

SPRAWOZDANIE

z realizacji zadania nr 41 na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2014 roku

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. Wojciech Święcicki

Wykonawcy: dr Magdalena Kroc, mgr Katarzyna Kamel, mgr Mateusz Wilczura/ Paulina Kiziak, mgr Paweł Barzyk

Cel zadania:

1. Sekwencjonowanie RNA 4 linii łubinu żółtego różniących się odpornością na fuzariozę.
2. Połączenie niskiej zawartości alkaloidów z odpornością na patogeny grzybowe (*Colletotrichum lupini* i *Fusarium*) w zróżnicowanym podłożu genotypowym o dużej wartości użytkowej.

Więdnienie fuzaryjne powodowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* stanowi poważne zagrożenie w uprawie łubinów. W warunkach sprzyjających rozwojowi choroby, szczególnie w latach wilgotnych, porażenie może doprowadzić do dużych uszkodzeń, a nawet całkowitego zniszczenia plantacji łubinów. Spośród uprawnych gatunków łubinów, łubin żółty cechuje się najwyższą odpornością na fuzariozę, warunkowaną genem *Fus1*. Niestety podłoże molekularne tej cechy nie zostało jeszcze poznane, dlatego w ramach realizacji zadania podjęta zostanie próba identyfikacji genów zaangażowanych w odporność łubinu żółtego na fuzariozę z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania nowej generacji – RNA-Seq.

Do eksperymentu wybrano 4 linie łubinu żółtego. Dwie linie wywodzą się z tego samego rodu hodowlanego, który w dalszych pokoleniach segregował na genotypy bardziej odporne i bardziej podatne na *Fusarium* oraz dwie odmiany hodowlane uwzględniane w doświadczeniach polowych jako wzorzec odporności i podatności na fuzariozę, odpowiednio Lord i Perkoz. Materiał roślinny wybrany do sekwencjonowania pochodził z roślin rosnących zarówno w typowych warunkach polowych, jak i na polu z wieloletnią monokulturą

łubinową, dodatkowo sztucznie infekowanych grzybami z rodzaju *Fusarium* (tzw. pole prowokacyjne). Doświadczenie prowadzono w dwóch powtórzeniach biologicznych. Sekwencjonowanie transkryptomu przeprowadzono łącznie dla 16 prób w technologii firmy Illumina metodą sekwencjonowania dwukierunkowego i odczytami długości 75 bp (PE 2x75bp).

W wyniku sekwencjonowania transkryptomu linii łubinu żółtego uzyskano ponad 73 mln odczytów o dobrej jakości dla każdej linii. Dzięki uzyskaniu tak dużej ilości danych sekwencyjnych oraz zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania bioinformatycznego możliwa stanie się rekonstrukcja *de novo* transkryptomów linii łubinu żółtego różniących się odpornością na *Fusarium*. Przeprowadzona w dalszej kolejności analiza ekspresji różnicowej linii podatnych i odpornych pozwoli na identyfikację genów zaangażowanych w odporność na fuzariozę.

Drugim celem zadania były krzyżowania zbliżające z uwzględnieniem pożądanых cech (odporność na patogeny grzybowe - *Colletotrichum lupini* i *Fusarium* oraz niska zawartość alkaloidów w nasionach) i genotypów użytkowych. Materiał do krzyżowań stanowiły odmiany uprawne łubinu żółtego i wąskolistnego oraz źródła niskiej zawartości alkaloidów i odporności na patogeny grzybowe. Do analiz i testów wykorzystano segregujące populacje mieszańcowe w pokoleniach F5-F8. Krzyżowania wykonano tradycyjną metodą. Zawartość alkaloidów ogółem oraz skład jakościowy oznaczono za pomocą techniki chromatografii gazowej. Testy fitopatologiczne przeprowadzono w warunkach kontrolowanych, szklarniowych i polowych w zależności od biologii patogena. Odporność na *Fusarium* testowano na „polu prowokacyjnym” na którym przez minimum 10 lat uprawiano łubin, nie stosując żadnej przerwy w płodozmianie. Poziom odporności obiektów/linii oceniono i wyrażono jako odsetek roślin, które przeżyły (łubin wąskolistny – 1 strąk/roślinę, łubin żółty – 1 okółek ze strąkami/roślinę). Ocenę poziomu podatności/odporności wybranych materiałów na porażenie antraknozą wykonano w osobnych doświadczeniach, w warunkach polowych i szklarniowych. Test szklarniowy wykonano przy zastosowaniu wystandaryzowanej procedury w klimatyzowanej szklarni. Test polowy podatności/odporności na porażenie antraknozą polegał na ocenie porażenia łodyg i strąków w trakcie wegetacji w polu, przy zastosowaniu agrotechniki typowej dla gatunku, z wyjątkiem ochrony za pomocą fungicydów.

W wyniku realizacji zadania uzyskano nowe genotypy mieszańcowe ze skrzyżowania form o niskim poziomie alkaloidów i wysokiej odporności na choroby grzybowe (antraknoza i fuzarioza). Zawartość i skład alkaloidów w łubinie żółtym i wąskolistnym jest bardzo

zróżnicowany. Krzyżowania i selekcja pozwalają na wprowadzenie dużych zmian w składzie jakościowym oraz ilościowym. Możliwa jest całkowita eliminacja pojedynczych alkaloidów oraz uzyskanie form o ogólnej zawartości poniżej 0,01% suchej masy.

Genotypy o wysokiej odporności na wędnięcie fuzaryjne są nieliczne w łubinie wąskolistnym, jednak możliwe jest ich znalezienie. Już jednokrotny test na polu fuzarialnym ujawnił przynajmniej jeden genotyp, który może być źródłem odporności. W łubinie żółtym przeciętny poziom odporności na wędnięcie fuzaryjne jest wyższy i liczba obiektów posiadających geny odporności jest większa. Wyselekcjonowanie najcenniejszych genotypów wymaga ponownych testów.

Znalezienie genetycznej odporności na antraknozę jest trudne i wymaga kompleksowej oceny w różnych warunkach wegetacji. Zestawienie obserwacji z doświadczeń polowych i szklarniowych pozwala wskazać obiekty, które z dużym prawdopodobieństwem posiadają genetyczną odporność na antraknozę. Uzyskanie stabilnych genotypów, łączących odporność i niską zawartość alkaloidów, wymaga dalszych testów i selekcji potomstwa wybranych materiałów i stworzonych mieszańców.