

Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej

Zadanie nr 39

Okres realizacji: 01.01.2022 - 31.12.2022

InHort
INSTYTUT OGRODNICTWA

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, mgr Michał Warabieda, Karolina Lelonkiewicz, Ewa Tuka



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

CELE PROJEKTU

- Kontynuowanie prac nad tworzeniem kolekcji genotypów fasoli o zróżnicowanym pochodzeniu i zestawie różnych cech użytkowych na potrzeby analiz genetycznych i mapowania molekularnego.
- Przeprowadzenie oceny fenotypowej wybranych obiektów fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody w różnych fazach wzrostu i rozwoju (I etap: 100 obiektów).
- Kontynuowanie prac nad monitoringiem występowania obwódkowej i ostrej bakteriozy fasoli w różnych rejonów geograficznych Polski z ukierunkowaniem na tworzenie kolekcji izolatów bakterii patogenicznych z rodzaju *Pseudomonas* i *Xanthomonas*.
- Rozpoczęcie badań nad charakterystyką wybranych izolatów *Xanthomonas* sp. i *Pseudomonas* sp. z kolekcji pozyskanej w 2021 roku.
- Wytypowanie obiektów fasoli o skrajnie zróżnicowanej reakcji na porażenie izolatami *Xanthomonas* sp. i *Pseudomonas* sp. oraz przeprowadzenie zapyleń krzyżowych na wybranych parach celem uzyskania populacji mieszańcowych F₁ przeznaczonych do uzyskania rekombinacyjnych linii wsobnych.

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane

Materiały i Metody

Temat badawczy nr 1

- ✓ pozyskiwanie nowych obiektów fasoli z zasobów genowych i firm hodowlano-nasiennych
- ✓ rozmnożenie wsobne 90 wybranych obiektów w warunkach szklarniowych i polowych

Temat badawczy nr 2

- ✓ 100 obiektów fasoli zwykłej
- ✓ 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 na poziomie wody trudno dostępnej w zakresie poniżej 38% pF

Temat badawczy nr 3

- ✓ ilustracje 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 roślinach fasoli, analiza zróżnicowania genetycznego izolatów zweryfikowanych jako patogeniczne na podstawie sekwencji repetytywnych BOX i REP

Temat badawczy nr 4

- ✓ Testy infekcyjne: 15 obiektów fasoli (*X. axonopodis* pv. *phaseoli* FAS9-1, *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* FAS36); 25 obiektów (*P. savastanoi phaseoli* pv. *phaseolicola*: GBBP1095, GBB1175), 8 obiektów (*P. viridiflava*, FAS2-1, FAS6-2), zgodnie z metodyką opracowaną w 2021 r
- ✓ przeprowadzenie ręcznych zapyleń krzyżowych z wykorzystaniem wytypowanych par form rodzicielskich (podatna i odporna na przedmiotowe patogeny)



Wyniki

Temat badawczy nr 1: Gromadzenie zasobów genetycznych fasoli

- ✓ powiększenie zgromadzonej do tej pory kolekcji fasoli zwyczajnej o kolejne 100 obiektów:
 - 87 obiektów → rody i odmiany pochodzące z PlantiCo – Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Zielonki
 - 13 obiektów → materiały z zasobów genowych: NAFC, Piešťany, Słowacja (5 obiektów) oraz CRI, Praga, Czechy (8 obiektów)
- ✓ poszerzenie zmienności fenotypowej kolekcji:
 - 97% nowo pozyskanej puli 100 obiektów fasoli stanowiły odmiany karłowe z przeznaczeniem na zbiór fasoli szparagowej (w materiałach pozyskanych do tej pory dominowały obiekty cechujące się nieograniczonym wzrostem i przeznaczone do uprawy na suche nasiona)
 - zdecydowana większość obiektów włączonych do kolekcji w br. pochodzi z krajowych materiałów hodowlanych, krajów sąsiadujących, a także kilku innych europejskich o klimacie zbliżonym do Polski
- ✓ w wyniku rozmnożenia wsobnego uzyskano nasiona w ilości zapewniającej realizację celów badawczych projektu (min. 600 szt.) dla wszystkich 90 obiektów uwzględnionych w doświadczeniach reprodukcyjnych



Wyniki

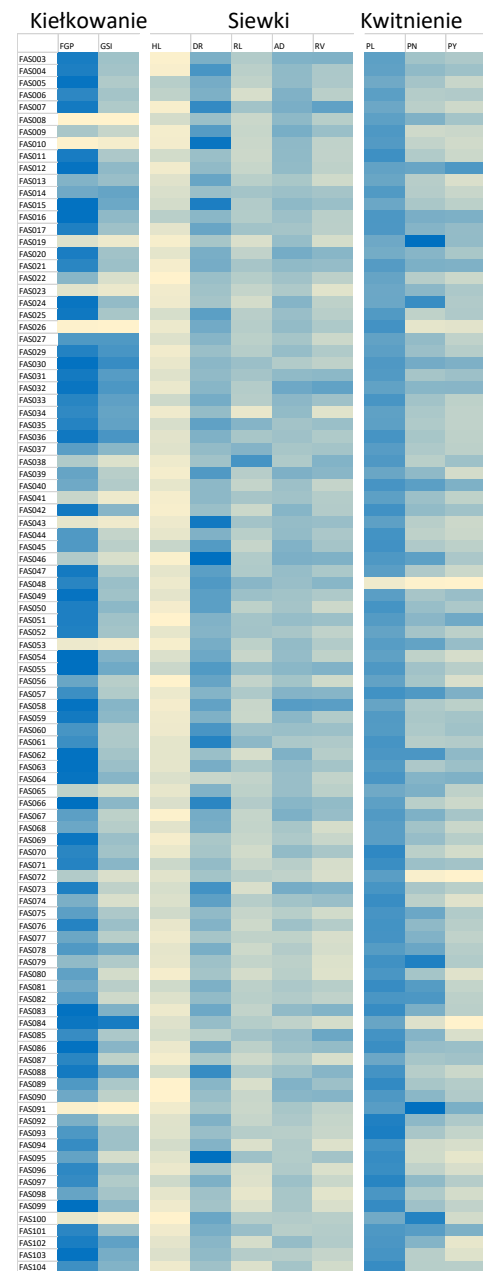
Temat badawczy nr 2: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody

Wpływ stresu suszy na wartość indeksu stresu, wyrażonego jako procentowa zmiana wartości wybranych parametrów w stresie względem kombinacji kontrolnej - na podstawie danych z 100 obiektów fasoli

	Kielkowanie		Siewki					Kwitnienie i zawiązywanie strąków		
Cecha	FGP	GSI	HL	DR	LR	AD	RV	PL	PN	PY
Średnia	71,3	35,4	41,5	134,4	78,5	105,9	87,6	80,5	50,3	37,1
Min	0	0	17,5	63,6	38,1	81,1	44,5	7,8	1,22	0
Max	100,0	91,2	77,3	276,9	166,4	157,2	169,0	96,3	123,5	86,1
CV*	39,4	50,3	33,1	25,5	24,7	14,7	30,8	12,5	39,1	37,8

*CV współczynnik zmienności

- ✓ Niezależnie od fazy rozwojowej, stwierdzono wpływ stresu suszy na reakcję badanych obiektów fasoli, co obrazują zróżnicowane wartości indeksu stresu, wyrażonego jako % kontroli dla poszczególnych parametrów: w fazie kiełkowania - maksymalny % skielkowanych nasion (FGP) i indeks szybkości kiełkowania (GSI); w fazie siewek - długość hypokotyła (HL), sucha masa korzenia (DR), sumaryczna długość systemu korzeniowego (LR), średnica systemu korzeniowego (AD) i objętość systemu korzeniowego (RV); oraz w fazie kwitnienia – długość pojedynczego strąka (PL), liczba (PN) i masa strąków (PY) w przeliczeniu na 1 roślinę.
- ✓ Badane obiekty fasoli różniły się pod względem tolerancji na niedobór wody, co potwierdzają szerokie zakresy wartości (Min, Max) oraz wysokie wartości współczynnika zmienności (CV) dla ocenianych parametrów we wszystkich fazach rozwoju i wzrostu.



Rys. 1. Mapa ciepła obrazująca reakcję 100 obiektów fasoli na stres suszy w różnych fazach rozwoju.

Im jaśniejsze wybarwienie tym większa redukcja ocenianego parametru pod wpływem stresu

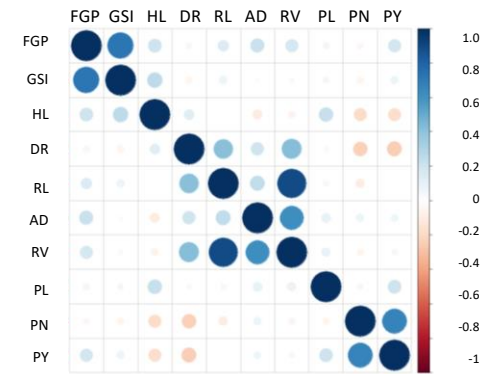
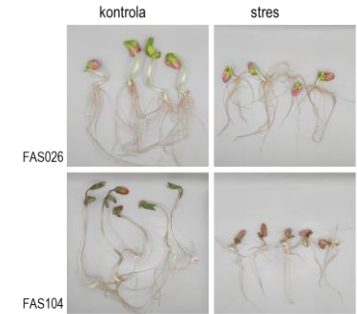
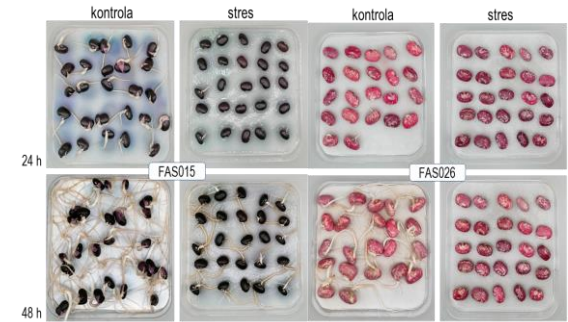
cd. tematu badawczego nr 2

✓ Stres symulowanej suszy (PEG 18%) bardziej ograniczał wartości wskaźnika szybkości kiełkowania nasion (GSI) niż procentu nasion maksymalnie skielkowanych (FGP).

✓ Nie wykazano jednoznacznej zależności pomiędzy stresem suszy a wartościami opisującymi parametry wzrostu siewek. Większość obiektów reagowała w odmienny sposób. Spośród badanych parametrów, długość hypokotyla ulegała najsilniejszej redukcji pod wpływem stresu suszy, natomiast dla suchej masy korzenia obserwowano odwrotną zależność, tj. wyraźny wzrost wartości masy pod wpływem stresu.

✓ Stres suszy zadawany w fazie kwitnienia miał największy wpływ na liczbę i masę strąków, w przypadku których obserwowano silną redukcję wartości ww. parametrów w porównaniu do roślin kontrolnych. Średnia długość strąka była cechą najsłabiej ograniczaną stresem (Rys. 1).

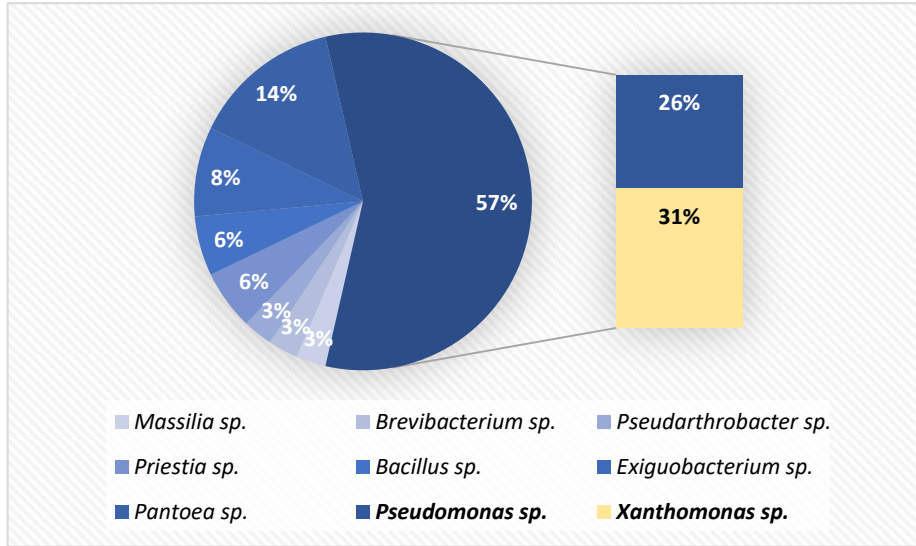
✓ Nie obserwowano zależności pomiędzy parametrami opisującymi reakcję fasoli w trzech fazach rozwoju (Rys. 2).



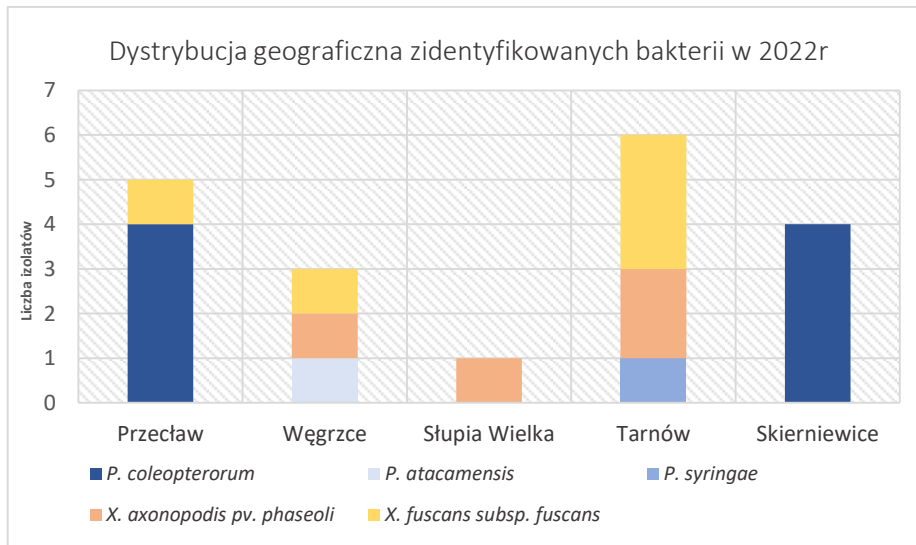
Rys. 2. Mapa ciepła ilustrująca zależności (współczynnik korelacji) pomiędzy ocenianymi parametrami dla trzech faz rozwoju na podstawie reakcji 100 obiektów.

Wyniki

Temat badawczy nr 3: Kolekcjonowanie bakterii z rodzaju *Xanthomonas* i *Pseudomonas*

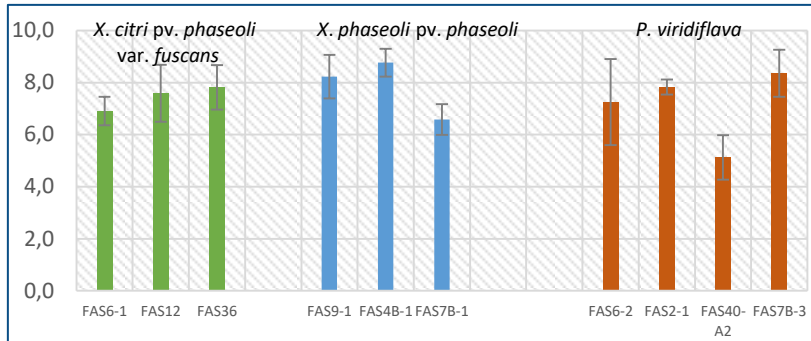


- ✓ Spośród 35 izolatów bakterii uzyskanych z porażonych roślin fasoli w b.r., ponad połowa została zaklasyfikowana do rodzaju *Pseudomonas* i *Xanthomonas*.
- ✓ Analiza porównawcza sekwencji genu *rpoB* wykazała, że izolaty zaklasyfikowane do rodzaju *Pseudomonas* reprezentowały trzy gatunki, z których najliczniejszą grupę (8) stanowiły izolaty należące do *P. coleopterorum*.
- ✓ Podobnie jak w ubiegłym roku, również w br. w puli *Pseudomonas* nie zidentyfikowano żadnego izolatu należącego do *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*.
- ✓ W grupie *Xanthomonas*, na podstawie analizy porównawczej sekwencji genu *gyrB*, 4 izolaty zidentyfikowano jako *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, zaś 5 - *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.
- ✓ Stwierdzono różnice w występowaniu bakterii *Pseudomonas* i *Xanthomonas* w zależności od regionu, z którego pozyskiwano symptomatyczne rośliny fasoli.



Wyniki

Temat badawczy nr 3: Kolekcjonowanie bakterii z rodzaju *Xanthomonas* i *Pseudomonas*



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

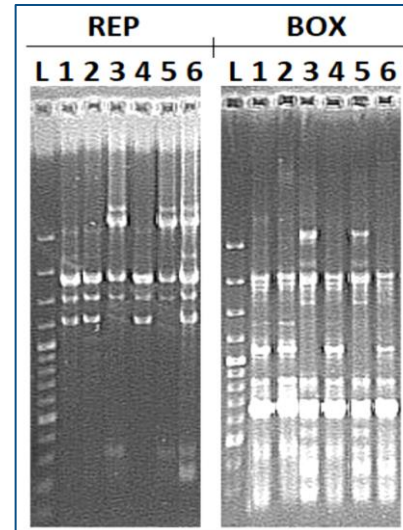
Charakterystyka wybranych izolatów

Pseudomonas i *Xanthomonas* z własnej kolekcji (2021r):

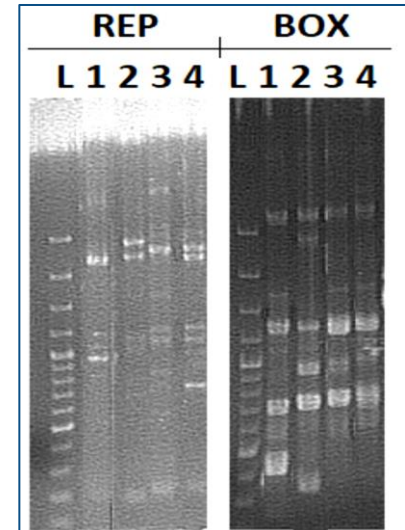
- ✓ Niezależnie od gatunku bakterii, wszystkie izolaty były patogeniczne względem fasoli (Fot. 1), aczkolwiek cechowały się one różną agresywnością.
- ✓ Amplifikacja DNA techniką „odcisku palca” dla sekwencji BOX oraz REP wykazała, że izolaty wszystkich trzech taksonów cechują się zróżnicowaniem genetycznym, przy czym w przypadku *P. viridiflava* heterogeniczność badanych sekwencji była znacznie wyższa w porównaniu do izolatów *X. axonopodis* pv. *phaseoli* i *Xanthomonas citri*



Fot. 1. Objawy bakterioz na liściach fasoli wywołwane odpowiednio przez: *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* oraz *P. viridiflava*



Elektroforogram po amplifikacji sekwencji REP i BOX izolatów *X. axonopodis* pv. *phaseoli*:
1 – FAS 4B-1
2 – FAS 7B-1
3 – FAS 9-1
Xanthomonas citri:
4 – FAS 6-1
5 – FAS 12
6 – FAS 36
L – marker 100 bp Ladder



Elektroforogram po amplifikacji sekwencji REP i BOX izolatów *P. viridiflava*:
1 – FAS 40-A2;
2 – FAS 7B-3
3 – FAS 2-1
4 – FAS 6-2
L – marker 100 bp Ladder

Wyniki

Temat badawczy nr 4:

Generowanie populacji do mapowania *loci* odporności na ostrą i obwódkową bakteriozę fasoli

- ✓ W wyniku prowadzonych testów infekcyjnych wytypowano zróżnicowane pod względem odporności na przedmiotowe patogeny komponenty rodzicielskie do krzyżowań:

***Xanthomonas* spp.**

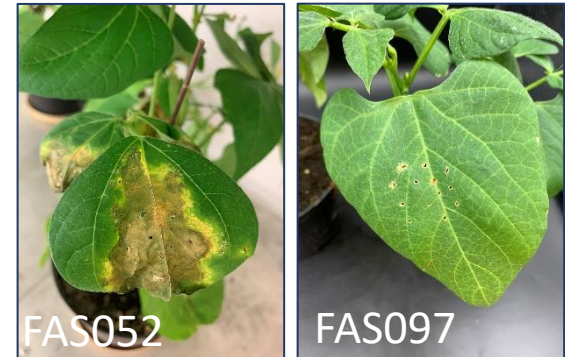
dwa obiekty (FAS097, FAS099), które wyróżniły się spośród 15 badanych obiektów najwyższym poziomem odporności na *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (FAS 9-1) i *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (FAS36). Jako komponent podatny został wykorzystany obiekt FAS052.

***Pseudomonas* spp.**

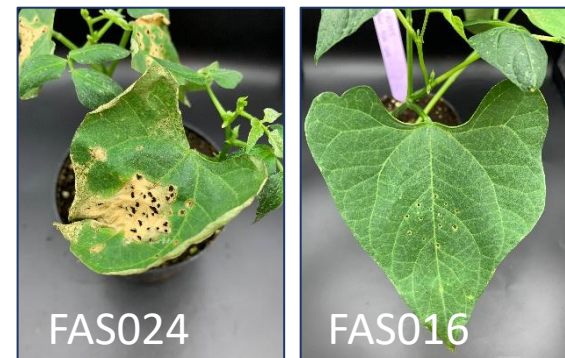
obiekt FAS016, który cechował się najwyższą odpornością zarówno na użyte w badaniach szczepy *P. savastanoi phaseoli* pv. *phaseolicola* (GBBP 1095 oraz GBB 1175), jak i izolaty *P. viridiflava* (FAS2-1, FAS6-2). Jako podatny komponent do krzyżowań został wybrany obiekt oznaczony symbolem FAS024.

- ✓ Przeprowadzono 4 kombinacje krzyżowań:
FAS097 x FAS052 i FAS099 x FAS099 - *Xanthomonas* spp.
FAS016 x FAS024 (w obu kierunkach) - *Pseudomonas* spp.

Xanthomonas spp.



Pseudomonas spp.



Wnioski

- Włączenie do kolekcji 100 kolejnych obiektów, różniących się pod względem pochodzenia geograficznego, przeznaczenia oraz typu wzrostu do puli obiektów pozyskanych w 2021 r., może korzystnie wpłynąć na pożądaną różnorodność fenotypową i genetyczną.
- Badane obiekty fasoli były zróżnicowane pod względem tolerancji na stres suszy w fazie kiełkowania i wzrostu siewek oraz w fazie zawiązywania strąków, dzięki czemu mogą stanowić cenny materiał do mapowania asocjacyjnego.
- Zależności pomiędzy parametrami opisującymi reakcję fasoli na stres suszy w fazie kiełkowania, siewek oraz kwitnienia i zawiązywania strąków okazały się nieistotne, co może wskazywać na inne mechanizmy warunkujące tolerancję fasoli w poszczególnych fazach rozwoju.
- *P. viridiflava* stanowi potencjalne zagrożenie dla upraw fasoli w Polsce, o czym świadczy wysoka patogeniczność wybranych izolatów pozyskanych w 2021 roku. Jest to pierwsze doniesienie wskazujące na potencjał chorobotwórczy *P. viridiflava* względem fasoli w Polsce. Jednocześnie w żadnej z monitorowanych upraw fasoli, po raz drugi z rzędu, nie wykryto ani jednego izolatu *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, dlatego też zasadne byłoby zastąpienie *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* w niniejszych badaniach izolatami *P. viridiflava*.
- Identyfikacja izolatów wyodrębnionych z roślin fasoli jako *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* i *X. citri* pv. *fuscans* w kolejnym roku badań oraz potwierdzenie patogeniczności wybranych izolatów obu taksonów sugeruje, iż oba gatunki są sprawcami ostrej bakteriozy fasoli w Polsce. Wskazuje to konieczność uwzględnienia izolatów *X. citri* pv. *fuscans* w badaniach mających na celu scharakteryzowanie kolekcji zasadniczej fasoli.