

Zadanie 39

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

Kierownik zadania: dr Michał Książkiewicz

Sprawozdanie merytoryczne 2016 - 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 zadania prace w roku 2016 dotyczyły czterech tematów badawczych:

1. Określenie **zmienności terminu kwitnienia** w materiałach kolekcyjnych **łubinu żółtego** i otrzymanie linii pokolenia F_3 z krzyżówek łubinu żółtego ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14.
2. Poznanie **liczby kopii w genomie łubinu białego** dla 20 homologów genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia oraz rekonstrukcja **drzew filogenetycznych** dla sekwencji tych genów w obrębie rodziny roślin strączkowych (bobowatych).
3. **Lokalizacja na mapie genetycznej łubinu białego** sekwencji homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia oraz ocena sprzężenia tych genów z cechą wczesności kwitnienia w populacji mapującej i grupie linii kolekcyjnych oraz odmian uprawnych.
4. Uzyskanie **profilu ekspresji** pięciu genów uczestniczących w **indukcji kwitnienia** w odpowiedzi na fotoperiod i wernalizację u linii **łubinu białego** różniących się terminem kwitnienia i wymaganiami wernalizacyjnymi.

Temat badawczy 1

Z Oddziału Wiatrowo Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. uzyskano wyniki obserwacji prowadzonych w latach ubiegłych w ramach rutynowej oceny kolekcji łubinu żółtego - liczbę dni od wysiania nasion do: początku i końca kwitnienia oraz dojrzewania strąków. Wybrano 110 linii reprezentujących zakres zmienności cech terminu kwitnienia i dojrzewania strąków. 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 prawdopodobnie warunkuje kilka niesprzężonych ze sobą genów.
2. Występujące w kolekcji linie wcześniej 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 niewielką różnicę w terminie kwitnienia i wymaganiach wernalizacyjnych w stosunku do zmienności występującej w kolekcji, natomiast różnią się znacznie terminem dojrzewania strąków i mogą być przydatne do badania genów warunkujących tę cechę.

Temat badawczy 2

Celem badań było poznanie liczby kopii w genomie łubinu białego dla 20 homologów genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia oraz rekonstrukcja drzew filogenetycznych dla sekwencji tych genów w obrębie rodziny roślin strączkowych.

W toku realizacji zadania w latach 2014-2015 uzyskano zestaw sekwencji mRNA z łubinu białego reprezentujących 41 genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia i ich kopie. Sekwencje te pochodzą z transkryptomu referencyjnego, linii rodzicielskich populacji mapującej i z sekwencionowania MACE. Sekwencje te zostały poddane translacji in silico względem sekwencji z *Glycine max*. Do dalszych analiz wybrano 28 genów. Sekwencje tych genów zostały przyrównane do sekwencji genomów 10 gatunków roślin strączkowych. Na tej podstawie zostały wybrane regiony genomu, które zostały poddane translacji in silico względem referencyjnych sekwencji białka. Na podstawie wnioskowania bayesowskiego skonstruowano **konsensusowe drzewa** ilustrujące hipotetyczny przebieg **ewolucji poszczególnych kopii** tych genów.

Mapowanie porównawcze wykazało, że część tych genów występuje prawdopodobnie w dwóch lub więcej kopiach. W celu precyzyjnego określenia liczby kopii badanych genów w genomie łubinu białego została przeprowadzona reakcja digital droplet PCR (ddPCR) we współpracy z zespołem dr. Jana Podkowińskiego z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Uzyskane wyniki sugerują, że w toku ewolucji roślin strączkowych występowało zjawisko **duplikacji całego genomu**. Z danych literaturowych wynika, że taka duplikacja nastąpiła ok. 45-65 milionów lat temu tuż przed rozejściem się linii ewolucyjnych dających początek poszczególnym kladom. Ponadto, nastąpiły niezależne duplikacje u części linii ewolucyjnych, np. w kładach Mimosoideae-Cassiinae-Caesalpinieae, Detarieae, Cercideae i *Lupinus*, datowane na 25-35 mln lat temu. Niektóre z duplikacji całego genomu wystąpiły stosunkowo niedawno, np. 13 mln lat temu u soi oraz kilka mln lat temu u orzeszków ziemnych (*Arachis*). Pozostałością po tych duplikacjach mogą być zachowane w genomie dodatkowe kopie genów. Pomimo duplikacji całych genomów, jakie zaszły u części badanych gatunków strączkowych, niektóre geny są aktualnie w jednej kopii. Wskazuje to na istnienie mechanizmów, które doprowadziły do specyficznej **eliminacji nadmiarowych kopii** tych genów w niezależnie rozwijających się liniach ewolucyjnych. Najwięcej loci zduplikowanych zidentyfikowano u soi i łubinu wąskolistnego, co może mieć związek z epizodami duplikacji całego genomu, jakie nastąpiły w toku ewolucji obu tych gatunków.

Temat badawczy 3

Celem badań była lokalizacja na mapie genetycznej łubinu białego sekwencji homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia oraz ocena sprzężenia tych genów z cechą wczesności kwitnienia w populacji mapującej i grupie linii kolekcyjnych oraz odmian uprawnych.

Korzystając z przyrównań sekwencji wykonanych podczas realizacji tematu badawczego nr 2, wykonano adnotację intronów i eksonów. Ze względu na ograniczenia w postaci długości sekwencji kodującej, długości intronów i dostępnych miejsc wiązania starterów spełniających ww. kryteria, analizie poddane zostały 22 homologi genów kwitnienia. Do detekcji polimorfizmu w toku mapowania genetycznego zostały wykorzystane metody: PCR, CAPS, dCAPS - w zależności od tego, czy istniał enzym restrykcyjny rozpoznający daną sekwencję. Segregacja markerów była testowana w puli 196 linii wsobnych pokolenia F₉ kombinacji krzyżówkowej Kiev Mutant × P27174. Segregacja wszystkich markerów w populacji mapującej spełniła kryterium testu zgodności chi-kwadrat z segregacją oczekiwaną.

W ramach realizacji projektu EU FP7 „LEGATO”, którego Instytut Genetyki Roślin PAN jest jednym z wykonawców, we współpracy z zespołem Centro di Ricerca per le Produzioni Foraggere e Lattiero-Casearie utworzono nową mapę genetyczną łubinu białego, która zawiera 3966 markerów, z tego 3668 sekwencyjnie zdefiniowanych, rozlokowanych w 25 grupach sprzężeń odpowiadających 25 chromosomom tego gatunku. Mapę tę wykorzystano do mapowania markerów uzyskanych w toku realizacji zadania nr 39. Przy założonych kryteriach istotności ($p=0,05$) **na mapie zlokalizowano 21 z 25 wygenerowanych**

markerów genetycznych. Markery otrzymane dla genów kwitnienia użyto do genotypowania linii kolekcyjnych, dla których termin kwitnienia i wymagania wernalizacyjne poznano w toku realizacji zadania w latach 2014-2015. Wyniki genotypowania zostały porównane z wynikami doświadczeń w warunkach kontrolowanych ukierunkowanych na ocenę terminu kwitnienia i odpowiedzi na wernalizację. Nie wykazano sprzężenia markerów z cechą, co stanowi potwierdzenie wyników mapowania genetycznego.

Markery genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia zlokalizowano na mapie genetycznej łąbinu białego w różnych grupach sprzężeń, ale innych niż te zawierające loci wczesności kwitnienia. Wskazuje to **inne podłoże molekularne tej cechy** niż u łąbinu wąskolistnego, soi, lucerny, komonicy i innych gatunków strączkowych. Geny, które uczestniczą w szlakach kwitnienia, są co prawda te same, co potwierdziły badania ekspresji techniką MACE w ubiegłym roku, ale loci z mutacją odpowiedzialną za termoneutralność lub obniżone wymagania fotoperiodu są inne niż u ww. gatunków.

Dzięki badaniom wykonanym w ramach tego tematu, znany jest poziom ekspresji tych genów dla 20 linii o różnym terminie kwitnienia. Stanowi to podstawę do dalszych badań genetycznych i fizjologicznych tego gatunku.

Na podstawie otrzymanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Znaczna liczba genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia występuje w genomie łąbinu białego **w kilku kopiach**.
2. **Gen *FTc1***, który u łąbinu wąskolistnego jest odpowiedzialny za termoneutralność (locus *Ku*), **nie warunkuje tej cechy u łąbinu białego**.

Temat badawczy 4

Celem badań było uzyskanie profilu ekspresji pięciu genów uczestniczących w indukcji kwitnienia w odpowiedzi na fotoperiod i wernalizację u linii łąbinu białego różniących się terminem kwitnienia i wymaganiami wernalizacyjnymi.

Podczas realizacji zadania w ramach projektu MRiRW w latach 2014-2015 wyselekcjonowano z kolekcji łąbinu białego linie znacznie różniące się terminem kwitnienia. Do doświadczenia w warunkach kontrolowanych została wybrana linia P.26780 o najpóźniejszym terminie kwitnienia (77-82 dni) oraz linia Kiev, kwitnąca najwcześniej (38-48 dni). Doświadczenie było założone w warunkach kontrolowanej temperatury, oświetlenia i wilgotności (Centrum Uprawy Roślin IGR PAN).

Geny do analiz zostały wybrane na podstawie zaangażowania w proces indukcji kwitnienia u gatunków modelowych (na podstawie danych literaturowych) oraz obecności w transkryptomie linii poddanej wernalizacji (na podstawie wyników w zadaniu nr 39 uzyskanych w latach 2014-2015). Wybór został dokonany na podstawie wyników oceny liczby kopii (analiza w temacie nr 2), mapowania genetycznego oraz wstępnej weryfikacji metodą PCR. Wśród wybranych genów znalazły się m.in. sekwencje z grupy FLOWERING LOCUS T, ponieważ jeden z tych genów, *LanFTc1*, odpowiada za cechę termoneutralności u łąbinu wąskolistnego, co wykazano podczas realizacji zadania MRiRW w latach 2011-2013.

Analiza poziomu ekspresji została wykonana na matrycy cDNA uzyskanego po przepisaniu wyizolowanego RNA. Detekcja produktu była przeprowadzona na zasadzie fluorescencji. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania zaimplementowanego w komputerze dostarczonym wraz z termocyklerem.

Obserwowany **profil ekspresji** tych genów w odpowiedzi na wernalizację i fotoperiod u łąbinu białego stanowi istotny przyczynek do wnioskowania, że regulacja terminu kwitnienia u tego gatunku odbywa się na wcześniejszych etapach tych szlaków. Wyniki analizy QTL wskazują, że są to co najmniej 4 różne loci. Dla porównania, u łąbinu wąskolistnego, cecha termoneutralności warunkowana jest przez delecję w regionie promotorowym genu *FTc1*.