

Zadanie 39

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

Kierownik zadania: prof. dr hab. Bogdan Wolko

Sprawozdanie merytoryczne 2015 - streszczenie

W roku 2015 kontynuowano **analizy ważnej cechy użytkowej łubinu białego - wczesności kwitnienia**. Przeprowadzone prace dotyczyły zmienności terminu kwitnienia w materiałach kolekcyjnych i w populacji mapującej, jak również identyfikacji sekwencji homologów znanych genów procesu indukcji kwitnienia u tego gatunku i polimorfizmu sekwencji w liniach rodzicielskich populacji mapującej. Podstawą badań były analizy porównawcze sekwencji genomu łubinu wąskolistnego, transkryptomów łubinu białego oraz innych sekwencji zdeponowanych w bazach danych. Na mapie genetycznej łubinu białego zlokalizowano sekwencje wybranych genów: integratorów szlaków kwitnienia oraz genów ze szlaku wernalizacyjnego. Wykonano ocenę sprzężenia tych genów z cechą wczesności kwitnienia. Zbadano zmienność na poziomie RNA pomiędzy liniami łubinu białego poprzez uzyskanie i porównanie sekwencji znacznej liczby markerów wywodzących się z regionów w pobliżu końców 3'poliA sekwencji cDNA. Ponadto, homologi genów kwitnienia zmapowano w chromosomach łubinu białego i wąskolistnego poprzez cytogenetyczną lokalizację klonów BAC (z biblioteki genomu jądrowego łubinu wąskolistnego), zawierających sekwencje tych genów. Projekt obejmował również przygotowanie materiału do analiz łubinu żółtego - wykonanie krzyżowań linii różniących się terminem kwitnienia.

Jednym z głównych celów badań było **poznanie zmienności terminu kwitnienia w liniach łubinu białego (*Lupinus albus*)**. Wykonano wernalizację 109 linii, obejmujących odmiany, rody hodowlane, mutanty i populacje dzikie, otrzymanych ze światowej kolekcji tego gatunku oraz z bieżących programów hodowlanych (PHR, Stacja Hodowli Roślin Wiatrowo). Doświadczenie w warunkach kontrolowanego oświetlenia i temperatury wykazało, że w kolekcji występuje znaczna zmienność zarówno terminu kwitnienia, jak i odpowiedzi na wernalizację. Dla linii wernalizowanych średni termin od wysiania do kwitnienia zawierał się w zakresie od 38 do 77 dni, zaś dla linii nie poddanych wernalizacji od 46 do 82 dni. Zaobserwowano, że nawet linie bardzo wczesne w odpowiedzi na wernalizację przyspieszają kwitnienie o ok. tydzień. Ponadto w wielu liniach zaobserwowano znaczną różnicę terminu kwitnienia dla poszczególnych pojedynków. Wykonano również wernalizację 195 linii łubinu białego z populacji mapującej Kiev Mutant × P27174 (IGR PAN). Doświadczenie z populacją przeprowadzono w warunkach polowych (HR Smolice, Oddział w Przebędowie). Termin kwitnienia dla roślin wernalizowanych mieścił się w zakresie 49-74 dni, zaś dla roślin nie poddanych wernalizacji 61-149 dni. Wykazano znaczną zmienność terminu kwitnienia w materiałach kolekcyjnych. Ciągły charakter zmienności świadczy o tym, że cecha jest warunkowana przez wiele genów. Na podstawie wyników uzyskanych dla linii z kolekcji i z populacji mapującej można wnioskować, że termin kwitnienia łubinu białego jest efektem współdziałania kilku genów i wyraża się poprzez termoneutralność oraz obniżone wymagania co do fotoperiodu. Cecha ta jest korzystna ze względu na warunki klimatyczne rolnictwa polskiego, gdyż warunkuje krótki okres wegetacji i wczesne dojrzewanie nasion. Ponadto istnienie co najmniej kilku genów wpływających na skrócenie terminu od wysiania nasion do kwitnienia umożliwia szeroki dobór komponentów do krzyżowań i skuteczne wprowadzenie cechy do linii hodowlanych.

Jednym z zadań było **przygotowanie materiału do analiz łubinu żółtego (*L. luteus*)**. W tym celu w stacji Hodowli Roślin Smolice, Oddział w Przebędowie, wysiano nasiona z pokolenia F₁ z dwóch kombinacji krzyżowań. Uzyskano odpowiednio 2272 i 1012 nasion pokolenia F₂.

Prace obejmowały również **mapowanie genetyczne sekwencji wybranych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia**. Na podstawie danych z publikacji wybrano 69

sekwencji genów związanych z głównymi szlakami regulatorowymi. W wyniku przyrównania tych sekwencji do sekwencji transkryptomu linii rodzicielskich populacji mapującej łubinu białego zidentyfikowano 41 homologów genów kwitnienia. Następnie sekwencje transkryptomu Kiev i P27174 porównano ze sobą w celu identyfikacji miejsc polimorficznych. Dodatkowo, dla rodziny białek wiążących fosfatydyloetanolaminę (FLOWERING LOCUS T) wykonano wnioskowanie bayesowskie i na tej podstawie przyporządkowano sekwencje do podrodzin FTa, FTc i BFT. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) znaleziono dla 17 przyrównań sekwencji. Na podstawie tych wyników oraz pozycji w skafoldach genomu łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) zaprojektowano startery do mapowania dla 33 homologów genów kwitnienia. Zastosowanie sekwencji transkryptomu linii rodzicielskich do poszukiwania loci polimorficznych było skuteczne tylko w części przypadków. Główną przyczyną był problem z amplifikacją produktów PCR, który mógł wynikać z fałszywie pozytywnego złożenia sekwencji z różnych kopii w jedną podczas składania transkryptomu i w konsekwencji zaprojektowania starterów w oparciu o sekwencję konsensusową, złożoną z kilku różniących się kopii. Istotnym utrudnieniem był także stosunkowo niewielki poziom polimorfizmu sekwencji między liniami rodzicielskimi populacji mapującej (Kiev Mutant i P27174). Ostatecznie polimorfizm wykazało 15 produktów PCR - 3 polimorfizm wielkości produktu, 1 polimorfizm obecności / braku produktu i 11 polimorfizm sekwencji. Na tej podstawie na mapie genetycznej łubinu białego zostały zlokalizowane markery następujących genów: LUMINIDEPENDENS, FLOWERING LOCUS D, FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN A, FLOWERING LOCUS T, FRIGIDA, EARLY FLOWERING 3, FPA, PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4, MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 4, CONSTANS, EARLY FLOWERING 1, EARLY FLOWERING 4, EARLY IN SHORT DAYS 4, MOTHER OF FT. Przeprowadzono ocenę ich sprzężenia z cechą wczesności kwitnienia. Na podstawie wyników można wnioskować, że znaczna liczba genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia występuje w genomie łubinu białego w kilku kopiach.

Kolejnym etapem prac było **generowanie markerów dla linii łubinu białego różniących się terminem kwitnienia metodą sekwencjonowania nowej generacji MACE**. Dla poznania zmienności na poziomie RNA generowane są markery wywodzące się z regionów w pobliżu końców 3' poliA sekwencji cDNA. Do badań służyły liście we wczesnej fazie wzrostu generatywnego. Z każdej z badanych linii zostało wybranych 5 prób, z których wyizolowano RNA, spektrofotometrycznie określono jego stężenie i poziom zanieczyszczenia, a jakość sprawdzono metodą rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym. Analiza sekwencji potwierdziła obserwowany stosunkowo niewielki poziom polimorfizmu linii rodzicielskich populacji mapującej, wskazując jednocześnie na istnienie nowych źródeł zmienności genetycznej w obrębie kolekcji łubinu białego.

Ostatnim etapem realizacji projektu była **lokalizacja cytogenetyczna klonów BAC** zawierających **sekwencje genów kwitnienia** w chromosomach metafazowych **łubinu wąskolistnego** (gat. referencyjny) i **białego** (gat. badany). Klony z biblioteki genomu jądrowego łubinu wąskolistnego zostały wybrane na podstawie wyników przeszukiwania biblioteki, zakotwiczenia końców klonów w skafoldach genomu łubinu wąskolistnego, obecności w regionach syntenicznych do genomu *Medicago truncatula*, jak również adnotacji funkcjonalnej sekwencji regionów syntenicznych, w tym liczby genów (regiony bogate w geny) i obecności homologów genów kwitnienia. Badane klony hybrydyzowały do jednego / kilku loci lub dawały sygnały rozproszone w wielu miejscach genomu. Wyniki BAC-FISH pozwoliły na identyfikację chromosomów posiadających regiony zawierające geny związane z procesem kwitnienia. Można wnioskować o występowaniu więcej niż jednego takiego regionu w badanych genomach. Przetestowanie cytogenetyczne wybranych klonów BAC pozwoliło na uzyskanie zestawu klonów o sygnałach unikatowych, mających charakter markerów cytogenetycznych.