

SPRAWOZDANIE

z realizacji zadania nr 41 na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2015 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, dr Mirosław Kwaśniewski, mgr Paulina Kiziak.

Cel zadania:

1. Składanie transkryptomu referencyjnego łubinu żółtego (RNA-seq dla 16 prób uwzględniając 2 powtórzenia biologiczne i 2 środowiska) oraz wytypowanie genów potencjalnie zaangażowanych w odporność na wędnięcie fuzaryjne.
2. Opracowanie i testowanie genów referencyjnych w celu wytypowania najlepszych genów referencyjnych dla doświadczenia.
3. Połączenie niskiej zawartości alkaloidów z odpornością na patogeny grzybowe (*Colletotrichum lupini* i *Fusarium*) w zróżnicowanym podłożu genotypowym o dużej wartości użytkowej.

Wyniki:

Ad. 1.

W wyniku sekwencjonowania transkryptomu (RNA-seq) uzyskano dużą liczbę fragmentów cDNA (min. 59 mln dla genotypu) o dobrej jakości sekwencji, które posłużyły do składania *de novo* transkryptomu referencyjnego łubinu żółtego. Uzyskano 55043 kontigów o średniej długości 1058 pz (N50 = 1497 bp). Liczba ta jest zbliżona do liczby unikatowych transkryptów deklarowanych w opublikowanym transkryptomie łubinu żółtego (5309) (Parra-Gonzalez i in., 2012) oraz transkryptomie łubinu wąskolistnego dla odmiany Tanjil (53761) (Kamphuis i in., 2014). Analiza danych sekwencyjnych pod kątem zawartości GC wykazała, że transkrypty łubinu żółtego mają stosunkowo niską zawartość GC (39,8%) porównywalną z innymi roślinami dwuliściennymi. Podobne wyniki uzyskano dla opublikowanego transkryptomu łubinu żółtego (37,5%) (Parra-Gonzalez i in., 2012) a także innych gatunków motylkowatych np. ciecierzycy (40,3%) (Garg i in., 2011), czy soi (40,9%) (Schmutz i in., 2012). Blast2GO został wykorzystany do klasyfikacji funkcjonalnej transkryptów/kontigów opartej na terminach GO. Transkrypty sklasyfikowano w trzech kategoriach terminów GO: funkcji molekularnej, procesów biologicznych i komponentów komórkowych. Spośród 55043 transkryptów 27435 zostało zgrupowane w kategorie funkcjonalne GO. Funkcja molekularna

została przypisana do 22699 transkryptów (82,7%), proces biologiczny do 23166 transkryptów (84,4%), a komponent komórkowy do 15314 (55,8%). W obrębie procesów biologicznych geny kodujące procesy metaboliczne (25%) i komórkowe (21%) stanowią główne kategorie. W obrębie funkcji molekularnej najbardziej reprezentowane były geny warunkujące aktywność katalityczną (46%) i wiązanie (40%), a w kategorii komponent komórkowy geny zlokalizowane w komórce (37%) i w organellach (25%). Na podstawie transkryptomu referencyjnego oraz krótkich odczytów dla genotypów odpornych i podatnych przeprowadzono następnie analizę ekspresji różnicowej genów uzyskując zbiory transkryptów, których ekspresja ulegała zmianie po infekcji, tj. istotnie rosła lub spadała u roślin rosnących na polu prowokacyjnym w stosunku do roślin rosnących w standardowych warunkach polowych. Zastosowanie różnych kryteriów porównania zbiorów transkryptów wraz z uwzględnieniem adnotacji funkcjonalnej umożliwiło wytypowanie transkryptów, które wydają się szczególnie interesujące, jako zaangażowane w odporność na fuzariozę ze względu na udział w związanych z odpornością szlakach metabolicznych. Geny te mogą być uwzględnione w planowanych na przyszłe lata szczegółowych analizach qPCR. Ze względu na bardzo dużą ilość danych po sekwencjonowaniu RNA-seq i ciągłej aktualizacji stanu wiedzy dotyczącej odporności na *Fusarium* lista transkryptów poddanych dalszej analizie może być modyfikowana.

Ad. 2.

qPCR jest najpopularniejszą techniką wykorzystywaną do analizy ekspresji genów w różnych układach biologicznych, a co za tym idzie kluczowym narzędziem w procesie identyfikacji funkcji genów. Wyniki analiz ekspresji genów normalizowane są względem genu referencyjnego, który powinien charakteryzować się stabilnym poziomem ekspresji, niezależnie od warunków doświadczenia. Niestety nie istnieje uniwersalny gen referencyjny, który mógłby zostać zastosowany dla każdego układu badawczego (Cankorur-Cetinkaya i in., 2012). Na podstawie literatury do badań wybrano 7 genów metabolizmu podstawowego: (1) aktyna 11, (2) α -tubulina 5, (3) ATP syntaza, (4) czynnik elongacyjny 1 β – ELF1B, (5) dehydrogenaza alkoholowa – ADH3, (6) cyklofilina oraz (7) dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu – G6PD, w celu wytypowania genów referencyjnych o najbardziej stabilnej ekspresji w liściach wybranych genotypów podatnych i odpornych na *Fusarium* rosnących zarówno w typowych warunkach polowych, jak i na polu z wieloletnią monokulturą łubinową. W doświadczeniu wykorzystano trzy najczęściej wykorzystywane i rekomendowane do analizy genów referencyjnych narzędzie bioinformatyczne: NormFinder, geNorm oraz BestKeeper (Schmid i in., 2005; Mallona i in., 2010; Rapacz i in., 2012). Uzyskane wyniki nieznacznie różniły się między sobą, w zależności od wykorzystanego w oprogramowaniu algorytmu. W analizowanym układzie badawczym genami charakteryzującymi się najbardziej stabilnym poziomem ekspresji okazały się aktyna i ATP syntaza. Gen ADH3 został wytypowany tylko w programie BestKeeper. Biorąc pod uwagę możliwości techniczne i finansowe najbardziej zasadne wydaje się zastosowanie aktyny i ATP syntazy jako genów referencyjnych w normalizacji danych dotyczących ekspresji genów w analizowanym układzie doświadczalnym. Takie podejście badawcze zapewni największą dokładność i pewność uzyskanych wyników z zastosowaniem techniki qPCR.

Ad. 3.

W celu połączenie 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 5 nowych kombinacji mieszańcowych łubinu wąskolistnego i 5 łubinu żółtego.

Za pomocą chromatografu gazowego przebadano 50 obiektów obu gatunków pod względem składu jakościowego alkaloidów, z uwzględnieniem procentowego udziału wszystkich zidentyfikowanych alkaloidów. W łubinie żółtym przeanalizowano próby wyselekcjonowane z segregującego materiału 5 kombinacji krzyżówkowych. Zawartość ogólna wynosiła od 0 do 0,5368% s.m. na tle 0,002% s.m. u odmiany wzorcowej Baryt. Alkaloidami głównymi gatunku były: lupinina, sparteina i ammodendryna. Gramina w większości przypadków występowała w śladowych ilościach. Z jednej kombinacji krzyżówkowej (Lidar x Taper) wyselekcjonowano próby o bardzo niskiej zawartości alkaloidów ($\bar{x} = 0,0005\%$ s.m.).

W łubinie wąskolistnym przeanalizowano próby z 3 kombinacji. Wzorcem była odmiana Salsa. Skład jakościowy większości prób był typowy dla gatunku – dominujące alkaloidy to lupanina i 13OH-lupanina. W niektórych zawartość 13OH-lupaniny wyraźnie dominowała nad lupaniną i angustifoliną (60:20:20). Wyjątkowo nie stwierdzono angustifoliny i/lub izolupaniny. Z dwóch kombinacji krzyżówkowych (Quilinox x Regent i Kalif x Sonet) wyselekcjonowano próby, o ogólnej zawartości alkaloidów na poziomie tysięcznych części procenta.

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. Zaobserwowano bardzo szeroki zakres zmienności (5,7% - 100%) i znaleziono dwa obiekty o bardzo wysokiej odporności, co pozwala je uznać za źródło genetycznej odporności przeciwko *Fusarium sp.* W doświadczeniu z łubinem żółtym odsetek roślin żywych w trzecim terminie wynosił od 0% do 100%, ze wzorcem odporności na poziomie 88,9%. Dwa najlepsze obiekty, u których odsetek roślin „żywych” wynosił 100%, mogą być źródłem odporności przeciwko *Fusarium sp.*

Odporność przeciwko *Colletotrichum lupini* przebadano na 100 obiektach w doświadczeniu polowym oraz szklarniowym. W doświadczeniu polowym porażenie wystąpiło głównie na strąkach, w średnim natężeniu (od 0% do 75% ogólnej liczby strąków na poletku), ze stopniem porażenia od 0 do 8 stopni. Na podstawie wykonanych obserwacji wybrano najlepsze obiekty do dalszych testów i krzyżowań. Wyniki pozwalają wskazać 29 obiektów, które wyróżniły się słabym porażeniem i mogą posiadać genetyczną odporność na antraknozę.

W doświadczeniu szklarniowym zaobserwowano dużą zmienność poziomu odporności w zakresie od 3,0 do 8,9 stopnia, w skali 0-9. Pięć najlepszych obiektów (Z516E,

Z-659, Z-658, Z-651, Z-611) wyróżniło się wysoką odpornością w teście szklarniowym, potwierdzając wyniki, uzyskane w testach polowych.

Wnioski

1. Krótkie odczyty uzyskane w doświadczeniu RNA-seq umożliwiły złożenie transkryptomu referencyjnego łubinu żółtego, który stanowił podstawę w dalszych analizach ekspresji różnicowej genów.
2. Na podstawie wyników analizy różnicowej ekspresji genów wytypowano geny, potencjalnie zaangażowane w odporność na fuzariozę, które mogą zostać włączone w dalsze szczegółowe analizy qPCR.
3. W wyniku przeprowadzonych analiz wytypowano geny charakteryzujące się najbardziej stabilnym poziomem ekspresji w liściach łubinu żółtego, genotypów podatnych i odpornych na *Fusarium*, rosnących zarówno w typowych warunkach polowych, jak i na polu z wieloletnią monokulturą łubinową.
4. Rekomendowane jest wykorzystanie dwóch genów referencyjnych: aktyny i ATP syntazy do normalizacji danych dotyczących ekspresji genów zaangażowanych w odporność na *Fusarium*.
5. Z kombinacji krzyżówkowej Lidar x Taper łubinu żółtego wyselekcjonowano próby o bardzo niskiej zawartości alkaloidów ($\bar{x} = 0,0005\%$ s.m.).
6. Z kombinacji krzyżówkowych Quilnock x Regent oraz Kalif x Sonet łubinu wąskolistnego wyselekcjonowano próby, w których zawartość alkaloidów plasowała się na poziomie tysięcznych części procenta.
7. Genotypy o wysokiej odporności na wędnięcie fuzaryjne są nieliczne w łubinie wąskolistnym, jednak możliwe jest ich znalezienie. Test na polu fuzarialnym ujawnił przynajmniej jeden genotyp, który może być źródłem odporności.
8. W łubinie żółtym przeciętny poziom odporności na wędnięcie fuzaryjne jest wyższy i liczba obiektów posiadających geny odporności jest większa. Wyselekcjonowanie najcenniejszych genotypów wymaga ponownych testów.
9. Znalezienie genetycznej odporności na antraknozę jest trudne i wymaga kompleksowej oceny w różnych warunkach wegetacji. Wyniki obserwacji z doświadczeń polowych i szklarniowych są wystarczająco zgodne w przypadku obiektów o najwyższym poziomie odporności i pozwalają wskazać te, 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.

Bibliografia:

- Cankorur-Cetinkaya A., Dereli E., Eraslan S., Karabekmez E., Dikicioglu D., Kirdar B. (2012) A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast. PLoS One 7 (6): 4.
- Garg R., Patel R.K., Tyagi A.K., Jain M. (2011) De Novo Assembly of Chickpea Transcriptome Using Short Reads for Gene Discovery and Marker Identification. DNA Research.
- Kamphuis L.G., Hane J.K., Nelson M.N., Gao L., Atkins C.A., Singh K.B. (2014) Transcriptome sequencing of different narrow-leaved lupin tissue types provides a

- comprehensive uni-gene assembly and extensive gene-based molecular markers. *Plant Biotechnol J* 24 (10): 12229.
- Mallona I., Lischewski S., Weiss J., Hause B., Egea-Cortines M. (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology* 10: 4-4.
- Parra-Gonzalez L., Aravena-Abarzua G., Navarro-Navarro C., Udall J., Maughan J., Peterson L., Salvo-Garrido H., Maureira-Butler I. (2012) Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies. *BMC Genomics* 13 (1): 425.
- Rapacz M., Stępień A., Skorupa K. (2012) Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. *Acta Physiologiae Plantarum* 34 (5): 1723-1733.
- Schmid M., Davison T., Henz S., Pape U., Demar M., Vingron M., Scholkopf B., Weigel D., Lohmann J. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37: 501 - 6.
- Schmutz J., Cannon S., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D., Song Q., Thelen J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tian Z., Zhu L., Gill N., Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X., Shinozaki K., Nguyen H., Wing R., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R., Jackson S. (2012) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178 - 83.

Prezentacja wyników na konferencjach:

1. Kamel K., Kroc M., Kwaśniewski M., Świącicki W. Yellow lupin transcriptome sequencing towards identification of genes associated with resistance to *Fusarium* sp. Joint 7th conference of the Polish Society for Experimental Plant Biology and the Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG & MUG, Gdańsk, 8-11 września 2015 (plakat, książka streszczeń – strona 21)

Abstrakt:

http://www.mobi4health.ug.edu.pl/wp-content/uploads/2015/09/7th_PSEPB_Abstract_book.pdf