

Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej

Zadanie nr 39

Okres realizacji: 01.01.2024 - 31.12.2024



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. 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 2024 roku

T1

→ Wytypowanie panelu obiektów fasoli o zróżnicowanej tolerancji na stres niedoboru wody w fazie kiełkowania oraz kwitnienia na potrzeby mapowania asocjacyjnego.

T2

→ Ocena fenotypowa wybranych obiektów fasoli pod względem reakcji na inokulację izolatami *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (XANTPH) i *X. citri* pv. *fuscans* (XANTFF), będących sprawcami ostrej bakteriozy fasoli w Polsce (kontynuacja badań).

→ Kontynuowanie prac nad wyprowadzaniem biparentalnej populacji mapującej, złożonej z rekombinacyjnych linii wsobnych na potrzeby analizy genetycznej i mapowania molekularnego odporności fasoli na ostrą bakteriozę.

T3

→ Monitoring występowania obwódkowej i ostrej bakteriozy fasoli w różnych rejonach geograficznych Polski z ukierunkowaniem na tworzenie kolekcji izolatów bakterii patogenicznych z rodzaju *Xanthomonas* i *Pseudomonas*.

→ Charakterystyka izolatów *Xanthomonas* spp. i *Pseudomonas* spp. (kontynuacja badań).

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane w 100%

Materiały i Metody

T1 Ocena reakcji fasoli na stres niedoboru wody w fazie:

Kiełkowania

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



Kwitnienia

- ✓ 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



T2 Analiza interakcji fasola-*Xanthomonas* z uwzględnieniem gatunków *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (XANTPH) i *X. citri* pv. *fuscans* (XANTFF)

Ocena stopnia podatności fasoli na ostrą bakteriozę

- ✓ 90 obiektów fasoli (II tura)
- ✓ 2 izolaty: bFAS9-1 (XANTPH), bFAS36 (XANTFF)
- ✓ inokulacja – wieloigłowe nakłuwanie liści
- ✓ ocena po 14 i 21 dpi wg 9-stopniowej skali: od 1 (brak objawów) do 9 (najwyższa int. porażenia)



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

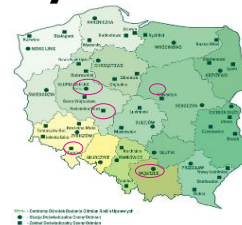
- ✓ rozmnożenie wsojne pokolenia F₂
- ✓ 2 cykle reprodukcyjne (uzyskanie pokolenia F₃ i F₄)
- ✓ metoda SSD



T3 Kolekcjonowanie bakterii z rodzaju *Xanthomonas* i *Pseudomonas*

Monitoring występowania obwódkowej i ostrej bakteriozy fasoli

- ✓ ilustracje upraw fasoli w 5 lokalizacjach Polski
- ✓ identyfikacja bakterii i określenie ich pozycji taksonomicznej – metody klasyczne i molekularne, spełniające kryteria klasyfikacji obu gatunków.



Charakterystyka izolatów *Xanthomonas* z kolekcji 2021-2023:

- ✓ ocena patogeniczności – 19 izolatów
- ✓ analiza różnicowania genetycznego izolatów na podstawie sekwencji repetytywnych *BOX* i *ERIC*

T1: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody

Wpływ stresu niedoboru wody na wartość indeksu stresu (procentowa zmiana wartości wybranych parametrów w stresie względem kombinacji kontrolnej) na podstawie danych z oceny dla 94 obiektów fasoli

Cecha	Kwitnienie i zawiązywanie strąków			
	Liczba strąków (PN)	Sucha masa strąków (PY)	Liczba nasion (SN)	Masa nasion (SY)
Średnia ± Sd	65,0 ± 14,6	41,6 ± 9,9	47,9 ± 9,9	41,3 ± 9,7
Min-Max	42,4 - 110,5	21,7 - 73,6	23,1 - 76,8	13,8 - 72,1
CV (%)	22,4	23,9	20,6	23,4
5 obiektów najbardziej wrażliwych	FAS019, FAS100, FAS108, FAS114, FAS143			
5 obiektów najbardziej tolerancyjnych	FAS017, FAS049, FAS057, FAS086, FAS052A			

Badane obiekty fasoli różniły się reakcją na stres suszy w fazie kwitnienia, co potwierdzają szerokie zakresy wartości (Min, Max) dla ocenianych parametrów w warunkach stresu. Obiekty te stanowią cenny materiał wyjściowy do przeprowadzenia szerokiego zakresu badań (molekularne, fizjologiczne, genetyczne), mających na celu zrozumienie mechanizmów odporności na stres suszy.



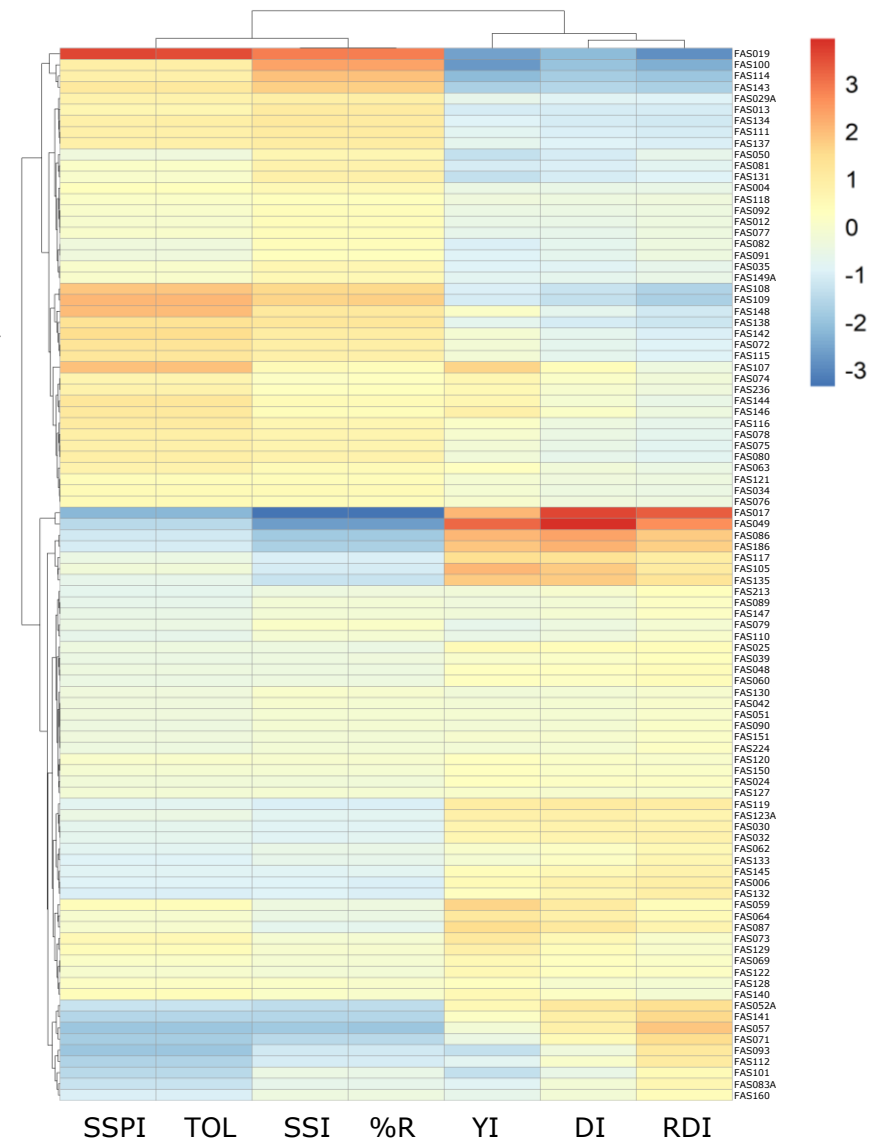
T1: Ocena fasoli pod względem reakcji na stres niedoboru wody

Mapa ciepła oraz analiza skupień różnicująca badane obiekty fasoli pod względem wrażliwości na suszę glebową w fazie kwitnienia, określoną na podstawie **masy nasion/na roślinę (SY)** z wykorzystaniem następujących indeksów: **SSPI** (Stress Susceptibility Percentage Index), **TOL** (Tolerance), **SSI** (Stress Susceptibility Index), **%R** (%Reduction), **YI** (Yield Index), **DI** (Drought Resistance Index) oraz **RDI** (Relative drought index).

Każda kolumna reprezentuje inny parametr, a każdy wiersz inny obiekt fasoli. Wartości wskaźników w całej macierzy poddano skalowaniu. Intensywność koloru świadczy o różnicach w wartości w obrębie danego parametru pomiędzy obiektami.

Obiekty o podwyższonej tolerancji na suszę:
SSPI, TOL, SSI, %R < 1
YI, DI, RDI > 1

Na mapie ciepłej wyróżniają się cztery obiekty (FAS017, FAS049, FAS086, FAS186) o stosunkowo niskich wartościach SSPI, TOL, SSI i %R a wysokich YI, DI, RDI, co wskazuje na ich wyższą tolerancję na stres suszy w fazie kwitnienia, w porównaniu do pozostałych obiektów.

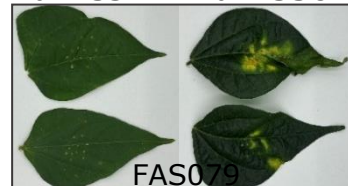


T2: Ocena reakcji roślin fasoli na porażenie przez *X. citri* pv. *fuscans* (bFAS36) oraz *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (bFAS9-1) w warunkach kontrolowanych

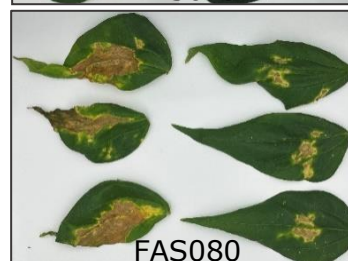
Podstawowe statystyki opisowe dla oceny stopnia porażenia 90 obiektów fasoli

Izolat (takson)	Min	Mediana	Max	Średnia	SD	Dominanta	CV (%)
bFAS36 (XANTFF)	2,6	8,2	9,0	7,8	1,3	9,0	17,3
bFAS9-1 (XANTPH)	1,1	8,4	9,0	7,6	1,8	9,0	24,2

bFAS9-1 bFAS36



FAS079



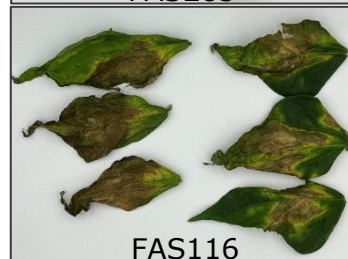
FAS080



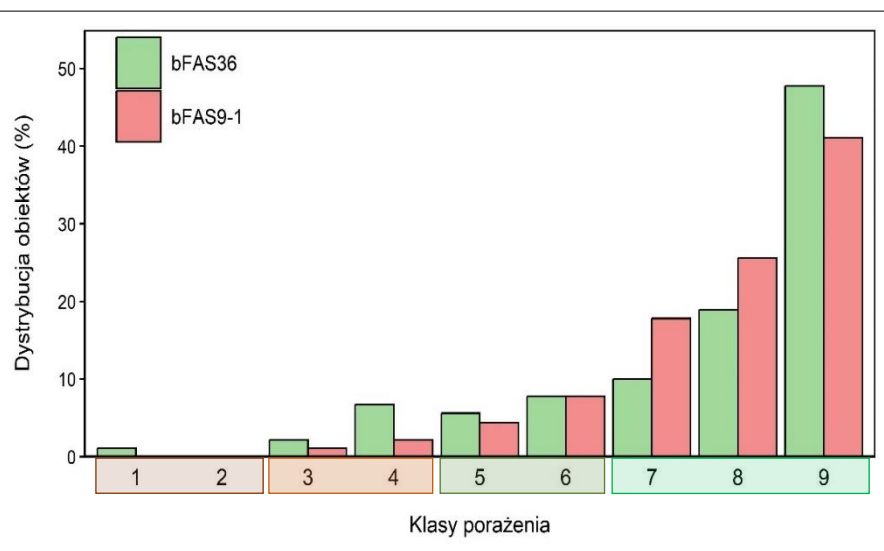
FAS137



FAS285



FAS116



Dystrybucja obiektów w poszczególnych klasach porażenia 21 dni po inokulacji roślin

Ocenę porażenia dokonywano wg skali od 1 (brak objawów chorobowych) do 9 (najwyższa intensywność porażenia).

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 obiekty fasoli charakteryzowały się zmiennością pod względem reakcji na porażenie izolatami należącymi do dwóch gatunków *Xanthomonas* spp. tj.: bFAS 9-1 (XANTPH) oraz bFAS 36 (XANTFF), z wyraźnie zaznaczoną dominacją obiektów podatnych.
- ❑ Wykazano istotny wpływ obiektu, izolatu (taksonu) oraz interakcji "obiekt × izolat" na stopień porażenia badanych obiektów fasoli.
- ❑ Współczynnik korelacji pomiędzy średnim stopniem poszczególnych obiektów przez bFAS36 i bFAS9-1 był istotny i wynosił $r = 0,655$.
- ❑ Przeprowadzone testy (łącznie 180 obiektów w latach 2023-2024) wskazują na złożoną problematykę odporności fasoli na bakteryjne choroby (np. dominację odmian podatnych), identyfikując obszary wymagające dalszych badań, zwłaszcza w kontekście rozwijania skutecznych strategii hodowli odpornościowej tego gatunku w Polsce.

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

❑ W wyniku rozmnożenia wsobnego metodą SSD uzyskano nasiona pokolenia F_3 i F_4 dla 210 linii RIL pochodzących ze skrzyżowania odpornego na wysoce zjadliwe izolaty XANTPH i XANTFF obiektu FAS097 z podatnym FAS052, co umożliwi realizację dalszych etapów badań.

❑ Na podstawie przeprowadzonego fenotypowania stwierdzono, że linie RIL pokolenia F_4 były zróżnicowane pod względem m.in. wysokości roślin, wzrostu, typu użytkowego, wybarwienia kwiatów oraz cech nasion.



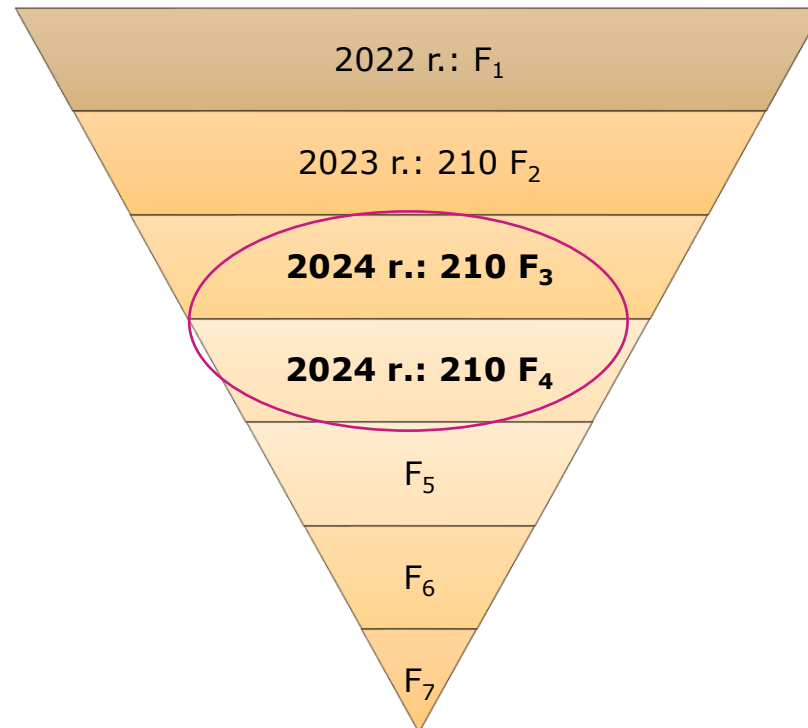
FAS097



FAS052

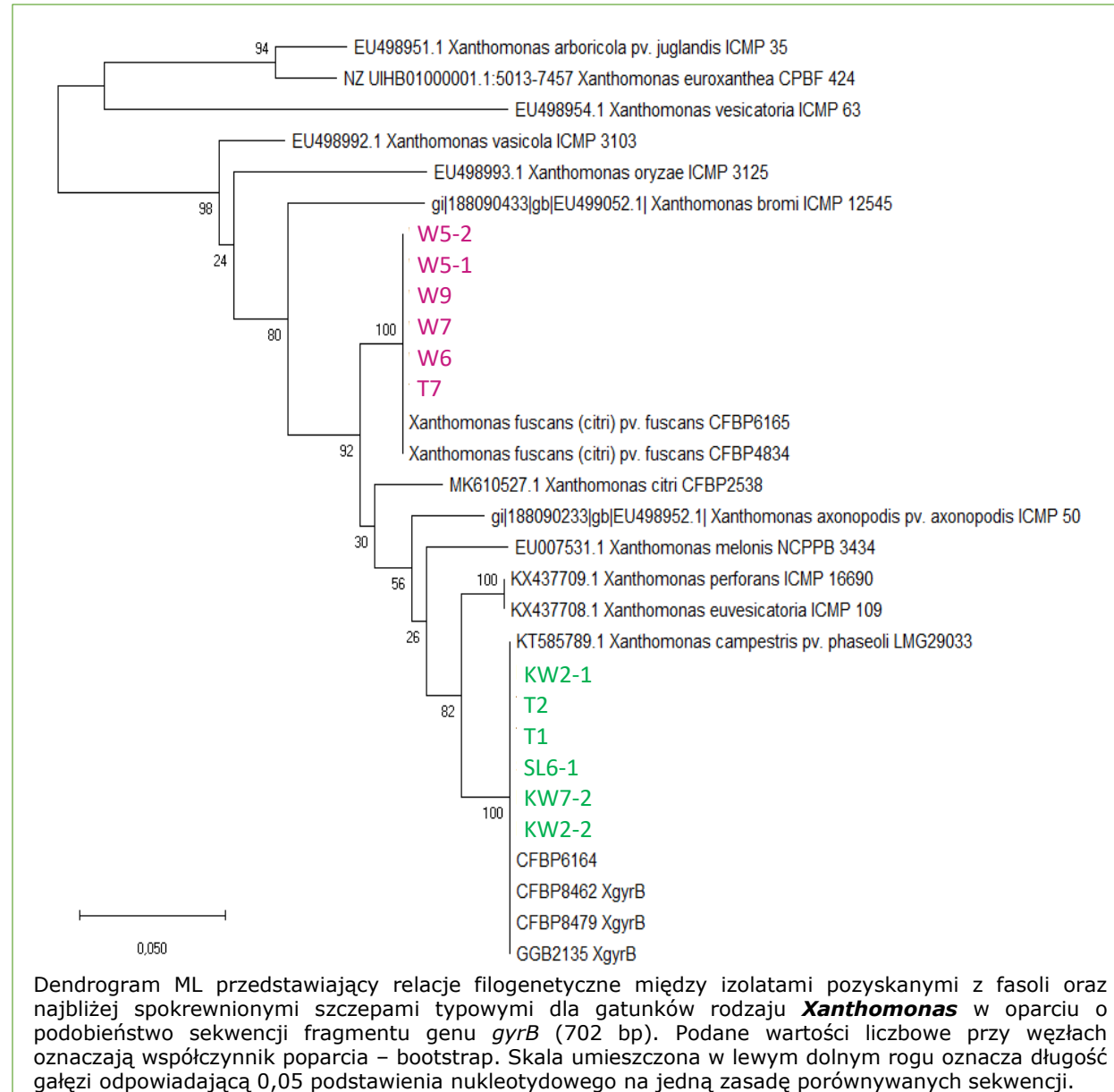


×



T3: Kolekcjonowanie bakterii z rodzaju *Xanthomonas* i *Pseudomonas*

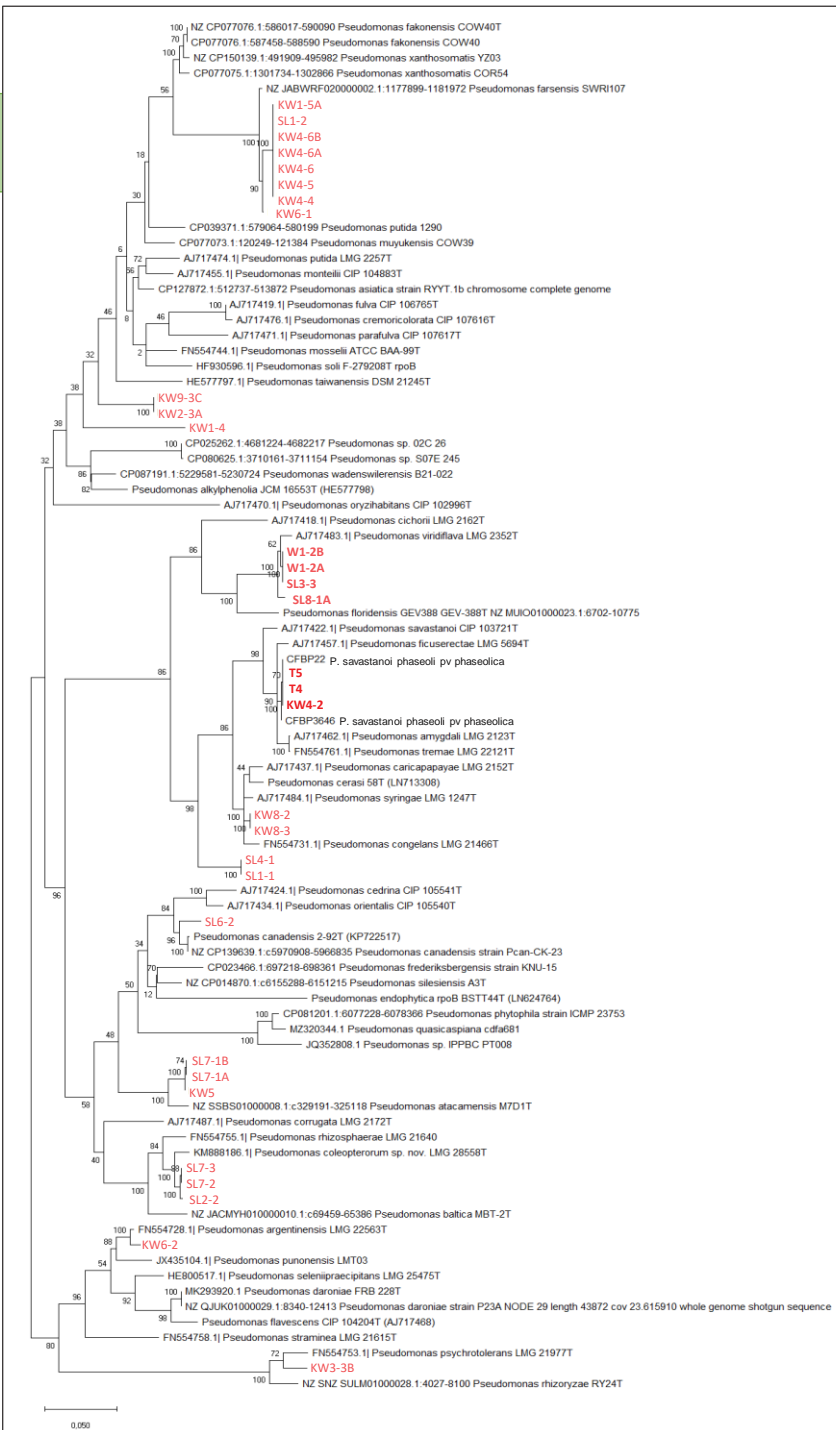
- Monitoring prowadzono w pięciu lokalizacjach: IO-PiB w **Skierniewicach (SK)** (łódzkie), oraz stacjach COBORU: **Słupi Wielkiej (SL)** i **Kościelnej Wsi (KW)** (Wielkopolskie), **Węgrzcach (W)** (Małopolskie) oraz **Tarnowie (T)** (Dolnośląskie).
- Analiza porównawcza sekwencji genu *gyrB* dla izolatów wstępnie zaklasyfikowanych do rodzaju *Xanthomonas* wykazała ich bardzo wysokie podobieństwo do ***X. citri* pv. *fuscans*** (XANTFF, *X. fuscans* subsp. *fuscans*) oraz ***X. phaseoli* pv. *phaseoli*** (XANTPH, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*).
- Zidentyfikowano **6 izolatów XANTFF** (5 izolatów - Węgrzce (W), 1 izolat - Tarnów (T)) oraz **6 izolatów XANTPH** (3 izolaty - Kościelna Wieś (KW), 1 izolat - Słupia Wielka (SL), 2 izolaty - Tarnów (T)).
- Identyfikacja izolatów wyodrębnionych z roślin fasoli jako *X. citri* pv. *fuscans* oraz *X. phaseoli* pv. *phaseoli* w kolejnym roku badań (oraz corocznie w ciągu czterech lat) potwierdza, że oba gatunki są sprawcami ostrej bakteriozy fasoli w Polsce.



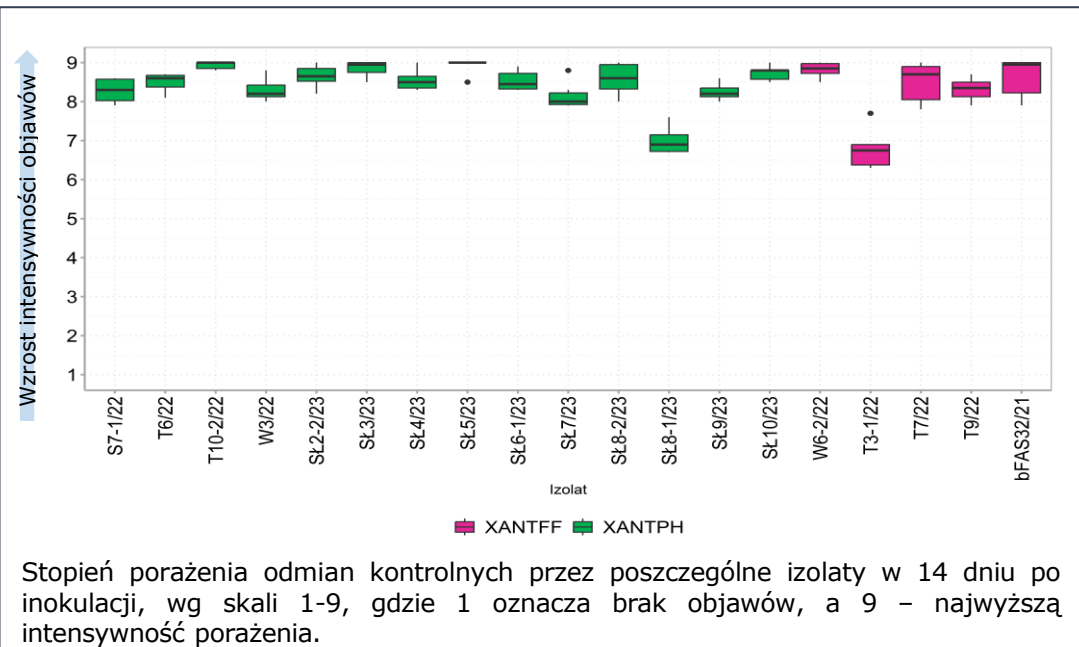
T3: Kolekcjonowanie bakterii z rodzaju *Xanthomonas* i *Pseudomonas*

- Spośród 80 izolatów bakterii uzyskanych z symptomatycznych roślin fasoli w roku bieżącym, ok. 39% izolatów zostało zaklasyfikowanych do rodzaju *Pseudomonas*.
- Analiza porównawcza sekwencji genu *rpoB* wykazała, że izolaty te reprezentowane były przez co najmniej dziewięć gatunków *Pseudomonas*, w większości takich, z których większość nie była dotąd raportowana jako patogeny roślin.
- Po raz pierwszy w ciągu czteroletnich badań zidentyfikowano izolaty wykazujące podobieństwo do ***P. savastanoi* pv. *phaseolicola***, sprawcy bakteriozy obwódkowej. Łącznie wyodrębniono trzy izolaty: dwa w Tarnowie (T) i jeden w Kościelnej Wsi (KW).
- Podobnie jak w latach 2021 i 2023, stwierdzono obecność izolatów ***P. viridiflava*** (cztery izolaty: dwa w Węgrzcach oraz dwa w Słupi Wielkiej). Biorąc pod uwagę wysoką patogeniczność potwierdzoną dla izolatów *P. viridiflava* pozyskanych w 2021 roku, można się spodziewać, iż gatunek ten stanowi potencjalne zagrożenie dla upraw fasoli w Polsce.

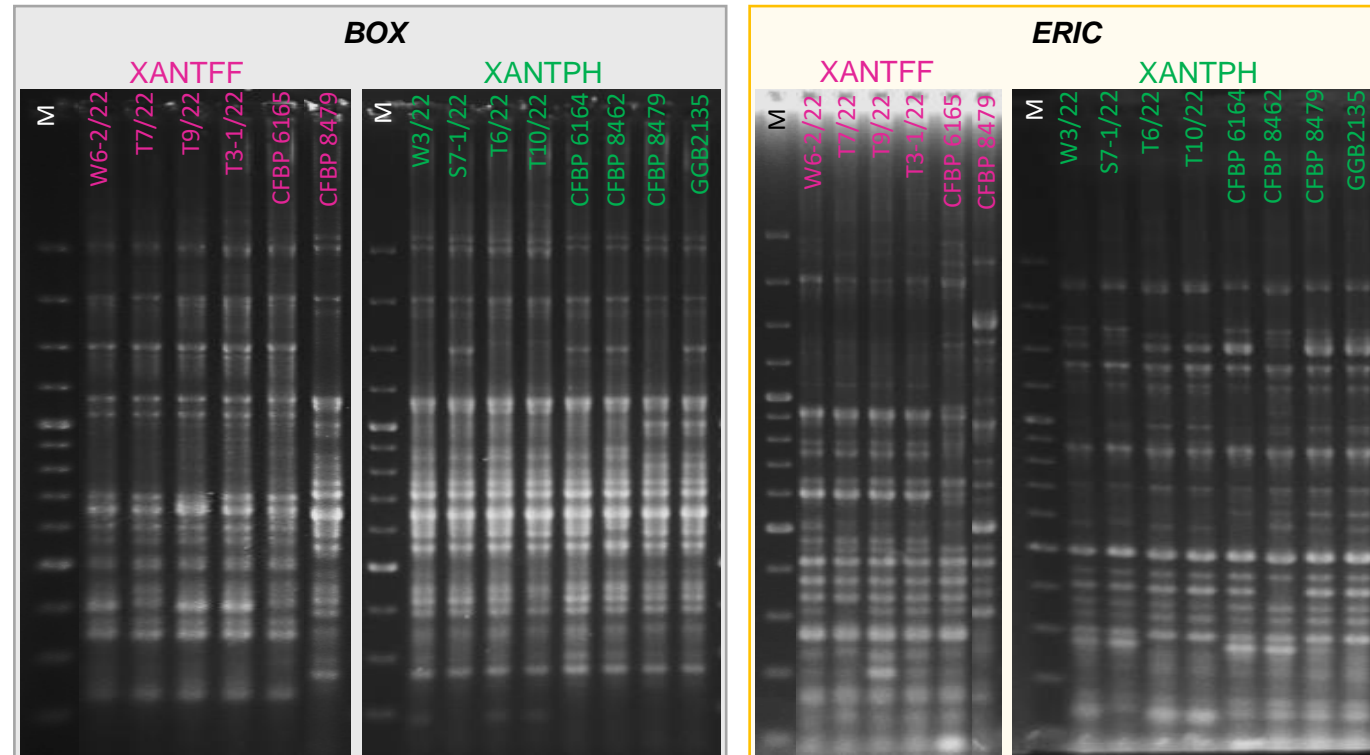
Dendrogram ML przedstawiający relacje filogenetyczne między izolatami pozyskanymi z fasoli oraz najbardziej spokrewnionymi szczepami typowymi dla gatunków rodzaju *Pseudomonas* w oparciu o podobieństwo sekwencji nukleotydów fragmentu genu *rpoB* długości 935 pz. Podane wartości liczbowe przy węzłach oznaczają współczynnik poparcia – bootstrap. Skala umieszczona w lewym dolnym rogu oznacza długość gałęzi odpowiadającą 0.05 podstawienia nukleotydowego na jedną zasadę porównywanych sekwencji. Kolorem **czzerwonym** oznaczono izolaty pozyskane w ramach realizacji niniejszego zadania.



T3: Charakterystyka wybranych izolatów *Xanthomonas* z własnej kolekcji (2021-2023)



- Amplifikacja DNA techniką tzw. odcisku palca (fingerprinting) ze starterami komplementarnymi do sekwencji powtarzalnych (tzw. Rep-PCR): *BOX* oraz *ERIC* wykazała, że izolaty obu taksonów cechują się umiarkowanym zróżnicowaniem genetycznym.



- Wszystkie badane izolaty, w tym **15 izolatów XANTPH** (4 pochodzące z 2022 r., 11 z 2023 r.) oraz **5 izolatów XANTFF** (1 z 2021 r., 4 z 2022 r.) wobec fasoli i wykazywały stosunkowo wysoką, choć zróżnicowaną agresywność.

Wyniki te wskazują na znaczące zagrożenie, jakie oba taksony mogą stanowić dla upraw fasoli w Polsce.

