puławska, dr Monika Kałużna, dr Urszula Kłosińska, dr inż. Jacek Nowak, dr Wojciech Szczechura, mgr Dominika Niedzielska, mgr inż. Katarzyna Nowak, Karolina Lelonkiewicz, Ewa Tuka



Institut Ogrodnictwa –
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

CELE PROJEKTU

- Przeprowadzenie oceny fenotypowej wybranych obiektów fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody w różnych fazach wzrostu i rozwoju (kontynuacja badań).
- Kontynuowanie prac nad tworzeniem kolekcji genotypów fasoli o zróżnicowanym pochodzeniu i zestawie różnych cech użytkowych na potrzeby mapowania asocjacyjnego.
- Monitoring występowania obwódkowej i ostrej bakteriozy fasoli w różnych rejonach Polski z ukierunkowaniem na tworzenie kolekcji izolatów bakterii patogenicznych z rodzaju *Xanthomonas* oraz *Pseudomonas*.
- Charakterystyka kolekcjonowanych izolatów *Xanthomonas* sp. oraz *Pseudomonas* sp. (kontynuacja badań).
- Przeprowadzenie oceny fenotypowej wybranych obiektów fasoli pod względem reakcji na inokulację izolatami *X. phaseoli* pv. *phaseoli* oraz *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, będących sprawcami ostrej bakteriozy fasoli w Polsce.
- Uzyskanie pokolenia F₂ niezbędnego do wyprowadzania wysoce homozygotycznych linii na potrzeby analizy genetycznej i mapowania molekularnego odporności fasoli na ostrą bakteriozę.

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane

Materiały i Metody

T1	100 obiektów fasoli	Ocena reakcji poszczególnych obiektów na stres niedoboru wody w trzech fazach rozwojowych: w fazie kiełkowania: testy szalkowe, warunki laboratoryjne, 18% PEG w fazie siewek: testy szalkowe, warunki fitotronowe, 12% PEG w fazie kwitnienia/zawiązywania strąków: doświadczenie pojemnikowe, warunki szklarniowe, wilgotność podłoża 38% pF
T2		<ul style="list-style-type: none">• Pozyskanie 50 nowych obiektów fasoli z różnych zasobów genowych• Rozmnożenie wsobne 63 wybranych obiektów w warunkach szklarniowych i polowych
T3		<ul style="list-style-type: none">• Lustracje upraw fasoli w 5 regionach Polski: Łódzkie, Małopolskie, Wielkopolskie, Dolnośląskie, Podkarpackie.• Identyfikacja bakterii i określenie ich pozycji taksonomicznej z zastosowaniem metod klasycznych i biologii molekularnej, spełniających kryteria klasyfikacji obu gatunków.• Charakterystyka wybranych izolatów z kolekcji 2021 r.: testy patogeniczności na odmianach testowych fasoli, analiza zróżnicowania genetycznego patogenicznych izolatów na podstawie sekwencji repetytywnych
T4	90 obiektów fasoli	Testy infekcyjne; 2 izolaty: <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (FAS9-1), <i>X. citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (FAS36); inokulacja zgodnie z metodyką opracowaną w 2021 r
T5		Rozmnożenie wsobne 2 populacji F ₁ pochodzących ze skrzyżowania obiektów o skrajnie zróżnicowanej podatności na wysoce zjadliwe izolaty <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> i <i>X. citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>

Wyniki i Wnioski

T1: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody

Wpływ stresu suszy na oceniane parametry: maksymalny % skielkowanych nasion (FGP), % skielkowanych nasion w trzeciej dobie (GE) oraz indeks szybkości kiełkowania (GSI) na podstawie danych ze 100 obiektów fasoli

	FGP (%)			GE (%)			GSI		
	kontrola	stres	SI (%)	kontrola	stres	SI (%)*	kontrola	stres	SI (%)
średnia	99,0	48,1	48,9	94,3	27,3	28,1	14,4	4,1	25,6
Sd	5,1	34,2	34,8	13,3	27,8	28,1	4,2	3,7	20,9
zakres	59-100	0-100	0-108,5	18-100	0-100	0-100	6,3-24,8	0-20,4	0-89,5
CV (%)**	5,2	71,0	71,1	14,1	101,8	100,0	29,1	91,8	81,7
mediana	100,0	44,0	44,3	100,0	18,0	19,2	14,2	3,0	20,8

Pięć najbardziej wrażliwych obiektów: FAS137, FAS026, FAS186, FAS221A, FAS167

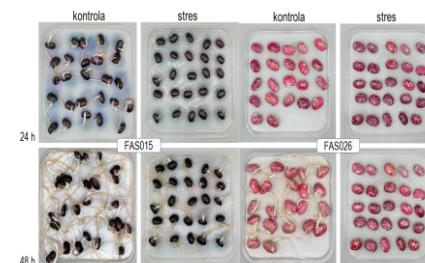
Pięć najbardziej tolerancyjnych obiektów: FAS135, FAS147, FAS012, FAS141, FAS140

*SI wartość indeksu stresu, wyrażonego jako procentowa zmiana wartości wybranych parametrów w stresie względem kombinacji kontrolnej

**CV współczynnik zmienności

Badane obiekty fasoli różniły się pod względem tolerancji na niedobór wody w fazie kiełkowania, co potwierdzają szerokie zakresy wartości (Min, Max) oraz wysokie wartości współczynnika zmienności (CV) dla ocenianych parametrów w warunkach stresu.

Wysoka zmienność roślin pod względem tolerancji na stres suszy w fazie kiełkowania może wskazywać na ich przydatność do mapowania asocjacyjnego



T2: Gromadzenie zasobów genetycznych fasoli

- ✓ powiększenie zgromadzonej do tej pory kolekcji fasoli zwyczajnej o kolejne 50 obiektów pochodzących z zasobów genowych:
 - NAFC Piešťany, Słowacja: 11 obiektów;
 - NPGS Pullman, USA: 7 obiektów;
 - KCRZG Radzików, Polska: 32 objekty.

- ✓ obecnie zgromadzona kolekcja nasion fasoli liczy 250 obiektów zróżnicowanych pod względem:
 - cech morfologicznych (typ wzrostu, typ użytkowy, zróżnicowany kształt i wybarwienie nasion, itp.);
 - reakcji na czynniki stresowe, zarówno biotyczne jak i abiotyczne;
 - pochodzenia geograficznego, ze specjalnym uwzględnieniem obiektów wywodzących się z kraju i terenów o szerokości geograficznej i klimacie zbliżonym do Polski

- ✓ w wyniku rozmnożenia wsobnego uzyskano nasiona w ilości zapewniającej realizację celów badawczych projektu (min. 600 szt.) dla wszystkich 63 obiektów uwzględnionych w doświadczeniach reprodukcyjnych w b.r.

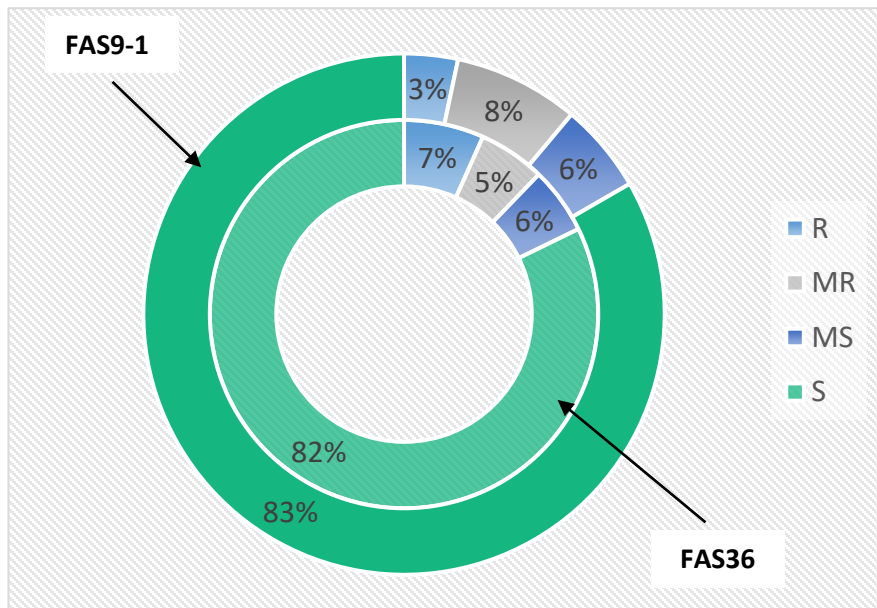


Wyniki i Wnioski

T3: Ocena reakcji roślin fasoli na porażenie przez *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (FAS9-1) oraz *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (FAS36) w warunkach kontrolowanych

Zróźnicowanie fenotypowe stopnia porażenia 100 obiektów fasoli przez **FAS 9-1** (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) oraz **FAS 36** (*X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*)

Izolat	Min	Mediana	Max	Średnia	SD	Kurtoza	Skośność	CV*
FAS9-1	1,1	8,57	9	7,73	2,0	-1,92	5,71	26,0
FAS36	1,1	8,67	9	7,71	2,2	-1,90	5,44	28,4



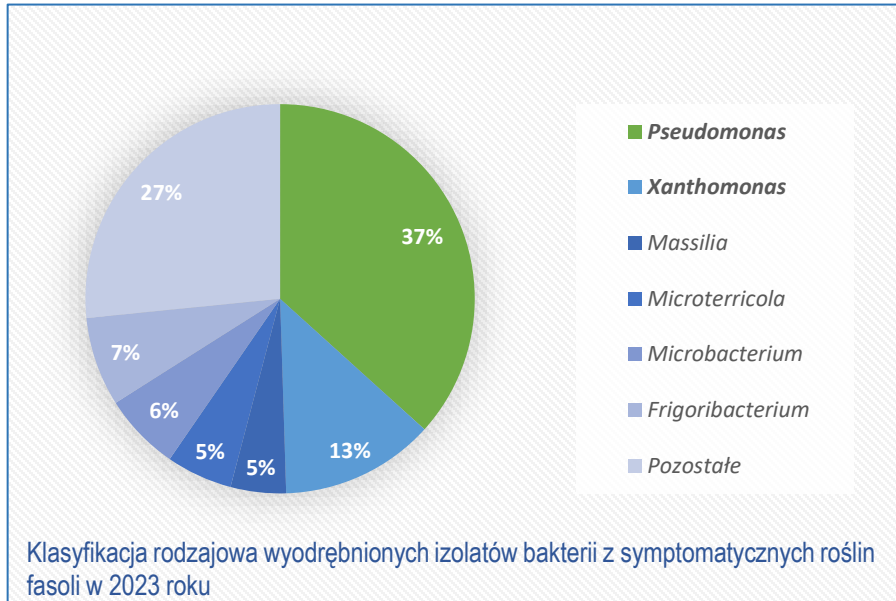
Dystrybucja obiektów w poszczególnych grupach 21 dni po inokulacji roślin. Ocenę porażenia dokonywano wg dziewięciostopniowej skali (1-9). Rośliny z klas: 1-2 klasyfikowane są jako odporne (R), 3-4 – średnio odporne (MR), 5-6 – średnio podatne (MS), 7-9 – podatne (S).

Badane objekty fasoli wykazywały umiarkowane zróźnicowanie w reakcji na porażenie izolatami *X. phaseoli* pv. *phaseoli* i *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, przy dominacji obiektów podatnych. Ta relatywnie niska zmienność może potencjalnie ograniczać ich przydatność do mapowania asocjacyjnego.

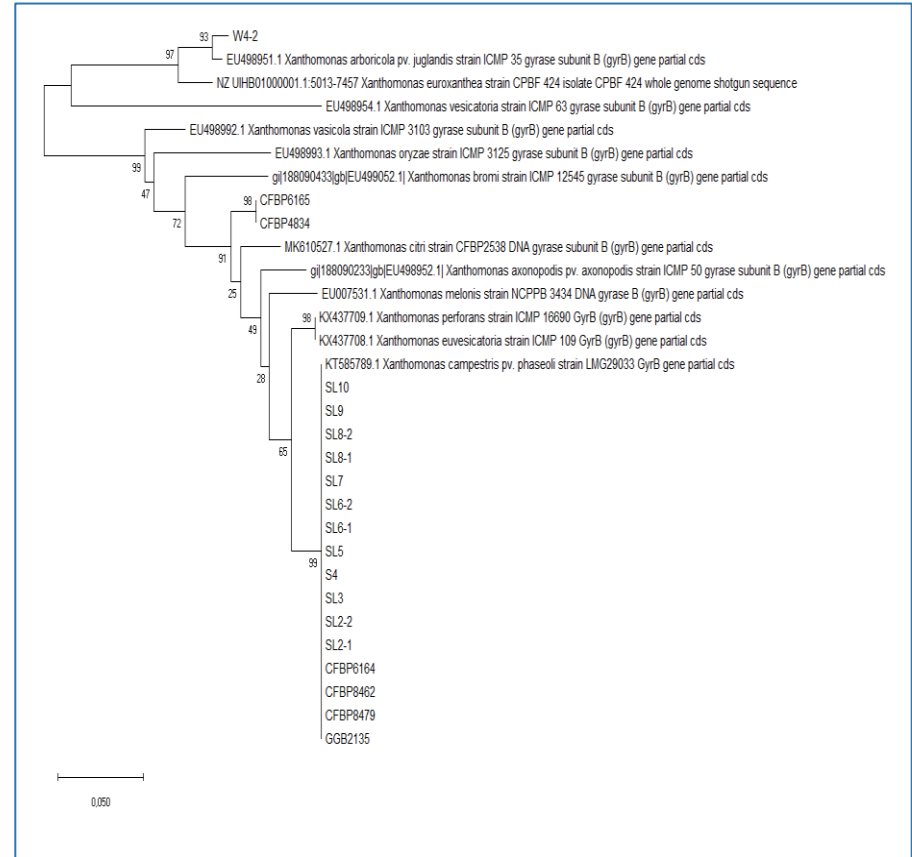
Zidentyfikowane odporne objekty mogą stanowić potencjalne źródło odporności na przedmiotowe patogeny. Ich wykorzystanie w hodowli fasoli może przyczynić się do wyprowadzenia materiałów wyjściowych dostosowanych do lokalnych populacji patogenu, i co istotne, jednocześnie uwzględniającej oba taksony wywołujące ostrą bakteriozę.

Wyniki i Wnioski

T4: Kolekcjonowanie bakterii z rodzaju *Xanthomonas* i *Pseudomonas*



- Spośród 109 izolatów bakterii uzyskanych z porażonych roślin fasoli w b.r., połowa została zaklasyfikowana do rodzaju *Pseudomonas* i *Xanthomonas*
- W grupie *Xanthomonas*, na podstawie analizy porównawczej sekwencji genu *gyrB*, 13 izolatów zidentyfikowano jako *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (wszystkie pochodziły z jednej lokalizacji)
- W przeciwieństwie do poprzednich lat, w bieżącym roku nie zidentyfikowano wśród pozyskanych izolatów gatunku *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

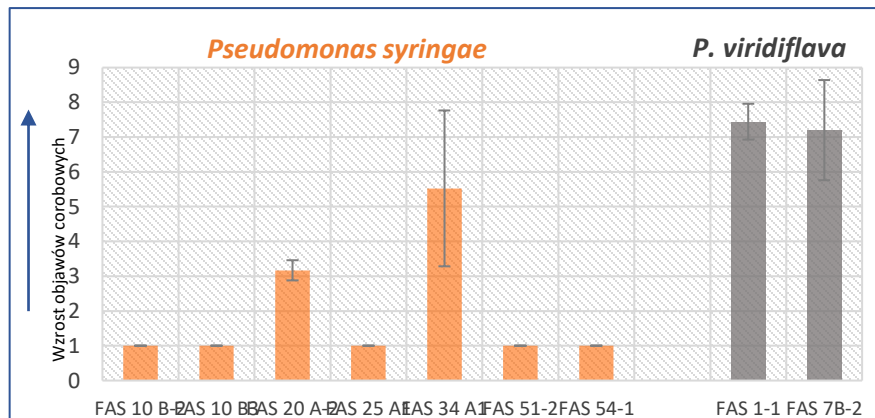
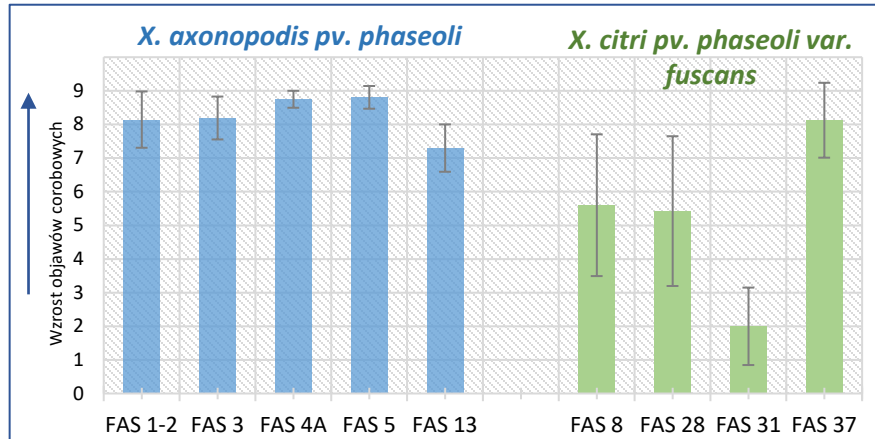


Dendrogram ML przedstawiający relacje filogenetyczne między izolatami pozyskanymi z fasoli oraz najbliższymi spokrewnionymi szczepami typowymi dla gatunków rodzaju *Xanthomonas* w oparciu o podobieństwo sekwencji nukleotydów fragmentu genu *gyrB* długości 702 bp.

Podane wartości liczbowe przy węzłach oznaczają współczynnik poparcia – bootstrap. Skala umieszczona w lewym dolnym rogu oznacza długość gałęzi odpowiadającą 0,05 podstawienia nukleotydowego na jedną zasadę porównywanych sekwencji. Kolorem purpurowym oznaczono izolaty pozyskane w ramach realizacji niniejszego zadania.

Wyniki i Wnioski

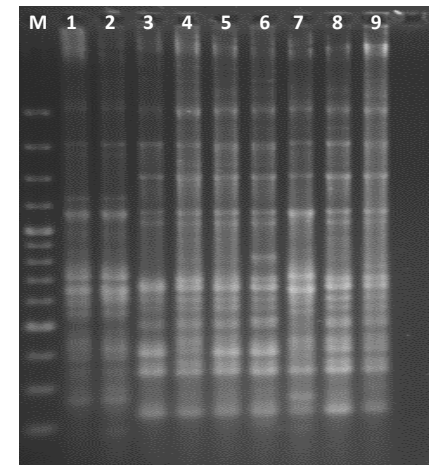
T4: Charakterystyka wybranych izolatów *Pseudomonas* i *Xanthomonas*



Stopień porażenia fasoli zwyczajnej przez izolaty *X. axonopodis pv. phaseoli*, *X. citri pv. phaseoli var. fuscans*, oraz *P. syringae* i *P. viridiflava* w testach infekcyjnych wg dziewięciostopniowej skali 1-9, gdzie 1 oznacza najmniejszą intensywność objawów, a 9 - najwyższą.

- Niezależnie od gatunku bakterii, wszystkie izolaty *Xanthomonas* oraz *P. viridiflava* były patogeniczne względem fasoli (zróżnicowana agresywność)
- w przypadku izolatów *P. syringae*, tylko 2 spośród 7 badanych wykazywały patogeniczność w stosunku do roślin fasoli.

Przykładowy elektroforogram produktów reakcji PCR z użyciem startera BOX1 ilustrujący zróżnicowanie genetyczne izolatów *X. citri pv. phaseoli var. fuscans*



M – marker standard masowy DNA O'GeneRuler 100-3000 bp (Thermo Scientific), 1 – FAS 6-1, 2 – FAS 8, 3 – FAS 12, 4 – FAS 28, 5 – FAS 31, 6 – FAS 32,7 – FAS 36, 8 – FAS 37, 9 – CFBP 6165

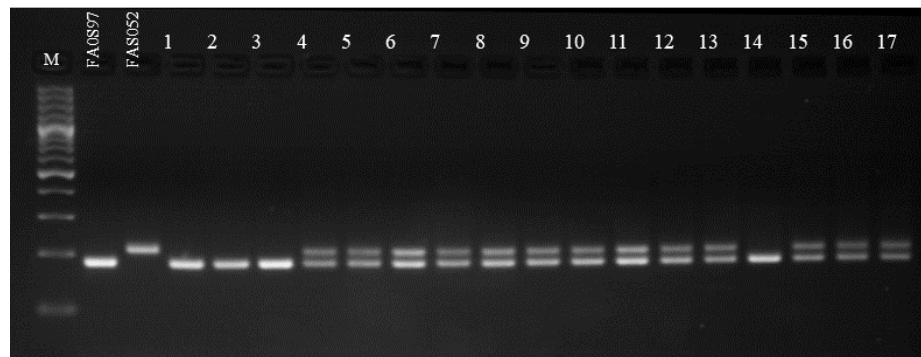
Wyniki i Wnioski

T3: Generowanie populacji do mapowania *loci* odporności na ostrą bakteriozę fasoli



Rozmnożenia dwóch populacji F_1 fasoli w warunkach szklarniowych

Liczba roślin F_1 o potwierdzonym statusie mieszańcowym	Liczba nasion	Masa nasion (g)
FAS097 × FAS052		
36	6503	1447.1
FAS099 × FAS052		
28	7905	2080.9



Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR amplifikowanych ze starterem BM187 dla populacji F_1 (FAS097 × FAS052) oraz jej form rodzicielskich celem weryfikacji statusu mieszańcowego.

Rośliny oznaczone 1-17 reprezentują kolejne rośliny pokolenia F_1

M: marker wielkości GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Metoda z wykorzystaniem markerów SSR jest wysoce efektywna w identyfikacji mieszańców fasoli. Przy jej udziale potwierdzono lub wykluczono mieszańcowe pochodzenie wszystkich analizowanych roślin.

Otrzymanie nasion pokolenia F_2 dla skrzyżowań opartych na dwóch różnych komponentach odpornych umożliwi kontynuowanie prac nad wyprowadzeniem populacji mapującej. Populacja ta, będąca złożoną z wysoce homozygotycznych linii, będzie użyteczna do przeprowadzenia analizy genetycznej i mapowania molekularnego odporności fasoli na ostrą bakteriozę w kolejnych etapach badań

Wyniki dotyczące optymalizacji metod testowania tolerancji fasoli na stres suszy w fazie kiełkowania zaprezentowano na VI Zjeździe PTNO - „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” 20-22 czerwca 2023 roku na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie



Optymalizacja metodyki testowania reakcji roślin fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) na stres deficytu wody w fazie kiełkowania

Stres niedoboru wody jest globalnym, skutkującym obniżeniem produktywności, problemem w rolnictwie. Fasola zwykła uważana jest za roślinę wrażliwą na stres niedoboru wody i ok. 60-70% obecnej światowej produkcji fasoli bywa dotknięta suszą, co skutkuje nawet 80% stratami upraw w niektórych regionach, a jednym z punktów krytycznych jest czas od siewu do wschodów.



Cel badań: optymalizacja metody wywoływania stresu niedoboru wody oraz ewaluacji reakcji roślin fasoli w fazie kiełkowania, umożliwiającej rozróżnienie genotypów tolerancyjnych i wrażliwych.



W badaniach laboratoryjnych stres suszy indukowano na szalkach poprzez zastosowanie PEG₆₀₀₀ na 5 obiektach fasoli o zróżnicowanej reakcji na niedobór wody. Inkubację prowadzono w temperaturze 25°C przez 10 dni. Parametry kiełkowania zostały analizowane programem SeedCalc w środowisku R 3.6.1 z wykorzystaniem pakietu *car* v.3.0-5 and *agricolae* v.1.3-1.

