

MICHAŁ KSIAŻKIEWICZ

PIOTR PLEWIŃSKI

SANDRA RYCHEL

MAGDALENA TOMASZEWSKA

ANETA SAWIKOWSKA

WOJCIECH BIELSKI

BARBARA NAGANOWSKA

BOGDAN WOLKO

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Kierownik Tematu: dr Michał Książkiewicz Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, tel. 61 6550268, e-mail: mksi@igr.poznan.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.18.2018. Zadanie 39.

Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego — podstawy genetyczne i molekularne

Early flowering traits of white lupin and yellow lupin — genetic and molecular backgrounds

Słowa kluczowe: termin kwitnienia, wernalizacja, phenotypowanie, mapowanie genetyczne, sekwencjonowanie DNA, sekwencjonowanie RNA

TEMAT BADAWCZY 1

Realizację zadania podzielono na cztery tematy badawcze.

Celem tematu badawczego 1 było otrzymanie linii pokolenia F5 z krzyżówek łubinu żółtego ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14 oraz poznanie wymagań wernalizacyjnych wybranych linii z kolekcji łubinu białego.

W stacji Hodowli Roślin Smolice, Oddział w Przebędowie, wysiano nasiona z pokolenia F4: ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14. Uzyskano plon z 200 linii z każdej kombinacji krzyżówkowej w ilości wystarczającej (z rezerwą na ewentualne powtórzenia) do kontynuacji prac w następnych latach.

Doświadczenie ukierunkowane na ocenę terminu kwitnienia łubinu białego założono w warunkach szklarniowych (z wernalizacją i bez wernalizacji). Badano 110 linii z kolekcji (Poznańska Hodowla Roślin, Oddział Wiatrowo) oraz 2 linie rodzicielskie populacji mapującej (Kiev Mutant i P27174). Doświadczenie wykazało, że w kolekcji

występuje znaczna zmienność zarówno terminu wiązania pąków, kwitnienia, dojrzewania strąków, jak i odpowiedzi w zakresie tych trzech cech na wernalizację. Dla linii wernalizowanych średni termin od wysiania do wiązania pąków zawierał się w zakresie 26–50 dni, zaś nie poddanych wernalizacji: 31–76 dni. Średnia liczba dni do inicjacji kwitnienia wynosiła 33–61 dni dla roślin wernalizowanych (w 2015 roku: 38–77 dni) i 37–80 dni dla niewernalizowanych (w 2015 roku: 43–87 dni). Zaobserwowano duże zróżnicowanie odpowiedzi na wernalizację — od przyspieszenia kwitnienia o 34 dni do całkowitej termoneutralności. Są to wyniki podobne do tych uzyskanych w 2015 roku (zakres od -36 do +2 dni). Linie wczesne po wernalizacji przyspieszały termin kwitnienia o 1–6 dni. Największe zróżnicowanie tej cechy występowało w liniach późnych (przyspieszenie o 10–32 dni). Wpływ wernalizacji na termin dojrzewania strąków był statystycznie istotny dla linii pośrednich i późnych — średnie przyspieszenie terminu dojrzewania wynosiło około 7 dni.

Wnioski

- Cecha wczesności kwitnienia łubinu białego jest cechą ilościową, warunkowaną przez kilka niesprzężonych ze sobą genów.
- Linie rodzicielskie populacji mapującej łubin białego istotnie różnią się terminem kwitnienia i wymaganiami wernalizacyjnymi.

TEMAT BADAWCZY 2

Celem tematu badawczego 2 była identyfikacja miejsc polimorficznych różnicujących linie rodzicielskie populacji mapującej oraz wybrane linie wczesne i późne łubinu żółtego w obrębie sekwencji homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia i opracowanie na tej podstawie markerów molekularnych. Zestaw sekwencji obejmował następujące geny:

- integratory szlaków indukcji kwitnienia: *FLOWERING LOCUS T (FTa1a, FTa1b, FTc1, FTc2)*, *UNIFOLIATA (UN1a, UN1b)*;
- geny ze szlaku wernalizacyjnego: *FRIGIDA*, *VERNALIZATION INDEPENDENCE 3*;
- geny ze szlaku autonomicznego: *FLOWERING LOCUS D*, *FLOWERING PROTEIN A (FPAa, FPAb)*, *FY*, *SQUAMOSA6*;
- gen inicjujący kwitnienie w odpowiedzi na stresy abiotyczne: *BROTHER OF FT AND TFL1*;
- geny indukujące kwitnienie w zależności od temperatury *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1a, TFL1b)*, *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4*;
- gen ze szlaku fotoperiodycznego: *CYCLIC DOF FACTOR 3*;
- gen regulujący dojrzewanie nasion: *MOTHER OF FT AND TFL1*;
- geny indukcji kwitnienia w ramach rytmu dobowego: *EARLY FLOWERING 1*, *EARLY FLOWERING 3*, *EARLY FLOWERING 4*, *SKI-INTERACTING PROTEIN 1*;
- gen zlokalizowany w obrębie jednego z *loci* QTL wczesności kwitnienia łubinu białego: *DNAJ10*.

Loci polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) pomiędzy liniami rodzicielskimi polskiej populacji mapującej (PRH444/14 × Parys) zidentyfikowano dla 8 genów, zaś

pomiędzy liniami rodzicielskimi australijskiej populacji mapującej (Wodjil × P28213) dla 19 genów. Polimorfizm insercji/delecji zidentyfikowano dla 3 genów (PRH444/14 × Parys) oraz dla 10 genów (Wodjil × P28213). Zaprojektowano 2 markery typu PCR, 6 CAPS i 2 dCAPS (PRH444/14×Parys) oraz 3 markery typu PCR, 19 CAPS i 1 dCAPS (Wodjil × P28213).

Wnioski

- Obserwowany poziom polimorfizmu między liniami wczesnymi a późnymi łubinu żółtego jest zbliżony do tego, który występuje u łubinu wąskolistnego i białego.
- Zaprojektowane markery polimorficzne zakotwiczone w sekwencjach genów związanych z procesem indukcji kwitnienia będą mogły być wykorzystane do mapowania genetycznego w obrębie dwóch populacji mapujących łubinu żółtego — polskiej i australijskiej.

TEMAT BADAWCZY 3

Celem tematu badawczego 3 było poznanie profilu ekspresji i sekwencji genów kwitnienia dla linii rodzicielskich populacji mapującej oraz wybranych linii wczesnych i późnych łubinu żółtego metodą sekwencjonowania nowej generacji.

Materiałem badawczym było 5 linii wybranych na podstawie obserwacji fenotypowych, polimorfizmu markerów DNA oraz danych literaturowych: Wodjil — wczesna, termoneutralna, z Australii; P28213 — późna, wymagająca wernalizacji, z Portugalii; Population Sewilla-4 — późna, wymagająca wernalizacji, z Hiszpanii; Parys — pośrednia, z Polski; PRH 444/14 — bardzo wczesna, termoneutralna, z Polski.

Doświadczenie zostało założone w warunkach kontrolowanych w Centrum Uprawy Roślin IGR PAN (z wernalizacją i bez wernalizacji): temperatura 18°C (noc) / 22°C (dzień), fotoperiod 16 godzin, wilgotność 50–70%. Do izolacji RNA i sekwencjonowania RNA pobrano tkankę liści 28 i 35 dni po wysianiu nasion.

Analiza różnicowa ekspresji genów wykazała, że większość homologów znanych genów kwitnienia była aktywna ekspresyjnie we wszystkich badanych wariantach/genotypach. Dla niektórych genów zaobserwowano zróżnicowanie poziomu ekspresji dla poszczególnych kopii w zależności od terminu, genotypu lub zastosowanej wernalizacji. Określono geny kandydujące, które mogą odpowiadać za cechę wczesności kwitnienia u linii termoneutralnych.

Wnioski

- Niektóre homologi genów indukcji kwitnienia u łubinu żółtego uległy duplikacji i subfunkcjonalizacji (dywergencji).
- Zidentyfikowano dwa geny kandydujące, które prawdopodobnie odpowiadają za zniesienie wymagań wernalizacyjnych i wczesność kwitnienia linii PRH444/14.

TEMAT BADAWCZY 4

Celem tematu badawczego 4 było opracowanie markerów do rutynowego genotypowania głównych QTL cechy wczesności kwitnienia łubinu białego i określenie za ich pomocą profilu tych QTL w światowej kolekcji tego gatunku.

Podczas realizacji tego zadania w latach 2016–2018 określono 5 *loci* QTL wczesności kwitnienia (*1N-5N*), które były wspólne dla wszystkich doświadczeń, w których nasiona nie były wernalizowane (doświadczenia polowe w latach 2004, 2005, 2015 i doświadczenie szklarniowe w 2016). Do genotypowania wybrano 10 markerów, po 2 na każde *locus* QTL wczesności kwitnienia. Użycie markerów zakotwiczonych w genach kandydujących pozwoliło na analizę frekwencji alleli odpowiadających za późne kwitnienie linii P27174 w kolekcji i częstości rekombinacji wokół tych *loci*. Zidentyfikowano, że allel „późny” *4N* zawiera jedna linia, allel „późny” *1N* zawierają dwie linie, allel „późny” genu *2N* posiadają 4 linie, allel „późny” genu *5N* ma 18 linii, zaś allel późny genu *3N* — 33 linie. Zaobserwowano szybki spadek współczynnika nierównowagi sprzężeń w miarę oddalania się od genów kandydujących za wyjątkiem *locus 5N*.

Wnioski

- Uzyskany zestaw markerów pozwala na wiarygodną identyfikację alleli dla wszystkich pięciu głównych *loci* wczesności kwitnienia łubinu białego.
- Wprowadzenie odporności na antraknozę z dzikich linii etiopskich do linii udomowionych jest możliwe jedynie przy użyciu linii wczesnych i termoneutralnych niespokrewnionych z linią Kiev Mutant.
- W kolekcji znajdują się co najmniej cztery linie, które mogą być użyte jako donory wczesności kwitnienia w krzyżowaniach z komponentami z Etiopii.