

Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej

Zadanie nr 39

Okres realizacji: 01.01.2025 - 31.12.2025



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

Kierownik zadania:

dr inż. Marzena Nowakowska (marzena.nowakowska@inhort.pl)

Wykonawcy:

prof. dr hab. Mirosław Tyrka
prof. dr hab. Joanna Puławska
dr hab. 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 2025 roku

T1

- Ocena fenotypowa wybranych genotypów fasoli pod kątem tolerancji na stres suszy w fazie kiełkowania i kwitnienia oraz kontynuacja wysokoprzepustowego genotypowania metodą DArTseq.
- Rozpoczęcie analizy asocjacyjnej (GWAS) celem identyfikacji kluczowych regionów genomu odpowiedzialnych za tolerancję fasoli na niedobór wody w fazie kiełkowania.

T2

- Kontynuacja prac nad wyprowadzaniem biparentalnej populacji mapującej (FAS097 × FAS052), składającej się z rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL), na potrzeby analizy molekularnych uwarunkowań odporności fasoli na ostrą bakteriozę.

T3

- Charakterystyka zgromadzonej kolekcji *Xanthomonas* spp. i *Pseudomonas* spp. ze szczególnym uwzględnieniem analizy patogeniczności oraz genetycznego zróżnicowania pozyskanych szczepów (kontynuacja badań).

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane w 100%

Materiały i Metody

T1 Ocena reakcji fasoli na stres niedoboru wody w fazie:

Kiełkowanie

- ✓ 188 obiekty
- ✓ warunki laboratoryjne
- ✓ testy szalkowe
- ✓ stres suszy: 18% PEG
- ✓ 8 dni



Kwitnienie

- ✓ 94 obiekty
- ✓ warunki szklarniowe
- ✓ wilgotność podłoża: 55%-65% (kontrola) i 38% (stres) pF
- ✓ traktowanie suszą kontynuowane przez 21 dni
- ✓ po zakończeniu trwania suszy: przywrócenie podlewania do poziomu 55%-65% pF do momentu dojrzałości strąków
- ✓ ocena zdolności regeneracji plonu po stresie



Genotypowanie metodą DArTseq - 94 obiekty badawcze (druga tura) - Diversity Arrays Technology Ltd. (Canberra, Australia)
Przygotowanie uzyskanych danych do analizy GWAS

T2 Generowanie populacji RIL do mapowania genów odporności na ostrą bakteriozę fasoli

- ✓ populacja mapująca: FAS097 × FAS052
- ✓ materiał wyjściowy: 204 linie RIL F₄
- ✓ warunki szklarniowe
- ✓ 2 cykle reprodukcyjne:
(uzyskanie pokolenia F₅ i F₆)
- ✓ metoda SSD



T3 Charakterystyka zgromadzonej kolekcji *Xanthomonas* spp. i *Pseudomonas* spp.

Charakterystyka patogeniczności wybranych szczepów bakterii:

- ✓ 8 szczepów XANTFF (*X. citri* pv. *fuscans*)
- ✓ 6 szczepów XANTPH (*X. phaseoli* pv. *phaseoli*)
- ✓ 15 szczepów z rodzaju *Pseudomonas* (różne gatunki)
- ✓ analiza różnicowania genetycznego szczepów patogenicznych na podstawie sekwencji repetytywnych *BOX* i *ERIC*



Wyniki (wybrane) i Wnioski

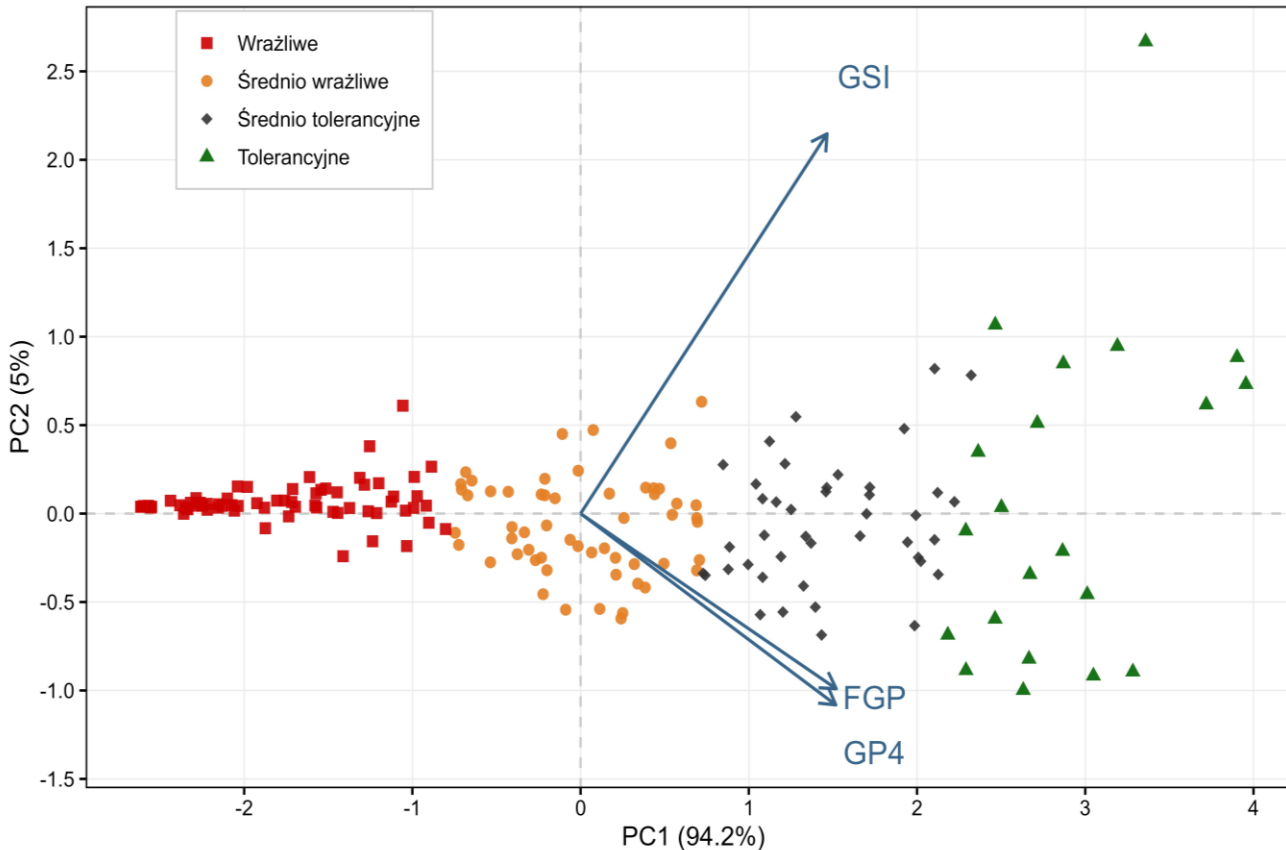
T1: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody – faza kiełkowania

Wpływ stresu osmotycznego indukowanego 18% PEG na parametry kiełkowania i wartość indeksu stresu (średnie z lat 2022–2025) dla 188 obiektów fasoli

Cecha	Warunki	Średnia ± Sd	Mediana	Zakres	CV (%)
FGP (% siewkujących nasion w ósmej dobie)	kontrola	98,4 ± 4,4	100,0	73,4-100	4,5
	stres	44,5 ± 26,9	44,6	47,5-100	60,4
	SI (%)*	45,1 ± 26,9	46,6	0-99,0	59,6
GP4 (% siewkujących nasion w czwartej dobie)	kontrola	94,8 ± 9,9	100,0	0-99,0	10,5
	stres	33,3 ± 24,6	29,5	0-96,8	74,0
	SI (%)*	34,6 ± 24,5	33,0	0-96,8	71,0
GSI (indeks szybkości kiełkowania)	kontrola	14,1 ± 4,3	13,5	5,5-27,9	38,0
	stres	3,7 ± 2,9	3,3	0-16,6	79,0
	SI (%)*	25,1 ± 17,4	22,5	0-96,6	69,6
Obiekty najbardziej wrażliwe (10):	FAS012, FAS030, FAS059, FAS083A, FAS099, FAS116, FAS119, FAS135, FAS147, FAS220				
Obiekty najbardziej tolerancyjne (10):	FAS026, FAS053, FAS091, FAS137, FAS186, FAS214, FAS215, FAS241, FAS243, FAS245				

*SI: wartość indeksu stresu wg wzoru: $SI = ((\text{wartość w stresie}) \times (\text{wartość w kontroli})^{-1}) \times 100$

T1: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody – faza kiełkowania cd.



Analiza PCA wykonana na skalowanych wartościach SI (FGP, GP4, GSI) dla 188 genotypów w warunkach stresu 18% PEG.

*SI: wartość indeksu stresu wg wzoru: $SI = ((\text{wartość w stresie}) \times (\text{wartość w kontroli})^{-1}) \times 100$

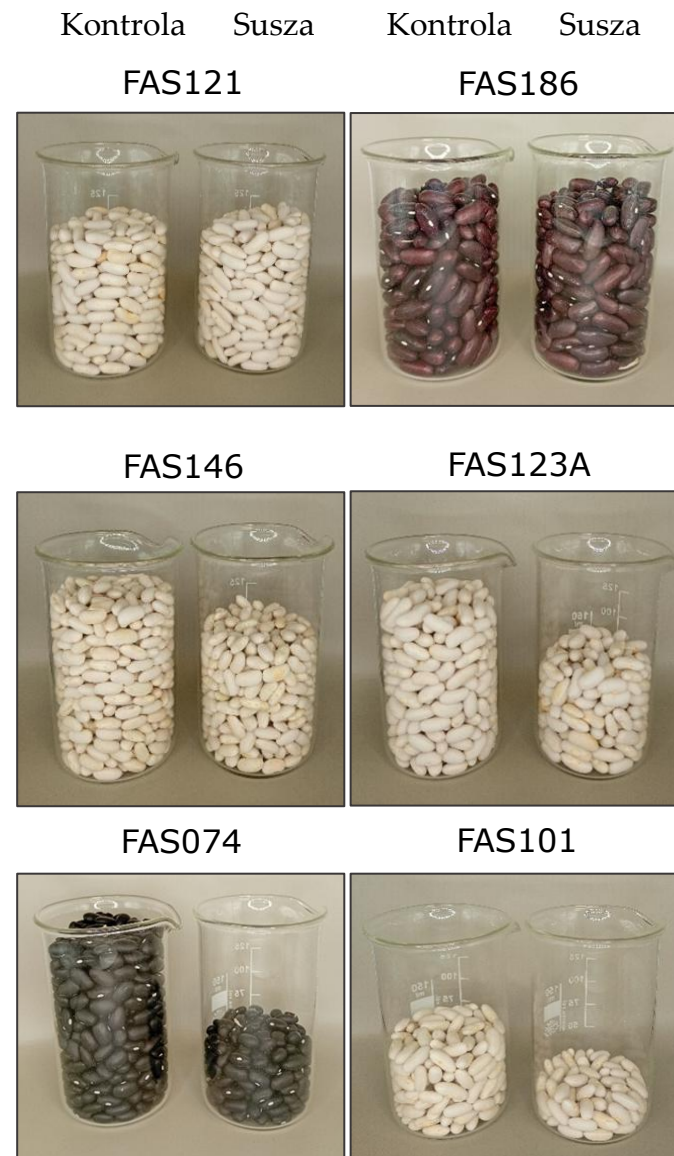
- ❑ Zastosowanie 18% PEG istotnie obniżyło wartości FGP, GP4 i GSI oraz zwiększyło ich zmienność, ujawniając szerokie zróżnicowanie reakcji 188 obiektów fasoli na stres osmotyczny.
- ❑ Indeksy stresu (SI) odzwierciedliły pełne spektrum reakcji: od niemal całkowitego zahamowania kiełkowania do utrzymania wysokiej stabilności parametrów. Pozwoliło to na wiarygodne wyróżnienie czterech klas: **wrażliwych** ($n = 69$), **średnio wrażliwych** ($n = 56$), **średnio tolerancyjnych** ($n = 42$) oraz **tolerancyjnych** ($n = 21$).
- ❑ Analiza PCA potwierdziła uporządkowanie genotypów zgodnie z gradientem tolerancji na suszę, wskazując na spójność klasyfikacji i podstawę do dalszych analiz asocjacyjnych.

T1: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody – faza kwitnienia

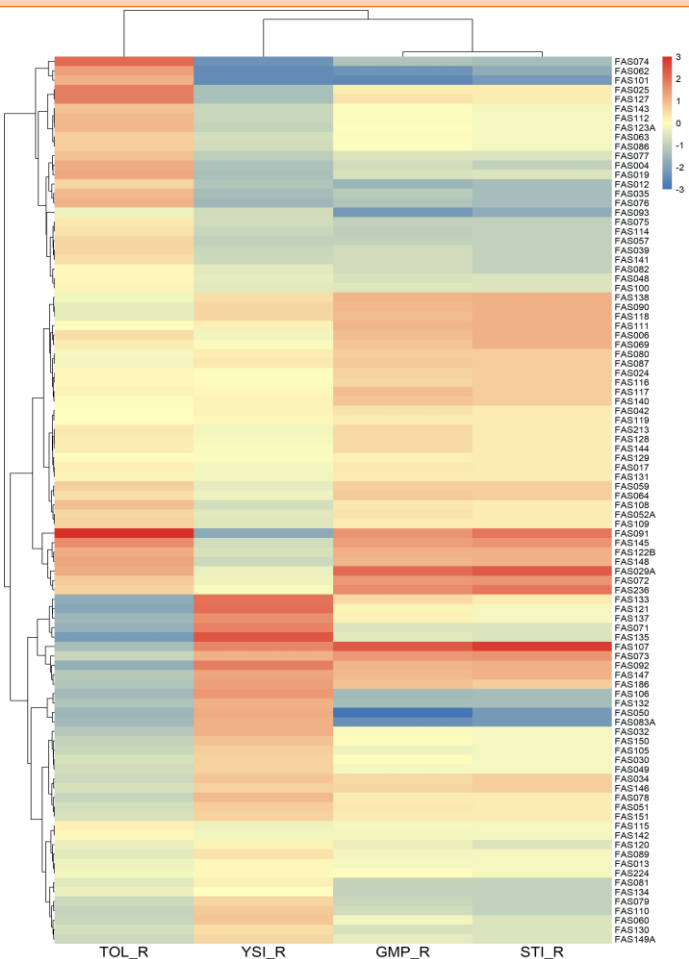
Wpływ stresu niedoboru wody na indeksy stresu (SI) parametrów plonowania w fazie kwitnienia i zawiązywania strąków – analiza po regeneracji dla 94 obiektów fasoli

Cecha	Kwitnienie i zawiązywanie strąków			
	Liczba strąków (PN)	Sucha masa strąków (PY)	Liczba nasion (SN)	Masa nasion (SY)
Średnia ± Sd	101,0 ± 23,6	74,9 ± 14,1	75,2 ± 15,6	71,0 ± 13,9
Min-Max	36,3-173,8	36,5-108,7	33,4-117,9	36,4-104,5
CV (%)	23,4	18,9	20,7	19,6
5 obiektów najbardziej wrażliwych	FAS062, FAS074, FAS076, FAS091, FAS101			
5 obiektów najbardziej tolerancyjnych	FAS092, FAS121, FAS133, FAS135, FAS185			

Większość badanych genotypów wykazała wyraźną regenerację po ustąpieniu stresu, osiągając wysokie wartości SI. Obiekty wrażliwe utrzymały niskie wartości SI, natomiast najbardziej tolerancyjne efektywnie kompensowały plon poprzez ponowne kwitnienie i zawiązywanie strąków.

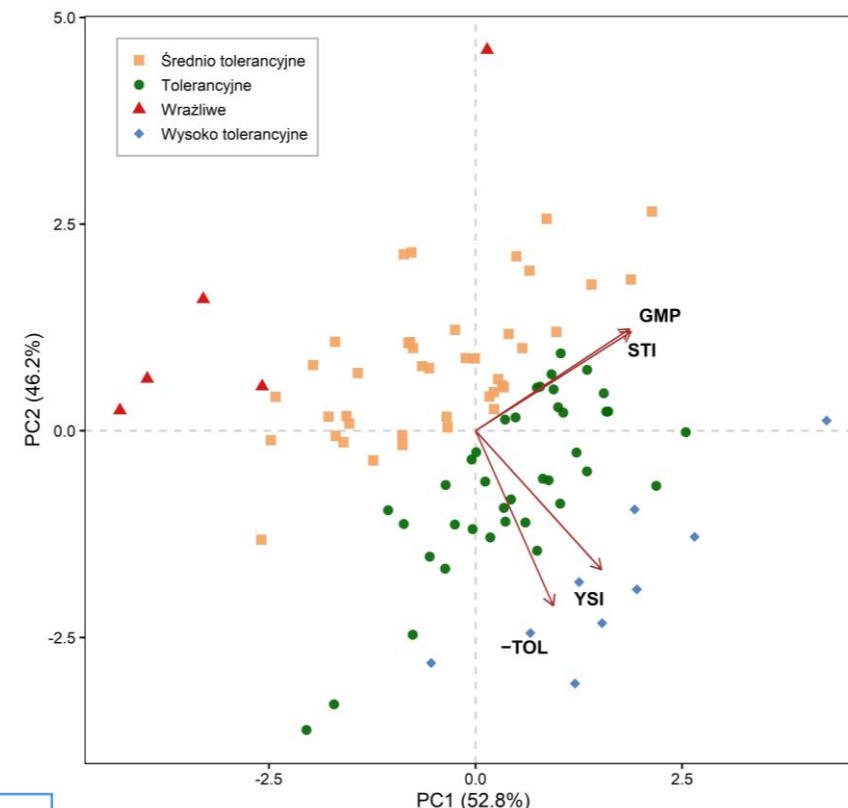


T1: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody – faza kwitnienia cd.



- Wartości indeksów tolerancji (YSI, GMP, STI, TOL) wyraźnie różnicowały badane genotypy fasoli pod względem zdolności regeneracji plonu po ustąpieniu stresu suszy.
- Analiza skupień oraz PCA potwierdziły obecność czterech grup reakcji na stres: wrażliwych, średnio tolerancyjnych, tolerancyjnych oraz wysoko tolerancyjnych, odzwierciedlających zróżnicowaną zdolność kompensacji plonu.

YSI - współczynnik stabilności plonu określający proporcję plonu w stresie względem kontroli.
 GMP - geometryczna średnia plonu w warunkach kontrolnych i stresowych.
 STI - indeks porównujący plon genotypu w stresie i w kontroli względem średniego plonu populacji
 TOL - różnica między plonem w kontroli a plonem w stresie.



PCA indeksów tolerancji dla 94 genotypów fasoli. Wektory ilustrują udział poszczególnych indeksów w różnicowaniu genotypów wzdłuż głównych składowych.

T1: Przygotowanie danych z genotypowania DArTseq do analizy asocjacyjnej

Genotypowanie DArTseq:

Dane z lat 2024–2025 scalono, uzyskując kompletny zestaw dla **188 obiektów**. Macierz obejmuje dwa typy markerów: **SNP i silicoDArT**, zapewniające wysokie zagęszczenie sygnałów w całym genomie.

Filtrowanie markerów

Zastosowano standardowe kryteria jakości ($MAF > 0,05$, heterozygotyczność $< 10\%$, brakujące dane $< 30\%$).

Po filtracji pozostawiono: **10782 SNP** (z 22524), **19065 silicoDArT** (z 30515).

Usunięto markery zduplikowane oraz markery silicoDArT, dla których istniały odpowiedniki wśród markerów SNP.

Finalna baza danych

Zintegrowana macierz obejmuje **26695 markerów**, w tym **21959** o jednoznacznie przypisanej pozycji chromosomowej.

Zestaw ten stanowi podstawę do identyfikacji regionów genomu powiązanych z tolerancją fasoli na stres suszy w fazie kiełkowania oraz fazie kwitnienia.

T2: Generowanie populacji RIL do mapowania genów odporności na ostrą bakteriozę fasoli

❑ W wyniku rozmnożenia wsobnego metodą SSD uzyskano nasiona pokolenia F_5 i F_6 dla 204 linii RIL pochodzących ze skrzyżowania odpornego obiektu FAS097 z podatnym FAS052 na wysoce zjadliwe szczepy XANTPH i XANTFF, co umożliwi realizację dalszych etapów badań.

❑ Na podstawie przeprowadzonego fenotypowania stwierdzono, że linie RIL pokolenia F_6 były zróżnicowane pod względem m.in. wysokości roślin, wzrostu, typu użytkowego, wybarwienia kwiatów oraz cech nasion.



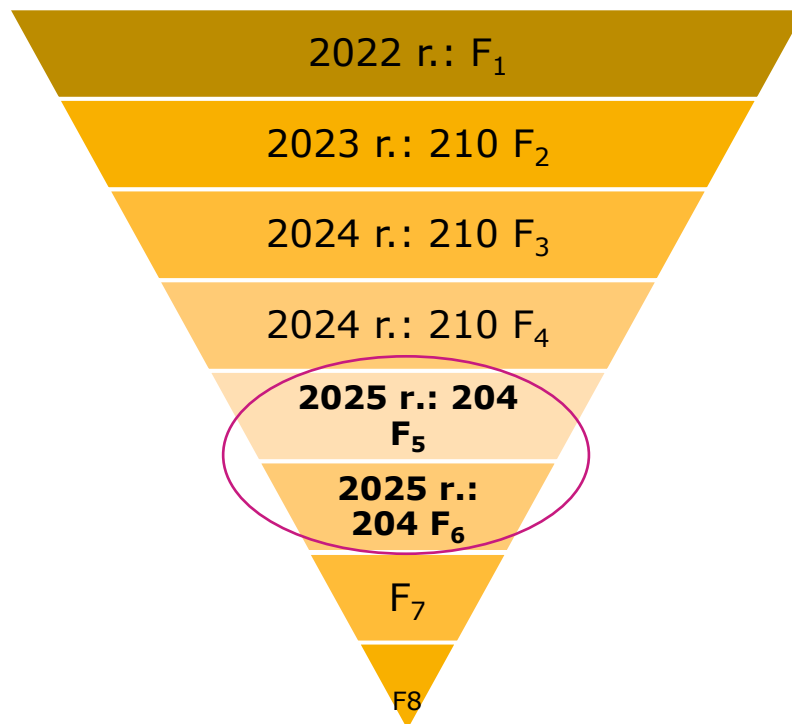
FAS097



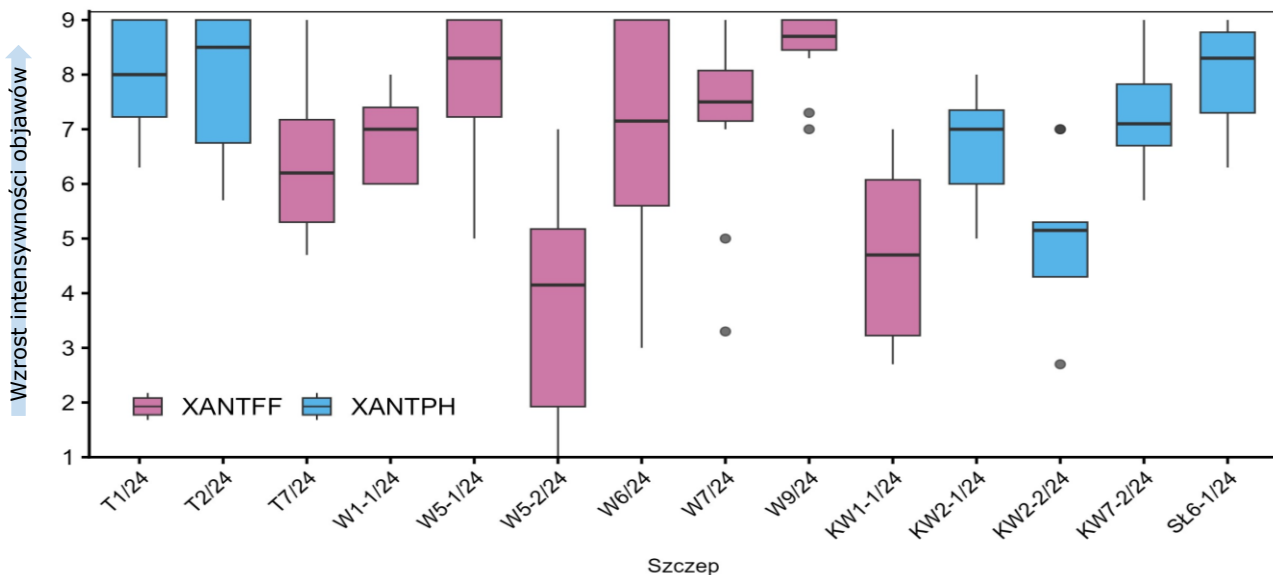
FAS052



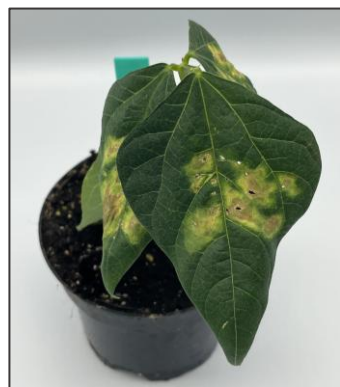
×



T3: Charakterystyka wybranych izolatów *Xanthomonas* z własnej kolekcji (pozyskane w 2024r)



Stopień porażenia odmian kontrolnych przez poszczególne szczepy w 21 dniu po inokulacji, wg skali 1-9, gdzie 1 oznacza brak objawów, a 9 – najwyższą intensywność porażenia.



- Niezależnie od gatunku *Xanthomonas*, wszystkie badane szczepy (6 XANTPH oraz 8 XANTFF) były patogeniczne względem fasoli, ale cechowały się zróżnicowaną agresywnością.
- Wyniki te potwierdzają stałe i realne zagrożenie bakteryjną plamistością fasoli w warunkach Polski.
- Zróżnicowana agresywność szczepów XANTPH i XANTFF podkreśla konieczność bieżącego monitorowania populacji oraz opracowywania skutecznych metod ochrony upraw.
- Szczepy XANTPH i XANTFF o różnym poziomie agresywności stanowią cenny materiał referencyjny do identyfikacji genów warunkujących odporność fasoli i mogą być wykorzystywane w programach hodowlanych.