

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 2021 - grudzień 2021

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. Charakterystyka transkryptomów linii pochodzących z Briańska oraz ich analiza porównawcza względem linii *iucundus/lucundus* (Temat badawczy 1)

Sekwencjonowanie metodą PacBio:

planowane: pierwsze powtórzenie biologiczne - liść

zrealizowane: pierwszy organ: liść (zgoda MRiRW, znak sprawy KS.zb.802.2.2021).

CEL ZREALIZOWANO.

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

CEL ZREALIZOWANO.



Materiał i metody:



Realizacja Tematu badawczego nr 1:

- Sekwencjonowanie transkryptomu liści 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 i adnotację funkcjonalną, ilościową i jakościową ocenę różnic pomiędzy indywidualnymi transkryptomami.

Realizacja Tematu badawczego nr 2:

- Materiał wyjściowy do traktowania mutagenem - nasiona łubinu wąskolistnego, odmiany Karo.
- Zastosowany chemomutagen: N-metylo-N-nitrosomocznik (MNU).
- Wstępny test optymalizacji stężeń MNU w szklarni: dziesięć dawek w przedziale od 0,3 mM do 1,2 mM.
- Na podstawie testu optymalizacji wybrano cztery dawki mutagenu do traktowania właściwego, uznane za mieszczące się w przedziale dawek optymalnych w generowaniu zmienności mutacyjnej.
- Traktowanie właściwe: 500 nasion dla każdej z czterech kombinacji z mutagenem (łącznie 2000 nasion).
- Doświadczenie polowe - Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., o. Wiatrowo:
 - ❖ Wysiew nasion po traktowaniu mutagenem = rozmnożenie populacji roślin M1 (2000 nasion).
 - ❖ Wysiew kontroli: 500 nasion nietraktowanych mutagenem.
- Zbiór nasion z roślin M1 (nasiona M2), oddzielnie dla każdej z czterech kombinacji mutagennych. Zbiór nasion z kontroli.
- Ocena aktywności mutagenicznej każdej z dawek MNU: ocena liczby i masy zebranych nasion w stosunku do kontroli.



WYNIKI:

- Analiza bioinformatyczna uzyskanych danych pozwoliła na ustalenie indywidualnych transkryptomów sekwencjonowanych linii.

Tabela 1. Charakterystyka transkryptomów liści uzyskanych dla badanych linii łubinu wąskolistnego.

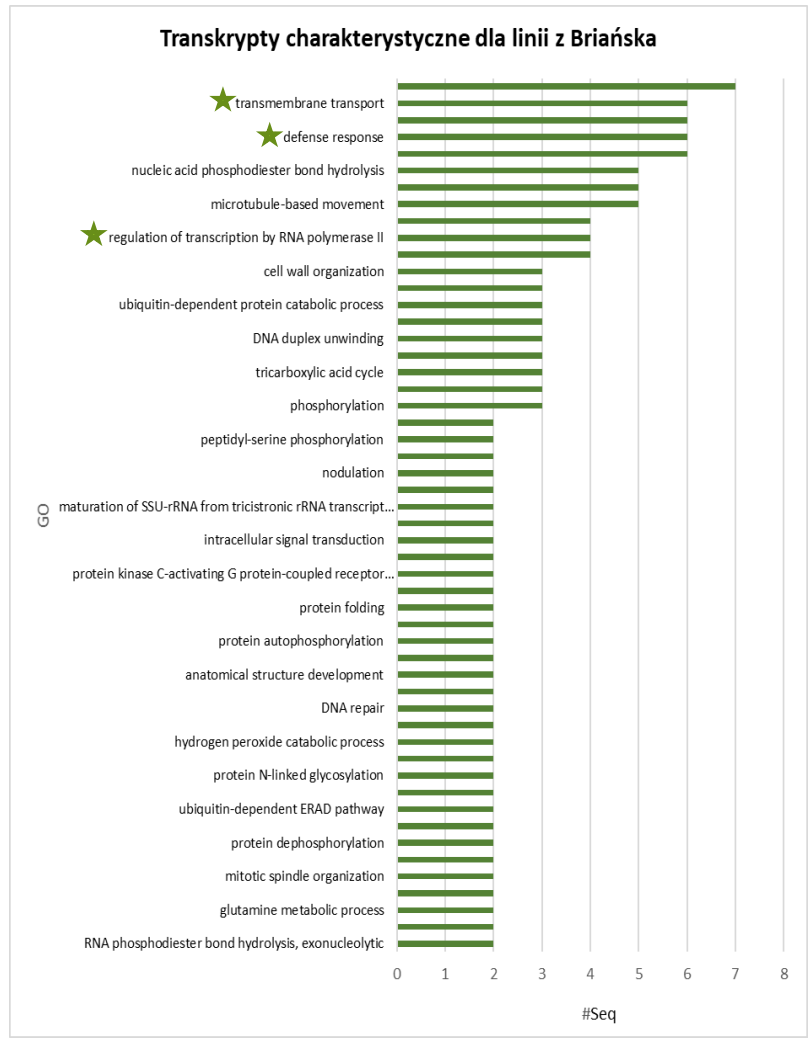
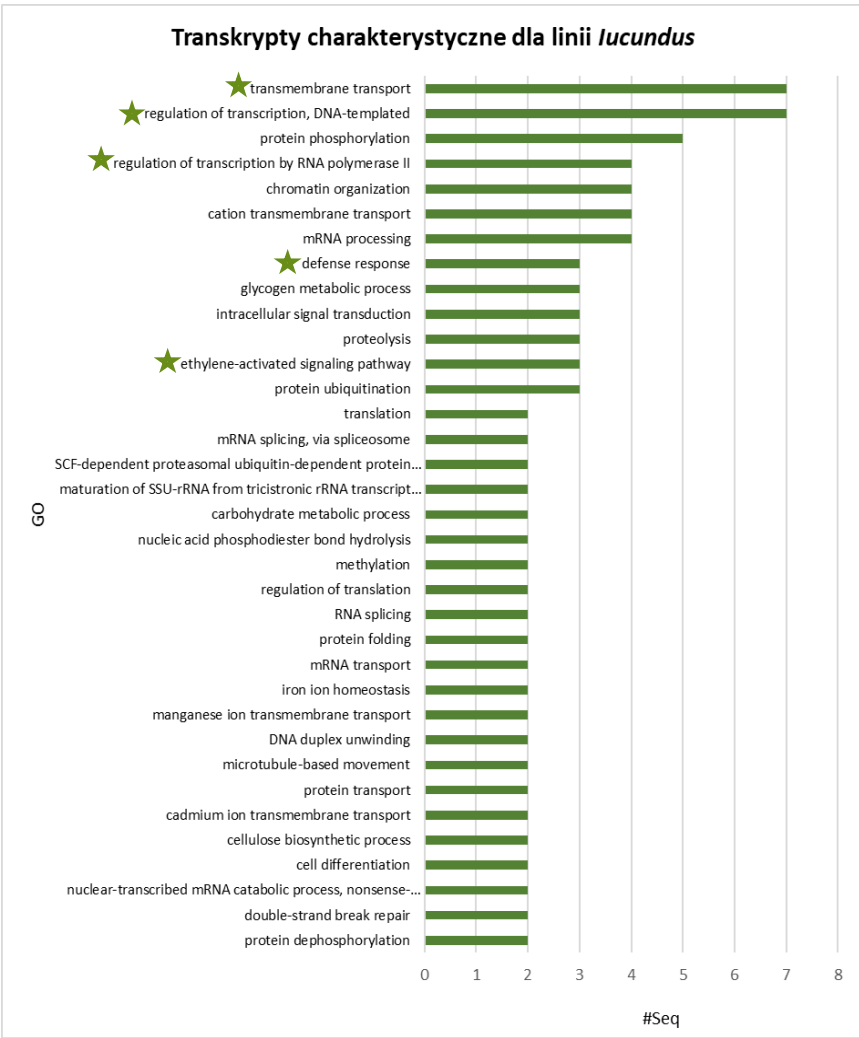
| | 83A:476 (<i>iucundus</i>) | P27255 (<i>lucundus</i>) | Brianskij-35 | Brianskij-123 | Brianskij-237/83 | Brianskij-35 /Brianskij-123 /Brianskij-237/83 | Łącznie dla wszystkich linii |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|------------------|---|------------------------------|
| Liczba zidentyfikowanych genów | 16264 | 16066 | 10583 | 13880 | 10465 | 15723 | 19615 |
| Liczba zidentyfikowanych transkryptów | 32843 | 32251 | 15743 | 26805 | 15018 | 33363 | 54701 |
| Nowe transkrypty | 25103 | 24660 | 11025 | 20450 | 10353 | 25894 | 44895 |
| Liczba zadnotowanych genów | 15558 | 15467 | 10282 | 13472 | 10265 | 15172 | 18538 |
| Liczba zadnotowanych transkryptów | 31548 | 31258 | 15280 | 26121 | 14722 | 32347 | 52388 |

- Ze względu na niższe pokrycie transkryptomów u linii: Brianskij-35, Brianskij-123 i Brianskij-237/83, w analizach zmierzających do jakościowej i ilościowej oceny różnic pomiędzy transkryptomami, potraktowano je jako łączny zbiór.
- W dalszych analizach wyselekcjonowano transkrypty (izoformy) charakterystyczne dla:
 - linii o wysokiej zawartości alkaloidów i regulacji zawartości alkaloidów w nasionach typu *lucundus*;
 - linii, pochodzących z Briańska, o odmiennym sposobie regulacji zawartości alkaloidów.
- W wyniku selekcji uzyskano:
 - 158 transkryptów (149 loci)** charakterystycznych tylko dla linii typu *lucundus*.
 - 194 transkrypty (176 loci)** charakterystyczne dla linii pochodzących z Briańska.



WYNIKI:

5. Większość wytypowanych transkryptów ma przypisaną adnotację funkcjonalną, co pozwala na ukierunkowanie dalszych prac badawczych. Zidentyfikowano m.in. transkrypty (izoformy) zaangażowane w odpowiedź na etylen, czy aktywność transportową produktów lub intermediatów procesu biosyntezy.



Rycina 1. Liczności transkryptów zadnotowanych termami GO (ontologii genów; gene ontology) w kategorii Proces Biologiczny (biological process) w zbiorze transkryptów charakterystycznych dla linii typu *lucundus* oraz dla linii pochodzących z Brińska. Zaznaczono kategorie szczególnie interesujące z punktu widzenia dalszych badań (★).



WNIOSKI:

1. W wyniku sekwencjonowania transkryptomów uzyskano dobrej jakości dane sekwencyjne, które umożliwiły pierwszą charakterystykę dla linii pochodzących z Briańska oraz wzbogacenie istniejącej wiedzy dla linii typu *iucundus* i *lucundus*.
2. Jakościowa analiza uzyskanych transkryptomów pozwoliła na identyfikację nowych transkryptów, niewystępujących w genomie referencyjnym (Hane i in. 2017). Uzyskane dane istotnie poszerzają katalog transkryptów (izoform) dostępnych w bazie Ensembl/Plants dla łubinu, dostarczając nowych informacji istotnych dla zrozumienia regulacji transkrypcji genów (występowania alternatywnych izoform splicingowych, transkryptów o zmienionej funkcjonalności lub niefunkcjonalnych).
3. Analiza ilościowych i jakościowych różnic pomiędzy badanymi liniami pozwoliła na wytypowanie wysoce prawdopodobnych transkryptów charakterystycznych odpowiednio tylko dla linii gorzkiej oraz tylko dla linii pochodzących z Briańska. Pozwoli to na ukierunkowanie dalszych badań zmierzających do lepszego zrozumienia szlaku biosyntezy i akumulacji alkaloidów w poszczególnych organach łubinu wąskolistnego, ze szczególnym uwzględnieniem nasion.
4. Pełny obraz transkryptomów poszczególnych linii, uwzględniający również dodatkowe źródła adnotacji genów (LupinExpress, genomy referencyjne NCBI) będzie uzyskany po przeprowadzeniu sekwencjonowania transkryptomu łodygi, które zaplanowano na rok 2022. Organ ten został zidentyfikowany w ramach wcześniejszych badań własnych, jako ważny, obok liści, w procesie biosyntezy i akumulacji alkaloidów u łubinu wąskolistnego.

WYNIKI:

1. Test szklarniowy optymalizacji dawek mutagenu.

Tabela 1. Ocena wpływu dziesięciu dawek MNU na wysokość siewek łubinu wrazą wielkością redukcji lub stymulacją wzrostu w stosunku do kontroli.

| Dawki mutagenu (MNU) | Wysokość siewek (cm) | Redukcja (-) lub stymulacja (+) wzrostu siewek w stosunku do kontroli (%) |
|-------------------------|----------------------|---|
| Kontrola (bez mutagenu) | 18,4 | - |
| 0,3 mM | 19,2 | + 4,3 |
| 0,4 mM | 18,5 | + 0,5 |
| 0,5 mM | 15,9 | - 13,4 |
| 0,6 mM | 12,7 | - 31,0 |
| 0,7 mM | 11,1 | - 39,7 |
| 0,8 mM | 9,4 | - 48,9 |
| 0,9 mM | 8,9 | - 51,6 |
| 1,0 mM | 6,0 | - 67,4 |
| 1,1 mM | 5,6 | - 69,6 |
| 1,2 mM | 4,1 | - 77,7 |

2. Na podstawie testu wybrano cztery dawki mutagenu do traktowania właściwego, uznane za mieszczące się w przedziale dawek optymalnych w generowaniu zmienności mutacyjnej, tj:

- 0,6 mM,
- 0,8 mM,
- 1,0 mM,
- 1,2 mM.

3. Traktowanie właściwe i rozmnożenie populacji roślin M1:

- 500 nasion dla każdej z czterech kombinacji z mutagenem (2000 nasion)
- 500 nasion nietraktowanych (kontrola)

WYNIKI:

4. Ocena aktywności mutagenicznej dawek MNU, na podstawie liczby i masy zebranych nasion w pokoleniu M1.

Tabela 2. Wykaz dawek mutagenu i ich wpływ na poziom redukcji (lub stymulacji) cech u roślin M1, dla uzyskania nasion M2.

| Dawka mutagenu | Liczba uzyskanych nasion | Redukcja liczby nasion do stosunku do kontroli (%) | Masa zebranych nasion (g) | Masa 1000 nasion (MTN) (g) | MTN Redukcja /stymulacja (-/+) |
|----------------|--------------------------|--|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| KONTROLA | 1806 | - | 381,1 | 211 | - |
| 0,6 mM MNU | 1056 | 41,53 | 214,4 | 203 | -3,8 |
| 0,8 mM MNU | 756 | 58,14 | 147,4 | 195 | -7,6 |
| 1,0 mM MNU | 250 | 86,18 | 53,0 | 212 | +0,5 |
| 1,2 mM MNU | 71 | 96,07 | 15,5 | 218 | +3,31 |

Tabela 3. Charakterystyka dawek MNU na podstawie redukcji wzrostu i liczby uzyskiwanych nasion (płodności roślin) w stosunku do kontroli.

| Dawki MNU (mM) | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,2 |
|-----------------------|---|-----|-----|-----|--|-----|-----|--|-----|--|-----|
| Charakterystyka dawek | Zakres dawek niskich (słabych) wywołujących efekt stymulacji cech i ich nieznaczną redukcję wzrostu w stosunku do roślin kontrolnych, z reguły nieprzekraczającą 30%. | | | | Zakres dawek z grupy optymalnych wywołujących redukcję płodności w granicach 50% (42 i 58 % dla dawek 0,6 i 0,8 mM). | | | Zakres dawek wysokich indukujących w M ₁ silny efekt redukcji płodności w granicach 86 %. | | Dawka z pogranicza dawek letalnych przy prawie 100% redukcji przeżywalności płodności roślin (96%); strąki prawie wyłącznie puste. | |

- Jako dawki zbliżone do optymalnych, wywołujących efekt redukcji przeżywalności/płodności oscylujący w granicach 50% (LD50) wykazano dawki 0,6 i 0,8 mM (odpowiednio 42% i 58% redukcji).
- Łącznie z roślin pokolenia M₁ zebrano 2133 nasiona, z czego 84% stanowiły nasiona z dawek 0,6 i 0,8 mM.
- Zebrane nasiona stanowią zasadniczy materiał badawczy do wysiewu i uzyskania dostatecznie licznych pokoleń M₂, umożliwiającego poszukiwanie zmutowanych form o znacznej zawartości alkaloidów w liściach, a niskiej w nasionach.

WNIOSKI:

1. W ramach realizacji tematu badawczego w roku bieżącym przeprowadzono pierwszy etap prac zmierzających do uzyskania populacji mutacyjnych i selekcji pożądaných genotypów, w kierunku wyboru zmutowanych form o zaburzonej transmisji alkaloidów z organów wegetatywnych (zielone części rośliny) do nasion.
2. Wykonany test optymalizacji dawki w zakresie dziesięciu stężeń mutagenu (od 0,3 do 1,2 mM MNU) pozwolił wyodrębnić dawki wywołujące zróżnicowany poziom redukcji wzrostu siewek łubinu w stosunku do kontroli.
3. Na podstawie wyników testu optymalizacji do zasadniczego traktowania i uzyskania nasion umożliwiających założenie dostatecznie licznych pokoleń M_2 i M_3 , wybrano cztery dawki, z których dwie (0,6 i 0,8 mM) wywołują umiarkowany efekt redukcji wzrostu, a dwie kolejne: 1,0 mM, a zwłaszcza 1,2 mM bardzo silny efekt (na pograniczu dawek letalnych).
4. Wykazano, że zastosowany mutagen (MNU) wywołał wystąpienie uszkodzeń somatycznych u roślin w pierwszym pokoleniu po traktowaniu mutagenicznym (M_1). Wielkość uszkodzeń somatycznych wyrażonych redukcją wzrostu oraz płodności roślin, zależna była od zastosowanych dawek i wzrastała w miarę ich zwiększania.
5. Uzyskanie ponad 2000 nasion M_2 (z roślin pokolenia M_1) w kombinacji z mutagenem, w wystarczającym stopniu reprezentuje zbiór odpowiadający 500 obiektom (miernik) w M_2 , niezbędnym do kontynuacji badań w roku kolejnym.