

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

Okres realizacji: **1.01.2021 – 31.12.2021**

### Kierownik zadania:

Dr inż. Marzena Nowakowska; [marzena.nowakowska@inhort.pl](mailto:marzena.nowakowska@inhort.pl)

### Zespół wykonawców:

Prof. dr hab. Jadwiga Treder<sup>3</sup>, Prof. dr. hab. Joanna Puławska<sup>2</sup>, Dr Mariusz Chojnowski<sup>4</sup>,  
Dr Monika Kałużna<sup>2</sup>, Dr inż. Urszula Kłosińska<sup>1</sup>, Dr inż. Jacek Nowak<sup>3</sup>,  
Dr Wojciech Szczechura<sup>1</sup>, Mgr inż. Artur Kowalski<sup>3</sup>, Mgr inż. Dominika Niedzielska<sup>2</sup>,  
Mgr Katarzyna Nowak<sup>1</sup>, Mgr inż. Michał Warabieda<sup>2</sup>, Ewa Baigazin<sup>1</sup>, Anna Borkowska<sup>3</sup>,  
Karolina Lelonkiewicz<sup>1</sup>, Ewa Tuka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, <sup>2</sup>Zakład Fitopatologii, <sup>3</sup>Zakład Uprawy i Nawożenia Roślin Ogrodniczych,

<sup>4</sup>Zakład Odmianoznawstwa, Szkółkarstwa i Zasobów Genowych



# Zadanie nr 39: Poznanie molekularnych podstaw mechanizmów odpowiedzi fasoli na wybrane stropy biotyczne i abiotyczne

---

## Cele projektu:

1. utworzenie kolekcji genotypów fasoli o różnym pochodzeniu i zestawie różnych cech użytkowych ze szczególnym uwzględnieniem tolerancji na stres niedoboru wody oraz stopnia podatności na obwódkową bakteriozę fasoli i ostrą bakteriozę fasoli
2. opracowanie i optymalizacja metody wywoływania stresu niedoboru wody oraz testowania reakcji na ten stres roślin fasoli w różnych jej fazach wzrostu i rozwoju
3. gromadzenie szczepów *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* oraz *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*
4. optymalizacja metod testowania odporności roślin fasoli na obwódkową i ostrą bakteriozę

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane

*Temat badawczy nr 1:*

- 100 obiektów fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris* L.) pozyskane z Banków Genów
- rozmnożenie w warunkach polowych i szklarniowych

*Temat badawczy nr 2:*

- 5 odmian o zróżnicowanej reakcji na stres suszy
  - opracowanie metodyki testowania fasoli w fazie kiełkowania nasion, siewek, kwitnienia i zawiązywania strąków z zastosowaniem różnych poziomów stresu suszy
- Testy szalkowe w fazie kiełkowania (warunki laboratoryjne)  
Testy pojemnikowe w fazie siewek (warunki fitotronowe)  
Testy w fazie kwitnienia/zawiązywania strąków (warunki szklarniowe)

*Temat badawczy nr 3:*

- rośliny i nasiona fasoli z objawami chorobowymi, pozyskiwane z różnych rejonów geograficznych Polski oraz różnych gatunków/typów fasoli
- identyfikacja bakterii i określenie ich pozycji taksonomicznej z zastosowaniem metod klasycznych i biologii molekularnej, spełniających kryteria klasyfikacji obu gatunków

*Temat badawczy nr 4:*

- 8 odmian o zróżnicowanej reakcji na porażenie przedmiotowymi bakteriami
- 2 szczepy *P. savastanoi phaseoli* pv *phaseolica* (GBBP1175, CFBP1390), *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (CFBP4834), *X. phaseoli* (CFBP8462)
- optymalizacja metod testowania fasoli na porażenie przedmiotowymi bakteriami

Warunki fitotronowe:

Testy na całych roślinach z uwzględnieniem fazy wzrostu, sposobu inokulacji itp.

Testy na odciętych strąkach



## Gromadzenie zasobów genetycznych fasoli

- ☺ Pozyskano, a następnie rozmnożono 100 obiektów fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris* L.)

Materiały te pochodziły z Banków Genów:

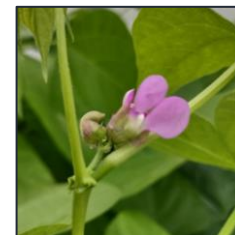
CIAT (International Center for Tropical Agriculture, Kolumbia): **58**

NPGS (U.S. National Plant Germplasm System, Pullman, WA, USA): **24**

KCRZG (Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (IHAR-PIB, Radzików): **16**

- ☺ Zgromadzona kolekcja charakteryzowała się dużym zróżnicowaniem pod względem cech agromorfologicznych (np. typ użytkowy, typ wzrostu, wybarwienie kwiatu, wielkość, kształt i wybarwienie strąków oraz nasion) oraz pochodzenia (różne regiony geograficzne świata)

- ☹ W bazie danych zasobów genowych zdarzają się obiekty błędnie zakwalifikowane, najwięcej tego typu przypadków odnotowano dla KCRZG

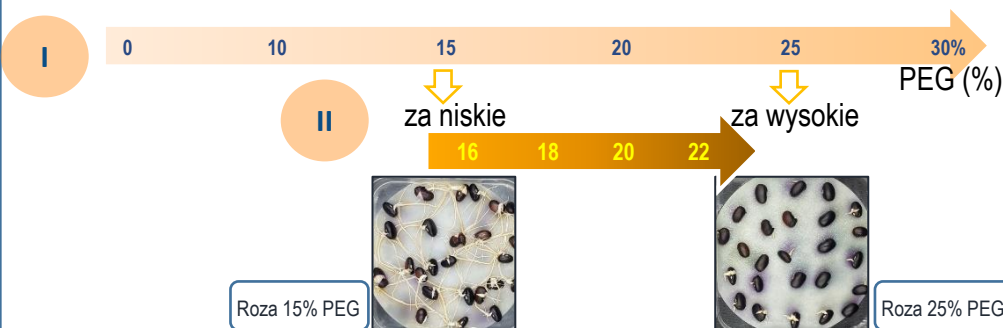


# Optymalizacja metody testowania reakcji roślin na stres niedoboru wody w różnych fazach wzrostu i rozwoju fasoli

## Faza kiełkowania (test szalkowy, warunki laboratoryjne)

Stres suszy indukowany roztworem glikolu polietylenowego 8000 (PEG 8000) obniżającego ciśnienie osmotyczne otoczenia

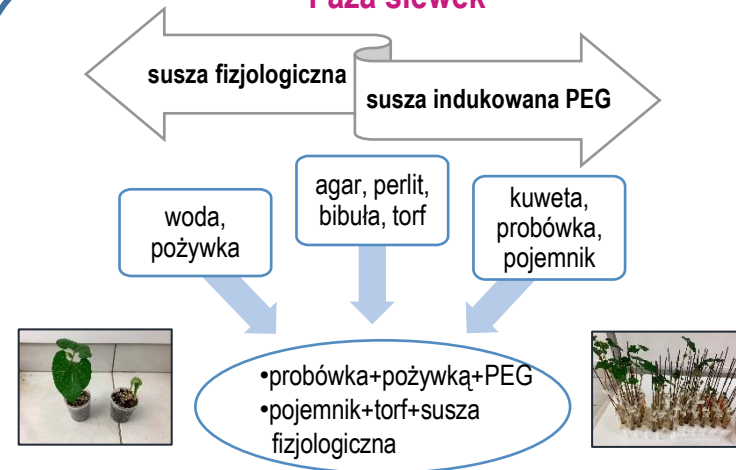
Optymalizacja obejmowała ustalenie stężenia PEG najlepiej różnicującego genotypy wrażliwe od tolerancyjnych i przebiegała dwuetapowo:



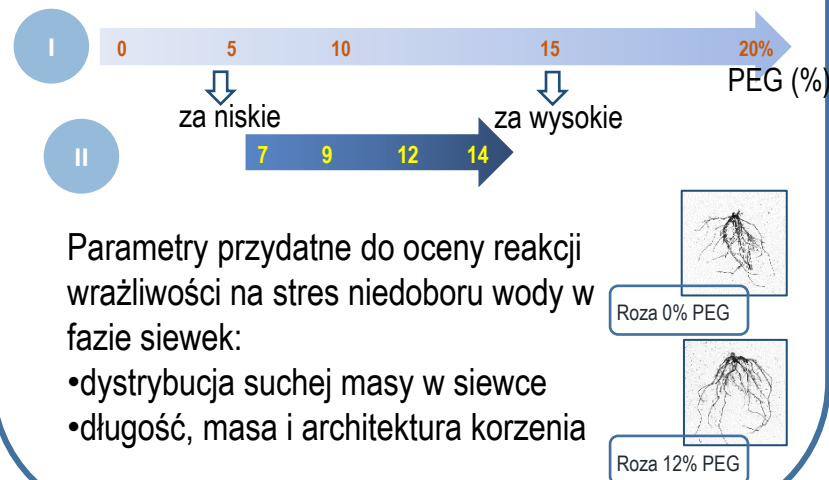
Na podstawie siły kiełkowania (GR), energii kiełkowania (GE), średniego czasu kiełkowania (MGT), oraz indeksu kiełkowania (GI) stwierdzono, że stężenia 20 i 22% najlepiej różnicowały badane odmiany. Niezbędne jest rozszerzenie testów o dodatkowe genotypy celem wyłonienia odpowiedniego stężenia.

Wśród pięciu badanych odmian, Roza cechowała się najwyższą tolerancją na stres suszy w fazie kiełkowania, natomiast najniższą – DOR 364

## Faza siewek



Dwuetapowe poszukiwania stężenia PEG, najlepiej różnicującego genotypy fasoli w war. suszy indukowanej:



Parametry przydatne do oceny reakcji wrażliwości na stres niedoboru wody w fazie siewek:

- dystrybucja suchej masy w siewce
- długość, masa i architektura korzenia

# Optymalizacja metody testowania reakcji roślin na stres niedoboru wody w różnych fazach wzrostu i rozwoju fasoli

## Faza kwitnienia/wiązania strąków

I Określenie poziomu stresu suszy rozróżniającego genotypy wrażliwe od tolerancyjnych:

zawartość wody

50-65%

**zakres optymalny - A**  
woda łatwo dostępna dla roślin, kontrola



40-50%

**lekki stres - B**  
woda dostępna w mniejszej ilości



38-40%

**mocny stres - C**  
woda trudno dostępna dla roślin



<38%

**bardzo silny stres - D**  
woda niedostępna dla roślin



Poziom stresu suszy wyznaczono z krzywej retencji wody (krzywa pF), w oparciu o zawartość wody w podłożu. Określono zakres optymalny oraz stresowy dla roślin.



Wysiew nasion i utrzymywanie wilgotności podłoża na poziomie w przedziale 50-65% obj.

Pomiary cech morfologicznych i fizjologicznych

Susza zadawana przed kwitnieniem, zawartość wody **38-40%** (mocny stres - woda trudno dostępna dla roślin)

# Optymalizacja metody testowania reakcji roślin na stres niedoboru wody w różnych fazach wzrostu i rozwoju fasoli

## Faza kwitnienia/wiązania strąków

II

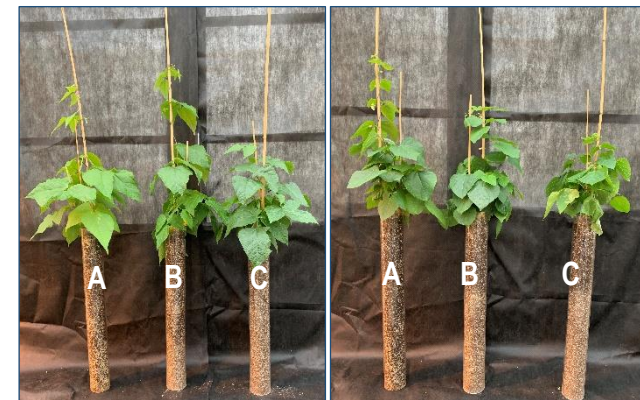
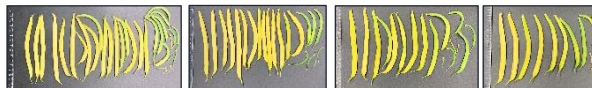
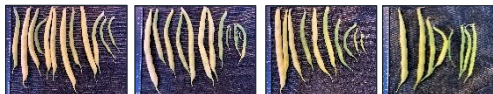
### Wytypowanie właściwych kryteriów umożliwiających ocenę reakcji roślin fasoli na stres suszy:

- ✓ cechy związane z architekturą systemu korzeniowego, dystrybucją biomasy, plonowaniem (liczba i masa strąków, średnia masa strąka) oraz parametry związane z gospodarką wodną (przewodność szparkowa, natężenie transpiracji i zawartość wody w liściach) jako dobre wskaźniki
- ✗ parametry związane z aktywnością fotochemiczną fotosystemu II oraz zawartością chlorofilu okazały się nieprzydatne w ocenach

III

### Wytypowanie odpowiednich pojemników w zależności od ocenianych parametrów:

- ✓ cylindry – ocena systemu korzeniowego
- ✓ doniczki – ocena plonowania

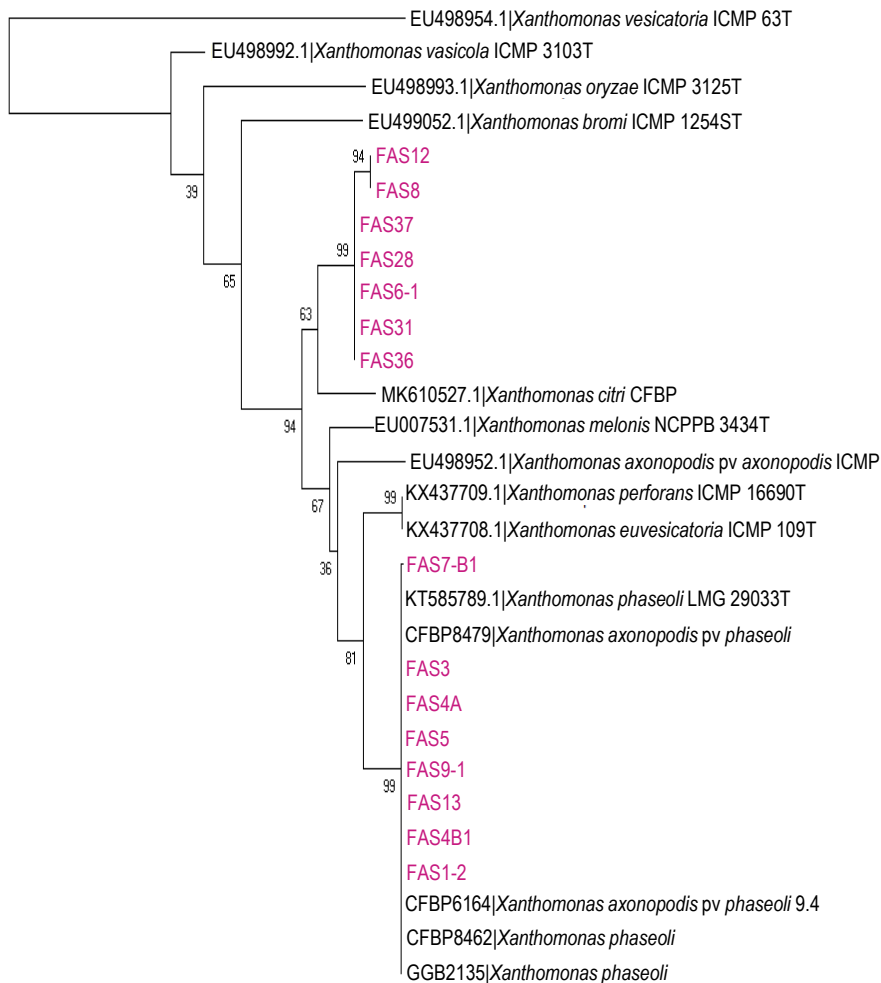


BAT 477

DOR 364

Różnice w plonie w zależności od typu pojemnika oraz poziomu stresu w odm. Polka

# Gromadzenie kolekcji *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* i *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*



0.050

- Spośród 43 izolatów bakterii uzyskanych z porażonych roślin fasoli w b.r., 15 zostało zaklasyfikowanych do rodzaju *Xanthomonas*
- 8 izolatów (53%) zidentyfikowano jako ***X. phaseoli* pv. *phaseoli***, zaś 7 (47%) - ***X. citri* pv *phaseoli* var. *fuscans***, co potwierdza, że oba te gatunki są odpowiedzialne za wywoływanie ostrej bakteriozy fasoli.

Dendrogram Maximum-likelihood przedstawiający relacje filogenetyczne między izolatami pozyskanymi z fasoli oraz najbliższymi spokrewnionymi szczepami typowymi 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.



## Gromadzenie kolekcji *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* i *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*

Spośród 43 izolatów bakterii pozyskanych z porażonych roślin w b.r., 28 należało do rodzaju *Pseudomonas*.

W puli tej nie zidentyfikowano żadnego izolatu należącego do *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*!

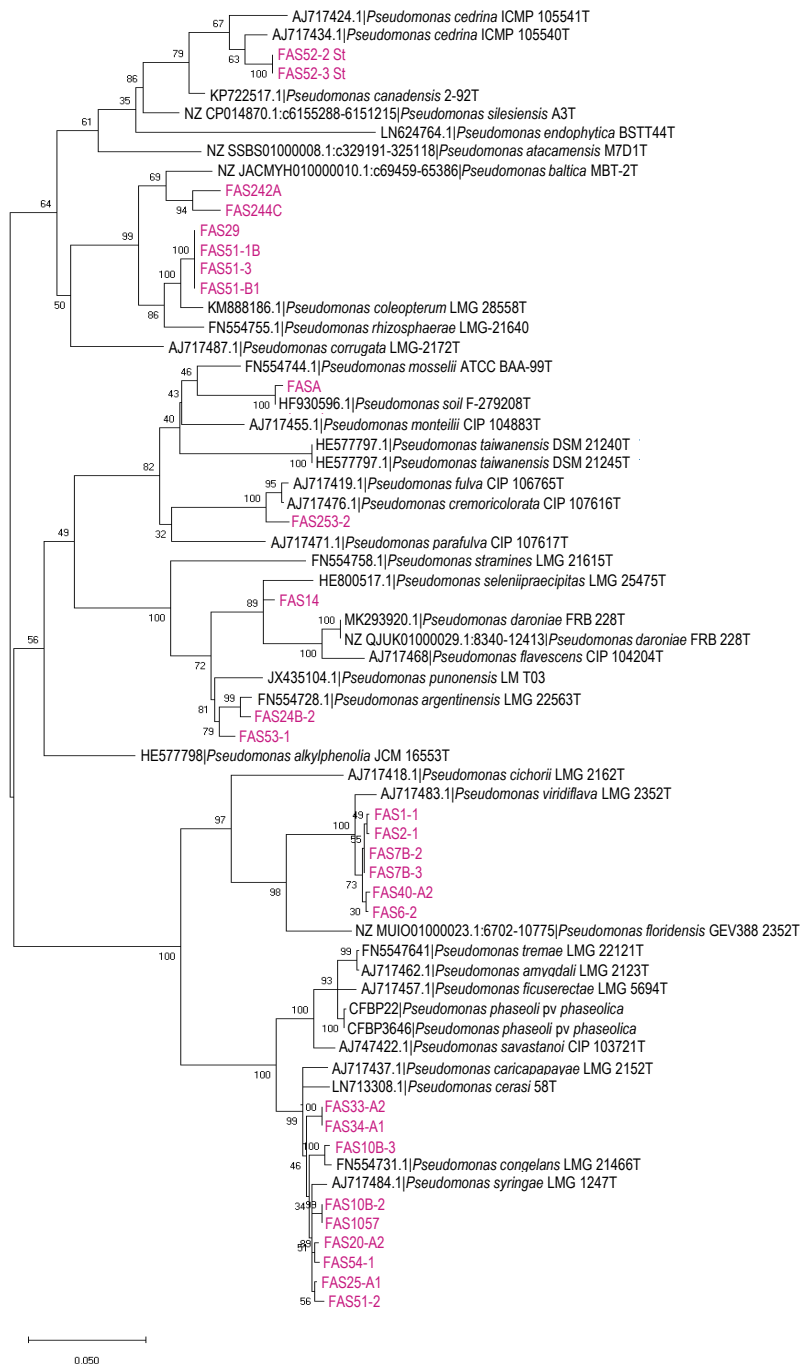
12 izolatów wykazywało pokrewieństwo do gatunków patogenicznych, w tym:

6 - *P. syringae*

6 - *P. viridiflava*

16 izolatów wykazywało podobieństwo do gatunków rzadko wymienianych jako potencjalne patogeny roślin

Dendrogram Maximum-likelihood przedstawiający relacje filogenetyczne między izolatami pozyskanymi z fasoli oraz najbardziej spokrewnionymi szczepami typowymi gatunków rodzaju *Pseudomonas* w oparciu o podobieństwo sekwencji nukleotydów fragmentu genu *rpoB* długości 935 pz. 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



# Ocena roślin fasoli pod względem porażenia przez *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* i *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*

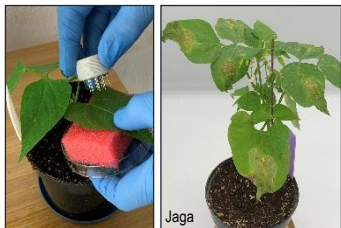
Opracowano podstawy metodyczne testowania odporności roślin fasoli na ostrą bakteriozę (*X. phaseoli* pv. *phaseoli*, *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) i obwódkową bakteriozę (*P. savastanoi* pv. *phaseolica*) w warunkach fitotronowych

## Test na całych roślinach

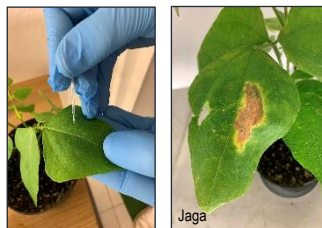
- Stwierdzono istotny wpływ metody inokulacji roślin na intensywność objawów chorobowych oraz ich powtarzalność. Metoda opryskiwania okazała się mało przydatna do testowania reakcji fasoli na przedmiotowe bakterie. Najbardziej efektywnymi technikami inokulacji okazały się natomiast: wieloigłowe nakłuwanie tkanki liściowej (Fot. 1), nakłuwanie powierzchni liścia tipsem (Fot. 2) oraz połączenie metody infiltracji z opryskiem (Taylor i in. 1996, Fot. 3).
- Stężenia inokulum w zakresie  $10^7$  -  $10^9$  j.t.k/ml nie wywoływało istotnych różnic w porażeniu roślin, niezależnie od badanego gatunku bakterii.

## Test na odciętych strąkach

- Określono sposób inokulacji strąków dostosowany do rodzaju bakterii: nakłucia wzdłuż strąka (*Pseudomonas*, Fot. 4) lub dwa równoległe nacięcia podłużne na obu końcach strąka nad nasionem (*Xanthomonas*, Fot. 5)



Fot. 1. Metoda wieloigłowego nakłuwania (po lewej) oraz objawy porażenia (po prawej) roślin *X. phaseoli*.



Fot. 2. Metoda inokulacji punktowej (po lewej) oraz objawy porażenia (po prawej) roślin *X. phaseoli*.



Fot. 3. Objawy porażenia roślin *P. savastanoi*



Fot. 4. Objawy porażenia strąków przez dwa szczepy *P. savastanoi*



Fot. 5. Objawy porażenia strąków przez *X. phaseoli*