

**Tytuł zadania:**

Doskonalenie mapy genetycznej łubinu wąskolistnego i poszukiwanie markerów sprzężonych z cechami użytkowymi ze szczególnym uwzględnieniem zawartości białka i alkaloidów

**Okres realizacji:**

Rok 2024

**Kierownik zadania:**

*Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk*  
dr hab. Michał Książkiewicz, mksi@igr.poznan.pl

**Zespół wykonawców:**

*Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk:*  
dr Wojciech Bielski  
mgr inż. Anna Surma

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

dr hab. inż., prof. UP Renata Galek  
dr Bartosz Kozak  
dr Sandra Rychel-Bielska  
mgr Marta Buzar, mgr Agnieszka Łącka, Mariusz Skrzyński,  
Tadeusz Czuj, Maciej Jakobina (pracownicy techniczni)

*Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o.*

mgr Paweł Barzyk (pracownik techniczny)

*Hodowla Roślin Smolice Spółka z o.o.*

mgr Krystyna Spychała, Anna Galińska (pracownicy techniczni)

## **Cele projektu:**

### *Temat badawczy nr 1*

Poznanie zakresu zmienności faz fenologicznych oraz cech struktury i jakości plonu w liniach kolekcyjnych i hodowlanych łąbinu wąskolistnego w warunkach polowych i rozmnożenie nasion do mapowania asocjacyjnego.

### *Temat badawczy nr 2*

Określenie fenotypu w zakresie pęknięcia strąków i elementów struktury plonu w populacji mapującej Emir × LAE-1 w warunkach polowych do mapowania genetycznego.

### *Temat badawczy nr 3*

Uzyskanie udoskonalonej konsensusowej mapy genetycznej zawierającej wspólne loci polimorficzne dla populacji mapujących łąbinu wąskolistnego Emir × LAE-1 oraz Graf × Mutant cienkościenny, a także poznanie lokalizacji w genomie loci cech ilościowych obserwowanych w warunkach polowych dla populacji mapującej Emir × LAE-1.

*Cel nr 1 został zrealizowany za wyjątkiem zawartości i składu alkaloidów w przeliczeniu na suchą masę (w trakcie analiz chemicznych, cel zostanie zrealizowany w całości do końca 2024 roku),*

*Cel nr 2 został zrealizowany w całości,*

*Cel nr 3 został zrealizowany w całości.*

## **Materiał:**

- **160 obiektów z kolekcji łubinu wąskolistnego:** populacje dzikie (34), odmiany lokalne (2), odmiany hodowlane (63), linie hodowlane (58), mutanty (3)
- **80 linii hodowlanych** (po 40 z Poznańskiej Hodowli Roślin i Hodowli Roślin Smolice)
- **populacja mapująca Emir × LAE-1 (129 linii wsobnych)**, która segreguje m. in. w zakresie wysokości roślin, liczby pędów bocznych, typu wzrostu, terminu kwitnienia i dojrzewania, pęknięcia strąków, plonu i masy tysiąca nasion
- **populacja mapująca Graf × Mutant cienkościenny (128 linii wsobnych)**, która segreguje w zakresie grubości okrywy nasiennej

## **Metody:**

- doświadczenia polowe: wysiew nasion (siewnikiem lub ręczny) w dwóch powtórzeniach i dwóch lokalizacjach (Przebędowo i Wiatrowo), zbiór strąków (ręczny/automatyczny)
- obserwacje polowe: typ wzrostu, kolor nasion i kwiatów, termin kwitnienia i dojrzewania, wysokość roślin, pęknięcie strąków, plon nasion z poletka i masa tysiąca nasion
- ocena składników jakościowych nasion w laboratorium COBORU:
  - zawartość białka wg polskiej normy PN-EN ISO 5983-2, metodą Kjeldahl'a
  - zawartość włókna surowego metodą weendeńską, podwójnej hydrolizy kwasowej
  - zawartość tłuszczu na podstawie normy PN-76/R-64753, metodą ekstrakcyjną Soxhleta
  - zawartość i skład alkaloidów przy użyciu metody udostępnionej przez IChB w Poznaniu
- mapowanie genetyczne w programie Joinmap 5
- złożone mapowanie interwałowe w programie Windows QTL Cartographer 2.5
- izolacja DNA przy użyciu Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega)

## Fenotypowanie faz fenologicznych oraz cech struktury i jakości plonu linii kolekcyjnych i hodowlanych łubinu wąskolistnego w warunkach polowych (temat 1):

- W 2023 roku wysiano **160** linii kolekcyjnych i **80** linii hodowlanych w Wiatrowie i Przebędowie
- **Plon** uzyskano dla wszystkich linii: zebrano średnio **325 g** nasion na linię w Przebędowie i **275 g** w Wiatrowie. Współczynnik korelacji między powtórzeniami wyniósł 0,94 i 0,51, między środowiskami 0,59 (p-value:  $4,3 \times 10^{-50}$ ;  $1,9 \times 10^{-54}$ ;  $1,3 \times 10^{-9}$ ), zaś względem wyników z 2023 roku wyniósł 0,57 w Wiatrowie i 0,30 w Przebędowie (p-value  $5,5 \times 10^{-22}$  i  $1,8 \times 10^{-6}$ ).
- **Termin kwitnienia** wynosił od **49** do **81** dni w Wiatrowie oraz od **41** do **85 dni** w Przebędowie. Współczynnik korelacji między powtórzeniami wyniósł 0,90 i 0,81, między środowiskami 0,76 (p-value:  $4,4 \times 10^{-89}$ ;  $2,9 \times 10^{-56}$ ;  $1,1 \times 10^{-45}$ ), zaś względem wyników z 2023 roku wyniósł 0,60 w Wiatrowie (p-value  $1,9 \times 10^{-24}$ ) i 0,74 w Przebędowie (p-value  $9,1 \times 10^{-43}$ ).
- **Termin dojrzałości** wynosił od **84** do **118** dni w Wiatrowie oraz od **64** do **108** dni w Przebędowie, a współczynnik korelacji między powtórzeniami wyniósł 0,97 i 0,63, między środowiskami 0,17 (p-value:  $1,2 \times 10^{-150}$ ;  $1,5 \times 10^{-27}$ ; 0,007), zaś względem wyników z 2023 roku wyniósł -0,01 w Wiatrowie (p-value 0,97) i 0,31 w Przebędowie (p-value  $7,5 \times 10^{-7}$ ).
- **Masa tysiąca nasion** wynosiła od **79** do **177** g w Wiatrowie i od **90** do **145** g w Przebędowie, przy czym współczynnik korelacji między powtórzeniami wyniósł 0,96 i 0,61, między środowiskami -0,01 (p-value  $5,8 \times 10^{-141}$ ;  $3,7 \times 10^{-26}$  i 0,83), zaś względem wyników z 2023 roku wyniósł 0,60 w Wiatrowie (p-value  $8,1 \times 10^{-25}$ ) i 0,13 w Przebędowie (p-value 0,04)
- **Wysokość roślin** wynosiła od **27** do **110** cm w Przebędowie, przy czym współczynnik korelacji między powtórzeniami wyniósł 0,01, zaś względem wyników z 2023 roku wyniósł 0,20 (p-value 0,91 i 0,002)

## Fenotypowanie cech jakości plonu (temat 1 – ciąg dalszy):

- **Zawartość białka** mieściła się w zakresie od **25,7%** do **37,7%** suchej masy. Współczynnik korelacji względem lat 2022 i 2023 wyniósł odpowiednio 0,23 i 0,25 dla linii kolekcyjnych (p-value 0,01 i 0,007) oraz 0,31 i 0,23 dla linii hodowlanych (p-value 0,005 i 0,04). Linie hodowlane miały znacznie mniejszą średnią różnicę w poziomie białka między latami (odpowiednio 2,6 i 2,3 punktów procentowych) niż materiały z kolekcji (około 4,3 p.p.).
- Wśród materiałów ze stacji hodowlanych najwyższą **zawartość białka** uzyskano w linii R540/19 - **34,5%** (32,8% w 2022 r. i 33,0% w 2023 r.). Z materiałów kolekcyjnych najwyższą zawartość białka zmierzono w linii 96104 - **37,7%** (36,1% w 2022 r. i 30,8% w 2023 r.).
- **Zawartość włókna** wynosiła od **13,7%** do **20,7%** suchej masy i była wyższa o 3,3 p.p. niż w 2023 roku i o 2,3 p.p. niż dwa lata temu. Linie hodowlane wykazały istotną statystycznie korelację wyników dla poziomu włókna między rokiem 2023 i 2024 (r-value 0,42; p-value 0,0001) oraz 2022 i 2024 (r-value 0,39; p-value 0,0003). Współczynnik korelacji dla materiałów kolekcyjnych wyniósł 0,19 (p-value 0,003) i 0,13 (p-value 0,17).
- **Zawartość tłuszczu** wynosiła od **4,1%** do **8,6%**, przy czym była o 1,9 p.p. niższa niż rok temu i o 0,8 p.p. niższa niż dwa lata temu. Współczynnik korelacji między latami był nieistotny statystycznie dla linii hodowlanych w obu porównaniach (2023/2024 i 2022/2024).
- **Zawartość tłuszczu** nie wykazała w 2024 roku istotnej statystycznie korelacji z zawartością białka. Z kolei zawartość włókna była negatywnie skorelowana z zawartością białka, przy czym dla zarówno dla linii kolekcyjnych jak i hodowlanych wynik był istotny statystycznie (współczynnik korelacji odpowiednio -0,52 i -0,44; p-value  $7,2 \times 10^{-10}$  i  $3,8 \times 10^{-5}$ ).
- **Zawartość włókna** była nieznacznie negatywnie skorelowana z zawartością tłuszczu, ale tylko w przypadku linii hodowlanych wartość była istotna statystycznie (współczynnik korelacji -0,23; p-value 0,04).

## Fenotypowanie pękania strąków i elementów struktury plonu w populacji mapującej Emir × LAE-1 w warunkach polowych do mapowania genetycznego (temat 2):

- Obserwacje **barwy kwiatu** wykazały wystąpienie różnic w pomiędzy powtórzeniami biologicznymi dla ponad **30** linii, przy czym zazwyczaj były to różnice w odcieniach. Wystąpiły też nieliczne różnice względem wzorca.
- Obserwacje **typu wzrostu** wykazały wystąpienie różnic względem wzorca lub między powtórzeniami biologicznymi (łącznie dla 16 linii). Aktualnie populacja segreguje pod względem typu wzrostu na poziomie 70 (tradycyjny) vs 60 (epigonalny), co daje rozkład zgodny z oczekiwanym (65 vs 65).
- **Liczba dni od wysiania nasion do indukcji kwitnienia** wyniosła od **50** do **57** dni w Wiatrowie i od **45** do **54** dni w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,42 w Wiatrowie (p-value  $5,4 \times 10^{-7}$ ) i 0,77 w Przebędowie (p-value  $2,4 \times 10^{-25}$ ), między środowiskami 0,47 (p-value  $2,2 \times 10^{-8}$ ), zaś między latami 2024 a 2022 i 2023 wyniósł odpowiednio 0,51 (p-value  $4,9 \times 10^{-10}$ ) i 0,27 (p-value 0,002) w Wiatrowie oraz 0,39 (p-value  $3,7 \times 10^{-6}$ ) i 0,42 (p-value  $4,7 \times 10^{-7}$ ) w Przebędowie.
- **Liczba dni od wysiania nasion do dojrzewania strąków** wyniosła od **84** do **105** dni w Wiatrowie i od **86** do **101** dni w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,62 w Wiatrowie (p-value  $5,1 \times 10^{-15}$ ) i 0,99 w Przebędowie (p-value  $1,7 \times 10^{-122}$ ), między środowiskami 0,47 (p-value  $1,8 \times 10^{-8}$ ), zaś między latami 2023 i 2024 wyniósł 0,47 (p-value  $1,7 \times 10^{-8}$ ) w Wiatrowie i 0,33 (p-value 0,0001) w Przebędowie.
- **Wysokość roślin** wynosiła od **38** do **110** cm w Przebędowie. Wyraźnie zaznaczył się wpływ środowiska w postaci większej wysokości roślin względem lat ubiegłych (47,0 cm w 2024 roku, 32,5 cm w 2022 roku i 24,5 cm w ubiegłym roku). Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,50 (p-value  $1,1 \times 10^{-9}$ ), a między latami 2022 i 2024: 0,06 (p-value 0,50), zaś między 2023 i 2024: 0,52 (p-value  $1,5 \times 10^{-10}$ ).

## Fenotypowanie pęknięcia strąków i elementów struktury plonu w populacji mapującej Emir × LAE-1 w warunkach polowych do mapowania genetycznego (temat 2 – ciąg dalszy):

- **Cecha pęknięcia strąków** uwidoczniła się od trzeciego terminu obserwacji (18.07.2024). Średni poziom pęknięcia strąków wynosił od **4,8%** w trzecim terminie do **57,6%** w szóstym. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,82 w czwartym terminie (p-value  $3,0 \times 10^{-33}$ ), 0,89 w piątym (p-value  $2,1 \times 10^{-45}$ ) i 0,89 w szóstym terminie (p-value  $1,1 \times 10^{-46}$ ). Porównując terminy między latami uzyskaliśmy współczynniki korelacji odpowiednio 0,47 (p-value  $1,3 \times 10^{-8}$ ), 0,61 (p-value  $1,2 \times 10^{-14}$ ) i 0,51 (p-value  $6,6 \times 10^{-10}$ ) dla lat 2022 i 2024 oraz 0,46 (p-value  $4,8 \times 10^{-8}$ ), 0,38 (p-value  $6,5 \times 10^{-6}$ ) i 0,69 (p-value  $6,8 \times 10^{-20}$ ) dla lat 2023 i 2024.
- **Masa tysiąca nasion** wynosiła od **71** do **160 g** w Wiatrowie i od **96** do **148 g** w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,83 w Wiatrowie (p-value  $6,2 \times 10^{-34}$ ) i 0,83 w Przebędowie (p-value  $4,2 \times 10^{-34}$ ), między środowiskami 0,45 (p-value  $5,8 \times 10^{-8}$ ). Współczynnik korelacji dla doświadczeń w Wiatrowie wyniósł 0,64 (p-value  $2,4 \times 10^{-16}$ ) dla lat 2022 i 2024, 0,87 (p-value  $3,6 \times 10^{-42}$ ) dla lat 2023 i 2024 oraz 0,78 (p-value  $4,2 \times 10^{-28}$ ) pomiędzy rokiem 2021 (Swojczyce) a rokiem 2024. Z kolei dla doświadczeń w Przebędowie współczynnik korelacji wyniósł 0,41 (p-value  $9,9 \times 10^{-7}$ ) dla lat 2021 i 2024, 0,67 (p-value  $1,6 \times 10^{-18}$ ) dla lat 2022 i 2024 oraz 0,50 (p-value  $1,2 \times 10^{-9}$ ) między latami 2023 i 2024.
- **Plon nasion z poletka** cechował się znaczną zmiennością pomiędzy lokalizacjami, w zakresie od **11** do **1046 g** w Wiatrowie i od **60** do **800 g** w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,35 w Wiatrowie (p-value  $3,7 \times 10^{-5}$ ) i 0,57 w Przebędowie (p-value  $1,8 \times 10^{-12}$ ). Współczynnik korelacji dla obserwacji w Wiatrowie dla lat 2022 i 2024 wyniósł 0,35 (p-value  $3,5 \times 10^{-5}$ ), dla lat 2023 i 2024 0,53 (p-value  $9,5 \times 10^{-11}$ ), zaś dla lat 2021 (Swojczyce) a 2024 wyniósł 0,55 (p-value  $1,4 \times 10^{-11}$ ). W Przebędowie współczynnik korelacji wyniósł 0,34 (p-value  $7,9 \times 10^{-5}$ ) dla lat 2021 i 2024, 0,49 (p-value  $3,7 \times 10^{-9}$ ) dla lat 2022 i 2024 oraz 0,08 (p-value 0,35) dla lat 2023 i 2024.

## **Konstrukcja konsensusowej mapy genetycznej zawierającej wspólne loci polimorficzne dla populacji mapujących Emir × LAE-1 oraz Graf × Mutant cienkościenny (temat 3):**

- Liczba markerów wspólnych wynosiła od 1 (grupa LG-20, chromosom NLL-20) do 48 (grupa LG-03, chromosom NLL-03). Ponieważ minimalna liczba wspólnych markerów do integracji grup sprzężeń wynosi 2, wykonanie takiej analizy możliwe było dla 19 grup sprzężeń.
- Analiza wykazała konieczność poprawieniu układu markerów na mapie genetycznej Graf × Mutant cienkościenny w następujących grupach sprzężeń: LG01 między pozycjami 64,1 a 85,5 cM, LG02 między 7,1 a 12,3 cM, LG07A między 61,6 a 64,8 cM oraz między 70,8 a 74,1 cM, a także w obrębie grupy sprzężeń LG10.
- Na mapie genetycznej Emir × LAE-1 układ markerów może wymagać poprawy w grupie LG03 między pozycjami 88,1 a 93,3 cM oraz w grupie LG10. W pozostałych grupach sprzężeń obu map genetycznych układ markerów jest prawdopodobnie poprawny.

## **Mapowanie loci cech ilościowych dla populacji mapującej Emir × LAE-1 (temat 3):**

- Główne loci QTL dla **terminu kwitnienia** zlokalizowano w grupach sprzężeń LG06, LG09, LG03 i LG16. Maksymalne wartości LOD wyniosły 22,4 dla grupy sprzężeń LG06; 19,3 dla LG09; 17,1 dla LG03 oraz 13,4 dla grupy sprzężeń LG16. Maksymalny procent obserwowanej wariacji fenotypowej wyjaśnianej przez dane loci QTL (PVE) wynosił 40% dla grupy sprzężeń LG06, 26% dla LG09, 28% dla LG03 oraz 21% dla grupy sprzężeń LG16.
- Główne loci QTL dla **terminu dojrzewania** zlokalizowano w grupach sprzężeń LG06, LG05, LG07A, LG10 i LG03. Maksymalne wartości LOD dla loci QTL wyniosły 39,1 dla grupy sprzężeń LG06; 11,0 dla LG05; 10,3 dla LG07A, 7,6 dla LG10 oraz 10,6 dla grupy sprzężeń LG03. Ponadto dla obserwacji w Przebudowie w 2023 roku zidentyfikowano silny locus QTL w grupie sprzężeń LG13 (LOD 16,3). Maksymalne wartości PVE wynosiły 53% dla grupy sprzężeń LG06; 10% dla LG05; 16% dla LG07A, 8% dla LG10 oraz 10% dla grupy sprzężeń LG03 i 16% dla grupy sprzężeń LG13.



## Mapowanie loci cech ilościowych dla populacji mapującej Emir × LAE-1 (ciąg dalszy):

- Główne loci QTL dla **plonu nasion z poletka** zlokalizowano w grupach sprzężeń LG06, LG01, LG03 LG05, LG08, LG10 i LG19. Maksymalne wartości LOD dla loci QTL wyniosły 24,1 dla grupy sprzężeń LG06; 8,6 dla LG01; 11,7 dla LG03, 15,3 dla LG05, 15,4 dla LG08, 16,3 dla LG10 oraz 9,8 dla grupy sprzężeń LG19. Maksymalne wartości PVE wynosiły 37% dla grupy sprzężeń LG06; 16% dla LG01; 17% dla LG03, 21% dla LG05, 22% dla LG08, 23% dla LG10 oraz 19% dla grupy sprzężeń LG19.
- Główne loci QTL dla **wysokości roślin** zlokalizowano w grupach sprzężeń LG06, LG01, LG03 LG05, LG10 i LG12. Maksymalne wartości LOD dla loci QTL wyniosły 15,0 dla grupy sprzężeń LG06; 16,0 dla LG01; 13,8 dla LG03, 12,3 dla LG05, 12,8 dla LG10 oraz 11,7 dla grupy sprzężeń LG12. Maksymalne wartości PVE wynosiły 30% dla grupy sprzężeń LG06; 18% dla LG01; 16% dla LG03, 15% dla LG05, 12% dla LG10 oraz 15% dla grupy sprzężeń LG12.
- Główne loci QTL dla **pęknięcia strąków** zlokalizowano w grupach sprzężeń LG08, LG01, LG03 LG06, LG10. Maksymalne wartości LOD dla loci QTL wyniosły 29,1 dla grupy sprzężeń LG08; 23,2 dla LG01; 11,5 dla LG03, 16,3 dla LG06 oraz 24,1 dla grupy sprzężeń LG10. Maksymalne wartości PVE wynosiły 65% dla grupy sprzężeń LG08; 30% dla LG01; 19% dla LG03, 17% dla LG06 oraz 40% dla grupy sprzężeń LG10. Główny locus QTL dla **pęknięcia strąków** z grupy LG08 ma potwierdzenie w danych literaturowych (gen *lentus*).
- Główne loci QTL dla **masy tysiąca nasion** zlokalizowano w grupach sprzężeń LG06, LG11, LG03 i LG19. Maksymalne wartości LOD dla loci QTL wyniosły 32,0 dla grupy sprzężeń LG06; 20,9 dla LG11; 18,6 dla grupy sprzężeń LG16 oraz 13,8 dla LG03. Maksymalne wartości PVE wynosiły 51% dla grupy sprzężeń LG06, 40% dla LG11, 20% dla LG19 oraz 16% dla grupy sprzężeń LG03.
- Dla pewnych wariantów i cech obserwowano wysoki poziom PVE dla locus w grupie sprzężeń LG11 (do 33%), ale locus ten rzadko osiągał próg LOD w teście permutacji.

## Wnioski:

1. W badanym materiale nasiennym występuje znaczny zakres zmienności w zakresie terminu kwitnienia i dojrzewania, wysokości roślin, plonu nasion oraz masy tysiąca nasion, a także składu jakościowego nasion (białka, tłuszczu, włókna i alkaloidów), co jest korzystnym wynikiem w kontekście zaplanowanego mapowania asocjacyjnego.
2. Termin kwitnienia, plon nasion, wysokość roślin oraz zawartość białka i włókna wykazały istotnie statystyczne współczynniki korelacji pomiędzy lokalizacjami i/lub latami, co wskazuje na istotny poziom odziedziczalności.
3. Wysokie istotne statystycznie wartości współczynnika korelacji badanych cech pomiędzy powtórzeniami biologicznymi, środowiskami i latami dla wskazują na relatywnie wysoką odziedziczalność, co jest korzystną przesłanką w kontekście mapowania loci QTL.
4. Wyniki uzyskane w 2024 roku mogą być bezpośrednio użyte do mapowania loci QTL z wykorzystaniem mapy genetycznej utworzonej dla populacji mapującej Emir × LAE-1 i zawierającej markery z genotypowania metodami seqSNP oraz DArT-seq.
5. W celu mapowania loci odpowiedzialnych za barwę kwiatów konieczne jest ujednoczenie słownika palety barw oraz określenie kolorów w standardzie CIELAB i mapowanie składowych koloru L, A i B jako cech ilościowych.
6. Uzyskana mapa genetyczna oraz wyniki obserwacji polowych dla linii wsobnych populacji mapującej Emir × LAE-1 umożliwiają wiarygodne mapowanie loci QTL.
7. W grupie sprzężeń LG06 zlokalizowany jest główny locus QTL kontrolujący szereg cech związanych z terminem kwitnienia i dojrzewania, plonem nasion, wysokością roślin i masą tysiąca nasion. Prawdopodobnie jest to locus odpowiedzialny za dostosowanie długości okresu wegetacyjnego do warunków polowych.
8. W grupie sprzężeń LG08 zlokalizowany główny locus QTL kontrolujący pęknięcie strąków.