

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, Patrycja Rakowska, Ewa Tuka



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

Cele projektu w 2023 roku

- Przeprowadzenie oceny fenotypowej wybranych obiektów fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody w różnych jej fazach rozwoju: kiełkowanie, stadium siewki, faza kwitnienia (kontynuacja badań: II etap - 100 obiektów).
- Kontynuowanie prac nad tworzeniem kolekcji genotypów fasoli o zróżnicowanym pochodzeniu i zestawie różnych cech użytkowych na potrzeby analiz genetycznych i mapowania molekularnego.
- Monitoring występowania obwódkowej i ostrej bakteriozy fasoli w różnych rejonach Polski z ukierunkowaniem na tworzenie kolekcji bakterii patogenicznych z rodzaju *Pseudomonas* oraz *Xanthomonas*.
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* (XANTPH) oraz *X. citri* pv. *fuscans* (XANTFF), będących sprawcami ostrej bakteriozy fasoli w Polsce.
- Uzyskanie pokolenia F₂ ze skrzyżowania obiektów skrajnie zróżnicowanych pod względem reakcji na porażenie XANTPH oraz XANTFF, niezbędnego do wyprowadzania wysoce homozygotycznych linii na potrzeby analizy genetycznej i mapowania molekularnego odporności fasoli na ostrą bakteriozę.

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane w 100%

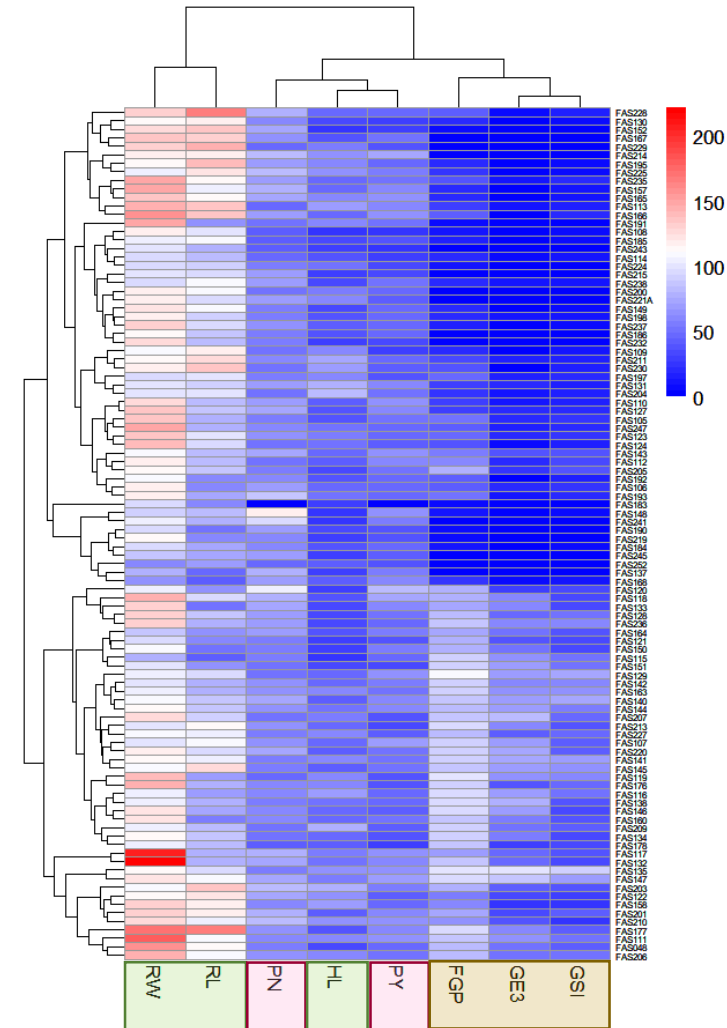
Wyniki i Wnioski

Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody

Ocena reakcji 100 obiektów na stres niedoboru wody w trzech fazach rozwojowych:

- **w fazie kiełkowania**: testy szalkowe, 18% PEG; FGP (maks. % skiełk. nasion), GE3 (energia kiełk. w 3 dobie, GSI (indeks szybkości kiełkowania);
- **w fazie siewek**: testy szalkowe, 12% PEG; HL (dł. hypokotyła), RW (sucha masa korzenia), RL (sumaryczna dł. korzenia);
- **w fazie kwitnienia/zawiązywania strąków**: doświadczenie pojemnikowe, war. szklarniowe, wilgotność podłoża: 55%-65% (kontrola) i 38% (stres) pF; PN (liczba strąków/1 rośl.), PY (masa strąków z 1 rośl.).

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.



Mapa ciepła oraz analiza skupień różnicująca badane obiekty fasoli pod względem wrażliwości na suszę w oparciu o indeks wrażliwości dla wybranych parametrów w poszczególnych fazach rozwojowych

Wyniki i Wnioski

Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody cd.

Wpływ stresu niedoboru wody na wartość **indeksu stresu (procentowa zmiana wartości wybranych parametrów w stresie względem kombinacji kontrolnej)** - na podstawie danych ze **100 obiektów fasoli**

Faza Cecha	Kiełkowanie		Siewki			Kwitnienie i zawiązywanie strąków	
	FGP max % skiełk. nasion	GSI indeks szybkości kiełk.	HL długość hypokotyła	DR sucha masa korzenia	LR sumaryczna dł. korzenia	PN liczba strąków	PY masa strąków
Średnia	49,9	26,3	46,7	118,5	92,8	63,0	48,7
Min-Max	0 - 100	0 - 89,6	23 - 83,2	62,1 - 221,9	42,1 - 165,7	1,2 - 119,3	0 - 80,6
CV (%)	70,4	81,0	30,7	20,9	27,9	23,0	26,2
5 obiektów najbardziej wrażliwych	FAS252, FAS245, FAS221A, FAS215, FAS186		FAS115, FAS108, FAS148, FAS152, FAS241			FAS178, FAS243, FAS108, FAS152, FAS114	
5 obiektów najbardziej tolerancyjnych	FAS135, FAS119, FAS147, FAS138, FAS131		FAS203, FAS227, FAS207, FAS131, FAS210			FAS120, FAS213, FAS118, FAS147, FAS107	

Zidentyfikowane obiekty fasoli, charakteryzujące się skrajnie różną reakcją na stres suszy, we wszystkich fazach rozwoju (szczególnie w fazie kiełkowania), stanowią cenny materiał wyjściowy do przeprowadzenia szerokiego zakresu badań (molekularne, fizjologiczne, genetyczne) mających na celu zrozumienie mechanizmów odporności na stres suszy.

Gromadzenie zasobów genetycznych fasoli

Powiększenie zgromadzonej do tej pory kolekcji fasoli zwyczajnej o kolejne 50 obiektów pochodzących z zasobów genowych:

- NAFC Piešťany, Słowacja: 16 obiektów;
- NPGS Pullman, USA: 7 obiektów;
- KCRZG Radzików, Polska: 27 obiektów.

Obecnie zgromadzona kolekcja nasion fasoli liczy 250 obiektów zróżnicowanych pod względem:

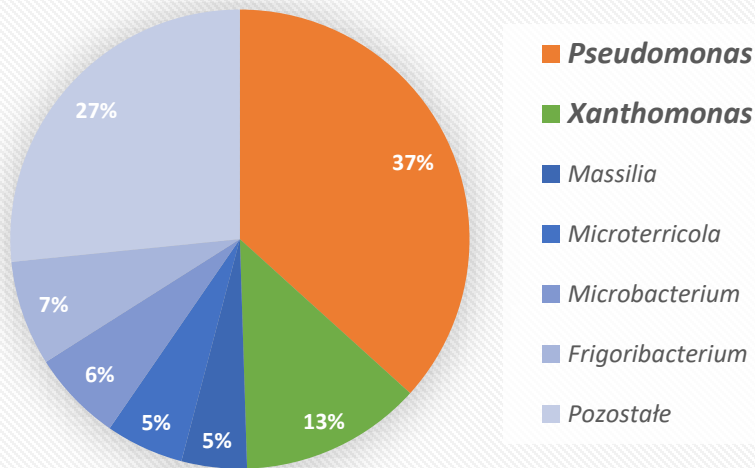
- cech morfologicznych (typ wzrostu, typ użytkowy, zróżnicowany kształt i wybarwienie nasion, itp.);
- reakcji na czynniki stresowe, zarówno biotyczne jak i abiotyczne;
- pochodzenia geograficznego (w tym uwzględniono obiekty dostępne na rynku krajowym i terenach o szerokości geograficznej i klimacie zbliżonym do Polski).



W wyniku rozmnożenia wsobnego uzyskano nasiona 63 obiektów.

Wyniki i Wnioski

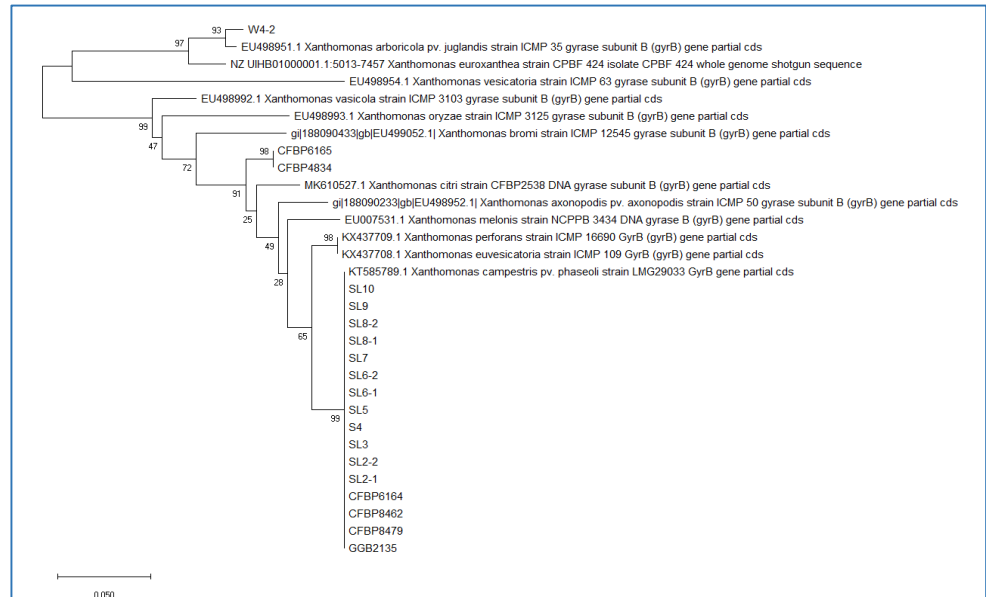
Kolekcjonowanie bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i *Xanthomonas*



Klasyfikacja rodzajowa wyodrębnionych bakterii z symptomatycznych roślin fasoli w 2023 roku

- Monitoring w pięciu lokalizacjach: **Skierniewice** (Łódzkie), **Słupia Wielka** (Wielkopolskie), **Węgrzce** (Małopolskie), **Tarnów** (Dolnośląskie) oraz **Przeclaw** (Podkarpackie).
- 109 izolatów bakterii uzyskanych z porażonych roślin fasoli - prawie połowa została zaklasyfikowana do rodzaju *Pseudomonas* (37%) oraz *Xanthomonas* (13%).
- Izolaty *Pseudomonas* spp. (*rpoB*) reprezentowane były przez 10 gatunków; najliczniejsze: *P. viridiflava* (10 iz., 25%), *P. coleopterorum* (8 iz., 20%) oraz *P. congelans* (8 iz., 20%).
- Nie zidentyfikowano żadnego izolatu *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* - sprawcy obwódkowej bakteriozy fasoli.

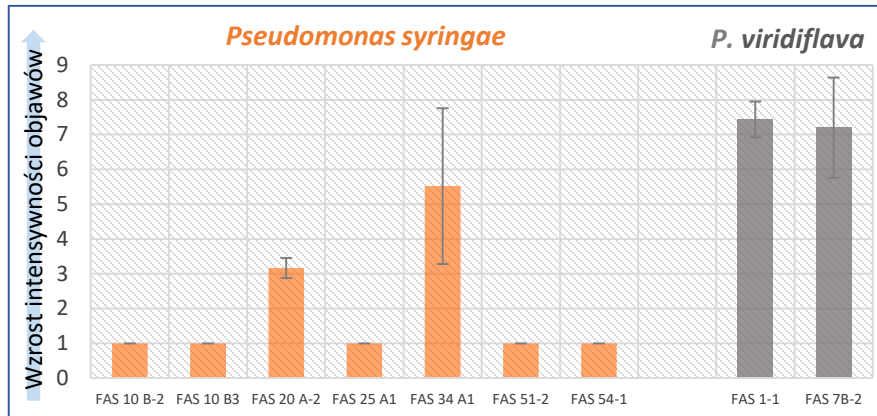
- W grupie *Xanthomonas*, na podstawie analizy porównawczej sekwencji genu *gyrB*, **13 izolatów zidentyfikowano jako *X. phaseoli* pv. *phaseoli*** (wszystkie pochodziły z jednej lokalizacji – Słupia Wielka).
- W przeciwieństwie do dwóch poprzednich lat, w bieżącym roku nie zidentyfikowano wśród pozyskanych izolatów gatunku *X. citri* pv. *fuscans*.
- Podobnie, jak w roku 2021 zidentyfikowano jeden **izolat *X. arboricola* (W4-2)**.



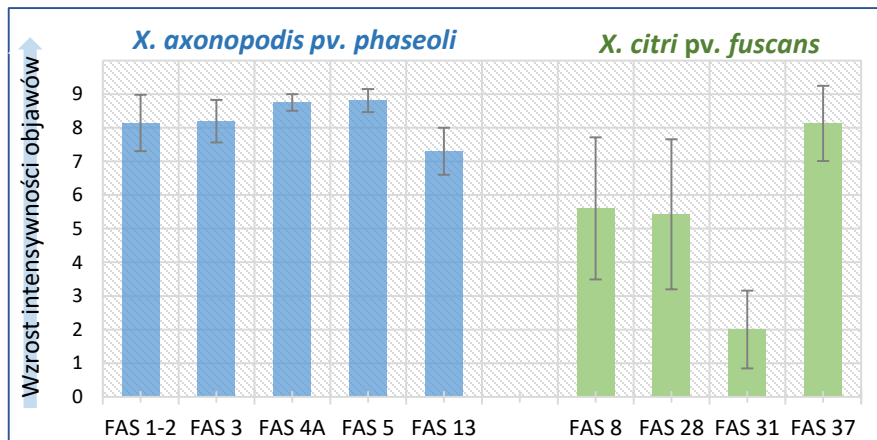
Wyniki i Wnioski

Charakterystyka kolekcjonowanych izolatów *Pseudomonas* i *Xanthomonas*

18 izolatów (9 z rodzaju *Pseudomonas*, 9 z rodzaju *Xanthomonas*) z kolekcji 2021



Stopień porażenia fasoli wg. skali 1-9, gdzie 1 oznacza brak objawów, a 9 – najwyższą intensywność porażenia.



Oba izolaty *P. viridiflava* były patogeniczne względem fasoli, natomiast w przypadku izolatów *P. syringae*, tylko dwa spośród siedmiu badanych wykazywały patogeniczność w stosunku do roślin fasoli.

Niezależnie od gatunku *Xanthomonas*, wszystkie badane izolaty okazały się patogeniczne względem fasoli, aczkolwiek cechowały się one różną agresywnością.



X. phaseoli pv. *phaseoli*



X. citri pv. *fuscans*



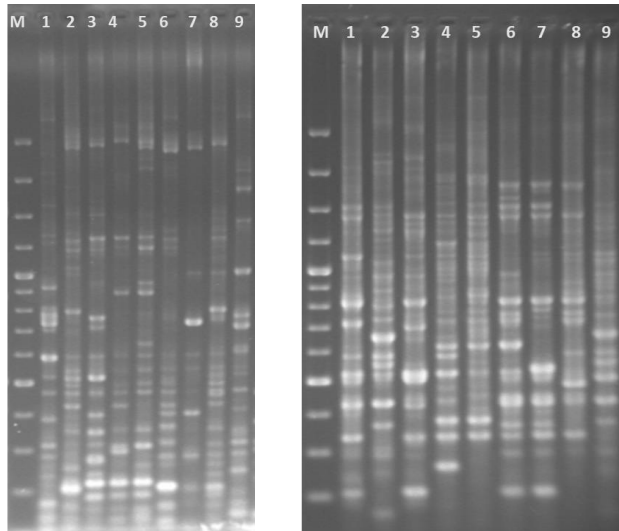
P. viridiflava

Wyniki i Wnioski

Charakterystyka wybranych izolatów *Pseudomonas* i *Xanthomonas* cd.

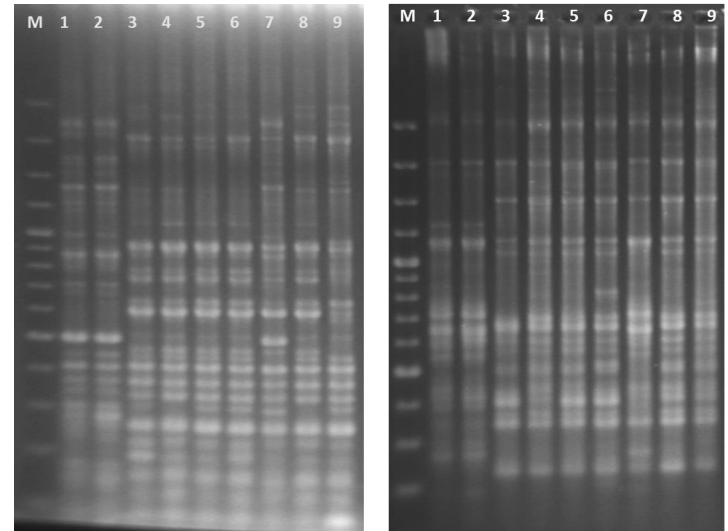
Amplifikacja DNA techniką „odcisku palca” dla sekwencji BOX oraz ERIC wykazała, że izolaty wszystkich badanych taksonów cechują się zróżnicowaniem genetycznym, przy czym w przypadku gatunków *Pseudomonas* heterogeniczność badanych sekwencji była znacznie wyższa w porównaniu do izolatów *X. phaseoli pv. phaseoli* oraz *X. citri pv. fuscans*.

Przykładowy elektroforogram produktów reakcji PCR z użyciem startera BOX1 (lewa strona) oraz ERIC1R i ERIC2 (prawa strona) ilustrujący zróżnicowanie genetyczne izolatów *P. syringae* i *P. viridiflava*



M – marker standard masowy DNA O'GeneRuler 100-3000 bp (Thermo Scientific), 1 – FAS10-B2, 2– FAS10-B3, 3 – FAS25-A1, 4 – FAS20-A2, 5 – FAS34, 6 – FAS51A2, 7 – FAS54-1, 8 – FAS1-1, 9 – FAS7B-2

Przykładowy elektroforogram produktów reakcji PCR z użyciem startera BOX1 (lewa strona) oraz ERIC1R i ERIC2 (prawa strona) ilustrujący zróżnicowanie genetyczne izolatów *X. phaseoli pv. phaseoli* oraz *X. citri pv. fuscans*



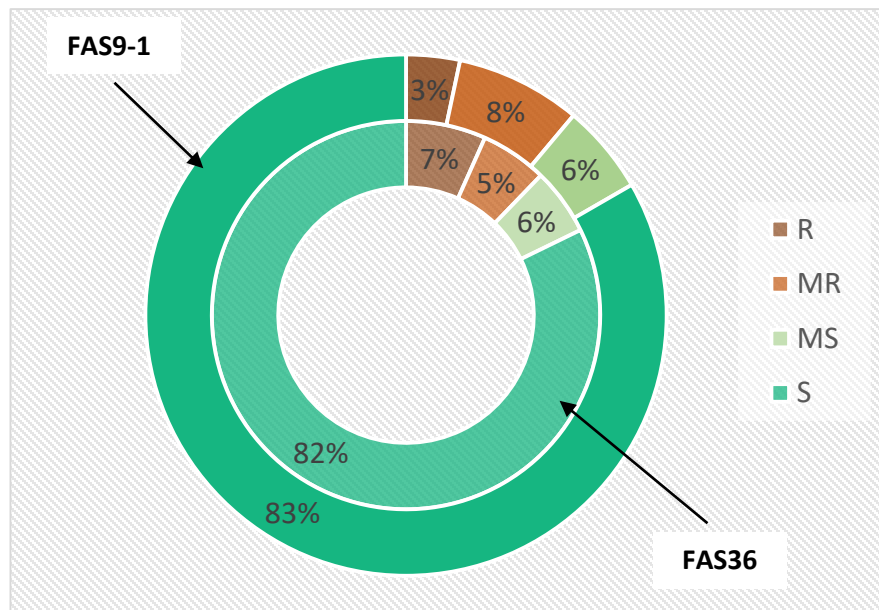
M – marker standard masowy DNA O'GeneRuler 100-3000 bp (Thermo Scientific), 1 – FAS1-2, 2– FAS3, 3 – FAS4A, 4 – FAS5, 5 – FAS13, 6 – FAS8, 7 – FAS28, 8 – FAS31, 9 – FAS37

Wyniki i Wnioski

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

Zróznicowanie fenotypowe 90 obiektów fasoli pod względem poziomu podatności na XANTPH i XANTFF

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



Badane obiekty fasoli wykazywały umiarkowane zróżnicowanie w reakcji na porażenie izolatami FAS9-1 (XANTPH) oraz FAS36 (XANTHFF), przy dominacji obiektów podatnych. Ta relatywnie niska zmienność może potencjalnie ograniczać ich przydatność do mapowania asocjacyjnego.

Zidentyfikowane odporne obiekty 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, uwzględniającej oba taksony wywołujące ostrą bakteriozę.

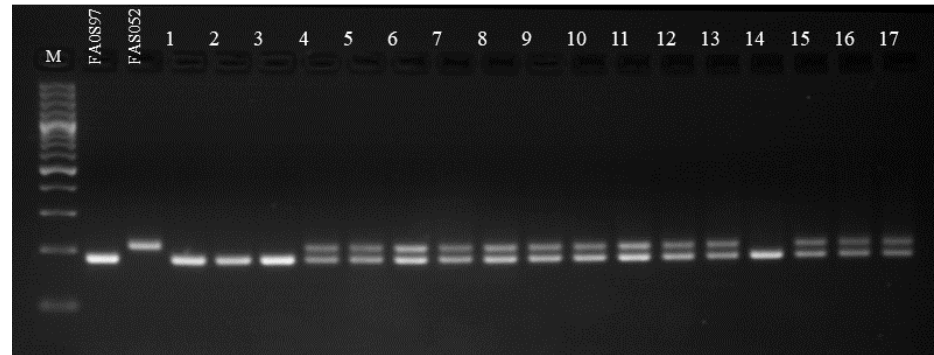
Dystrybucja obiektów w poszczególnych grupach porażenia 21 dni po inokulacji roślin;

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).

Wyniki i Wnioski

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



Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR amplifikowanych ze starterem BM187 dla populacji F₁ (FAS097 × FAS052) oraz jej form rodzicielskich celem weryfikacji statusu mieszańcowego.

Rośliny oznaczone 1-17 reprezentują kolejne rośliny pokolenia F₁

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

Rozmnożenie dwóch populacji F₁ fasoli w warunkach szklarniowych

Liczba roślin F ₁ o potwierdzonym statusie mieszańcowym	Liczba uzyskanych nasion	Masa nasion (g)
FAS097 × FAS052		
36	6503	1447.1
FAS099 × FAS052		
28	7905	2080.9

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 F₂ dla skrzyżowań opartych na dwóch różnych formach odpornych (FAS097 i FAS099) umożliwi kontynuowanie prac nad wyprowadzeniem populacji mapującej (RIL-e). Populacja ta będzie wykorzystana do przeprowadzenia analizy genetycznej i mapowania molekularnego odporności fasoli na ostrą bakteriozę w kolejnych etapach badań.