

Alkaloidy u łubinu wąskolistnego: zrozumienie molekularnych podstaw procesu biosyntezy i akumulacji w nasionach oraz poszukiwanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w zielonych częściach rośliny, przy zachowaniu niskiej zawartości w nasionach

Okres realizacji:

styczeń 2022 - grudzień 2022

Zespół wykonawców Projektu:

Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

dr Magdalena Kroc (Kierownik, mkro@igr.poznan.pl)

prof. dr hab. Wojciech Święcicki czł. rzecz. PAN

prof. dr hab. Wojciech Rybiński

dr hab. Karolina Susek

dr hab. Grzegorz Koczyk

mgr Katarzyna Czepiel

Cele projektu:



1. Sekwencjonowanie metodą PacBio linii pochodzących z Briańska oraz linii typu *iucundus/lucundus* (drugi organ: łodyga). Charakterystyka i analiza porównawcza uzyskanych transkryptomów (Temat badawczy 1).

Sekwencjonowanie metodą PacBio

Organ: łodyga

CEL ZREALIZOWANO.

2. Indukowanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w częściach zielonych rośliny, a niskiej w nasionach, na drodze sztucznej mutagenezy (Temat badawczy 2).

CEL ZREALIZOWANO.



Materiał i metody:



Realizacja Tematu badawczego nr 1:

- Sekwencjonowanie transkryptomu łodygi metodą PacBio.
- W badaniach uwzględniono 5 linii łubinu wąskolistnego reprezentujących różny mechanizm regulacji niskiej zawartości alkaloidów w nasionach:
 - 1) dwie linie reprezentujące najczęściej występujący typ regulacji zawartości alkaloidów w nasionach (*iucundus*: 83A:476 i *lucundus*: P27255).
 - 2) trzy linie pochodzące z Briąnska, reprezentujące odmienny niż *lucundus*/*iucundus* mechanizm regulacji niskiej zawartości tych związków w nasionach.
- Do analizy danych sekwencyjnych wykorzystano dostępne narzędzia bioinformatyczne, jak i indywidualnie tworzone skrypty mające na celu: ustalenie indywidualnych transkryptomów sekwencjonowanych linii, mapowanie do referencyjnego genomu łubinu wąskolistnego (Hane i in. 2017), rekonstrukcję konsensusowego transkryptomu z uwzględnieniem danych transkryptomicznych uzyskanych dla liści w roku ubiegłym, a także adnotację funkcjonalną uzyskanych transkryptów oraz ilościową i jakościową ocenę różnic pomiędzy indywidualnymi liniami z uwzględnieniem badanego organu.

Realizacja Tematu badawczego nr 2:

- Rozmnożenie nasion w pokoleniu M2 po traktowaniu mutagenem (nasiona z dawek 0,6 mM, 0,8 mM, 1,0 mM i 1,0 mM MNU). Łącznie liczba wysianych nasion = 861 (w tym 40 nasion nietraktowanych odmiany Karo).
- Doświadczenie połowe prowadzone w: Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., o. Wiatrowo.
- Wstępna analiza zawartości alkaloidów w nasionach prowadzona metodą kolorymetryczną (odczynnik Wagnera) prowadzona dla 500 rodzin. Przetestowano do 10 nasion z rodziny (zależnie od ilości dostępnych nasion). Zastosowano skala od 0 (tj. jasnożółte wybarwienie liścieni, jak u odmiany słodkiej (Regent)) do 2 (tj. ciemno brązowe wybarwienie liścieni, jak u odmiany gorzkiej (Karo)).
- Analiza zawartości alkaloidów w nasionach metodą chromatografii gazowej - wykonano w przypadku gdy test kolorymetryczny wskazywał na obniżoną zawartość alkaloidów oraz dysponowano odpowiednią ilością nasion).



WYNIKI:

1. Analiza bioinformatyczna uzyskanych danych pozwoliła na ustalenie indywidualnych transkryptomów sekwencjonowanych linii oraz rekonstrukcję konsensusowego transkryptomu dla łodyg i liści, osadzonego na referencyjnej sekwencji genomowej (odmiana Tanjil, Hane i in. 2017).

Tabela 1. Charakterystyka transkryptomu konsensusowego uzyskanego dla liści i łodyg pięciu badanych linii łubinu wąskolistnego.

Organ	Liczba zidentyfikowanych genów	Liczba zidentyfikowanych transkryptów	Nowe geny	Nowe transkrypty	Liczba zadnotowanych genów	Liczba zadnotowanych transkryptów
Liść + łodyga	20670	63267	1107	52807	19658	60762

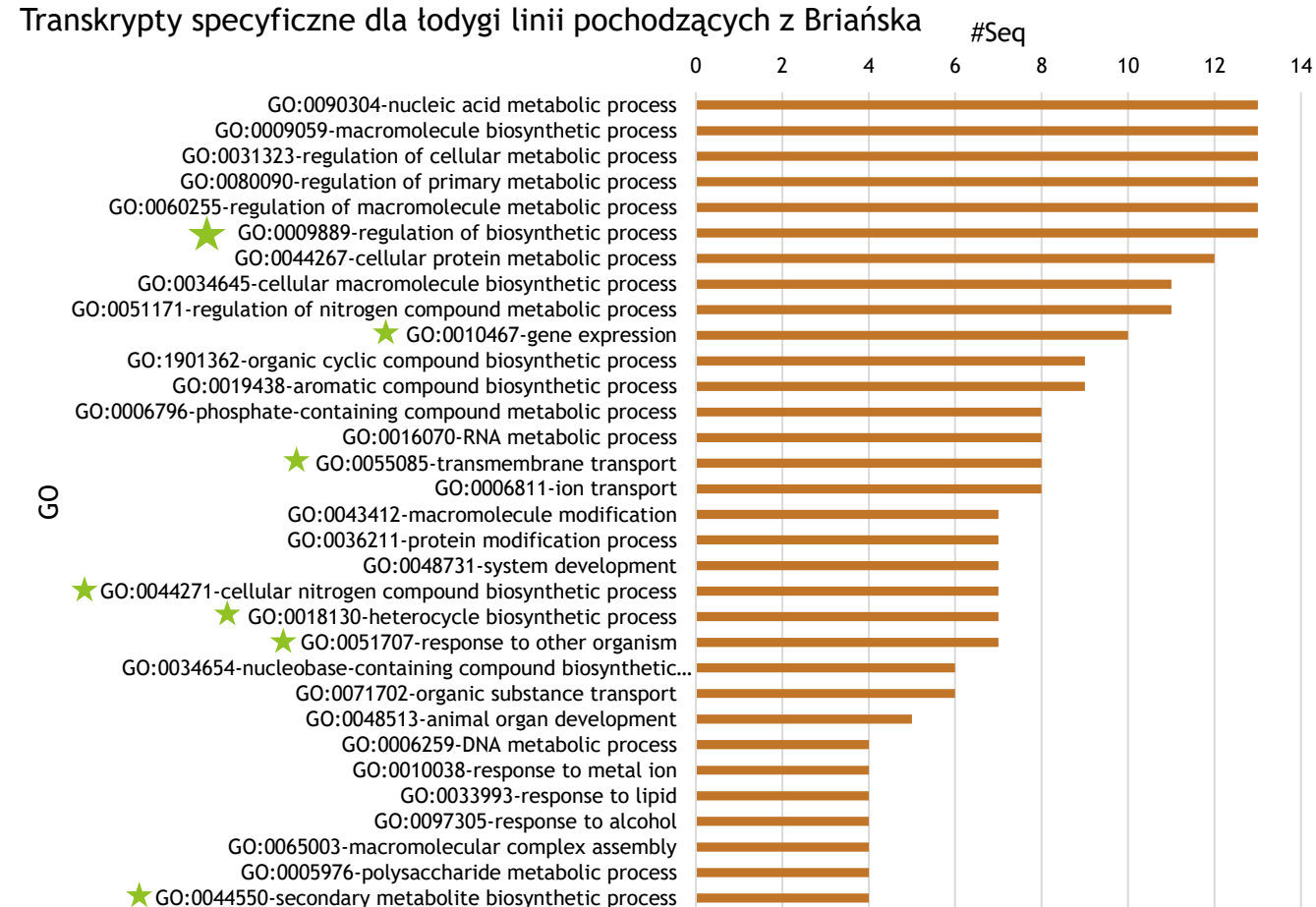
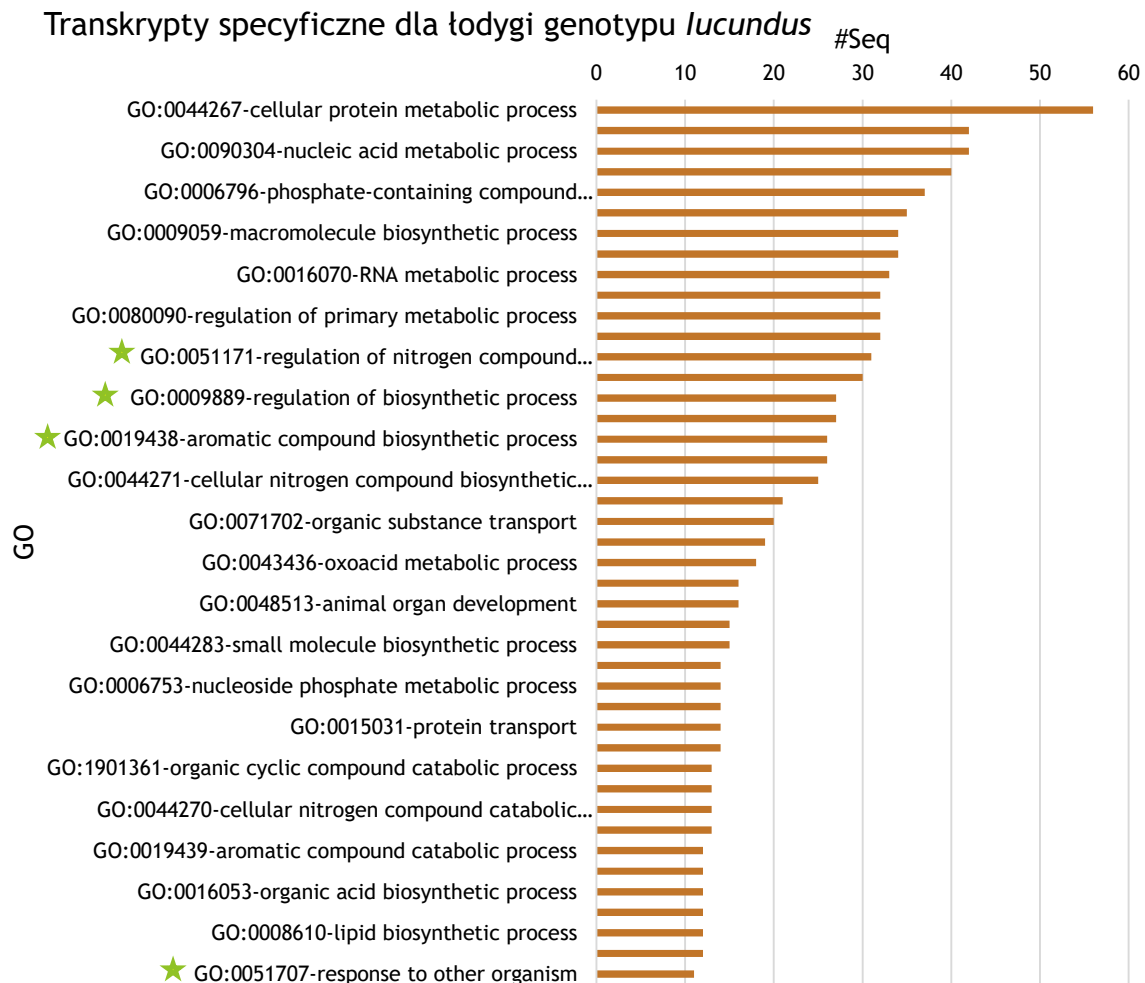
2. Adnotację funkcjonalną przypisano dla 96% transkryptów (tj. dla 60762 z 63267)
3. Zidentyfikowano transkrypty nowe, tj. o nieprzypisanej adnotacji w genomie referencyjnym (tj. zamieszczonej w bazie Ensembl/Plants).
4. W dalszych analizach wyselekcjonowano geny i transkrypty (izoformy) specyficzne dla:
 - linii o wysokiej zawartości alkaloidów i regulacji zawartości alkaloidów w nasionach typu *lucundus*;
 - linii o nowym sposobie regulacji niskiej zawartości alkaloidów, reprezentowanych przez obiekty pochodzące z Briańska.
5. Specyficzność oceniano w odniesieniu do danego organu rośliny.

Tabela 2. Liczności genów/transkryptów uznanych za specyficzne w konkretnym organie i dla genotypów o poszczególnych sposobach regulacji zawartości alkaloidów, określone jako klasy genów/transkryptów

Klasa genów/transkryptów	Liczba genów specyficznych	Liczba transkryptów specyficznych
Specyficzne dla gorzkiego <i>lucundus</i> (tylko łodyga)	321	819
Specyficzne dla Briańskich (tylko liść)	300	495
Specyficzne dla gorzkiego <i>lucundus</i> (tylko liść)	153	318
Specyficzne dla Briańskich (tylko łodyga)	95	309
Specyficzne dla Briańskich (liść + łodyga)	12	77
Specyficzne dla gorzkiego <i>lucundus</i> (liść + łodyga)	11	67
Specyficzne dla Briańskich (liść) i gorzkiego <i>lucundus</i> (łodyga)	1	1

WYNIKI:

5. Większość wytypowanych transkryptów ma przypisaną adnotację funkcjonalną, co pozwala na ukierunkowanie dalszych prac badawczych. Na podstawie list wyselekcjonowanych genów/transkryptów specyficznych, do dalszych analiz wybrano najbardziej obiecujące geny kandydackie o przewidywanej funkcji powiązanej z biosyntezą/regulacją biosyntezy alkaloidów, jak również ich transportem lub tworzeniem niezbędnych do biosyntezy prostszych prekursorów.




Rycina 1. Liczności transkryptów zadnotowanych termami GO, w kategorii Proces Biologiczny w zbiorze transkryptów charakterystycznych dla łodygi linii typu *lucundus* oraz dla linii pochodzących z Brińska. Zaznaczono kategorie szczególnie interesujące z punktu widzenia dalszych badań (★).

WNIOSKI:

1. W wyniku sekwencjonowania transkryptomów łądugi uzyskano dobrej jakości dane sekwencyjne, które w powiązaniu z danymi uzyskanymi w roku ubiegłym dla liści, umożliwiły pełniejszą charakterystykę dla linii pochodzących z Briańska oraz wzbogacenie istniejącej wiedzy dla linii typu *iucundus* i *lucundus*.
2. Zidentyfikowano zarówno niezobserwowane wcześniej geny jak i kolejne izoformy splicingowe, poszerzając katalog transkryptów dla łąbinu wąskolistnego.
3. Analiza ilościowych i jakościowych różnic pomiędzy badanymi liniami pozwoliła na wytypowanie wysoce prawdopodobnych genów (i transkryptów) specyficznych zarówno dla danego typu regulacji zawartości alkaloidów, jak i organu rośliny. Pozwoli to na ukierunkowanie dalszych badań zmierzających do walidacji ich roli, a co za tym idzie lepszemu zrozumieniu szlaku biosyntezy i akumulacji alkaloidów w układzie badawczym Brianskij - *iucundus* - *lucundus*.



WYNIKI:

1. Rozmnożenie nasion M2  Zbiór nasion z indywidualnych roślin **Zbiór 500 rodzin nasion w pokoleniu M3**
2. Zebrane nasiona w pokoleniu M3 wykorzystane następnie do:
 - 1) testów kolorymetrycznych umożliwiających selekcję pożądaných genotypów w kierunku wyboru zmutowanych form o zaburzonej transmisji alkaloidów z zielone części rośliny do nasion,
 - 2) testów potwierdzających niską zawartość alkaloidów w nasionach metodą chromatografii gazowej (wykonane w przypadku korzystnych wyników analiz kolorymetrycznych i dostępności nasion),
 - 3) zabezpieczenia materiału siewnego do rozmnożenia populacji M3 w doświadczeniu polowym w kolejnym roku trwania projektu (2023).
3. Analiza zawartości alkaloidów metodą kolorymetryczną wykonana łącznie dla 500 rodzin. **W tym:**
 - wybarwienie większości ocenionych materiałów wskazywało na wysoką zawartość alkaloidów (ocenione jako 2) lub zawartość nieznacznie niższą od wyjściowej odmiany gorzkiej Karo (ocenione jako 1).
 - dla nielicznych rodzin wykryto nasiona, których zabarwienie liścieni wskazywało na niską zawartość alkaloidów (ocenione jako 0). Spośród nich najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla 14 linii, dla których min. 90% testowanych nasion wybarwiała się jak odmiana słodka.
 - potwierdzenie uzyskanych wyników z zastosowaniem chromatografii gazowej (GC) możliwe było dla 7 linii, dla których dysponowano odpowiednią liczbą nasion.
 - Analizy GC potwierdziły niską zawartość w 4 z 7 analizowanych rodzin (analiza prowadzona na podstawie mączki z ok. 12 nasion/roślinę).

Temat badawczy 2: Poszukiwanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w liściach, a niskiej w nasionach



WYNIKI:

Tabela 3. Zestawienie wyników analizy zawartości alkaloidów w nasionach wybranych mutantów łubinu wąskolistnego uzyskanych z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej i metody chromatografii gazowej.

Nr obiektu	Pochodzenie nasion	nasiona zebrane [szt.]	analiza kolorymetryczna											Całkowita zawartość alkaloidów na podstawie analizy GC (% suchej masy nasion)
			liczba testowanych nasion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
128	K-0,8	40	5	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-	2,40
188	K-0,8	51	5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0,0143
196	K-0,8	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,72
259	K-0,8	23	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,45
313	K-0,8	55	5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0,0185
484	K-1,2	79	5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0,016
500	K-1,2	50	5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0,0076

WNIOSKI:

1. Uzyskane wyniki, tj. duże zróżnicowanie dotyczące analiz kolorymetrycznych, świadczą o skuteczności wyboru optymalnych dawek mutagenu dokonanego w poprzednim roku. O skuteczności wybranych dawek świadczą także pojawiające się w analizowanym materiale „pomutacyjnym” liczne mutanty innych cech, np. barwy nasion, kwiatów, a także pokroju roślin.
2. Uzyskane niskie zawartości alkaloidów na podstawie analiz GC, stanowią wstępną przesłankę do wnioskowania o realizacji założeń tematu badawczego 2. Wymaga to dalszych analiz potwierdzających w homozygotycznym materiale kolejnych pokoleń, w tym potwierdzenia, że indukowane mutanty o niskiej zawartości alkaloidów w nasionach zachowały wysoką zawartość tych związków w zielonej masie.

