

Tytuł zadania nr 40: **Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne.**

Cele zadania w 2014 roku:

1. Stwierdzenie zależności pomiędzy efektywnością wykorzystania azotu NUtE w wybranych liniach grochu, a plonem, uzupełnioną o aspekt aktywności nitrogenazy jako wskaźnika aktywności bakterii *Rhizobium*.
2. Skorelowanie efektywności NUtE z efektywnością wykorzystania wody i aktywnością aparatu fotosyntetycznego.
3. Rozpoznanie zróżnicowania efektywności wykorzystania azotu w warunkach optymalnego i nieoptymalnego zaopatrzenia w azot, w warunkach polowych i doświadczenia kontrolowanego.
4. Rozpoznanie odporności na wyleganie w populacji mapującej [Wt10245×Wt11238] i korelacja tej cechy z zawartością lignin w łodydze.

Materiał badawczy stanowił zestaw wybranych 18 linii RIL i formy rodzicielskie populacji mapującej [Carneval×MP1401] (Tar'an i in. 2003). Rośliny badano w dwóch doświadczeniach wazonowych: w fazie wegetatywnej wzrostu (pokój hodowlany) i w pełnej dojrzałości (szklarnia, optymalny i niski poziom zawartości azotu w podłożu) oraz w doświadczeniu polowym (Wiatrowo - 2 lokalizacje; Przebędowo - 1 lokalizacja).

Obserwowano: fazy wzrostu, wczesność, wagę (sucha masa) części wegetatywnych i nasion. Analizowano zawartość azotu (%; metodą spalania Dumasa; analizator VarioMax) w wysuszonych (65°C, 72h) i zmielonych częściach roślin. Określono poziom tolerancji stresu na niedobór azotu i komponenty efektywności wykorzystania azotu: %Nveg (słoma) i %Nzia (nasiona), NHI - azotowy indeks plonu (% całkowitej ilości N translokowanego do nasion), GwNg - ilość wyprodukowanej suchej masy nasion na jednostkę azotu zakumulowanego w nasionach, NERveg, NERgen - fizjologiczny współczynnik efektywności wykorzystania azotu w formowaniu masy wegetatywnej (veg) i nasion (gen). Wykonano pomiary efektywności wykorzystania wody (WUE) w całych wazonach. Pomierzono ilość wytranspirowanej wody [mol/wazon] w sezonie wegetacyjnym i określono komponenty efektywności wykorzystania wody WUE. Oceniono aktywność fotosyntetyczną liści grochu w warunkach optymalnego zaopatrzenia w azot i skorelowano z aktywnością nitrogenazy, jako wskaźnika aktywności bakterii *Rhizobium*.

Wyniki wykorzystania azotu w warunkach kontrolowanych sugerują, że odmiana Carneval gorzej zareagowała na stres niedoboru azotu, bo efektywność wiązania N₂ (Nfix) i aktywność nitrogenazy (NA) u tej odmiany była mocno zredukowana (Nfix 54%, NA 70

nMC₂H₄/roślinę/godzinę) (plon 5,79 g/ rośliny w warunkach optymalnych; 3,6 g/ rośliny w warunkach niedoboru azotu). W linii MP1401 deficyt azotu w podłożu prawdopodobnie rekompensowała zwiększona efektywność procesu wiązania (Nfix 61%, 924 nMC₂H₄/roślinę/godzinę), która jest gwarantem jej niezmiennego plonowania w zastosowanym stresie azotu (5,75 g z rośliny w warunkach optymalnych; 5,4 g/ rośliny w warunkach stresowych).

Wyniki w warunkach kontrolowanych dowodzą, że zakres zmienności genetycznej w populacji badanej przez cały okres wegetacji jest dużo szerszy niż badanej tylko w wegetatywnej fazie wzrostu i wskazują na różnice w schematach zagospodarowywania wody i azotu oraz translokacji/redystrybucji asymilatów i azotu dla ostatecznie wytworzonego plonu. Pozytywne, a istotne relacje między tymi parametrami efektywności w obu fazach wegetacji sugerują, że procesy gospodarowania wodą są w dużej mierze zbliżone i niezależne od fazy wzrostu. Ścisła korelacja pomiędzy efektywnością wykorzystania wody w fazie wegetatywnej i do pełnej dojrzałości może sugerować, że warunkują ją te same rejony w genomie.

Pozytywną korelację powyżej 0,6 stwierdzono dla aktywności nitrogenazy i niektórych parametrów aktywności fotosyntetycznej w warunkach kontrolowanych [intensywności transpiracji, przewodnictwa szparkowego i wigoru roślin (biomasa)], natomiast negatywną dla aktywności nitrogenazy i efektywności fotosyntezy oraz efektywności wymiany gazowej. Zależności te zaistniały zarówno w warunkach zaopatrzenia w azot, jak i w warunkach jego niedoboru. Pozytywną korelację pomiędzy parametrami fotosyntetycznymi i aktywnością nitrogenazy stwierdzono również dla koniczyny (0,8-0,9) i dla lucerny (0,6-0,8) (Niewiadomska 2013). Autorzy uważają, że ATP pochodzące z procesu fotosyntezy w roślinie stanowi źródło energii dla mikrosymbiontów, niezbędnej do wiązania azotu.

Stwierdzono bardzo słabą korelację pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania wody w formowaniu nasion w warunkach kontrolnych w szklarni ($r=-0,03$). Wyższe, istotne korelacje dotyczyły masy wegetatywnej i efektywności wykorzystania wody (0,64, $p<0,01$). Korelacje pomiędzy sprawnością aparatu fotosyntetycznego i plonem wahały się od 0,2 do 0,38. W warunkach stresu zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami wzrastały (plon i WUE_{gen} $r=0,59$; masa wegetatywna i efektywność wykorzystania wody $r=0,74$).

Plon z rośliny był największy w Wiatrowie, w lokalizacji optymalnej (5 g/roślinę), najmniejszy w Przebędowie (3,5 g/ roślinę). Stwierdzono istotne korelacje ($p<0,01$) pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w kształtowaniu nasion (NER_{gen}) (Wiatrowo optym. 0,47, Wiatrowo niskie 0,58, Przebędowo stresowe 0,84). Istotna była

również negatywna korelacja pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w formowaniu masy wegetatywnej (NER_{veg}) (Wiatrowo optym. -0.45, Wiatrowo niskie -0.76, Przebędowo stresowe -0.56). Potwierdza się zaobserwowana wcześniej tendencja wzrostu wartości korelacji w zależności od stresogenności środowiska.

Plon z doświadczenia szklarniowego był około 7% większy w warunkach optymalnych i 27% większy w warunkach stresowych niż plon z doświadczenia polowego. Linia MP1401 wytwarzała wyższy plon niż linia Carneval (warunki szklarniowe, Wiatrowo - stanowisko optymalne, Przebędowo - warunki stresowe) i charakteryzowała się lepszymi parametrami gospodarki azotowej. Wyższy był również indeks plonowania z warunków szklarniowych. W warunkach niedoboru azotu plon małał o około 7%, natomiast stresowe warunki polowe redukowały plon o około 27%. Małał również indeks plonu od 5% (warunki szklarniowe i polowe, Wiatrowo) do 21% (warunki stresowe, Przebędowo). W doświadczeniu polowym wyższe wartości niż w warunkach kontrolowanych wykazywały parametry takie, jak Gw/Ng (sucha masa nasion/ jednostkę azotu zakumulowanego w nasionach) i efektywność wykorzystania azotu w formowaniu masy wegetatywnej $NUtEveg$. Niższe wartości w doświadczeniu polowym niż szklarniowym wykazywał azotowy indeks plonu NHI (azot zakumulowany w ziarnie/ ilość pobranego azotu) i efektywność wykorzystania azotu w formowaniu masy nasion $NUtE_{GEN}$. W warunkach stresu azotowego parametry fizjologiczne

poboru azotu rośliny – $NUpE$, $N2fix$, małały parametry wykorzystania azotu – Gw/Ng, $NUtE_{GEN}$, NHI. Wartości efektywności wykorzystania azotu w formowaniu masy wegetatywnej ($NutEveg$) wahały się (rosły w doświadczeniu polowym, małały w doświadczeniu szklarniowym). Stwierdzone wartości azotowego indexu plonu (NHI), plonu wykształconego na jednostkę pobranego azotu (Gw/Ng), efektywności wykorzystania azotu w formowaniu ziarna (NER_{gen}) i formowaniu masy wegetatywnej (NER_{veg}) u grochu były porównywalne do tych, stwierdzonych u pszenicy (Ratajczak i Górny 2012). W warunkach kontrolowanych zaobserwowano istotną, negatywną korelację ($p < 0.01$) pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w kształtowaniu masy nasion (NER_{gen}). Przypomina to negatywną korelację plon – zawartość białka w nasionach. W doświadczeniu polowym istotne korelacje ($p < 0.01$) pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w kształtowaniu masy nasion (NER_{gen}) były już pozytywne (Wiatrowo warunki optymalne - 0.47, Wiatrowo niska zawartość azotu - 0.58, Przebędowo warunki stresowe - 0.84). Parametry gospodarki azotowej u grochu znacząco wpływają na wysokość plonu. Im bardziej stresogenne środowisko, tym wyższy udział parametrów fizjologicznych w kształtowaniu plonu.

Stwierdzone zależności pomiędzy plonem, a sprawnością aparatu fotosyntetycznego i efektywnością wykorzystania wody były niższe, niż stwierdzone u pszenicy przez Ratajczak i Górny (2012).

Linia rodzicielska Carneval wykazała większą wartość współczynnika tolerancji w porównaniu do linii MP1401 dla obydwu polowych lokalizacji stresowych w odniesieniu do lokalizacji optymalnej. W doświadczeniu szklarniowym linia Carneval wykazała mniejszą wartość współczynnika. Doświadczenie szklarniowe pozwoliło na wyznaczenie współczynnika tolerancji tylko dla niedoboru azotu (warunki kontrolowane). Natomiast współczynniki tolerancji wyznaczone z doświadczeń polowych wskazywały na tolerancję nie tylko dla niedoboru azotu, ale również na wysokie pH, nadmiar fosforu, potasu, wapnia, magnezu (charakterystyka stanowiska w Przebędowie). Wynik ten sugeruje, że odmiana Carneval była gorzej przystosowana do stresu niedoboru azotu ze względu na efektywność wiązania N_2 . Korelacja pomiędzy współczynnikami stresu w lokalizacjach polowych wynosiła 0,73. Korelacja pomiędzy współczynnikami stresu dla Przebędowa i szklarni wyniosła -0,58, natomiast dla Wiatrowa i szklarni -0,68.

Są to prace wstępne, zmierzające do uzupełnienia mapy i nałożenia QTL gospodarki azotowej grochu, gdy zebrane zostaną dane ilościowe dla całej populacji. Mapę genetyczną uzupełniono 3 markerami SSR, dzięki czemu obecnie mapa liczy 228 markerów, jej długość wynosi 946 cM, średnia odległość pomiędzy markerami wynosi 6,3 cM. Cennymi markerami są AB33, AB141, AB83, ponieważ znalazły się na mapie opublikowanej przez Bourion i in. (2010). Autorzy ci przeanalizowali QTL związane z gospodarką azotową roślin grochu i grupy QTL zostały umieszczone w pobliżu tych markerów. Umożliwi to odniesienie lokalizacji QTL gospodarki azotowej grochu z badań własnych do innych autorów.

Określenie korelacji wylegania w wybranych liniach populacji mapującej z zawartością lignin.

Celem było określenie, czy istnieje zależność pomiędzy zawartością lignin w łodygach grochu, a wyleganiem.

Populację mapującą grochu [Wt 10245×Wt 11238] – 20 rodzin wysiano w doświadczeniu polowym w dwóch terminach, na poletkach 4 rzędkowych o powierzchni 0,5 m², w rozstawie międzyrzędzi 20 cm, w rzędzie co 5 cm do oceny podatności na wyleganie. Ocenę wylegania prowadzono według metodyki COBORU w trzech terminach tj. początek kwitnienia, koniec kwitnienia i pełna dojrzałość.

Populacja ta odznaczała się znaczną podatnością na wyleganie we wczesnym etapie wegetacji. Już na początku kwitnienia wyleganie oceniono średnio na poziomie 6,1 dla badanej populacji wg skali COBORU przy współczynniku zmienności CV = 10,1%. Przed zbiorem wyleganie oceniono na 3,5 (wartość średnia dla linii) w dziewięciostopniowej skali,

przy zakresie zmienności ocen od 2 do 5,5 (współczynnik zmienności CV 23,6%), a form rodzicielskich odpowiednio 4,5 i 2,8. Analiza korelacji pomiędzy %-ową zawartością lignin w łodydze, a wyleganiem, wysokością roślin i parametrami mechanicznymi łodygi wykazała słabe korelacje ($p < 0,1$) pomiędzy zawartością lignin w łodydze, a wytrzymałością łodygi w dole części oraz negatywną pomiędzy %-ową zawartością lignin i średnicą łodygi w środkowej części. Łączy się to z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi w ramach Postępu Biologicznego. Stwierdzono wówczas korelację wylegania w 1 i 2 terminie z wytrzymałością i średnicą łodygi w dolnej jej części i ujemnie z wysokością rośliny, natomiast wylegania przed zbiorem ze średnicą łodygi w jej dolnej części i grubością ściany łodygi w dolnej i środkowej części.

LITERATURA:

- Bourion V., Rizvi S., Fournier S., Larambergue H., Galmiche F., Marget P., Duc G., Burstin J. 2010. Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL approach of root, nodule, and shoot variability. *Theoretical and Applied Genetics* 121 (1): 71-86.
- 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.
- Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Henaut I. 2005. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* 111 (6): 1022 - 1031.
- Niewiadomska A. 2013: Ocena wpływu nawozu PRP SOL i koinokulacji bakteriami na proces diazotrofii, aktywność biologiczną i właściwości fizykochemiczne gleby oraz kondycję i plon koniczyny i lucerny. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu; 106.
- Ratajczak D., Górny A.G. 2012. Water- and nitrogen-dependent alterations in the inheritance mode of transpiration efficiency in winter wheat at the leaf and whole-plant level. *J Appl Genet* 53 (4): 377-88.
- Tar'an B., Warkentin T., Somers D.J., Miranda D., Vandenberg A., Blade S., Woods S., Bing D., Xue A., Dekoeyer D., Penner G. 2003. Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107 (8): 1482-1491.
- Van Ooijen J., Voorrips R. 2001. JoinMap Version 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen, The Netherlands: Plant Research International B.V.