

Tytuł zadania:

Doskonalenie mapy genetycznej łubinu wąskolistnego i poszukiwanie markerów sprzężonych z cechami użytkowymi ze szczególnym uwzględnieniem zawartości białka i alkaloidów

Okres realizacji:

Rok 2023

Kierownik zadania:

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
dr hab. Michał Książkiewicz, mksi@igr.poznan.pl

Zespół wykonawców:

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk:
dr Wojciech Bielski
mgr inż. Anna Surma
Sonia Nowak (pracownik techniczny)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
dr hab. inż., prof. UP Renata Galek
dr Bartosz Kozak
dr Sandra Rychel-Bielska
mgr inż. Barbara Wiśniewska, mgr Marta Buzar,
mgr Agnieszka Łącka, mgr Alicja Trybuła, Mariusz Skrzyński,
Tadeusz Czuj, Maciej Jakobina (pracownicy techniczni)

Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o.
mgr Paweł Barzyk (pracownik techniczny)

Hodowla Roślin Smolice Spółka z o.o.
mgr Krystyna Spychała, Anna Galińska (pracownicy techniczni)

Cele projektu:

Temat badawczy nr 1

Poznanie zakresu zmienności faz fenologicznych oraz cech struktury i jakości plonu w liniach kolekcyjnych i hodowlanych łąbinu wąskolistnego w warunkach polowych i rozmnożenie nasion do mapowania asocjacyjnego.

Temat badawczy nr 2

Określenie fenotypu w zakresie pęknięcia strąków i elementów struktury plonu w populacji mapującej Emir × LAE-1 w warunkach polowych do mapowania genetycznego.

Temat badawczy nr 3

Uzyskanie macierzy zawierających wyniki genotypowania przez sekwencjonowanie linii wsobnych populacji mapujących Emir × LAE-1 i Graf × Mutant cienkościenny oraz opracowanie map genetycznych zawierających te markery.

Cel nr 1 został zrealizowany za wyjątkiem zawartości i składu alkaloidów w przeliczeniu na suchą masę (w trakcie analiz chemicznych, cel zostanie zrealizowany w całości do końca 2023 roku),

Cel nr 2 został zrealizowany w całości,

Cel nr 3 został zrealizowany częściowo (trwa dopracowanie układu markerów w obrębie mapy genetycznej dla populacji mapującej Emir × LAE-1, cel zostanie zrealizowany w całości do końca 2023 roku).

Materiał:

- **160 linii z kolekcji łubinu wąskolistnego:** populacje dzikie (34), odmiany lokalne (2), odmiany hodowlane (63), linie hodowlane (58), mutanty (3)
- **80 linii hodowlanych** (po 40 z Poznańskiej Hodowli Roślin i Hodowli Roślin Smolice)
- **populacja mapująca Emir × LAE-1 (130 linii wsobnych)**, która segreguje m. in. w zakresie wysokości roślin, liczby pędów bocznych, typu wzrostu, terminu kwitnienia i dojrzewania, pęknięcia strąków, plonu i masy tysiąca nasion
- **populacja mapująca Graf × Mutant cienkościenny (129 linii wsobnych)**, która segreguje w zakresie grubości okrywy nasiennej

Metody:

- doświadczenia polowe: wysiew nasion (siewnikiem lub ręczny) w dwóch powtórzeniach i dwóch lokalizacjach (Przebędowo i Wiatrowo), zbiór strąków (ręczny/automatyczny)
- obserwacje polowe: typ wzrostu, kolor nasion i kwiatów, termin kwitnienia i dojrzewania, wysokość roślin, pęknięcie strąków, plon nasion z poletka i masa tysiąca nasion
- ocena składników jakościowych nasion w laboratorium COBORU:
 - zawartość białka wg polskiej normy PN-EN ISO 5983-2, metodą Kjeldahl'a
 - zawartość włókna surowego metodą weendeńską, podwójnej hydrolizy kwasowej
 - zawartość tłuszczu na podstawie normy PN-76/R-64753, metodą ekstrakcyjną Soxhleta
 - zawartość i skład alkaloidów przy użyciu metody udostępnionej przez IChB w Poznaniu
- mapowanie genetyczne w programie Joinmap 5
- izolacja DNA przy użyciu Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega)
- ocena stężenia i czystości DNA - Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)

Fenotypowanie faz fenologicznych oraz cech struktury i jakości plonu linii kolekcyjnych i hodowlanych łubinu wąskolistnego w warunkach polowych (temat 1):

- W 2023 roku wysiano **160** linii kolekcyjnych i **80** linii hodowlanych w Wiatrowie i Przebędowie
- **Plon** uzyskano dla **240** linii, w tym **239** linii w Przebędowie i **237** linii w Wiatrowie: zebrano średnio **159 g** nasion na linię w Przebędowie i **253 g** w Wiatrowie. Korelacja między powtórzeniami wyniosła 0,78 w Wiatrowie i 0,80 w Przebędowie, zaś między środowiskami 0,38 (**wartości p-value istotne statystycznie: $4,3 \times 10^{-50}$, $1,9 \times 10^{-54}$, $1,3 \times 10^{-9}$**)
- **Termin kwitnienia** wynosił od **62** do **73** dni na polu w Wiatrowie oraz od **56** do **68** dni w Przebędowie. Korelacja między powtórzeniami wynosiła odpowiednio 0,48 i 0,99, zaś między środowiskami 0,63 (**wartości p-value istotne statystycznie: $3,9 \times 10^{-15}$, $5,1 \times 10^{-204}$, $8,9 \times 10^{-28}$**)
- **Wysokość roślin** wynosiła od **10** do **45** cm w Wiatrowie i od **17** do **59** cm w Przebędowie, przy czym korelacja między powtórzeniami wynosiła odpowiednio 0,55 i 0,59, zaś między środowiskami 0,20 (**wartości p-value istotne statystycznie: $3,0 \times 10^{-20}$, $9,5 \times 10^{-24}$, 0,002**)
- **Zawartość białka** wynosiła od **22,3%** do **34,5%** suchej masy. Średni poziom białka w liniach hodowlanych z obu stacji nasiennych był na zbliżonym poziomie (30,2 i 30,3%) i wykazał **istotną statystycznie korelację** między rokiem 2022 i 2023 (0,32, p-value 0,0034)
- **Poziom włókna** wynosił od **11,9%** do **17,8%** suchej masy; wyniki dla linii hodowlanych wykazały **istotną statystycznie korelację** między rokiem 2022 i 2023 (0,28, p-value 0,011)
- **Zawartość tłuszczu** wynosiła od **5,2%** do **10,4%**, przy czym najwyższa była w materiałach udomowionych z kolekcji, a najniższa w materiałach ze stacji hodowlanych. Współczynnik korelacji między rokiem 2022 i 2023 dla linii hodowlanych był ujemny (!), aczkolwiek nieistotny statystycznie (-0,18, p-value 0,1061). Linie kolekcyjne z kolei wykazały **istotną statystycznie korelację** pomiędzy latami (0,280, p-value 0,0032)
- **Zawartość tłuszczu** wykazała **istotną statystycznie negatywną korelację** z zawartością białka (współczynnik korelacji -0,25, p-value 0,00047)

Fenotypowanie cech jakości plonu (temat 1 – ciąg dalszy):

➤ zawartość alkaloidów zostanie uzupełniona w sprawozdaniu końcowym.

Tab. 1. Linie posiadające minimalną i maksymalną zawartość badanych składników nasion w 2023 roku (dla porównania podano poziom zmierzony w 2022 roku).

Nr kolecyjny	Nazwa	Białko 2022	Białko 2023	Włókno 2022	Włókno 2023	Tłuszcz 2022	Tłuszcz 2023
95849	Population-22723	32.01	34.48	15.72	13.80	6.78	8.88
R1099/18	linia hodowlana Przebędowo	31.37	33.70	16.92	16.49	7.92	7.79
R766/19	linia hodowlana Przebędowo	31.45	33.70	13.44	13.28	7.22	7.00
96133	F2 z Marii L. angustifolius	29.89	22.30	17.32	16.45	8.33	10.30
95929	Ernani	36.71	23.62	14.82	14.78	5.77	7.47
96116	Illyarie	33.59	23.65	16.44	15.79	7.18	6.04
96119	Puławski Różowy Wczesny	31.68	26.11	19.09	17.85	5.96	9.41
96176	Pertalen	31.66	27.89	16.49	17.25	6.87	9.23
95892	R-1128/a	30.53	25.31	15.88	17.02	6.14	7.68
96242	Dalbor	31.82	30.77	16.59	11.86	4.67	9.06
R874/19	linia hodowlana Przebędowo	30.58	29.57	14.15	12.16	8.20	7.17
R591/19	linia hodowlana Przebędowo	32.74	28.64	12.11	12.33	8.11	7.41
96118	Kuba	31.18	26.92	15.03	15.95	6.21	10.41
96206	Wa 1917E	31.98	31.71	17.40	14.92	8.63	10.40
96121	Emir	32.34	28.68	16.20	14.50	7.80	10.22
R589/19	linia hodowlana Przebędowo	30.52	28.66	13.49	13.20	7.74	5.18
W-519	linia hodowlana Wiatrowo	31.48	31.71	16.13	13.61	6.55	5.24
R904/19	linia hodowlana Przebędowo	26.71	28.60	16.27	14.72	7.41	5.26

Fenotypowanie pękania strąków i elementów struktury plonu w populacji mapującej Emir × LAE-1 w warunkach polowych do mapowania genetycznego (temat 2):

- Obserwacje **barwy kwiatu** wykazały wystąpienie różnic w pomiędzy powtórzeniami biologicznymi dla **28** linii, przy czym głównie dotyczyły one linii wsobnych posiadających kwiaty barwy różowej i sinobiałej. Wystąpiły też nieliczne różnice względem wzorca. Wynika to z wysokiego poziomu heterozygotyczności niektórych linii wsobnych
- Obserwacje **typu wzrostu** wykazały wystąpienie różnic względem wzorca dla **10** linii, przy czym 7 linii - zmiana typu wzrostu z epigonalnego na tradycyjny, zaś 3 - z tradycyjnego na epigonalny. Aktualnie populacja segreguje na poziomie 73 (tradycyjny) vs 57 (epigonalny), co daje wartość testu Chi² odchylenia od rozkładu oczekiwanego (65 vs 65) odpowiadającą p-value 0,16 (**rozkład jest zgodny z rozkładem oczekiwanym**).
- **Liczba dni od wysiania nasion do indukcji kwitnienia** wyniosła od **64** do **69** dni w Wiatrowie i od **61** do **67** dni w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,42 w Wiatrowie (p-value $5,4 \times 10^{-7}$) i 0,77 w Przebędowie (p-value $2,4 \times 10^{-25}$), między środowiskami 0,23 (p-value 0,009), zaś między latami 2022 i 2023 wyniósł 0,23 (p-value 0,009) w Wiatrowie i 0,31 (p-value 0,0006) w Przebędowie (**istotny statystycznie**)
- **Liczba dni od wysiania nasion do dojrzewania strąków** wyniosła od **86** do **101** dni w Wiatrowie i od **96** do **105** dni w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,41 w Wiatrowie (p-value $7,9 \times 10^{-7}$) i 0,97 w Przebędowie (p-value $7,3 \times 10^{-74}$), między środowiskami 0,46 (p-value $1,1 \times 10^{-7}$), zaś między latami 2022 i 2023 wyniósł 0,49 (p-value $6,6 \times 10^{-9}$) dla obserwacji w Wiatrowie (**istotny statystycznie**)
- **Wysokość roślin** wynosiła od **10** do **45** cm w Wiatrowie i od **21** do **63** cm w Przebędowie. Współczynnik korelacji między powtórzeniami wyniósł 0,56 w Wiatrowie (p-value $2,0 \times 10^{-12}$) i 0,73 w Przebędowie (p-value $3,9 \times 10^{-22}$), między środowiskami 0,52 (p-value $7,1 \times 10^{-10}$), zaś między 2022 i 2023 0,41 (p-value $8,9 \times 10^{-7}$) w Wiatrowie, 0,16 (p-value 0,08) w Przebędowie.

Fenotypowanie pęknięcia strąków i elementów struktury plonu w populacji mapującej Emir × LAE-1 w warunkach polowych do mapowania genetycznego (temat 2 – ciąg dalszy):

- **Cecha pęknięcia strąków** uwidoczniła się od trzeciego terminu obserwacji (18.07.2023). Średni poziom pęknięcia strąków wynosił od **0,2%** w trzecim terminie do **24,6%** w siódmym terminie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,86 w piątym terminie (p-value $4,9 \times 10^{-41}$), 0,85 w szóstym terminie (p-value $1,5 \times 10^{-39}$) i 0,83 w siódmym terminie (p-value $2,8 \times 10^{-35}$). Ze względu na przebieg pogody, szósty i siódmy termin w 2023 roku odpowiadały mniej więcej trzeciemu, czwartemu terminowi w 2022 roku. Porównując takie pary uzyskaliśmy współczynniki korelacji 0,47 i 0,42, co odpowiada wartościom p-value rzędu $2,0 \times 10^{-8}$ i $5,7 \times 10^{-7}$ (**wszystkie wartości istotne statystycznie**)
- **Masa tysiąca nasion** wynosiła od **46** do **144 g** w Wiatrowie i od **90** do **155 g** w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,76 w Wiatrowie (p-value $1,6 \times 10^{-26}$) i 0,72 w Przebędowie (p-value $4,6 \times 10^{-21}$), zaś między środowiskami 0,49 (p-value $1,5 \times 10^{-9}$). Współczynnik korelacji średnich wartości dla MTN z obu powtórzeń pomiędzy latami 2022 i 2023 wyniósł 0,64 (p-value $1,3 \times 10^{-16}$) dla obserwacji w Wiatrowie i 0,71 (p-value $3,5 \times 10^{-21}$) dla obserwacji w Przebędowie (**wszystkie wartości istotne statystycznie**)
- **Plon nasion z poletka** cechował się znaczną zmiennością pomiędzy lokalizacjami, w zakresie od **5** do **505 g** w Wiatrowie i od **17** do **800 g** w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami był **istotny statystycznie** i wyniósł 0,38 w Wiatrowie (p-value $8,7 \times 10^{-6}$) i 0,55 w Przebędowie (p-value $1,6 \times 10^{-11}$).
- Wyraźnie zaznaczył się **wpływ środowiska na plon nasion**, bowiem współczynnik korelacji pomiędzy środowiskami wyniósł 0,04 i był **nieistotny statystycznie** (p-value 0,62). Współczynnik korelacji średnich wartości dla plonu nasion z obu powtórzeń pomiędzy latami 2022 i 2023 wyniósł 0,32 (p-value 0,0002) dla obserwacji w Wiatrowie i 0,03 (p-value 0,69) dla obserwacji w Przebędowie (nieistotny statystycznie dla drugiego z porównań). .

Analiza segregacji zidentyfikowanych loci polimorficznych w liniach wsobnych populacji mapujących i konstrukcja map genetycznych dla obu populacji (temat 3):

- Utworzono plik wynikowy zawierający informacje o nazwie, pozycji w genomie i segregacji w obu populacjach mapujących (Emir × LAE-1 i Graf × Mutant cienkościenny) **33099** markerów, w tym **8644** markerów DArT-seq, **13426** markerów SeqSNP oraz **11029** markerów SilicoDArT
- Usunięto markery o nieznanym lub heterozygotycznym genotypie linii rodzicielskich oraz markery o wartości p-value testu Chi-2 mniejszej niż $1,0 \times 10^{-7}$, liczbie heterozygot większej jak 13 oraz liczbie pozycji bez informacji o allelu większej jak 13
- Zestaw po filtracji liczy **11521** markerów dla populacji mapującej Graf × Mutant cienkościenny (w tym 2031 DArT-seq, 6804 SeqSNP i 2686 SilicoDArT) oraz **12069** markerów dla populacji mapującej Emir × LAE-1 (w tym 2859 DArT-seq, 5576 SeqSNP i 3634 SilicoDArT)
- Segregację markerów ujednotwiono tak, że linie rodzicielskie Emir oraz Graf w obrębie danej populacji mają allel „a”, zaś linie rodzicielskie „LAE-1” i Mutant cienkościenny – allel „b”
- Dla populacji **Graf × Mutant cienkościenny** uzyskano mapę genetyczną zawierającą **20** grup sprzężeń odpowiadających **20** chromosomom łubinu wąskolistnego. Ponadto, mapa umożliwiła przypisanie do sekwencji genomu **129** skafoldów. Mapa zawiera **2407** loci unikatowych (ok. 9,5 tys. markerów), zaś łączna długość grup sprzężeń wynosi **2883,16** cM.
- Aktualnie są prowadzone prace nad konstrukcją mapy genetycznej dla populacji mapującej **Emir × LAE-1**, wyniki tych prac będą przedstawione w sprawozdaniu końcowym.
- Wykonano izolację DNA dla tych linii wsobnych z populacji mapujących Emir × LAE-1 oraz Graf × Mutant cienkościenny, dla których było zbyt mało DNA z ubiegłego roku. Dla linii wsobnych z populacji mapującej Emir × LAE-1 uzyskano stężenie DNA powyżej 350 ng/μl, zaś dla populacji mapującej Graf × Mutant cienkościenny powyżej 290 ng/μl.

Wnioski:

1. W kolekcji nasiennej oraz w puli linii hodowlanych łubinu wąskolistnego występuje znaczne zróżnicowanie składu jakościowego nasion (białka, tłuszczu, włókna i alkaloidów), co jest korzystnym wynikiem w kontekście zaplanowanego mapowania asocjacyjnego.
2. Termin kwitnienia, plon, wysokość roślin oraz zawartość włókna wykazały istotnie statystyczne współczynniki korelacji pomiędzy środowiskami i/lub latami w badanych liniach łubinu wąskolistnego, co wskazuje na wysoki poziom odziedziczalności.
3. Wysokie istotne statystycznie wartości współczynnika korelacji cech badanych w populacji mapującej Emir×LAE-1 (liczba dni od indukcji kwitnienia i dojrzałości strąków, wysokość roślin, pęknięcie strąków i masa tysiąca nasion) pomiędzy powtórzeniami biologicznymi, środowiskami i latami dla wskazują na relatywnie wysoką odziedziczalność, co jest korzystną przesłanką w kontekście mapowania loci QTL zaplanowanego w kolejnych latach projektu.
4. Wyniki uzyskane w 2023 roku dla koloru kwiatów, terminu kwitnienia, terminu dojrzewania strąków, wysokości roślin, pęknięcia strąków, masy tysiąca nasion oraz plonu nasion będą mogły być bezpośrednio użyte do mapowania loci QTL z wykorzystaniem konsensusowej mapy genetycznej utworzonej dla populacji mapującej Emir × LAE-1 i zawierającej markery z genotypowania metodami seqSNP oraz DArT-seq.
5. Uzyskany w latach 2021-2022 zestaw polimorficznych markerów jest wystarczający do utworzenia map o rozdzielczości porównywalnej z referencyjnymi mapami genetycznymi używanymi do składania sekwencji genomów i mapowania loci cech ilościowych.
6. Zastosowanie różnych typów markerów (SeqSNP, DArT-seq i SilicoDArT) oraz użycie odmiennego tła genetycznego do konstrukcji populacji mapujących niż dotychczas stosowane w badaniach łubinu wąskolistnego pozwoliło na przypisanie do grup sprzężeń, a zarazem i pseudochromosomów, sekwencji 129 skafoldów o nieznanej dotąd lokalizacji.

Prezentacja wyników badań w 2023 roku:

- XVI. International Lupin Conference 19.06.2023 – 23.06.2023 „Breeding, Cultivation and Use of Lupins for a Sustainable Agriculture – Recent Developments”. Rostock, Niemcy

Rodzaj prezentacji: poster

Tytuł: „Development of high-density linkage maps for quantitative trait loci mapping of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.)”

Autorzy: Michał Książkiewicz, Bartosz Kozak, Wojciech Bielski, Sandra Rychel-Bielska, Jolanta Belter, Piotr Plewiński, Renata Galek

Development of high-density linkage maps for quantitative trait loci mapping of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.)

Michał Książkiewicz¹, Bartosz Kozak², Wojciech Bielski^{1,3}, Sandra Rychel-Bielska², Jolanta Belter¹, Piotr Plewiński¹, Renata Galek²



¹ Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

² Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland

³ Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

POZNAŃ
UNIVERSITY
OF LIFE SCIENCES

Funding

Ministry of Agriculture and Rural Development,
Basic Research for Biological Progress in Crop
Production program for years 2021-2027, Task 18.



Ministerstwo Rolnictwa
i Rozwoju Wsi



ILC 2023

International Lupin Conference XVI