

WOJCIECH RYBIŃSKI¹, WOJCIECH ŚWIĘCICKI¹, PAWEŁ BARZYK²

¹Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, ²Poznańska Hodowla Roślin, Oddział w Wiatrowie

Kierownik tematu: Wojciech Rybiński, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, wryb@igr.poznan.pl
tel. 61 65 50 252

Prace zostały wykonane w roku 2020 w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, zadanie nr 42

Analiza zmienności genetycznej i piramidyzacja genów warunkujących cechy użytkowe łubinu białego

Estimation of genetic variability and pyramiding of genes controlling agricultural traits of white lupin

Słowa kluczowe: alkaloidy, antraknoza, łubin biały, krzyżowania zbliżające, kwasy tłuszczowe, populacja mapujaca, tłuszcz, wczesność

Streszczenie

1. Cel podjętego tematu i prowadzonych badań:

Według danych PIORIN za rok 2020 ocena polowa plantacji nasiennych obejmowała odpowiednio 27 i 10 odmian łubinu wąskolistnego i żółtego oraz dwie odmiany łubinu białego oceniane na 202 ha (4798 ha i 661 ha dla łubinu wąskolistnego i żółtego) stanowiących zaledwie 3,5% łącznej powierzchni plantacji łubinowych. Ta wyjątkowo niekorzystna proporcja nie ulegnie zmianie dopóki nie zintensyfikuje się prac genetyczno-hodowlanych w kierunku poszerzenia puli genowej o korzystne warianty cech użytkowych (prezentowanych w projekcie) oraz poznania właściwego dla ich pełnej ekspresji podłoża genetycznego.

Łubin biały ma jeden z najstarszych rodowodów spośród gatunków uprawianych w Europie. Jego uprawa w Egipcie datuje się na rok 330 p.n.e. skąd poprzez Grecję dotarł do Włoch. Z uwagi na mniej korzystne warunki klimatyczne w Centralnej Europie gatunku tego nie uprawiano, a dopiero udane doświadczenia Wulfena w Niemczech w roku 1810 zwróciły uwagę na wartość roślin łubinu białego w użyźnianiu gleby. Dotąd łubin biały np. w Polsce i w Niemczech nie stał się tak rozpowszechniony (głównie z powodu braku odpowiednich odmian) jak łubin żółty, a zwłaszcza wąskolistny. Jest gatunkiem mało poznanym od strony genetycznej. Aby zwiększyć jego powierzchnię uprawy i wykorzystanie należy ulepszyć w

odmianach uprawnych kilka cech: wczesność i odporność na antraknozę oraz obniżyć zawartość alkaloidów i podwyższyć zawartość tłuszczu. Celem proponowanych badań w aspekcie wieloletnim jest zidentyfikowanie i selekcja pożądanych cech łubinu białego w światowych zbiorach kolekcyjnych lub wśród mutacji indukowanych, określenie sposobu dziedziczenia oraz łączna introdukcja cech do genotypów o wysokiej wartości użytkowej. Realizacja powyższego jest niezbędnym warunkiem, aby łubin biały stał się cenionym gatunkiem uprawnym, konkurencyjnym dla głównych roślin strączkowych, źródłem wysokoenergetycznej paszy białkowej dla drobiu i trzody chlewnej.

2. Opis wyników

W ramach zdania 42 w roku 2020 badania realizowano w dwóch tematach badawczych:

Temat badawczy 1: Krzyżowania zbliżające. Uzyskiwanie segregujących populacji w kolejnych pokoleniach pod względem pary cech (zawartość tłuszczu i wczesność dojrzewania) i zróżnicowane podłoże genetyczne (odmiany uprawne). Druga para cech w krzyżowaniach zbliżających uwzględnia zawartość alkaloidów i odporność na antraknozę i zróżnicowane podłoże genetyczne (odmiany uprawne). Na podstawie uzyskanych wyników z wspomnianych krzyżowań zbliżających kontynuowano prace nad łączną inkorporacją cechy wczesności i wysokiej zawartości tłuszczu do jednego genotypu na drodze krzyżowania zbliżającego, a w odniesieniu do drugiej pary cech (zawartość alkaloidów i odporność na antraknozę) w ubiegłym roku realizowano krzyżowania zbliżające wybranych mieszańców o najniższej zawartości alkaloidów z wyselekcjonowanymi mieszańcami o największej tolerancji na porażenie antraknozą.

Temat badawczy 2: Wyprowadzenie populacji mapującej W roku ubiegłym z krzyżówki formy dzikiej z odmianą uprawną (AL. 22 x Boros) uzyskano nasiona roślin F₄, a w roku bieżącym rośliny pokolenia F₅.

Temat badawczy 1

Prace realizowane w bieżącym roku w powyższym temacie badawczym są logiczną kontynuacją wcześniejszych, a modyfikowanych na podstawie wyników uzyskiwanych w poszczególnych pokoleniach (latach). Badania w odniesieniu do pierwszej pary cech (forma o zwiększonej tolerancji na antraknozę x odmiana i formy niskoalkaloidowe x odmiana) w roku bieżącym obejmowały kolejne pokolenie mieszańcowe.

W trzech kombinacjach krzyżówkowych, obserwowano szeroki zakres zmienności, co pozwoliło zidentyfikować mieszańce o bardzo niskiej zawartości alkaloidów w porównaniu z wzorcem, którą była odmiana uprawna Butan. Potwierdzono wyniki z wcześniejszych pokoleń, że najkorzystniejszą kombinacją krzyżówkową była krzyżówka B17 (niskoalkaloidowa odmiana Amiga x odmiana uprawna Pikador) w której ujawniono najwięcej niskoalkaloidowych mieszańców w zakresie zmienności od 0,002 do 0,0061 %, przy średniej zawartości alkaloidów na poziomie 0,024 % w nasionach wzorca, odmiany Butan. W pozostałych dwóch kombinacjach (B15 – Lotos x Butan i B16 Amiga x Boros) również zidentyfikowano niskoalkaloidowe mieszańce. Sposób dziedziczenia alkaloidów jest złożony, a dla większości alkaloidów istotne było zarówno addytywne i nieaddytywne działanie genów z przewagą działania dominującego. Udział nieaddytywnego działania genów i zmniejszenia stopnia dominacji sugeruje stopniowe utrwalenie addytywności w kolejnych pokoleniach. Systematyczny spadek zawartości alkaloidów w nasionach jest niewątpliwie wynikiem prowadzonej od kilku lat selekcji, wybierając do dalszych badań w kolejnych pokoleniach najbardziej niskoalkaloidowe genotypy mieszańcowe. Podobnie jak w poprzednich pokoleniach, oprócz zmienności zawartości alkaloidów w nasionach segregującej populacji mieszańców, szczególnie interesująco przedstawia się struktura zawartości poszczególnych alkaloidów w ich łącznej zawartości. Generalnie analizy obejmowały zróżnicowaną paletę alkaloidów, przy czym obecność niektórych z nich jak przykładowo sparteina, nie ujawniała się w żadnej z analiz. Niezależnie od kombinacji, w nasionach każdego mieszańca obecna jest lupanina i jest to kluczowy alkaloid w łubinie białym. Jego dominującą pozycję obserwowano praktycznie we wszystkich analizowanych pokoleniach i bez wyjątku w nasionach mieszańców wszystkich ocenianych kombinacji krzyżówkowych. Jego średnia zawartość różni się między kombinacjami i tak w kombinacjach B15 i B17 nasiona zawierają średnio prawie identyczną zawartość lupaniny (69,7 i 69,1%), ale już genotypy z kombinacji B16 tylko 57,7 %, Drugim w kolejności wiodącym alkaloidem jest angustifolina z wartościami 10,2; 13,4 i 17,8% w nasionach kombinacji B15, B16 i B 17, przy czym należy tu zauważyć nieco odmienny profil alkaloidowy kombinacji B16 o bardzo wysokiej zawartości 13-hydroksylupaniny (18,4%) przy zawartości tylko 5,1 i 1,7% w nasionach mieszańców kombinacji B15 i B17. Trzecim wiodącym alkaloidem, niezależnie od kombinacji krzyżówkowej jest izolupanina. Miarą odmienności profilu alkaloidów w nasionach mieszańców w kombinacji B 17 jest stosunkowo wysoka zawartość trzech dominujących alkaloidów (lupanina, angustifolina i izolupanina) przy braku takich alkaloidów jak: sparteina, ammodendryna, 11,12-secodidehydromultifloyna i multifloryna.

Pośród ocenianych obiektów kolekcyjnych po infekcji roślin w szklarni przez grzyb *Colletotrichum lupini*, podobnie jak w pokoleniach F₃ F₄ F₅ i F₆ w tegorocznym pokoleniu, nie zidentyfikowano form o pełnej odporności na antraknozę. Stwierdzono natomiast szeroki zakres reakcji roślin na infekcję, wyrażony zróżnicowanym stopniem porażenia (od 3,37 do 8,80 w 9-stopniowej skali) w odniesieniu do poszczególnych mieszańców. Średnia wartość porażenia dla wszystkich mieszańców wynosiła 6,7 a dla roślin kontrolnych czołowej krajowej odmiany uprawnej Butan: 8,6 i 8,3 w ubiegłorocznym pokoleniu F₅, co potwierdza ustabilizowaną genetycznie, wysoką podatność na antraknozę wysokopiennej krajowej odmiany Butan. Podobnie jak we wcześniejszych pokoleniach, zidentyfikowane formy o najmniejszym stopniu podatności (zwiększonej tolerancji) na antraknozę, przy czym kombinacja B19 okazała się bardziej efektywna niż B20. Mieszańce lokujące się w przedziale bonitacyjnym 3-4 i w dalszej kolejności 4-5 przy braku obiektów o pełnej tolerancji stanowią wartościowy materiał wyjściowy w dalszych pracach nad uzyskaniem form odpornych. Wzorem lat ubiegłych, reasumując uzyskane wyniki można przyjąć (wymaga to potwierdzenia w polu), że formy o największej tolerancji w warunkach silnej sztucznej infekcji grzybem w szklarni, okażą się również wartościowe w mniej prowokacyjnych warunkach polowych. Mimo uzyskania tych pozytywnych wyników, należy podkreślić dalszy brak identyfikacji form odpornych, co wskazuje jak trudno jest uzyskać pełną odporność. Jest to możliwe tylko przy zintensyfikowaniu badań w tym kierunku. Bez istotnej poprawy w tej kwestii trudno będzie zwiększyć uprawę łąbinu białego w krajowych warunkach środowiskowych, często sprzyjających silnej infekcji polowej prowadzącej do całkowitego zniszczenia plantacji. W odniesieniu do piramidyzacji genów, co jest między innymi celem badań, wykonano krzyżowania obejmujące obiekty o niskiej zawartości alkaloidów x obiekty o największej tolerancji na antraknozę. Niskoalkaloidowa forma pochodziła z 2018 roku z kombinacji B16 i potomstwa mieszańcowego 23 (Amiga x Boros), a obiekt o zwiększonej tolerancji na antraknozę z roku 2018 z potomstwa mieszańcowego 44 z kombinacji B 20 (mutant cienkościenny x Butan). Aktualnie uzyskano strąki (przy częściowym porażeniu mączniakiem), a rozmnożenia polowe pozwoliły uzyskać pierwsze nasiona mieszańcowe.

W odniesieniu do drugiej pary cech, zastosowane kombinacje krzyżowań obiektów kolekcyjnych o podwyższonej zawartości tłuszczu i wcześniejszym dojrzewaniu z wybranymi odmianami uprawnymi pozwoliły na uzyskanie mieszańców pokolenia F₇ o poszerzonym zakresie zmienności ocenianych cech w stosunku do ich form rodzicielskich, a wybrane, najbardziej wartościowe mieszańce (przy ograniczeniu się z pięciu do trzech najlepszych kombinacji) stanowiły materiał wyjściowy do uzyskania segregującego pokolenia F₇. W tym pokoleniu

potwierdzono ujawnianie się mieszańców o wcześniejszym dojrzeniu. Pod względem efektywności uzyskiwania najwcześniejszych mieszańców, podobnie jak w F₅ czy F₆, szczególnie wartościową okazała się kombinacja B1 (Damascus x Boros), z której w roku bieżącym wyselekcjonowano mieszańce o najwcześniejszym dojrzeniu. Równie wartościową w F₇, w aspekcie wyboru form wczesnych okazała się kombinacja B2 (Damascus x Pikador), a w mniejszym stopniu kombinacja B6 (MJS208-1 x Wat), w których zidentyfikowano także mieszańce o wcześniejszym dojrzeniu niż formy rodzicielskie. Uzyskane obserwacje potwierdzają znaczenie odpowiedniego doboru komponentów rodzicielskich do krzyżowań i dobrą zdolność kombinacyjną wspomnianych kombinacji krzyżówkowych z ukierunkowaniem segregacji w kierunku pojawiania się form o najwcześniejszym dojrzeniu.

W odniesieniu do cechy zawartości tłuszczu, na podstawie wcześniej wykonanych analiz chemicznych, potwierdzono trafność wyboru do badań w roku 2017 kombinacji krzyżówkowej AL. 22 x Kalina. Pozwoliło to uzyskać w potomstwie mieszańcowym F₅, F₆ i tegorocznym F₇ szeroki zakres zmienności cechy zawartości tłuszczu i składu kwasów tłuszczowych, a w efekcie finalnym (w wyniku wcześniejszego wyboru form o najwyższej zawartości tłuszczu) zidentyfikować w kolejnym, już, tegorocznym pokoleniu F₇ 10 mieszańców wysokotłuszczowych o zawartości tłuszczu na poziomie 12 % i powyżej, przy zakresie zmienności od 10 do 14,2 % i korzystnym z żywieniowego punktu widzenia profilu kwasów tłuszczowych. W odniesieniu do danych literaturowych i wyników własnych, nasiona i wysokotłuszczowych form łubinu białego przewyższają pod tym względem nasiona zarówno łubinu żółtego jak i wąskolistnego, a ustępują tylko nasionom łubinu Andyjskiego. Niezależnie od wyników analiz nasion we wcześniejszych pokoleniach i zastosowanych kombinacji krzyżówkowych, również w tegorocznym pokoleniu F₇ wykazano, że w profilu kwasów tłuszczowych nasion u ocenianych mieszańców dominującym jest kwas oleinowy oraz linolowy. Mniejsza jest zawartość kwasu linolenowego, palmitynowego, stearynowego, eikozenowego oraz erukowego. Specyfika profilu kwasów tłuszczowych ocenianych nasion mieszańców łubinu białego polega na wyraźnej dominacji kwasu oleinowego nad linolowym. W każdym z analizowanych pokoleń z tegorocznym pokoleniem F₇ włącznie potwierdzono utrzymywanie się korzystnego stosunku kwasów omega-3 do omega-6, to jest kwasu linolenowego do linolowego na poziomie 1:2. Stosunek ten nie zmieniał się istotnie w latach, co wskazuje na jego genetyczną stabilizację jako typową dla nasion łubinu białego. Według wszystkich danych literaturowych ten stosunek obydwu nienasyconych kwasów uważany jest za prawie idealny w diecie ludzi, jak i w żywieniu zwierząt.

Zgodnie z jednym z celów zadania jakim jest piramidyzacja genów, w ramach drugiego etapu wykonano krzyżowania zbliżające obejmujące wczesność dojrzewania i zawartość tłuszczu dla ich finalnego połączenia w jednym genotypie, a materiał do krzyżowań zbliżających stanowiły nasiona wybranych mieszańców o wczesnym dojrzewaniu oraz mieszańce wysokotłuszczowe. Uzyskane wyniki z pokolenia F₄ wskazują na trafny dobór komponentów rodzicielskich, czego przykładem jest szeroki zakres zmienności obydwu ocenianych cech między kombinacjami jak i w obrębie każdej z nich. Potwierdzeniem aspektu piramidyzacji genów związanych z ocenianymi cechami jest uzyskanie mieszańców o zarówno poprawionej wczesności jak i zawartości tłuszczu, co wiąże się z realizacją jednego z założonych celów realizowanego projektu.

Temat badawczy 2

Wyprowadzanie populacji mapującej jest systematycznym postępowaniem metodycznym począwszy od nasion otrzymanych z krzyżówki, poprzez rozmnożenia poszczególnych pojedynków w następnych pokoleniach. Dla praktyki hodowli roślin i uzyskania postępu biologicznego niewątpliwie istotny jest aktualny rozwój biotechnologii obejmujący metody badania polimorfizmu DNA. Między innymi biotechnologia, poprzez prezentacje metodyki polimorfizmu DNA może prowadzić do uzyskania i wykorzystania specyficznych markerów dla określonego materiału roślinnego. Dla uwzględnienia możliwie szerokiego polimorfizmu wybór form rodzicielskich oparto na dużej liczbie przeciwstawnych alleli genów warunkujących badane cechy użytkowe (linia dzika x odmiana uprawna). Warunki te spełnia linia AL 22 charakteryzująca się tradycyjnym typem wzrostu, wysoką zawartością alkaloidów i tłuszczu oraz odmiana uprawna Boros o samokończącym typie wzrostu oraz niskiej zawartości alkaloidów i tłuszczu. Z wysianych nasion rozmnażanych na polu doświadczalnym w Wiatrowie w roku 2017 wybrano potomstwa mieszańcowe pokolenia F₂, które w roku 2018; 2019 i 2020 były przedmiotem kontynuacji wyprowadzania populacji mapującej umożliwiając przejście do kolejnego etapu wzrostu poziomu homozygotyczności w tegorocznym pokoleniu F₅.

3. Podsumowanie

Zastosowane krzyżowania zbliżające w zróżnicowanych układach kombinacyjnych (wraz z zawężaniem liczby kombinacji do najwartościowszych w kolejnych pokoleniach) umożliwiły uzyskanie widocznego postępu w stosunku do lat ubiegłych, wyrażającego się uzyskaniem mieszańców F₆ o niższej zawartości alkaloidów i większej tolerancji na antraknozę niż odmiana Butan, mieszańców pokolenia F₇ wcześniejszych niż ich formy rodzicielskie oraz o wyższej

zawartości tłuszczu (do 14,5 %) i zbalansowanym profilem kwasów tłuszczowych (stosunek kwasu omega 3 do omega 6) w idealnym z żywieniowego punktu widzenia stosunku 1:2. W aspekcie piramidyacji genów efektem inkorporacji najlepszych analizowanych cech do jednego genotypu było uzyskanie mieszańców w odniesieniu do cechy zawartości alkaloidów i tolerancji na antraknozę, a dla drugiej pary cech, mieszańców o poprawionej wczesności dojrzewania i zwiększonej zawartości tłuszczu. Przeprowadzone krzyżowania i pierwsze rozmnożenia były początkowym etapem prac nad uzyskaniem populacji mapującej. Wielkość zebranej partii nasion z roślin F₂ okazała się wystarczająca dla kontynuacji w kolejnych latach wyprowadzania populacji mapującej i uzyskania dostatecznie licznej populacji roślin z tegorocznym pokoleniem F₅ włącznie.