

Gatunek rośliny, której dotyczy sprawozdanie:

Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) i łubin biały (*Lupinus albus* L.)

Autor/autorzy:

MICHAŁ KSIAŹKIEWICZ, PIOTR PLEWIŃSKI, SANDRA RYCHEL-BIELSKA, WOJCIECH BIELSKI, BOGDAN WOLKO

Afiliacja:

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Adres korespondencyjny, adres e-mail i nr telefonu kierownika tematu:

ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, mksi@igr.poznan.pl, 61-6550268

Informacja o dotacji:

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji nr HOR hn-801-8/14, Zadanie nr 39

Tytuł zadania w języku polskim:

Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne

Tytuł zadania w języku angielskim:

Early flowering traits of white lupin and yellow lupin – genetic and molecular backgrounds

Słowa kluczowe:

fenotypowanie, genotypowanie, termin kwitnienia, wernalizacja, profilowanie ekspresji genów

Realizację zadania podzielono na cztery tematy badawcze (opisane na kolejnych stronach).

Cel tematu badawczego 1:

Otrzymanie linii pokolenia F₆ z krzyżówek łubinu żółtego ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14 oraz ocena terminu kwitnienia wybranych linii z kolekcji łubinu białego.

Wyniki uzyskane w toku realizacji tematu badawczego 1:

W stacji Hodowli Roślin Smolice, Oddział w Przebędowie, wysiano nasiona z pokolenia F₅ obu wariantów populacji mapującej łubinu żółtego. Uzyskano plon z 200 linii z każdej kombinacji krzyżówkowej. Po ręcznej obróbce strąków uzyskano nasiona w liczbie wystarczającej (z rezerwą na ewentualne powtórzenia) do kontynuacji prac w następnych latach.

Na podstawie wyników obserwacji fenotypowych prowadzonych w ramach realizacji zadania w latach 2014, 2015 i 2018 opracowano zestaw 137 linii łubinu białego reprezentujący istniejący w kolekcji zakres zmienności terminu kwitnienia. Doświadczenie ukierunkowane na ocenę terminu kwitnienia zostało założone w warunkach szklarniowych w wariancie bez wernalizacji. Wysiano po 12 nasion dla każdej z badanych linii. Prowadzono codzienny monitoring roślin i obserwację kwitnienia. Odczytano liczbę dni od wysiania do utworzenia pąków, początku kwitnienia, końca kwitnienia oraz dojrzałości większości strąków na roślinie.

Wszystkie linie zawiązały strąki, aczkolwiek 3 linie nie osiągnęły fazy dojrzałości (zbioru nasion) ze względu na stan fitosanitarny. Podsumowując, 97,8% badanych linii wydało plon nasion. Rośliny potrzebowały średnio ~50,9 dni do zawiązania pąków (min. ~38,5 / max. ~74,6), ~64,5 dni do początku kwitnienia (min. ~47,2 / max. ~88,4), ~76,0 dni do zakończenia kwitnienia (min. ~62,0 / max. ~94,5) i ~130,8 dni do dojrzałości strąków (min. ~104 / max. ~164). Wyniki były zbieżne z tymi, które uzyskano w latach poprzednich. Dla przykładu, korelacja pomiędzy terminem kwitnienia dla obserwacji z 2018 i 2020 wyniosła 0,84 (wartość $p \sim 0$), zaś dla obserwacji z lat 2015 i 2020 wyniosła 0,77 ($p \sim 1E-37$). Wyniki obserwacji terminu kwitnienia łubinu białego uzyskane w latach 2015-2020 oraz wyniki oceny odpowiedzi wernalizacyjnej uzyskane w latach 2015 i 2018 porównano z rozkładem polimorfizmu markerów genetycznych opracowanych dla genów indukcji kwitnienia oraz loci QTL w poprzednich latach realizacji projektu. Obliczono współczynnik korelacji punktowo-dwuseryjnej i wartość prawdopodobieństwa skojarzonego z rozkładem dwustronnym t-Studenta. Dla 12 markerów zlokalizowanych w obrębie 4 głównych loci QTL wykazano istotną statystycznie ($p \leq 0,05$) korelację z terminem kwitnienia, przy czym dla 7 markerów wartość p była niższa niż 0,01.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 1:

1. Pomimo dużego poziomu kolinearności pomiędzy genomami łubinu wąskolistnego i białego, cecha wczesności kwitnienia u tych gatunków warunkowana jest przez różne geny, zlokalizowane na innych chromosomach.
2. Cecha wczesności kwitnienia łubinu białego jest kontrolowana przez wiele genów, co w praktyce uniemożliwia klasyczną selekcję w kierunku wczesności kwitnienia przy użyciu markerów molekularnych (zbyt wiele markerów do analizy).
3. Występowanie statystycznie istotnej korelacji między rozkładem terminu kwitnienia łubinu białego i polimorfizmem niektórych markerów wskazuje na możliwość opracowania modelu selekcji genomowej. Wymaga to jednak genotypowania kolekcji, a następnie wybranych linii hodowlanych metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania (aktualnie metoda nieoptymalna w hodowli twórczej łubinów ze względu na zbyt wysoki koszt).

Cel tematu badawczego 2:

Opracowanie zestawu najbardziej użytecznych markerów do genotypowania materiałów kolekcyjnych łąbinu żółtego ukierunkowanego na identyfikację składu allelicznego w obrębie dwóch głównych loci QTL wczesności kwitnienia.

Wyniki uzyskane w toku realizacji tematu badawczego 2:

Przeprowadzono amplifikację 70 produktów PCR na matrycy DNA 113 linii łąbinu żółtego, w tym na 4 liniach referencyjnych: P28213 i Wodjil (linie rodzicielskie australijskiej populacji mapującej) oraz Parys i PRH 444/14 (linie rodzicielskie opracowywanej w ramach niniejszego zadania polskiej populacji mapującej). Po uzyskaniu zestawu wyników dla wszystkich badanych markerów i linii obliczono (dla każdego analizowanego markera) współczynnik korelacji punktowo-dwuseryjnej pomiędzy genotypem (fazą markera, allelem) a fenotypem (terminem kwitnienia) oraz wartość prawdopodobieństwa skojarzonego z rozkładem dwustronnym t-Studenta.

Dla każdej podanej pary starterów udało się uzyskać specyficzne produkty amplifikacji PCR. Spośród 23 polimorficznych produktów, 14 wykazało istotną statystycznie korelację rozkładu alleli z liczbą dni od wysiewu do kwitnienia (uśrednioną z 3 lat obserwacji szklarniowych) na poziomie istotności $p < 0,05$, w tym 11 produktów wykazało istotną statystycznie korelację na poziomie istotności $p < 0,001$. Z kolei 13 polimorficznych produktów wykazało istotną statystycznie korelację rozkładu alleli z wpływem wernalizacji na liczbę dni do kwitnienia (uśrednionym z 3 lat obserwacji szklarniowych) na poziomie istotności $p < 0,05$, a w tym 5 produktów wykazało istotną statystycznie korelację na poziomie istotności $p < 0,001$.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 2:

1. Cecha wczesności kwitnienia łąbinu żółtego jest warunkowana przez kilka głównych loci.
2. Główny gen wczesności kwitnienia u łąbinu żółtego jest położony w regionie kolinearnym do regionu genomu łąbinu wąskolistnego zawierającego allele *Ku* i *Julius* warunkujące termoneutralność u tego gatunku.

Cel tematu badawczego 3:

Poznanie kompletnej sekwencji wybranych 5 genów związanych z procesem kwitnienia i adnotacja funkcjonalna uzyskanych sekwencji.

Wyniki uzyskane w toku realizacji tematu badawczego 3:

Amplifikacja PCR była prowadzona na matrycy DNA wyizolowanego z linii Parys, Wodjil, PRH444/14 i P28213 przy użyciu starterów zaprojektowanych w ubiegłym roku oraz nowych starterów zaprojektowanych w 2020 roku dla fragmentów sekwencji nie objętych jeszcze analizami. Sekwencjonowanie produktów PCR zostało zlecone firmie wykonującej tego typu usługi. Chromatogramy z wynikami sekwencjonowania zostały zaimportowane do programu Geneious i poddane inspekcji w celu określenia poprawności odczytu sekwencji. Następnie przy wykorzystaniu nakładających się końców zostały złożone kontigi i utworzone sekwencje konsensusowe dla każdego z badanych genów (osobno dla każdej z linii). Na podstawie wzajemnego przyrównania czterech sekwencji konsensusowych dla każdego z badanych genów zostały zidentyfikowane loci polimorficzne. Loci te były poddane adnotacji funkcjonalnej ukierunkowanej na identyfikację potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za regulację ekspresji tych genów.

Łącznie w tym roku sekwencjonowano 179 produktów PCR amplifikowanych przy pomocy 53 różnych par starterów. Dla każdego z nich uzyskano czytelną sekwencję. W zdecydowanej większości przypadków sekwencjonowanie wykonane zostało z obydwu końców i dla każdej z analizowanych linii. Pojedyncze przypadki sekwencjonowania produktów dla mniejszej liczby linii (jednej, dwóch lub trzech) wynikały zazwyczaj ze znacznych rozbieżności pomiędzy dotychczas poznaną sekwencją genu i koniecznością projektowania nowych par starterów lub dobierania już posiadanych starterów w nowe, nietypowe pary, by uzyskać specyficzny wynik dla poszczególnych linii. Rzadziej celem sekwencjonowania pojedynczych linii była chęć potwierdzenia występowania polimorfizmu lub uzyskanie bardziej satysfakcjonującego wyniku sekwencjonowania produktów, które były sekwencjonowane w roku ubiegłym. Uzyskano pełne sekwencje genów dla wszystkich linii. Zidentyfikowano 33 loci polimorficzne między liniami rodzicielskimi Wodjil i P28213 oraz 21 loci polimorficznych między liniami PRH444/14 i Parys.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 3:

1. Potencjalne znaczenie funkcjonalne w regulacji terminu kwitnienia u łubinu żółtego mają mutacje zidentyfikowane w obrębie trzech homologów genu *FLOWERING LOCUS T*.
2. Loci polimorficzne występujące w regionach regulatorowych pomiędzy liniami rodzicielskimi populacji mapujących łubinu żółtego zawierają m.in. hipotetyczne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genu *FLOWERING LOCUS T* w odpowiedzi na fotoperiod i niską temperaturę.

Cel tematu badawczego 4:

Poznanie profilu ekspresji genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia w liniach rodzicielskich dwóch populacji mapujących w odpowiedzi na wernalizację w warunkach dnia krótkiego.

Wyniki uzyskane w toku realizacji tematu badawczego 4:

RNA z prób został wyizolowany za pomocą komercyjnego zestawu SV Total RNA Isolation System (Promega). RNA został przepisany na cDNA przy użyciu komercyjnego zestawu iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Do ilościowego PCR użyto zestawu odczynników iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). W analizie stosowano trzy powtórzenia techniczne i trzy powtórzenia biologiczne. Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji genu referencyjnego - homolog z genomu łubinu wąskolistnego: Lup025874, nazwa genu: RNA helicase *DRH1*, homolog z genomu *Arabidopsis thaliana*: AT5G47010. Analiza danych była prowadzona w programie CFX Manager Software 3.1 (Bio-Rad). Wykresy poziomu ekspresji genów zostały wykonane w programie Microsoft Excel.

Uzyskano profile ekspresji dla wszystkich badanych genów (czterech homologów genu *FLOWERING LOCUS T*), linii, terminów oraz wariantów wernalizacyjnych. W przypadku niektórych genów zaobserwowano w liniach P28213 i Parys wysoką odpowiedź wernalizacyjną, wyrażoną poprzez wzrost poziomu ekspresji odpowiednio maksymalnie 270× i 304×. Linie PRH444/14 i Wodjil były natomiast zazwyczaj termoneutralne pod względem poziomu ekspresji badanych genów. Ponadto, wystąpiły znaczne różnice pomiędzy genotypami, wynoszące w wariancie bez wernalizacji nawet ~1200× między liniami Wodjil i P28213 czy też ~700× między liniami PRH444/14 i Parys. Zastosowanie wernalizacji zmniejszyło różnice w poziomie ekspresji genów obserwowane pomiędzy liniami wczesnymi a późnymi.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 4:

1. Jeden z badanych homologów genu *FLOWERING LOCUS T* jest prawdopodobnie genem integratorowym dla szlaku wernalizacyjnego u łubinu żółtego, zaś drugi jest genem kandydującym dla szlaku fotoperiodycznego.
2. Jeden z badanych homologów genu *FLOWERING LOCUS T* prawdopodobnie nie jest zaangażowany w regulację procesu indukcji kwitnienia łubinu żółtego w odpowiedzi na fotoperiod i wernalizację.