

## Zadanie 39

Tytuł zadania: **Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne**

Kierownik zadania: dr Michał Książkiewicz

### Sprawozdanie merytoryczne 2017 - streszczenie

Zasadniczym celem Zadania realizowanego w okresie 2014–2020 jest analiza zmienności ważnej cechy użytkowej - wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego. W ramach tego zadania prace prowadzone w 2017 roku dotyczyły czterech tematów badawczych, których cele szczegółowe były następujące:

1. **Poznanie zmienności ważnej cechy użytkowej**, terminu kwitnienia, w liniach kolekcyjnych łubinu żółtego oraz otrzymanie linii pokolenia F4 z krzyżówek łubinu żółtego ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14.
2. **Identyfikacja miejsc polimorficznych** różnicujących linie rodzicielskie populacji mapującej łubinu żółtego w obrębie sekwencji homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia.
3. **Uzyskanie zestawu klonów BAC** zawierających kopie znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia i ich wstępna charakterystyka cytogenetyczna w chromosomach łubinu żółtego.
4. **Opracowanie markerów do rutynowego genotypowania** czterech głównych QTL cechy wczesności kwitnienia łubinu białego i określenie za ich pomocą profilu tych QTL w światowej kolekcji tego gatunku.

Wszystkie cele zostały zrealizowane zgodnie z założeniami.

### Temat badawczy 1

Na podstawie danych uzyskanych wcześniej z Oddziału Wiatrowo Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. oraz obserwacji fenotypowych prowadzonych w ramach realizacji zadania nr 39 w ubiegłym roku wybrano 110 linii reprezentujących występujący w kolekcji łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L) zakres zmienności zarówno w zakresie terminu kwitnienia, jak i dojrzewania strąków. Dodatkowo do doświadczenia pozyskano nasiona linii rodzicielskich populacji mapującej, PRH444/14 i Parys.

Doświadczenie ukierunkowane na ocenę terminu kwitnienia zostało założone w warunkach szklarniowych (z wernalizacją i bez wernalizacji). Prowadzony był codzienny monitoring roślin. Zarejestrowana została liczba dni od wysiania do utworzenia pąków, początku kwitnienia, końca kwitnienia oraz dojrzałości większości strąków na roślinie.

Wykazano znaczną zmienność terminu kwitnienia w materiałach kolekcyjnych łubinu żółtego, które obejmowały odmiany, rody hodowlane, mutanty i populacje dzikie. Zmienność ma charakter ciągły, co świadczy o tym, że cecha jest warunkowana przez wiele genów.

Podobne wyniki uzyskano w badaniach terminu kwitnienia i odpowiedzi na wernalizację w kolekcji australijskiej łubinu żółtego.

W celu przygotowania materiałów łubinu żółtego w kolejnych latach wysiano nasiona dwóch kombinacji krzyżówkowych ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14. Aby uniknąć zapylenia przez owady, rośliny były izolowane. Strąki zbierane były wczesną jesienią i ręcznie obrabiane.

Prowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Cecha wczesności kwitnienia łubinu żółtego jest cechą ilościową, którą najprawdopodobniej warunkuje kilka niesprzężonych ze sobą genów.
2. Występujące w kolekcji linie wczesnie dojrzewające nie wykazują przyspieszenia dojrzewania po zastosowaniu wernalizacji, a więc skrócenie terminu od wysiania do inicjacji kwitnienia poprzez krzyżowania z liniami całkowicie termoneutralnymi może nie wpłynąć na wymaganą przez łubin żółty długość okresu wegetacyjnego.
3. Linie rodzicielskie wyprowadzanej populacji wykazują pośrednią, ale powtarzalną różnicę w terminie kwitnienia i wymaganiach wernalizacyjnych w stosunku do zmienności

występującej w kolekcji, natomiast reprezentują szeroki zakres zmienności dojrzewania strąków i będą także przydatne do badania genów warunkujących tę cechę.

## **Temat badawczy 2**

Na podstawie danych literaturowych oraz wyników uzyskanych w toku realizacji zadania w ramach projektu MRiRW w latach 2014-2016 wybrano zestaw sekwencji obejmujący geny z różnych szlaków indukcji kwitnienia:

- integratory szlaków indukcji kwitnienia: FLOWERING LOCUS T (FT), UNI=LEAFY (UNI=LFY)
- geny ze szlaku wernalizacyjnego: FRIGIDA (FRI), VERNALIZATION INDEPENDENCE 3 (VIP3)
- geny ze szlaku autonomicznego: FLOWERING LOCUS D (FLD), FLOWERING PROTEIN A (FPA), FY, SQUAMOSA6 (SPL6),
- gen inicjujący kwitnienie w odpowiedzi na stresy abiotyczne: BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)
- geny indukujące kwitnienie w zależności od temperatury TERMINAL FLOWER 1 (TFL1), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4),
- geny ze szlaku fotoperiodycznego: CYCLIC DOF FACTOR 3 (CDF3),
- regulacja dojrzewania nasion, MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT),
- geny indukcji kwitnienia w ramach rytmu dobowego EARLY FLOWERING 1 (ELF1), EARLY FLOWERING 3 (ELF3), EARLY FLOWERING 4 (ELF4), SKI-INTERACTING PROTEIN (SKIP1)

Utworzony zestaw 21 sekwencji został przyrównany do referencyjnego, opublikowanego transkryptomu łubinu żółtego. Zidentyfikowane sekwencje były następnie poddane mapowaniu do genomu łubinu wąskolistnego w celu identyfikacji granic intron/ekson oraz oszacowania hipotetycznej długości intronów. Na tej podstawie zostały wybrane miejsca do zaprojektowania starterów do PCR. Startery zostały użyte do amplifikacji PCR na matrycy DNA linii rodzicielskich populacji mapującej łubinu żółtego PRH 444/14 i Parys, a także dwóch linii z kolekcji (Valle dos Peixes 3 i Idol). Produkty PCR zostały oczyszczone i poddane sekwencjonowaniu. Na tej podstawie zostały zidentyfikowane miejsca polimorfizmu sekwencji DNA.

Metodą PCR analizowano łącznie 136 par starterów. Otrzymano specyficzne produkty reakcji PCR dla 118 par starterów. Produkty PCR dla 97 par starterów poddano sekwencjonowaniu. Poprawny wynik sekwencjonowania produktów PCR uzyskanych na matrycy DNA min. 2 linii otrzymano dla 86 par starterów. Polimorfizm sekwencji zidentyfikowano w przypadku 29 par starterów. Uzyskano 29 markerów polimorficznych różniących się sposobem detekcji:

- polimorfizm długości produktu PCR – 3 markery
- CAPS – 20 markerów
- dCAPS – 6 markerów.

Prowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Obserwowany poziom polimorfizmu między linią wczesną a późną łubinu żółtego jest zbliżony do tego, który występuje u łubinu wąskolistnego i białego.
2. Loci polimorficzne zidentyfikowane w sekwencjach genów związanych z procesem indukcji kwitnienia będą mogły być wykorzystane do zaprojektowania markerów molekularnych i genotypowania linii z populacji mapującej oraz z kolekcji łubinu żółtego.

## **Temat badawczy 3**

Do analiz wybrano 6 homologów genów kwitnienia, które zmapowano w poprzednich latach w genomie łubinu białego w obrębie loci QTL wczesności kwitnienia lub te, które według danych literaturowych mogą pełnić szczególnie istotną funkcję w regulacji procesu kwitnienia. Sondy zostały uzyskane poprzez amplifikację PCR na matrycy genomowego DNA *L. angustifolius* z użyciem starterów. Oczyszczony DNA sondy był zsekwencjonowany w celu weryfikacji poprawności amplifikacji, a następnie znakowany metodą „random priming” z użyciem tzw. fragmentu Klenowa w obecności nukleotydów, z których jeden,

dCTP, zawierał podstawiony izotop fosforu  $^{32}\text{P}$ . Wyznakowane sondy były hybrydyzowane z makromacierzami biblioteki BAC. Weryfikacja pozytywnych sygnałów hybrydyzacyjnych została przeprowadzona za pomocą PCR na matrycy DNA wyizolowanego z klonów BAC i przy użyciu starterów specyficznych dla danej sondy. Wykonano sekwencjonowanie końców insertów klonów BAC, a następnie uszeregowano klony w kontigi poprzez przyrównanie tych końców do sekwencji genomu łubinu wąskolistnego.

W analizie regionów genomu łubinu żółtego, zawierającego homologi genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia, została wykorzystana metoda cytogenetyki molekularnej – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* z wykorzystaniem klonów BAC z biblioteki genomowej jako sond molekularnych (BAC-FISH). Wyselekcjonowane klony/sekwencje zostały wyznakowane znacznikami fluorescencyjnymi, a następnie użyte do hybrydyzacji do chromosomów mitotycznych na preparacie cytologicznym. Dla zwiększenia czułości metody zostały też przygotowane preparaty chromosomów w stadium pachytenu.

W toku realizacji tego tematu uzyskano zestaw klonów zawierający sekwencje genów: BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT), FRIGIDA1 (FRI1), FLOWERING LOCUS T, MFT (MOTHER OF FT AND TFL1) i LUMINIDEPENDENS (LD). Na podstawie mapowania klonów BAC w genomie łubinu żółtego (*L. luteus*) określono ich lokalizację oraz wzór hybrydyzacji. Wśród 27 klonów BAC zidentyfikowano 4 'unikatowe' klony (typu single locus), natomiast pozostałe klony hybrydyzowały do wielu loci u łubinu żółtego (repetytywne).

#### **Temat badawczy 4**

Podczas realizacji zadania w ramach projektu MRiRW w roku 2016 uzyskano sekwencyjnie zdefiniowane markery sprzężone z loci QTL wczesności kwitnienia. Pięć z tych QTL w niezależnych eksperymentach wykazało zbliżoną lokalizację. W roku 2017 w celu zawężenia zakresów QTL do wybrania markerów przeprowadzono dodatkowo złożone mapowanie interwałowe (ang. composite interval mapping) przy użyciu programu Windows QTL Cartographer V2.5 oraz złożone mapowanie interwałowe w skali genomu (ang. genome-wide composite interval mapping) korzystając z mrMLM. Wykonanie dodatkowych analiz w roku 2017 pozwoliło na zmniejszenie zakresów QTL do kilku/kilkunastu markerów dla każdego z loci. Ponadto uzyskano dodatkową ewaluację istotności statystycznej zidentyfikowanych loci. Sekwencje markerów sprzężonych z tymi QTL zostały przyrównane do sekwencji transkryptomu linii Kiev Mutant i P27174, a następnie wydłużone o zidentyfikowane transkrypty. Na matrycy tych sekwencji zostały zaprojektowane startery flankujące miejsca polimorficzne. Dla każdego z QTL wygenerowano po kilka markerów. Łącznie zaprojektowano startery do detekcji 19 markerów: dwie pary starterów amplifikujące geny wczesności kwitnienia, 15 par amplifikujących fragmenty transkryptów flankujące loci SNP i dwie pary starterów bezpośrednio zakotwiczone w sekwencji GBS.

Do detekcji polimorfizmu w toku mapowania genetycznego została wykorzystana metoda CAPS lub dCAPS - w zależności tego, czy istnieje enzym restrykcyjny rozpoznający daną sekwencję. Linie łubinu białego z kolekcji scharakteryzowane pod względem terminu kwitnienia (wymagań wernalizacyjnych) oraz polimorfizmu markerów zakotwiczonych w sekwencjach genów kwitnienia w toku realizacji projektu w latach 2014-2016 zostały poddane genotypowaniu przy użyciu nowo opracowanych markerów sprzężonych z loci QTL wczesności kwitnienia.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na wąskie tło genetyczne komponentów do krzyżowań użytych do wyprowadzenia linii Kiev Mutant. Najprawdopodobniej głównym donorem wczesności kwitnienia była linia z Salamanki (dla co najmniej dwóch loci QTL). Allel warunkujący późne kwitnienie w locus 1N pochodzi z Etiopii, co znacznie utrudnia, a w praktyce uniemożliwia uzyskanie linii wczesnych w pokoleniach po krzyżowaniu tej linii z Kiev Mutant. Wyjaśnia to trudności, jakie napotkano podczas australijskich prac hodowlanych przy tego typu krzyżowaniach (Adhikari i in. 2009, Adhikari i in. 2013).