

Komunikat

Gatunek rośliny, której dotyczy sprawozdanie: groch

Autor/autorzy: Wojciech Świącicki*, Magdalena Gawłowska, Andrzej Górny, Katarzyna Beczek, Alicja Niewiadomska, Lech Boros, Anna Wawer

Afiliacja: Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

Adres korespondencyjny i adres e-mail Kierownika Tematu:

Instytut Genetyki Roślin PAN
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
tel: (+48 61) 65 50 263,
fax: (+48 61) 65 50 301
e-mail: wswi@igr.poznan.pl

Informacja o dotacji: Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w roku 2020 , zadanie nr 40,

Tytuł zadania w języku polskim: Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne.

Tytuł zadania w języku angielskim: Identification of pea genome regions in the determining of the selected parameters of the physiological effectiveness as an important factor of the resistance to abiotic stresses.

Słowa kluczowe: efektywność wykorzystania azotu, groch, mapowanie QTL, selekcja z wykorzystaniem markerów, sprawność aparatu fotosyntetycznego, wyleganie, zawartość lignin.

Cele prowadzonych badań:

1. Ocena parametrów efektywności wykorzystania azotu i fosforu w wybranych liniach grochu w warunkach optymalnych i niedoboru azotu w warunkach kontrolowanych i polowych. Określenie korelacji plonu w wybranych liniach z pozostałymi cechami. Ocena reakcji na stresy abiotyczne w wybranych liniach. Ustalenie loci konserwatywnych w latach, warunkujących badane cechy ilościowe oraz wskazanie w liniach markerów sprzężonych – cel zrealizowany.
2. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w liniach grochu w warunkach optymalnych i niedoboru azotu w warunkach kontrolowanych. Określenie korelacji z pozostałymi cechami - cel zrealizowany.

3. Określenie korelacji wylegania w wybranych liniach grochu z zawartością lignin w łodydze - cel zrealizowany.
4. Wyznaczenie QTL efektywności wykorzystania azotu, fosforu, sprawności fotosyntetycznej, wylegania, zawartości lignin. Wytypowanie markerów bliskosprzężonych z badanymi cechami użytkowymi i przetestowanie w wybranych, innych niż potomstwo populacji mapującej, liniach grochu. - cel zrealizowany.

Materiały i metody:

Wybrane linie grochu: 1. Wt10269 (trad), 2. Astronaute (*afila*), 3. Wt2033 (trad), 4. Starski (*afila*), 5. Wt3805 (trad), 6. Wt11145 (trad), 7. Wt9013 (trad), 8. Wt404 (trad), 9. Wt10270 (*afila*), 10. Wt2815 (trad), 11. Wt12368 (trad), 12. Wt15237 (trad), 13. Tarchalska (*afila*), 14. Mecenas (*afila*), 15. Carneval (*afila*), 16. MP1401 (*afila*), 17. Wt11238 (*accacia*), 18. Wt10245 (trad),

Szklarnia fitotronowa, warunki optymalne i stresowe, 2 powtórzenia, **3 lokalizacje polowe** (Wiatrowo, 2 lokalizacje (optymalna i niedobór); Przebędowo, 1 lokalizacja (stresowa); w każdej lokalizacji 2 powtórzenia).

1. Czynnikiowe doświadczenie wazonowe (azot, fosfor, woda, fotosynteza); czynniki: zmienny poziom nawożenia azotowego; **szklarnia fitotronowa**; wazony 8dm³; podłoże glebowe o **optymalnej** zawartości składników pokarmowych (**95** mg azotu dm⁻³ gleby) i stałej, optymalnej wilgotności (75-80% ppw) utrzymywanej wagowo przez cały okres wegetacji oraz **stresowej** - optymalna wilgotność i obniżona zawartość azotu (**39** mg N dm⁻³ gleby),

Doświadczenia polowe w zróżnicowanych warunkach klimatyczno – glebowych (analiza stanowisk na zawartość mikro i makroelementów, np. Wiatrowo optymalne, Wiatrowo słabe: fosforu, potasu, wapnia, magnezu, siarki, manganu (mniej niż w Wiatrowie optymalnym), Przebędowo: na nadmiar żelaza, niedobór azotu, fosforu, potasu, magnezu, siarki, manganu.

2. pomiary i obserwacje:

1. Azot - zawartość azotu w materiale roślinnym (nasiona + słoma) mierzona przy pomocy analizatora elementarnego VarioMax (Elementar GmbH, Hanau, D),- metoda Dumas'a,
2. Fosfor - zawartość fosforu w materiale roślinnym (nasiona + słoma) mierzona przy pomocy metoda spektrometrycznej PN-ISO 6491:2000 Laboratorium Analityczne Lublin,
3. **NA** - Aktywność nitrogenazy określona metodą acetylenową na chromatografie gazowym CHROM5., na podstawie ilości acetyleny zredukowanego do etylenu i wyrażonego w nMC₂H₂ (Niewiadomska, 2013).
4. zbiór i omłoty; waga (sucha masa) części wegetatywnych i nasion (ZIA, VEG), indeks plonu (HI %),

*komponenty efektywności wykorzystania **wody**:

- WUse, ilość wytranspirowanej wody/roślinę w ciągu całego sezonu wegetacyjnego (dm^3 lub mole),
- WUEveg, WUEgen, WUEb współczynnik efektywności wykorzystania wody (współczynnik efektywności transpiracji) w formowaniu masy wegetatywnej, masy nasion i biomasy

* komponenty efektywności wykorzystania **azotu N**:

- %N veg i %N ziarna,
- NAC - ilość pobranego azotu/ wazon
 - GwNg, ilość wyprod. suchej masy nasion na jednostkę N zakumulowanego w nasionach,
 - NHI, azotowy indeks plonu; % całkowitej ilości azotu N translokowanego do nasion,
 - NERveg, NERgen, fizjologiczny współczynnik efektywności wykorzystania azotu w formowaniu masy wegetatywnej(veg), nasion (gen)

* komponenty efektywności wykorzystania **fosforu**:

- % zawartość fosforu P w słomie i % zawartość P w nasionach,
- PHI, fosforowy indeks plonu; % całkowitej ilości P translokowanego do nasion,
- PERveg, PERgen, fizjologiczny współczynnik efektywności wykorzystania fosforu w formowaniu masy wegetatywne (veg) i nasion (gen),

Wyznaczono indeks tolerancji (T) dla wybranych linii $T = (\text{plon st}/\text{plon opt}) / \text{śred plon str} / \text{śred plon opt}$ (Górny et al., 2011).

G.C.V. – genotypowy współczynnik zmienności = $[(\sqrt{\sigma_g^2})/\text{średnia og.}]$; w %

h^2_{BS} – odziedziczalność cechy w szerokim sensie. = σ_g^2/σ_{ph}^2 .

Pomiary fotosyntezy zostały wykonane w fazie wegetatywnej wzrostu, przy pomocy: przenośnego systemu pomiarowego LI-COR 6400XT (firmy LiCor Ltd., USA).

P_n – intensywność fotosyntezy (netto), $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (także jako A),

T_r – intensywność transpiracji, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (także jako E); zwykle silnie (pozytywnie) skorelowana z przewodnictwem szparkowym (g_s) i/lub (negatywnie) z opornością szparek na dyfuzję ($1/g_s$); uzależniona także od systemu korzeniowego, transportu wody z korzenia do pędu (np tzw. *hydraulic conductance*); kutikuli, itd.,

Cond – przewodnictwo szparkowe; miara dyfuzji CO_2 ; $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; zwykle oznaczana symbolem g_s ; stosowana jednostka: zwykle $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$,

C_i – międzykomórkowe (sub-stomatal) stężenie CO_2 , ppm lub $\mu\text{moli CO}_2/\text{mol}$ powietrza; przydatny do oceny zmienności w ruchu dyfuzyjnym (przewodnictwo szparkowe),

P_n/T_r (A/E) – liściowy miernik efektywności transpiracji; opisywany także jako „*instantaneous*”

miernik efektywności wykorzystania wody (WUE) na poziomie liści; $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$ lub $\text{mmol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$,

P_n/C_i (A/C_i) – miernik sprawności procesu karboksylacji RuBP (1,5-bisfosforybulozy) w fotosyntetycznym cyklu Calvina-Bensona; uczestniczy enzym RuBisCo; nmol ppm^{-1} .

Ocenę wylegania prowadzono według metodyki COBORU w trzech terminach tj. początek kwitnienia, koniec kwitnienia i przed zbiorem. Ligniny oznaczono metodą Klasona (Theander et al., 1995).

4. Do lokalizacji QTL został wykorzystany QTL Cartographer 2.0 (Wang et al., 2012) [opcja composite interval mapping (CIM)], niezależnie dla każdej cechy.

Opis wyników:

1. Warunki kontrolowane, wybrane linie grochu, inne niż populacja mapująca: stwierdzono korelację pomiędzy plonem z rośliny, a ilością pobranego azotu/ wazon (NAC) ($r=0.88$) oraz ilością związanego azotu na g biomasy (0,73). W warunkach stresu zależność pomiędzy plonem i NAC rosła, natomiast pomiędzy plonem, a NHI, NER_g , NER_v , Nfix/biom malały.
2. Stwierdzono silną korelację pomiędzy plonem z rośliny, a ilością wytranspirowanej wody (0,74) i efektywnością wykorzystania wody w warunkach optymalnych ($r=0,88$). W warunkach stresu zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami fotosyntezy malały (plon i WUE_g $r=0,63$).
3. Warunki kontrolowane: najsilniejsze korelacje między plonem, a poszczególnymi parametrami sprawności aparatu fotosyntetycznego wystąpiły pomiędzy plonem ZIA, a powierzchnią liścia LA (0,43) i negatywną pomiędzy plonem i intensywnością transpiracji Tr (-0,48). Były silniejsze w warunkach optymalnych niż przy niedoboru azotu.
4. W warunkach niedoboru azotu (pole) rosła korelacja plonu z parametrami gospodarki azotowej, z wyj. efektywności wykorzystania azotu w formowaniu nasion NER_g ($r=0.97$, $r=0.90$, $r=0.93$).
5. Stwierdzono istotne korelacje (warunki polowe optymalne) pomiędzy plonem z rośliny, a % całkowitej ilości fosforu translokowanego do nasion (PHI, $r=0.83$) i efektywnością wykorzystania fosforu w formowaniu masy nasion ($r=0.84$).
6. Przeanalizowano zależność pomiędzy wyleganiem, a zawartością lignin w łodydze. Analiza pomiędzy %-ową zawartością lignin w łodydze, a wyleganiem i wysokością roślin nie wykazała korelacji.
7. Przetestowano markery sprzężone z gospodarką azotową, wyznaczone w poprzednim roku, w liniach tegorocznych i skorelowano z wynikami z warunków szklarniowych. Wskazano marker PsGAPA jako sprzężony z % ilością związanego azotu w warunkach stresowych.

8. Przeanalizowano cechy sprawności aparatu fotosyntetycznego i gospodarki wodnej z warunków szklarniowych (optymalnych i niedoboru azotu). Zidentyfikowano 28 loci. Wyznaczono trzy markery bliskosprężone (PsGAPA, A004 i AC74). Największą zgodność zaobserwowano dla układu: warunki optymalne, międzykomórkowe stężenie CO₂ (Ci) i efektywność transpiracji (A/Tr), marker PsGAPA oraz intensywność transpiracji, warunki optymalne, marker AC74.
9. Przeanalizowano cechy związane z gospodarką fosforową w popul. [Wt10245×Wt11238] z warunków polowych, optymalnych, 2017. Zidentyfikowano 21 loci. Największą zgodność zaobserwowano dla układu: warunki optymalne, polowe, efektywność wykorzystania fosforu w formowaniu masy vegetatywnej, marker AD21, warunki stresowe, polowe, fosforowy indeks plonu i efektywność wykorzystania fosforu w formowanie masy nasion, marker AA473.
10. Wykonano również analizę QTL dla populacji [Carneval×MP1401] doświadczenia prowadzonego w warunkach kontrolowanych, w warunkach optymalnych 2015. Największą zgodność zaobserwowano dla układu: warunki kontrolowane, efektywność wykorzystania fosforu w formowaniu masy nasion i vegetatywnej, markery MTIC16 i Leg404.

Wnioski z prowadzonych badań:

1. Coroczne monitorowanie stanu gleby w trzech lokalizacjach wykazało niedobór azotu i siarki zarówno na stanowiskach Wiatrowie, jak i w Przebądowie.
2. Warunki kontrolowane, w których jedynym czynnikiem stresowym był brak azotu, zmniejszyły wpływ badanych parametrów fizjologicznych na wysokość plonu.
3. Warunki polowe, w których czynnikiem stresowym był nie tylko brak azotu, ale również nadmiar lub niedobór pozostałych mikro i makroelementów, zaostrzały znaczenie badanych parametrów fizjologicznych.
4. Przeanalizowano 6 cech związane z gospodarką azotową i fosforową. Przeanalizowano zgodność układu alleli wybranych markerów oraz wartości cech, związanych z gospodarką azotową, fosforową, sprawnością fotosyntetyczną, wyleganiem, zawartością lignin, dane zebrano z warunków polowych i szklarniowych oraz warunków optymalnych i stresowych. Największą zgodność uzyskano pomiędzy 6 markerami i 6 cechami.
5. Odniesienie sekwencji markera PsGAPA (mapa Carneval×MP1401) do sekwencji fizycznej genomu grochu wykazało bliższą jego lokalizację względem markera AB83 (obie mapy) i PsCam962 (mapa Wt10245×Wt11238) niż do markera Pis_Gen_9_3 (mapa Wt10245×Wt11238).

PSGAPA Chr3LG5 187 855 780 - 187 855 876 pz
AB83 Chr3LG5 200 728 460 - 200 728 691 pz
PSGAPA-AB83, 13 Mpz
PsCam962 Chr3LG5 201 344 852 - 201 344 907 pz
PSGAPA- PsCam962, 13,5 Mpz
PisGEN9_3 Chr3LG5 261 832 144 - 261 832 600 pz
PSGAPA- PisGEN9_3, 74 Mpz

Osiągnięcia projektu:

1. Wykazano możliwość zwiększenia plonu u grochu poprzez selekcję linii o zwiększonym parametrze NAC i NHI (szklarnia, warunki optymalne NAC Wt15237 2.5 g/wazon, Astronaute 1.7, NHI Astronaute 90% , Mecenaz 89%, NERgen Carneval 27g/g, Astronaute 22.5g/g, warunki polowe optymalne NAC Astronaute 9,6g, Starski 9,3, NHI Astronaute 57,9%, NERgen Wt3805 15 g/g).
2. Przeanalizowano wyżej wymienione zależności w warunkach stresowych, zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i polowych (szklarnia, warunki stresowe NAC Wt15237 3,2 g/wazon, Astronaute 2g/ wazon, NHI; Starski 89% NHI, Astronaute 87%, NERgen Starski 25g/g, Astronaute 21 g/g, warunki polowe, stresowe NAC Starski 6,3, NHI Mecenaz 69%, NERgen 3805 15 g/g. Nie potwierdzono korelacji plonu z aktywnością bakterii korzeniowych. Potwierdzono korelację plonu z parametrem Nfix (wiązania azotu).
3. Wskazano markery sprzężone z wyżej wymienionymi cechami: zawartość azotu w nasionach %Nzia, marker SSR AD21; %Nfix, marker SSR PsGAPA; międzykomórkowe stężenie CO₂ C_i i efektywność transpiracji A/Tr, marker PsGAPA; intensywność transpiracji Tr, marker SSR AC74; efektywność wykorzystania fosforu w formowaniu masy nasion i wegetatywnej, AD21, AA473, Mtic16, Leg404.

Literatura:

- Górny, A., Banaszak, Z., Ługowska, B., & Ratajczak, D. (2011). Inheritance of the efficiency of nitrogen uptake and utilization in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under diverse nutrition levels. *Euphytica*, 177(2), 191-206.
- Niewiadomska, A. (2013). *Ocena wpływu nawozu PRP SOL i koinokulacji bakteriami naproces diazotrofii, aktywność biologiczną i właściwości fizykochemiczne gleby oraz kondycję i plon koniczyny i lucerny.*, (462). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań.
- Theander, O., Åman, P., Westerlund, E., Andersson, R., & Pettersson, D. (1995). Total dietary fiber determined as neutral sugar and uronic acid residues, and lignin (The Uppsala method):

Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 78, 1030-1044.

Wang, S., Basten, C. J., & Zeng, Z. B. (2012). Windows QTL Cartographer 2.5. North Carolina State University, Raleigh, NC.: Department of Statistics. Retrieved from <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>

Wykaz publikacji wyników

Publikacje:

W. Świącicki, M. Gawłowska, A. Górny, K. Beczek, A. Niewiadomska, L. Boros (2020), Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne **Biuletyn IHAR**, 289: 135-136. MEiN 20 pkt.

M.Gawłowska, M.Knopkiewicz, W.Świącicki, L. Boros and A. Wawer (2020) Quantitative trait loci for stem strength properties and lodging in two pea bi-parental mapping populations (*Pisum sativum* L.). Crop Science, **DOI:** 10.1002/csc2.20395 – publikacja z poprzedniej transzy Postępu Biologicznego, MEiN 100 pkt.