

**SPRAWOZDANIE**  
z realizacji zadania nr 41 na rzecz postępu biologicznego  
w produkcji roślinnej w 2017 roku

Temat: Identyfikacja i sposób dziedziczenia genów warunkujących odporność na choroby grzybowe i niską zawartość alkaloidów w doskonaleniu wartości użytkowej łubinów, ze szczególnym uwzględnieniem łubinu żółtego.

Kierownik zadania: prof. dr hab. W. Świącicki

Wykonawcy: dr M. Kroc, mgr P. Barzyk, mgr K. Czepiel, mgr P. Wilczura

**Cel zadania:**

1. Testowanie genów kandydatów wytypowanych po analizie ekspresji różnicowej w celu wytypowania genów zaangażowanych w odporność na wędnięcie fuzaryjne u łubinu żółtego.
2. Połączenie niskiej zawartości alkaloidów z odpornością na patogeny grzybowe (*Colletotrichum lupini* i *Fusarium*) w zróżnicowanym podłożu genotypowym o dużej wartości użytkowej.

**Wyniki:**

**Ad. 1.**

W roku bieżącym wybrano geny kandydackie, których adnotacja funkcjonalna bezpośrednio sugerowała udział w procesach odpornościowych (pLrr-Rlpk, kPR), miały związek z organizacją i modyfikacją ściany komórkowej (xyl-Araf2, PME68, LTPs1), a także pełniły funkcje regulacyjne (bhlh). Dla wybranych genów zaprojektowano startery do standardowej reakcji PCR, na podstawie dostępnych transkryptów. Do amplifikacji wykorzystano DNA odmian Lord i Perkoz wykorzystywanych w testach fitopatologicznych, jako wzorce odpowiednio odporności i podatności na *Fusarium* spp. Uzyskane sekwencje DNA umożliwiły potwierdzenie homologii badanych genów oraz stanowiły niezbędną matrycę do prawidłowego zaprojektowania starterów i sond do reakcji real-time PCR, w której ze względu na bardzo wysoką czułość wymagane jest całkowite dopasowanie starterów/sondy i matrycy. Właściwe reakcje real-time PCR przeprowadzono w zoptymalizowanych warunkach reakcji tak, aby uzyskać maksymalnie wysoką wydajność zbliżoną do 100% (+/-5%). Wydajność badanych genów mieściła się w granicach od 0,91 do 1,09. Wartości ekspresji uzyskane dla badanych genów znormalizowano względem genów referencyjnych. Znormalizowaną wartość względnego poziomu ekspresji genów badanych w liniach porażonych analizowano względem kalibratora (próby nieporażone). W przypadku linii podatnych zaobserwowano spadek ekspresji dla wszystkich badanych genów kandydackich. U dwóch linii odpornych zaobserwowano wzrost ekspresji wszystkich badanych genów. Trzecia z linii odpornych potwierdziła wyniki RNA-seq dla dwóch genów, wykazując wzrost ekspresji, natomiast dla 4 genów zaobserwowano spadek ekspresji po porażeniu. Reasumując wyniki qPCR w większości przypadków potwierdziły zaangażowanie wybranych genów kandydatów w odporność na fuzariozę. W przypadku trzeciej linii odpornej zaobserwowano spadek ekspresji po porażeniu dla czterech genów, co ze względu

na połowy charakter doświadczenia może być spowodowane zbiorem materiału roślinnego na innym etapie porażenia, aktywacji innych mechanizmów odporności (inne tło genetyczne odporności) lub też faktem, że obserwowane objawy chorobowe nie były związane z *Fusarium*. Wyniki uzyskane dla tego genotypu wymagają potwierdzenia z wykorzystaniem innego materiału roślinnego (zbiór 2018).

## **Ad. 2.**

Wykonano krzyżowania na łubinie żółtym i wąskolistnym, których genotypy rodzicielskie zostały dobrane w ten sposób, że jeden z nich był odmianą uprawną o wysokich walorach użytkowych, a drugi źródłem odporności na patogeny grzybowe oraz genów warunkujących niską zawartość ogólną alkaloidów. Uzyskano w ten sposób 10 nowych kombinacji mieszańcowych łubinu wąskolistnego i żółtego. W łubinie wąskolistnym udało się w ten sposób połączyć genotypy odmian uprawnych Koral, Bolero, Wars i Salsa ze źródłem odporności na *Fusarium* sp. (rody W-336 i W-350) oraz ze źródłem odporności na antraknozę (Sonate). W łubinie żółtym analogicznie połączono genotypy odmian uprawnych Bursztyn, Baryt, WTD2811, Talar i Perkoz ze źródłem odporności na *Fusarium* sp. (rody Z-505, Z 525) i ze źródłem odporności na antraknozę (ród Z-686).

Zanalizowano 50 obiektów obu gatunków (w dwóch powtórzeniach) pod względem składu jakościowego alkaloidów, z uwzględnieniem procentowego udziału wszystkich zidentyfikowanych alkaloidów. W łubinie żółtym zawartość wahała się od 0,00048 do 0,0208% sm. nasion. Zaledwie w kilku przypadkach stwierdzono zawartość zbliżoną do dopuszczalnego maksimum, natomiast w wielu próbach stwierdzono zawartość na poziomie dziesięciotysięcznych części procenta. Jest to materiał bardzo wartościowy, świadczący o dużym postępie hodowlanym. Skład jakościowy nie był zbyt zróżnicowany. Dominowały lupinina i/lub sparteina oraz ammodendryna.

Wśród badanych linii łubinu wąskolistnego zawartość ogółem była także zróżnicowana, od 0,0003 do 0,077% sm., przeciętnie wyższa w porównaniu do analizowanego łubinu żółtego. Można jednak w badanym materiale wybrać segreganty o podobnie niskiej zawartości alkaloidów, wyraźnie niższej od obowiązującej normy (0,02%). Świadczy to o prawidłowym doborze form rodzicielskich do krzyżowań i skutecznej selekcji. Wykazano obecność pięciu alkaloidów głównych (lupanina, 13-OH lupanina, oxolupanina, angustifolina i izolupanina). Lupanina i 13-OH lupanina) stanowiły najczęściej około 80% wszystkich alkaloidów, chociaż zdarzały się przypadki niskiego ich udziału w ogólnej zawartości alkaloidów.

Odporność na wędnięcie fuzaryjne badano w doświadczeniach polowych, w dwóch lokalizacjach, na łubinie żółtym i wąskolistnym. Przetestowano 20 obiektów łubinu wąskolistnego oraz 40 obiektów łubinu żółtego, każde doświadczenie w dwóch powtórzeniach. W doświadczeniu z łubinem wąskolistnym wykonano obserwacje w trzech terminach – po wschodach, w pełni kwitnienia i na początku dojrzewania. Wśród przetestowanych obiektów zaobserwowano szeroki zakres zmienności sięgający od 7,5% do 95,2% przeżycia w końcowym terminie. Wzorzec odporności (odmiana Kalif) osiągnął wynik 100% przeżycia w obu terminach, wzorzec podatności (odmiana Sonet) 40% w stadium kwitnienia i 12,1% w stadium dojrzewania. Oznacza to, że zastosowana procedura badawcza zadziałała skutecznie, ujawniając poziom genetycznej odporności lub podatności z wysokim prawdopodobieństwem. Żaden z badanych obiektów nie dorównał poziomem przeżycia

wzorcowi odporności (odmiana Kalif) w terminie końcowej obserwacji. Pomimo tego 4 najlepsze obiekty (W-411, W-417, W-405, W-408) można uznać za formy odporne, ponieważ w stadium kwitnienia miały wyniki bardzo zbliżone do wzorca odporności (od 98,6% do 100% przeżycia) i końcowe wyniki w zakresie 91,2% - 95,2%. Wymienione linie posiadają genetyczną odporność przeciwko patogenom z rodzaju *Fusarium* i mogą być jej źródłem w dalszych pracach. W doświadczeniu na polu fuzarialnym z łubinem żółtym średni odsetek roślin żywych w końcowym terminie wynosił od 11,1% do 100%. U odmian wzorcowych przeżycie wynosiło 100% (Parys) i 87,3% (Lord). Średnie przeżycie roślin odmiany odpornej Lord wyraźnie poniżej 90% oznacza, że presja selekcyjna była wyjątkowo wysoka i wyniki testu są miarodajne. Potwierdza to również bardzo szeroki zakres zmienności - spadek przeżywalności u form podatnych do 11%. Wyniki pozwalają wskazać 3 obiekty (Z-563, Z-526 i Z-505) jako odporne i nadające się do wykorzystania jako źródła genetycznej odporności. Uzasadnieniem takiego wniosku jest odsetek roślin „żywych” wynoszący 100% w obydwu powtórzeniach i fakt, że zostały wytypowane do testu z segregującego potomstwa kombinacji odpornościowych, jako linie odporne. 15 innych obiektów miało pełną obsadę (100%) w końcowym terminie i z pewnością należą do genotypów o wysokiej odporności, jednak uznanie ich za użyteczne źródła odporności wymaga potwierdzenia i sprawdzenia stabilności genotypów.

Odporność na porażenie antraknozą łubinów (*Colletotrichum lupini*) przebadano na 40 obiektach (plus obiekty kontrolne) w doświadczeniu polowym oraz szklarniowym. Metodą selekcji negatywnej odrzucono obiekty podatne – czyli takie, u których został przekroczony określony poziom nasilenia objawówporażenia. W doświadczeniu polowym 2017 oznaczało to odrzucenie obiektów, w których odsetek porażonych strąków był równy lub większy niż 20% i stopień porażenia tych strąków był równy lub większy niż 5 w skali 0-9. Przy takich kryteriach selekcji tylko 8 obiektów (Z-632, Z-638, Z-630, Z-652, Z-669, Z-610, Z-639, Z-611) w obu powtórzeniach spełniało postawione wymagania. Ze względu na wysoki średni poziom porażenia w roku 2017, do najciekawszych obiektów, które mogą posiadać wysoką odporność na antraknozę można zaliczyć jeszcze dwa (Z-651, Z-640), u których jedynie stopień porażenia nieznacznie przekroczył określony poziom.

Zestawienie wyników w testach polowych i szklarniowych daje największe prawdopodobieństwo właściwej oceny odporności badanych obiektów. Należy również uwzględnić to, że wśród testowanych obiektów był rośliny w różnych pokoleniach i w potomstwie młodszych pokoleń może jeszcze nastąpić segregacja od względem poziomu odporności. Oznacza to, że w kolejnych latach możliwe będzie znalezienie genotypów odpornych wśród potomstwa, mimo tego, że u form rodzicielskich w teście polowym zaobserwowano niewielkie porażenie. Z wymienionych powodów warte uwagi mogą być kolejne obiekty: Z-698 (pokolenie F3 w roku 2017) i Z-641, Z-642, Z-643, Z-630 (pokolenie F4 w roku 2017).

## **Wnioski**

1. Wykazano zaangażowanie badanych genów kandydatów w odporność na więdnienie fuzaryjne łubinu żółtego.
2. Wśród analizowanych prób łubinu żółtego i wąskolistnego na wyróżnienie zasługuje bardzo niska zawartość alkaloidów - na poziomie dziesięciotysięcznych części procenta.

3. Genotypy o bardzo wysokiej odporności na wędnięcie fuzaryjne są nieliczne w łubinie wąskolistnym, jednak test na polu „fuzarialnym” pozwala na ich wyodrębnienie spośród badanych materiałów. Znalaziono 4 genotypy o poziomie odporności wzorca.
4. W łubinie żółtym przeciętny poziom odporności na wędnięcie fuzaryjne jest wyższy i liczba obiektów posiadających geny odporności jest większa. Dzięki kontynuacji testów udało się wskazać 3 obiekty, które mają bardzo wysoką odporność i mogą być wykorzystane jako źródło genów odporności.
5. Znalezienie genetycznej odporności na antraknozę jest trudne i wymaga kompleksowej oceny w różnych warunkach wegetacji. Wysoka zgodność wyników obserwacji z doświadczeń polowych i szklarniowych pozwoliła wskazać przynajmniej dwa genotypy, które mogą być źródłem genetycznej odporności na antraknozę. Uzyskanie stabilnych genotypów, łączących odporność i niską zawartość alkaloidów, wymaga dalszych testów i selekcji.

Prezentacja wyników na konferencjach:

Barzyk P., Święcicki W. Ocena odporności na antraknozę (*Colletotrichum lupini*) wybranych kombinacji krzyżówkowych łubinu żółtego. – poster na konferencji "Zasoby Genowe Roślin Użytkowych na Rzecz Hodowli", 6-8.IX.2017, Kazimierz Dolny, zeszyt streszczeń str. 63. (wyniki badań z 2016 r, sprawozdanie str. 6-20).