Tytuł zadania

# Analiza zmienności genetycznej i piramidyzacja genów warunkujących cechy użytkowe łubinu białego

**Numer zadania: 42**

**Okres realizacji: 1 styczeń 2014 -31 grudzień 2020**

**Kierownik zadania: Wojciech Rybiński, prof. dr hab. Instytut Genetyki Roślin PAN, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, 61 6550252, sekretariat: 61 6550250, wryb@igr.poznan.pl, z-ca: prof. dr hab. Wojciech Święcicki, 61 6550263, wswi@igr.poznan.pl**

## Zespół badawczy

| Kierownik zadania | | |
|---|---|---|
| Imię i nazwisko | Stopień i tytuł naukowy | Miejsce zatrudnienia |
| Wojciech Rybiński | Prof. dr hab. | Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu |
| Wykonawcy zadania | | |
| Imię i nazwisko | Stopień i tytuł | Miejsce zatrudnienia |
| Wojciech Święcicki | Prof. dr hab. | Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu |
| Paweł Barzyk | Mgr inż. | Poznańska Hodowla Roślin, Oddział Wiatrowo |
| Zespół pomocniczy – 3 osoby | | IGR PAN, IHAR Poznań |

## Cele projektu

Łubin biały jest potencjalnie jedną z najbardziej wartościowych roślin strączkowych (wysoki plon, 34-36% białka i 9% tłuszczu w nasionach). Ma jednak istotne wady (późne dojrzewanie, podatność na antraknozę i inne) wpływające na ograniczone zainteresowanie rolników. Postęp w hodowli łubinu białego jest niemożliwy bez poszerzenia puli genowej o korzystne warianty cech użytkowych oraz poznania właściwego dla ich pełnej ekspresji podłoża genetycznego. Analiza zmienności i uzyskanie populacji mieszańcowych z kombinacją kilku ulepszonych cech ( w tym wspomnianych powyżej) stanowią kolejne etapy badań. Z kolei wyprowadzona populacja mapująca jest niezbędna dla badań genetyczno-molekularnych w tym konstrukcji mapy genetycznej z markerami cech użytkowych. Uzyskane wyniki projektu w istotnym zakresie poszerzą wiedzę z zakresu genetyki gatunku, stworzą podstawy do dalszych badań genetyczno-hodowlanych, ale także będą miały znaczenie aplikacyjne.

**Celem proponowanych badań było:**

- zidentyfikowanie i selekcja pożądanych cech w światowych zbiorach kolekcyjnych lub wśród mutacji indukowanych, sposób dziedziczenia,
- introdukcja cech do genotypów o wysokiej wartości użytkowej,
- opracowanie populacji mapującej, stanowić będzie punkt wyjścia do pogłębionych badań genetyczno-molekularnych.

**Powyższe cele obejmowały:**

- opracowanie zmienności analizowanych materiałów oraz wyodrębnienie korzystnych wariantów cech takich, jak: odporność na antraknozę, wczesność, niska zawartość alkaloidów i wysoka zawartość tłuszczu o pożądanym profilu kwasów tłuszczowych,
- wyselekcjonowanie z segregującej populacji cech determinujących wczesność i korzystny układ elementów struktury plonu,
- uzyskanie materiałów zawierających kombinacje cech niezbędnych dla postępu biologicznego w zróżnicowanym podłożu genotypowym,
- wyprowadzenie populacji mapującej dla badań genetyczno-molekularnych, lokalizacji genów dla cech użytkowych i ich markerów.

**Założone i wymienione powyżej cele zrealizowano w okresie trwania realizacji projektu**

**Materiały i metody**

Materiały stanowiły światowe zasoby genowe łubinu białego analizowane na podstawie dostępnej bazy danych i testów polowo-laboratoryjnych, populacje mutacyjne oraz wytworzone populacje mieszańcowe i populacja mapująca.

**Metody:**

- analiza zmienności i selekcja genotypów o niskiej zawartości alkaloidów, zbadanie dziedziczenia – analizy biochemiczne, krzyżowania, analizy statystyczno-genetyczne,
- analiza zmienności i selekcja genotypów o podwyższonej zawartości tłuszczu, w tym o korzystnym profilu kwasów tłuszczowych, zwłaszcza wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: omega 3 i omega 6 – analizy biochemiczne,
- identyfikacja i selekcja genotypów odpornych na antraknozę (*Colletotrichum lupini*) - inokulacyjne testy szklarniowe w kolejnych pokoleniach u wybranych kombinacji krzyżówkowych w porównaniu do odmian wzorcowych,
- analiza zmienności w zbiorach kolekcyjnych oraz indukowanie nowej zmienności dla wyselekcjonowania genotypów o skróconym okresie wegetacji w połączniu z genem *rb* (*restricted branching*) – mutageneza: w tym optymalizacja dawek chemomutagenu MNU, ich wybór, traktowanie nasion, analiza i selekcja pokoleń mutacyjnych: $M_1$-$M_4$,
- krzyżowania zbliżające i analiza segregujących populacji mieszańcowych oraz wytworzenie populacji mapującej.

**WYNIKI i WNIOSKI**

Postęp w hodowli łubinu białego jest niemożliwy bez poszerzenia puli genowej o korzystne warianty cech użytkowych. Stąd na pierwszym etapie realizacji projektu przed wyborem najwartościowszych obiektów dla realizacji projektu dokonano oceny zawartości w nasionach alkaloidów i tłuszczu oraz odporności roślin na antraknozę w materiałach pochodzących z światowych zasobów genowych łubinu białego, a zgromadzonych (ponad 300 akcesów) w krajowym banku genów w Wiatrowie.

**Wnioski**

- analizy zawartości alkaloidów jak i tłuszczu w nasionach obiektów kolekcyjnych z ponad 40 krajów świata wykazały szeroki zakres zmienności obydwu cech w zakresie odpowiednio od 0,001 do 7 % i od 7% do 14%,
- w zasobach genowych reprezentujących 300 obiektów kolekcyjnych, inokulacyjne testy szklarniowe wykazały brak form o pełnej odporności na antraknozę, a szeroki zakres zmienności stopnia porażenia oceniany w skali 1-9 umożliwił wybór obiektów o największej tolerancji w zakresie od 1 do 4.

Drugi etap realizacji projektu obejmował krzyżowanie zbliżające z uwzględnieniem czterech cech (zawartość alkaloidów, tłuszczu, odporność na antraknozę i wczesność dojrzewania) i zróżnicowanego podłoża genetycznego ( odmiany uprawne) oraz ocenę wartości użytkowej wyselekcjonowanych rekombinantów.

## ALKALOIDY

- średnia zawartość alkaloidów dla wszystkich ocenianych mieszańców wynosiła 0,0069% przy zawartości na poziomie 0,024% i 0,035% w nasionach wzorcowych odmiana uprawnych: Butan i Boros,
- w finalnym pokoleniu $F_6$ średnia zawartość alkaloidów w trzech kombinacjach (B15, B16 i B17) wynosiła odpowiednio 0,0011%; 0,0190% i 0,00088% przy zakresach zmienności odpowiednio: od 0,0001% do 0,0039%; od 0,0034 do 0,0321% i od 0,002% do 0,00061%,
- wykazano różnice w zdolności kombinacyjnej poszczególnych kombinacji w kierunku uzyskiwania najbardziej niskoalkaloidowych rekombinantów. Najbardziej efektywna okazała się kombinacja B17: Amiga x Pikador,
- profil alkaloidowy wyrażony obecnością lub brakiem poszczególnych alkaloidów był specyficzny w odniesieniu do poszczególnych kombinacji krzyżówkowych i mieszańców, przy czym największą odrębnością w tym względzie wyróżniała się w kolejnych latach kombinacja B17 przy całkowitej absencji ammodendryny, albiny, 11,12- secodidehydromultifloryny i multifloryny,
- analizując linie rodzicielskie oraz pokolenia $F_1$ i $F_2$ zaobserwowano złożony sposób dziedziczenia alkaloidów. Dla większości z nich istotne było zarówno addytywne i nieaddytywne działanie genów z przewagą działania dominującego. W $F_1$ występowała naddominacja, a w $F_2$ częściowa lub całkowita dominacja genów dla większości alkaloidów. Udział nieaddytywnego działania genów i zmniejszenia stopnia dominacji w pokoleniu $F_2$ sugeruje stopniowe uwalnianie addytywności w kolejnych pokoleniach.

## ANTRAKNOZA

- zarówno w przeglądzie kolekcji łubinu białego jak i w uzyskanych materiałach mieszańcowych nie zidentyfikowano form w pełni odpornych na antraknozę,
- obserwowano szeroki zakres stopnia porażenia roślin przez antraknozę. W zastosowanej skali porażenia (1-9) zidentyfikowano szereg mieszańców o wyraźnie większej tolerancji (1-4) w porównaniu z silnie podatną, rodzicielską odmianą uprawną Butan, (8 w przyjętej skali ocen),
- wykazano wysoką zdolność kombinacyjną dla B19 (Wt 95673 x Boros) wyrażająca się identyfikacją najliczniejszej grupy segregantów o zwiększonej tolerancji na antraknozę.

## WCZESNOŚĆ

- prowadzenie oceny dojrzewania segregantów w kolejnych pokoleniach (do pokolenia $F_7$) umożliwiło wybór trzech, o najlepszych zdolnościach kombinacyjnych w kierunku selekcji najwcześniejszych mieszańców,
- zidentyfikowano najwcześniejsze mieszańce, dojrzewające kilka dni wcześniej niż ich formy rodzicielskie. Reprezentowały one dwie kombinacje krzyżówkowe obejmujące wczesną lokalną formę kolekcyjną Damascus (Wt 95517) oraz odmiany uprawne Boros i Pikador,
- dawki mutagenu NMU poszerzyły zakres terminu kwitnienia i dojrzewania w ocenianych populacjach umożliwiając wybór najwcześniej dojrzewających obiektów, średnio o cztery dni w porównaniu z kontrolną odmianą wyjściową Butan. Najbardziej efektywną dawką mutagenu w kierunku izolacji form najwcześniejszych o korzystnej strukturze plonowania okazała się 0,8 mM.

**TŁUSZCZ I KWASY TŁUSZCZOWE**

- potwierdzono trafność wyboru do badań w roku 2017 kombinacji krzyżówkowej AL 22 (Wt 95149) x Kalina o najlepszej zdolności kombinacyjnej, a w konsekwencji zidentyfikowano mieszańce o najwyższej zawartości tłuszczu (powyżej 13 i 14 %) w porównaniu ze średnią zawartością tłuszczu form rodzicielskich (10 % – 12%),
- w profilu kwasów tłuszczowych nasion u ocenianych mieszańców dominującym jest kwas oleinowy oraz linolowy. Mniejsza jest zwartość kwasu linolenowego, palmitynowego, stearynowego, eikozenowego oraz erukowego,
- wykazano korzystny stosunek kwasów omega–3 do omega-6, to jest kwasu linolenowego do linolowego na poziomie 1:2. Według danych literaturowych stosunek obydwu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych uważany jest za prawie idealny w diecie ludzi jak i żywieniu zwierząt.

**KRZYŻOWANIA ZBLIŻAJĄCE - PIRAMIDYZACJA GENÓW**

Identyfikacja mieszańców niskoalkaloidowych, o zwiększonej tolerancji na porażenie antraknozą, poprawionej wczesności dojrzewania oraz o wysokiej zawartości tłuszczu umożliwiły wykonanie krzyżowań zbliżających wiążących w jednym genotypie mieszańcowym niską zawartość alkaloidów z tolerancją na antraknozę i w drugiej parze cech, wysoką zawartość tłuszczu z wczesnością dojrzewania. Materiał do krzyżowań stanowiły uzyskane mieszańce o najkorzystniejszych wariantach wspomnianych cech i właściwym dla łubinu białego ideotypie.

- W kombinacjach krzyżowych obejmujące obiekty o niskiej zawartości alkaloidów x obiekty o największej tolerancji na antraknozę, niskoalkaloidowa forma pochodziła z kombinacji Amiga x Boros, a obiekty o zwiększonej tolerancji na antraknozę z potomstwa mieszańcowego (mutant cienkościenny x odmiana Butan). Uzyskane mieszańce są aktualnie rozmnażane dla analiz biochemicznych.

- W odniesieniu do drugiej pary cech, wczesności i zawartości tłuszczu, wyniki uzyskane w tegorocznym pokoleniu $F_4$ wykazały trafny dobór mieszańców, jako komponentów rodzicielskich, a efektem finalnym piramidyzacji genów związanych z ocenianymi cechami jest uzyskanie mieszańców o zarówno poprawionej wczesności jak i zawartości tłuszczu.

**POPULACJA MAPUJĄCA**

Dla uwzględnienia możliwie szerokiego polimorfizmu wybór form rodzicielskich oparto na dużej liczbie przeciwstawnych alleli genów warunkujących badane cechy użytkowe (linia dzika x odmiana uprawna). Warunki te spełnia linia z krajowej kolekcji łubinu białego AL 22 charakteryzująca się tradycyjnym typem wzrostu, wysoką zawartością alkaloidów i tłuszczu oraz odmiana uprawna Boros o samokończącym typie wzrostu oraz niskiej zawartości alkaloidów i tłuszczu. W tegoroczny pokoleniu $F_5$ populacje mapującą reprezentowało ponad 150 roślin.

# WYBRANE OSIĄGNIĘCIA

## Aspekt utylitarny:

1. Uzyskano rekombinanty które charakteryzowały się:
   - zwiększoną tolerancją na porażenie przez antraknozę i obniżoną zawartością alkaloidów,
   - poprawioną zawartością tłuszczu i wczesnością dojrzewania.
2. Analizy profilu kwasów tłuszczowych wykazały jego wysoce zbalansowany charakter wyrażający się z żywieniowego punktu widzenia idealnym stosunkiem (1:2) wielonienasyconych kwasów: linolenowego (omega 3) do linolowego (omega 6).

## Aspekt metodyczny:

- wyprowadzono populację mapującą z możliwością jej wykorzystana dla badań genetyczno-molekularnych, w tym konstrukcji mapy genetycznej z markerami cech użytkowych,
- opracowano metodykę indukowania mutacji dla łubinu białego (gatunek o wąskiej zmienności naturalnej) w oparciu o testy optymalizacji dawek. Za optymalną dla nasion łubinu białego uznano dawkę 0,8 mM MNU,
- zmodyfikowano metodykę inokulacyjnego testu szklarniowego dla oceny stopnia porażenia roślin łubinu białego przez antraknozę i identyfikacji form odpornych.

## Wyjaśnienie mechanizmu:

- wykazano złożony charakter dziedziczenia alkaloidów. Istotne było zarówno addytywne i nieaddytywne działanie genów z przewagą działania dominującego (w $F_1$ naddominacja, w $F_2$ częściowa lub całkowita dominacja genów).

## Publikacje

**Rybinski W. , Kroc M. , Święcicki W., Wilczura P., Kamel K., Barzyk P. , Mikulski W. 2018.** Preliminary Estimation of Variation of Alkaloids Content in White Lupin (*Lupinus albus* L.) Collection. In:. *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics,* Brazauskas et al. (Eds.) Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, pp. 131-136

**Rybiński W., Święcicki W., Bocianowski J., Börner A., Starzycka-Korbas E., Starzycki M. 2018.** Variability of fat content and fatty acids profiles in seeds of a Polish white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. Genetic Resources and Crop Evolution 65: 417-431. (IF- 1,25)

## Konferencje naukowe - streszczenia

**Rybiński W., Święcicki W., Nawrot Cz., Barzyk P., Starzycki M., Starzycka E., Wilczura M. 2014**. Zawartość alkaloidów i tłuszczu w nasionach oraz odporność na antraknozę w krajowej kolekcji łubinu białego. Krajowa konferencja „Łubin we współczesnym rolnictwie", 8-10 września 2014, Kudowa Zdrój; Materiały Konferencyjne s. 49-50

**Rybiński W., Święcicki W., Barzyk P, Starzycki M. 2015**. Zmienność zawartości tłuszczu i profilu kwasów tłuszczowych dla części obiektów kolekcyjnych łubinu białego w 2015 r. Konferencja Naukowa Polskiego Towarzystwa Agrofizycznego, Malinówka k. Ełku, 9-11 września 2015; Materiały Konferencyjne s. 49-50

**Rybiński W., Święcicki W., Bocianowski J., Boerner A., Starzyck E., Starzyckia M. 2016**. Variability of fat and fatty acids profiles in seed of white lupin (*Lupinus albus* L.) collection., Second International Legume Society Conference (ILS2) 2016: Legumes for Sustainable World, Troia, Portugal, 12-14 October 2016; Book of Abstracts p. 98

**Rybiński W., Kroc M., Święcicki W., Wilczura P., Kamel K., Barzyk P., Mikulski W. 2017**. Variability of fat content and fatty acids profiles in seeds of a Polish white lupin. Eucarpia „ Breeding grasses and protein crops in the era of genomics", Vilnius, Lithuania, September 11-14, 2017. (Udział P. Barzyk), Book of Abstracts p.63

**Rybiński W., Święcicki W., Starzycka-Korbas E., Starzycki M., Barzyk P. 2018.** Seeds of white lupin (*Lupinus albus* L.) as a valuable source of fat and fatty acids. International Congress On Oil and Protein Crops – Chisinau, Republic of Moldova, May 20-24, 2018; Abstract Book p. 89

**Rybiński W., Święcicki W., Barzyk P., Nawrot Cz., Starzycki M., Starzycka-Korbas E., Wilczura M. 2019.** Ocena zmienności zawartości alkaloidów i tłuszczu w nasionach oraz odporność na antraknozę w krajowej kolekcji łubinu białego. Ogólnopolska konferencja IGR PAN: „Od rośliny modelowej do odmiany", 5-7 listopad 2019; Poznań; Materiały Konferencyjne s. 74

**Rybiński W., Święcicki W., Starzycki M., Wilczura P., Starzycka-Korbas E., Barzyk P., Górynowicz B. 2019.** White lupin (*Lupinus albus* L.) with increased fat and reduced alkaloids content. European Conference on Crop Diversification, September 18-21.2019. Budapest, Hungary; Book of Abstracts p.198-19