

# SPRAWOZDANIE

## z realizacji zadania nr 41 na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 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 Paweł Barzyk, mgr Katarzyna Kamel, mgr Paulina Wilczura, mgr Katarzyna Czepiel

### **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.**

Na podstawie wyników analizy ekspresji różnicowej oraz adnotacji funkcjonalnej do analiz qPCR prowadzonych w 2016 roku wybrano 6 genów kandydackich (transkryptów), potencjalnie zaangażowanych w odporność na fuzariozę łubinu żółtego. Na podstawie dostępnych transkryptów dla wybranych genów, zaprojektowano startery do standardowej reakcji PCR. Do amplifikacji wykorzystano DNA odmian Lord i Perkoz wykorzystywanych w testach fitopatologicznych, jako wzorce odpowiednio odporności i podatności na *Fusarium* spp. Na podstawie sekwencji genomowego DNA potwierdzono homologię badanych genów, a poprzez zestawienie z sekwencją transkryptu zlokalizowano introny/egzony i zidentyfikowano drobne błędy w sekwencji transkryptów, często powstające w procesie składania krótkich odczytów RNA-seq. Zapewniło to 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%). Wartości ekspresji uzyskane dla genów badanych znormalizowano względem genów referencyjnych. Znormalizowaną wartość względnego poziomu ekspresji genów badanych w liniach porażonych analizowano względem kalibratora (prób nieporażonych). Wykazano wzrost poziomu ekspresji w liniach odpornych po infekcji.

#### **Ad. 2.**

W celu połączenia niskiej zawartości alkaloidów z odpornością na patogeny grzybowe (*Colletotrichum lupini* i *Fusarium* sp.) wykonano krzyżowania zbliżające, 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 Lazur, Wars i Rumba ze źródłem odporności na *Fusarium* sp. (ród W-336) oraz ze źródłem odporności na antraknozę (Sonate). W łubinie żółtym analogicznie połączono genotypy odmian uprawnych Bursztyn, Baryt, WTD2811, Talar ze źródłem odporności na *Fusarium* sp. (rody Z-505 i Z-526) i ze źródłem odporności na antraknozę (rody Z-537 i Z-538).

Za pomocą chromatografu gazowego przebadano 50 obiektów obu gatunków pod względem składu jakościowego alkaloidów, z uwzględnieniem procentowego udziału wszystkich zidentyfikowanych alkaloidów. W łubinie żółtym stwierdzono silne zróżnicowanie ogólnej zawartości alkaloidów, od 0,00064 do 0,118% sm. Zwraca uwagę 12 linii o zawartości na poziomie tysięcznych części procenta, a wyróżniają się dwie linie – 1.6 – 0,0006% i 1.50 – 0,00096%. Zróżnicowany był także skład jakościowy. We wszystkich liniach dominowała lupinina. Wystąpiły linie pozbawione ammodendryny i co najważniejsze – graminy (linia 1-5, 1.7-12, 1.14, 1.16, 1.18-23, 1.26-27, 1.31-33, 1.37 i 1.43. Na wyróżnienie zasługują linie o najniższej zawartości ogólnej i dodatkowo pozbawione graminy (1.7,9,26,37). Wśród badanych linii łubinu wąskolistnego stwierdzono zróżnicowanie od 0,00076% do 0,117% sm. nasion. Dwie linie miały zawartość alkaloidów na bardzo niskim poziomie, podobnie jak odmiana kontrolna Salsa (R93/13 i R 14/14). Ponadto można wyselekcjonować linie z zawartością na poziomie tysięcznych części procenta. Powyższe świadczy o dalszym postępie w wytworzeniu materiałów niskoalkaloidowych.

Odporność na wędnięcie fuzaryjne zbadano w doświadczeniach polowych u 20 obiektów łubinu wąskolistnego oraz 40 obiektów łubinu żółtego. Wyniki, wyrażone w procentach roślin „żywych” na poletku, były miarą podatności na porażenie. Wśród przetestowanych obiektów łubinu wąskolistnego zaobserwowano szeroki zakres zmienności sięgający od 30,1% do 100% przeżycia. Dwa badane obiekty miały stuprocentową obsadę podczas końcowej obserwacji (W-369 i W-382), tak samo jak wzorzec odporności (odmiana Kalif), co oznacza, że z pewnością posiadają genetyczną odporność przeciwko patogenom z rodzaju *Fusarium* i mogą być jej źródłem w dalszych pracach. Kolejne 6 obiektów nie miało już pełnej obsady w końcowym stadium wegetacji, lecz odsetek roślin żywych był na tyle wysoki (od 82,9% do 94,0% przeżycia), że również można je uznać za formy odporne i bardzo interesujące pod względem odporności na *Fusarium* sp. W doświadczeniu z łubinem żółtym odsetek roślin żywych w trzecim terminie wynosił od 0% do 100%, ze wzorcem odporności na poziomie 91,7%. Jako najpewniejsze źródło odporności można wskazać obiekt Z-525, ponieważ odsetek roślin „żywych” wynosił u niego 100% i dokładnie taki sam wynik uzyskał w poprzednim teście przeprowadzonym w roku 2015. Oprócz tego obiektu 5 innych osiągnęło wynik lepszy od wzorca odporności, dzięki czemu można je uznać za formy posiadające genetyczną odporność na wysokim poziomie. Spośród nich szczególnie warte uwagi są rody Z-559, Z-563 i Z-526, ponieważ wcześniej zostały wytypowane do testów z segregującego potomstwa kombinacji odpornościowych, jako linie odporne i eksperyment przeprowadzony w roku 2016 potwierdził trafność tego wyboru.

Odporność na porażenie antraknozą łubinów (*Colletotrichum lupini*) przebadano na 40 obiektach (plus obiekty kontrolne) w doświadczeniu polowym oraz szklarniowym. Wykonane obserwacje porażenia posłużyły do wyodrębnienia najlepszych obiektów, które mogą posiadać genetyczną odporność na antraknozę i być materiałem do dalszych badań oraz źródłem odporności. Metodą selekcji negatywnej odrzucono obiekty podatne – czyli takie, u których został przekroczony określony poziom nasilenia objawów porażenia. W doświadczeniu polowym w 2016 roku, 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 4 obiekty testowe (Z-615, Z-590, Z-594, Z-598), oraz 4 wzorcowe, w obu powtórzeniach spełniały całkowicie wymagania. W doświadczeniu szklarniowym ocena porażenia ujawniła dużą zmienność poziomu odporności w zakresie od 4,2 do 8,6 stopnia (w skali 0-9). W odniesieniu do testu polowego, najcenniejszymi obiektami okazały się dwa (Z-687, Z-686), u których wystąpiła największa zbieżność wyników w obu typach doświadczeń.

### **Wnioski**

1. Wykazano zaangażowanie badanych genów kandydatów w odporność na wędnięcie fuzaryjne łubinu żółtego.
2. Wśród analizowanych linii łubinu żółtego i wąskolistnego zwracają uwagę genotypy o zawartości alkaloidów na poziomie tysięcznych części procenta, co świadczy o dalszym postępie w wytworzeniu materiałów niskoalkaloidowych.
3. Genotypy o wysokiej odporności na wędnięcie fuzaryjne są rzadkie w łubinie wąskolistnym, jednak test na polu fuzarialnym bardzo skutecznie je ujawnił. Znalezione przynajmniej dwa genotypy, które mogą być źródłem tej odporności.
4. W łubinie żółtym przeciętny poziom odporności na wędnięcie fuzaryjne jest wyższy i liczba obiektów posiadających geny odporności jest większa, co utrudnia wyodrębnienie najlepszych genotypów, jednak dzięki kontynuacji testów udało się wskazać przynajmniej jeden obiekt, który ma bardzo wysoką odporność i może być wykorzystany 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 w tym roku 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 potomstwa wybranych materiałów i stworzonych mieszańców.

Prezentacja wyników na konferencjach:

1. Kroc M, Kamel K, Święcicki W. Selection of reliable reference genes for expression analyses in yellow lupin subjected to *Fusarium* spp. – poster na konferencji, P7.8 (wyniki badań z 2015 r, sprawozdanie str. 10-14).
2. Kamel KA, Święcicki W, Kaczmarek Z, Barzyk P (2016) Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) collection. Genet Resour Crop Evol 63:711-719 (wyniki z lat 2014-2015, w szczególności porównania segregujących materiałów pokrzyżówkowych, na tle wyjściowych form rodzicielskich (sprawozdanie rok 2014 – str. 9-10, 2015 – str. 18-19).