

Zadanie 39

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

Kierownik zadania: prof. dr hab. Bogdan Wolko

Sprawozdanie merytoryczne 2014 - streszczenie

Przeprowadzone prace dotyczyły zmienności terminu kwitnienia w materiałach kolekcyjnych i w populacji mapującej łąbinu białego, jak również identyfikacji sekwencji homologów znanych genów procesu indukcji kwitnienia u tego gatunku i polimorfizmu tych sekwencji w liniach rodzicielskich populacji mapującej. Podstawą badań były analizy porównawcze sekwencji genomu łąbinu wąskolistnego, transkryptomów łąbinu białego oraz innych sekwencji zdeponowanych w bazach danych. Ponadto projekt obejmował przygotowanie materiału do analiz łąbinu żółtego - wykonanie krzyżowań linii łąbinu żółtego różniących się terminem kwitnienia.

Głównym celem projektu w roku 2014 było poznanie sekwencji, z genomu łąbinu białego, homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia. Analizy były kilkietapowe. Najpierw sekwencje referencyjne homologów (wybranych na podstawie danych literaturowych) zostały przyrównane do dostępnych scaffoldów projektu sekwencjonowania genomu łąbinu wąskolistnego. Dla szeregu genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia zidentyfikowano po kilka scaffoldów pochodzących z genomu łąbinu wąskolistnego: m.in. dwa dla siedmiu genów, trzy i cztery dla trzech genów, sześć i osiem dla jednego genu. Potwierdza to przyjętą wcześniej hipotezę zakładającą, że znaczna liczba genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia występuje w kilku kopiach. Wykorzystując sekwencje scaffoldów łąbinu wąskolistnego wykazujących istotne statystycznie podobieństwo do sekwencji homologów genów kwitnienia, przeszukano bazę danych sekwencji transkryptomu łąbinu białego. Mapowanie porównawcze sekwencji transkryptomu łąbinu białego do scaffoldów łąbinu wąskolistnego wykazało, że także u łąbinu białego znaczna liczba genów występuje w postaci loci zduplikowanych. Z analizy danych literaturowych wynika, że stosunkowo niewielka liczba genów u strączkowych występuje w pojedynczej kopii. Uważa się, że łąbiny przeszły więcej niż jedną rundę duplikacji całego genomu, a proces/y poliploidyzacji został/y zamaskowane w toku ewolucji poprzez liczne i złożone rearanżacje genomowe. Mapowanie porównawcze genomu łąbinu wąskolistnego i wybranych genomów roślin strączkowych (*Medicago truncatula* i *Lotus japonicus*) wykazało, że w genomie występują regiony, które prawdopodobnie uległy duplikacjom i triplikacjom. Następnie, na podstawie wyselekcjonowanych sekwencji cDNA łąbinu białego reprezentujących homologi znanych genów uczestniczących w regulacji procesu indukcji kwitnienia, zaprojektowano startery do reakcji PCR. Amplifikację prowadzono na matrycy DNA wyizolowanego m.in. z linii rodzicielskich populacji mapującej łąbinu białego. Uzyskane fragmenty DNA zostały poddane sekwencjonowaniu. W wyniku porównania sekwencji uzyskanych na matrycy obu linii rodzicielskich zostały zidentyfikowane polimorfizmy typu SNP. Zaobserwowany poziom polimorfizmu sekwencji między liniami rodzicielskimi populacji mapującej łąbinu białego jest stosunkowo niski - średnio dla co dziesiątej pary starterów uzyskiwano polimorficzne produkty. Oznacza to, że w celu poznania lokalizacji genetycznej wszystkich badanych genów będzie konieczne wykonanie większej liczby analiz niż pierwotnie zakładano. Z danych literaturowych wynika, że w światowej kolekcji łąbinu białego poziom polimorfizmu DNA jest znacznie wyższy niż w obrębie populacji mapującej.

W toku realizacji projektu w 2014 roku, wykonano także (w warunkach szklarniowych, bez wernalizacji) doświadczenie ukierunkowane na ocenę terminu kwitnienia w populacji mapującej i liniach kolekcyjnych łąbinu białego. Populacja mapująca liczy 191 rekombinantów wsobnych

pokolenia F₈, kombinacji krzyżówkowej Kiev Mutant i linii dzikiej P27174. Linie kolekcyjne zostały natomiast wybrane na podstawie obserwacji terminu kwitnienia prowadzonych w poprzednich latach w ramach doświadczeń we współpracujących z Instytutem stacjach hodowlanych (Hodowla Roślin Smolice, Oddział Przebędowo i Poznańska Hodowla Roślin, Oddział Wiatrowo). Zmienność terminu kwitnienia w populacji mapującej łąbinu białego była zgodna z danymi literaturowymi. Zakres zmienności terminu kwitnienia w materiałach kolekcyjnych był większy niż w populacji mapującej. Jest to przyczynek do postawienia hipotezy, że w niektórych liniach kolekcyjnych występują dodatkowe geny bądź formy genów nie występujące w populacji mapującej. W celu poznania podłoża molekularnego cechy wczesności kwitnienia w całej puli genowej konieczne jest więc włączenie tych linii do genotypowania za pomocą wysokoprzepustowego sekwencjonowania końców 3' cDNA (MACE).

Wykonano także prace ukierunkowane na wyselekcjonowanie z biblioteki BAC genomu jądrowego łąbinu wąskolistnego klonów do heterologicznych analiz cytogenetycznych (BAC-FISH) w kolejnych latach projektu. Pierwszym etapem była adnotacja funkcjonalna sekwencji z genomu łąbinu wąskolistnego – zidentyfikowano geny oraz sekwencje powtarzalne. Do przygotowania sond do hybrydyzacji z biblioteką wybrano te scaffoldy z łąbinu wąskolistnego, w których elementy repetytywne stanowiły łącznie nie więcej niż 1,5% długości całej sekwencji. Amplifikacja PCR została przeprowadzona na matrycy DNA łąbinu wąskolistnego odmiany Sonet. Rozdzielone za pomocą elektroforezy fragmenty DNA zostały wyizolowane z żelu i oczyszczone, następnie wyznakowane radioaktywnie metodą „random priming”. Wyznakowane fragmenty DNA zostały użyte jako sondy do hybrydyzacji z makromacierzami biblioteki BAC. Sondy zawierały fragmenty następujących genów: LUMIDEPENDENS (LD), FCA, EARLY FLOWERING 6 (ELF6), SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1), VERNALIZATION 5 (VRN5). Dla każdej z sond uzyskano pozytywne sygnały hybrydyzacyjne - łącznie z biblioteki wyselekcjonowano 53 klony BAC. Klony wykazujące pozytywne sygnały hybrydyzacyjne pobrano z biblioteki. DNA, wyizolowany z klonów BAC, został poddany reakcji trawienia restrykcyjnego, a produkty rozdzielono elektroforetycznie. Końce klonów BAC zostały zsekwencjonowane.

Ponadto, w Oddziale Przebędowo Hodowli Roślin Smolice została wysiana populacja mapująca łąbinu białego w celu namnożenia materiału siewnego. Rośliny były izolowane, aby uniknąć zapylenia przez owady. Strąki zebrano wczesną jesienią, uzyskując min. 50 nasion dla każdej linii. W celu przygotowania nowej populacji mapującej do przyszłych badań łąbinu żółtego, w Przebędowie wykonano krzyżowania odmiany wczesnie kwitnącej, termoneutralnej, nierozgałęziającej się, zdeterminowanej (syn. samokończącej, epigonalnej), o nasionach białych i pomarańczowym kolorze kwiatu, z odmianą Parys, późno kwitnącą, nietermoneutralną, rozgałęziającą się, o nasionach nakrapianych czarnym pigmentem. Dla obu układów linii rodzicielskich uzyskano po kilkadziesiąt nasion pokolenia F₁.