

Alkaloidy u łubinu wąskolistnego: zrozumienie molekularnych podstaw procesu biosyntezy i akumulacji w nasionach oraz poszukiwanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w zielonych częściach rośliny, przy zachowaniu ich niskiej zawartości w nasionach

Zespół wykonawców Projektu:

Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

dr hab. Magdalena Kroc (Kierownik, mkro@igr.poznan.pl)

prof. dr hab. Wojciech Święcicki, czł. rzec. PAN

dr hab. Grzegorz Koczyk

dr hab. Agnieszka Kiełbowicz-Matuk

dr hab. Karolina Susek

dr Katarzyna Czepiel

Okres realizacji:

styczeń 2024 - grudzień 2024



Cele projektu:

1. Przeprowadzenie dalszej charakterystyki transkryptomów linii pochodzących z Briańska oraz linii typu *iucundus/lucundus* z uwzględnieniem danych sekwencyjnych wygenerowanych w toku realizacji zadania, w celu lepszego zrozumienia obserwowanej zmienności fenotypowej badanych genotypów (Temat badawczy 1).

CEL ZREALIZOWANO.

2. Wykonanie pełnej procedury przygotowania prób i sekwencjonowania w ramach eksperymentu DAP-seq, z uwzględnieniem linii pochodzących z Briańska oraz linii typu *iucundus/lucundus*, mającej na celu identyfikację miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego RAP2-7 w genomie łubinu wąskolistnego. (Temat badawczy 2).

CEL ZREALIZOWANO.

3. Indukowanie na drodze sztucznej mutagenезы form o niskiej zawartości alkaloidów w nasionach, przy zachowaniu ich wysokiej zawartości w częściach zielonych rośliny (Temat badawczy 3).

CEL ZREALIZOWANO.

Materiał i metody:

Realizacja Tematu badawczego nr 1:

- Analiza zbioru transkryptów o niskiej wiarygodności przez adnotację funkcjonalną z wykorzystaniem EnTAP oraz ręczne porównania z bazami referencyjnymi transkryptów oraz genomów modelowych (NCBI/RefSeq, Ensembl/Plants).
- Filtrowanie i analiza zbioru wariantów charakterystycznych dla łubinów pochodzących z Briańska. Analizowano zmiany sekwencji kodującej o przewidywanym wysokim (=silnym) lub średnim wpływie na funkcję (wg narzędzia Variant Effect Predictor), poprzez modelowanie wybranych sekwencji białkowych oraz odniesienie do uprzednio zgromadzonych adnotacji funkcjonalnych (terminy Gene Ontology).

Realizacja Tematu badawczego nr 2:

- Materiał roślinny stanowiło 5 genotypów łubinu wąskolistnego tj. 3 linie pochodzące z Briańska, 1 linię *iucundus*, 1 linię *lucundus*
- Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania DAP-seq obejmowało szereg etapów, w tym: izolację genomowego DNA, przygotowanie bibliotek genomowego DNA, ekspresja białka *in vitro*, inkubacja białka fuzyjnego i biblioteki DNA, a następnie oczyszczenie z mieszaniny fragmentów DNA specyficznie związanych z badanym białkiem, reakcja PCR, oczyszczanie.
- Sekwencjonowanie bibliotek DAP-seq w technologii Illumina NovaSeq X Plus PE150 (min. 20 mln odczytów na próbę).
- Przewidywanie i charakterystyka kandydackich miejsc wiązania RAP2-7 w badanych genotypach *iucundus*, *lucundus* oraz pochodzących z Briańska.

Realizacja Tematu badawczego nr 3:

- Rozmnożenie nasion w pokoleniu M4 po traktowaniu mutagenem
- Doświadczenie polowe prowadzone w Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o., o. Wiatrowo.
- Analiza zawartości alkaloidów w liściach (analiza chromatograficzna, 33 rodziny, analiza 1-6 roślin z rodziny, łącznie 151 analiz).
- Analiza zawartości alkaloidów w nasionach M5 metodą kolorymetryczną (odczynnik Wagnera), prowadzona dla 233 rodzin. Przetestowano do 1-5 nasion z rodziny (zależnie dostępności nasion). Zastosowano skala od 0 (tj. jasnożółte liścienie, jak u odmiany słodkiej (Regent)) do 2 (tj. ciemno brązowe liścienie, jak u odmiany gorzkiej (Karo)).
- Zestawienie wyników obu typów analiz w kierunku wyboru zmutowanych form o zaburzonej transmisji alkaloidów z zielonych części rośliny do nasion.

Temat badawczy 1: Dalsza szczegółowa charakterystyka transkryptomów w modelu badawczym Brianskij - *iucundus* - *lucundus*

WYNIKI:

1. Wśród zanalizowanego zbioru 140 transkryptów o niskiej wiarygodności nie wykryto reprezentantów nowych loci potencjalnie powiązanych z biosyntezą/akumulacją alkaloidów. Transkrypty w przeważającej części miały charakter przypuszczalnych artefaktów sekwencjonowania, nie zaobserwowano kandydatów należących do potencjalnie sprawczych rodzin genowych (czynniki transkrypcyjne, homologi enzymów zaangażowanych w procesy biosyntezy).
2. Wśród 68765 wariantów sekwencyjnych uzyskanych w roku ubiegłym, zidentyfikowano podzbiór 4971 mutacji sekwencji kodujących o potencjalnie istotnym wpływie na funkcje białka (Tab. 1). Rozpatrywano jedynie mutacje wspólne dla 3 łubinów pochodzących z Brińska, a jednocześnie niewystępujące w genotypach *iucundus* i *lucundus*.

Tab. 1. Zestawienie kandydackich mutacji o istotnym wpływie na funkcję.

Wpływ	Genotyp	Liczba wariantów	Liczba wariantów łącznie	Suma
silny	heterozygota	822	1371	4971
silny	homozygota	549		
średni	heterozygota	165	3600	
średni	homozygota	3435		

3. Końcowy zbiór wariantów dotyczył 2659 genów, obejmował 53 geny związane z odpowiedzią na etylen, w których zaobserwowano łącznie 88 mutacji, o istotnym wpływie, występujących w układzie homozygotycznym.
4. W całym zbiorze genów o dużym obciążeniu mutacyjnym, podzbiór związany z biosyntezą etylenu nie pojawiał się jako znacząco liczniejszy (Tab. 2).
5. W wyniku modelowania struktur białkowych, wśród przewidywanych zmian istotnie wpływających na strukturę, ponownie odnotowano czynnik MYB zawierający wielokrotne mutacje poza obszarem wiążącym DNA. Zidentyfikowano także związane z biosyntezą etylenu białko o potencjalnie zmienionych interakcjach w pobliżu miejsca aktywnego.

Temat badawczy 1: Charakterystyka transkryptomów w modelu badawczym Brianskij - *iucundus* - *lucundus*

Tab.2 Nadreprezentowane terminy Gene Ontology powiązane z genami o dużym obciążeniu mutacyjnym (kategoria: procesy biologiczne; P<0.001).

GO.ID	GO Term/ Termin GO	Liczba genów zadnotowanych	Liczba genów istotnych	Expected	P-value
GO:0018958	proces metaboliczny związku zawierającego fenol	168	41	21.81	0.00024
GO:0006139	proces metaboliczny związku zawierającego nukleobazę	6277	915	814.82	0.00029
GO:0009218	proces metaboliczny rybonukleotydów pirymidynowych	29	11	3.76	0.00044
GO:0060966	regulacja wyciszania genów przez regulatorowe ncRNA	62	18	8.05	0.00054
GO:1901998	transport toksyn	7	5	0.91	0.00057
GO:0030705	transport wewnątrzkomórkowy zależny od cytoszkieletu	65	17	8.44	0.00075
GO:0006220	proces metaboliczny nukleotydów pirymidynowych	37	12	4.8	0.00094

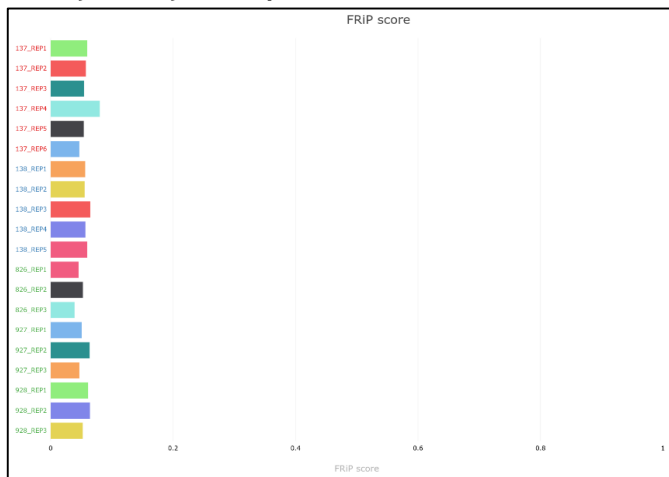
WNIOSKI:

1. Zbiór transkryptów o niskiej wiarygodności nie zawierał transkryptów dla potencjalnie nowych genów kandydackich.
2. Pozyskano dane przydatne do dalszych prac (zbiór mutacji różnicujących łubiny briańskie od *iucundus* i *lucundus*), ponadto wyniki analiz strukturalnych dostarczyły dodatkowych przesłanek na zaangażowanie dwu genów powiązanych z odpowiedzią na etylen, ulegających również ekspresji różnicowej i zawierających kandydackie mutacje w układzie homozygotycznym.

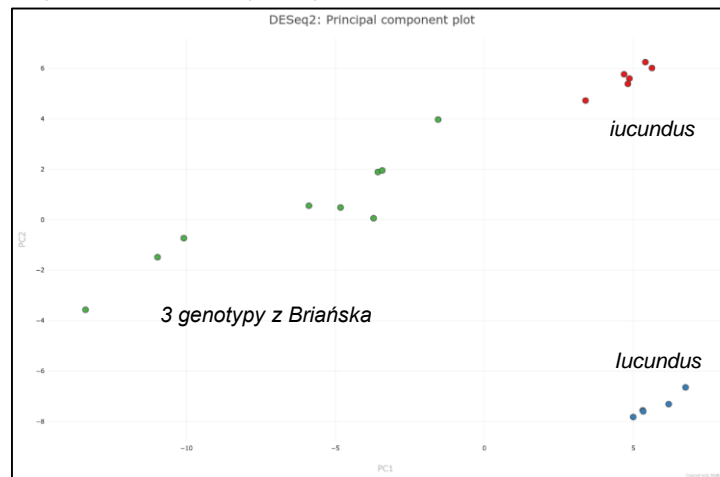
Temat badawczy 2: Sekwencjonowanie DAP-seq w modelu badawczym Brianskij - *iucundus* - *lucundus*

WYNIKI:

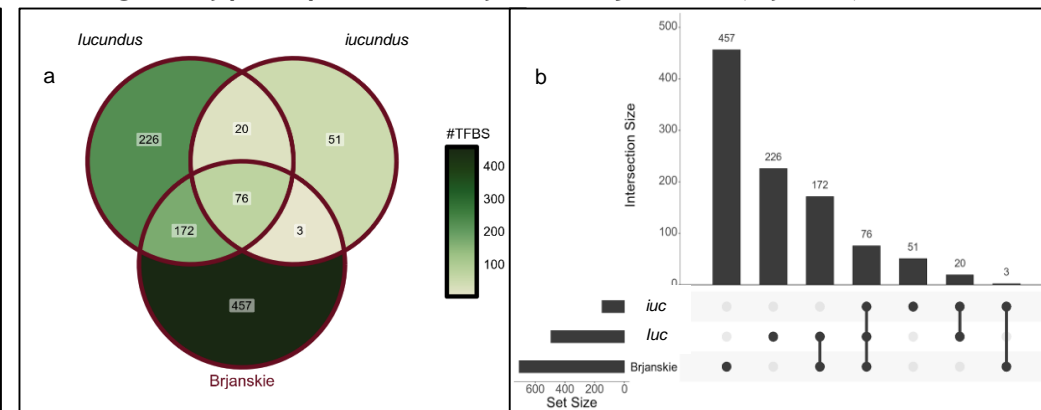
1. Dla wszystkich linii uwzględnionych w sekwencjonowaniu DAP-seq uzyskano bądź przekoczono graniczną, rekomendowaną wartość frakcji odczytów w rejonie szczytu (parametr FRiP; fraction of reads in peaks) w wysokości 5% (Ryc. 1).
2. Analiza komponentów głównych uzyskanych odczytów dla poszczególnych powtórzeń biologicznych, wskazała na jednorodny charakter odczytów uzyskanych z powtórzeń dla *iucundus* (137), *lucundus* (138) oraz zróżnicowanie w obrębie genotypów pochodzących z Brjańska (Ryc. 2).



Ryc. 1. Zestawienie frakcji wszystkich zmapowanych odczytów, przypadających na kandydackie miejsca wiązania RAP2-7.



Ryc. 2. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) odczytów dla poszczególnych próbek w eksperymencie.



Ryc. 3. Podział zidentyfikowanych kandydackich miejsc wiązania RAP2-7 w poszczególnych genotypach (a) diagram Venna (b) wykres typu upset.

3. Sekwencjonowanie DAP-seq pozwoliło na identyfikację miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego RAP2-7 w genotypach *iucundus*, *lucundus* oraz liniach pochodzących z Brjańska, a porównanie uzyskanych wyników wskazało na różnice pomiędzy genotypami (Ryc. 3).
4. Na podstawie nadreprezentacji odczytów w sekwencjonowaniu DAP-seq, przewidziano 1005 kandydackich miejsc wiązania czynnika RAP2-7 (we wszystkich genotypach łącznie).
5. Wykazano, że linia *iucundus* reprezentowała najbardziej ubogi profil miejsc wiązania obejmujący 96 miejsc współdzielonych z innymi liniami oraz 51 rejonów unikalnych (Ryc.3).
6. Odniesienie wyników eksperymentu DAPseq do wcześniejszych analiz transkryptomocnych wskazało brak istotnej korelacji pomiędzy lokalizacją miejsca wiązania w obszarze promotorowym, a zmianą w profilu ekspresji tych genów. W większości, zaobserwowane miejsca wiązania leżały w obszarach międzygenowych niezachodzących na rejony promotorowe. Wyniki sugerują możliwość funkcjonowania elementów wiążących RAP2-7 jako położonych dystalnie regulatorów ekspresji.


WNIOSKI:

1. Opracowany protokół laboratoryjny stanowi pierwszą udaną próbę zastosowania techniki DAPseq w łubinach, spełniającą warunki powtarzalności procedury badawczej i może stanowić podstawę do kolejnych eksperymentów z wykorzystaniem innych czynników transkrypcyjnych i szerszej puli materiału badawczego/hodowlanego.
2. Zubożenie miejsc wiązania w genotypie typu *iucundus* świadczy o zmniejszonej roli regulacyjnej RAP2-7 w łubinach o obniżonej zawartości alkaloidów warunkowanej tym locus.
3. Czynniki transkrypcyjne RAP2-7 najprawdopodobniej funkcjonuje w oddaleniu do miejsc promotorowych regulowanych genów.



Temat badawczy 3: Poszukiwanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w liściach, a niskiej w nasionach

WYNIKI:

1. Rozmnożenie nasion M4  Zbiór nasion z indywidualnych roślin **Zbiór 200 rodzin nasion w pokoleniu M5**
2. Wykonano analizę zawartości alkaloidów w liściach dla 33 rodzin (łącznie 151 roślin badanych), wybranych na podstawie obiecujących wyników z lat poprzednich. Całkowita zawartość alkaloidów w liściach poszczególnych prób badanych mieściła się w zakresie od 0,003% do 6.572% suchej masy.
3. Dla 233 rodzin zebranych nasion M5 wykonano analizę zawartości alkaloidów metodą kolorymetryczną (łącznie 1103 analiz). Wybarwienie ponad połowy ocenionych materiałów wskazywało na niską zawartość alkaloidów (ocenione jako 0) lub zawartość nieznacznie niższą od Karo (ocenione jako 1).
4. Zestawienie wyników obu typów analiz wykazało, że większość linii, dla których uzyskano niską zawartość alkaloidów w nasionach, cechowała się również niską zawartością tych związków w liściach. Jednocześnie w zebranych zbiorze danych zaobserwowano kilka ciekawych linii mutacyjnych, wyniki których wymagają dalszego potwierdzenia np.:
 - zidentyfikowano linie, dla których test nasion wskazał na obniżoną zawartość alkaloidów, natomiast zawartości tych związków w liściach nie była w roku bieżącym analizowana.
 - dla kilku rodzin, które cechowała wysoka zawartość alkaloidów w liściach, odpowiadające oznaczenie alkaloidów w nasionach nie mogło być przeprowadzone ze względu na brak wystarczającej liczby nasion.
 - zidentyfikowano obiekty, które charakteryzowały się wysoką zawartością alkaloidów w nasionach, a niską w liściach, stanowiąc potencjalnie ciekawy obiekt do dalszych badań naukowych, skierowanych na poznanie szlaku biosyntezy i akumulacji tych związków u łubinu wąskolistnego.

Temat badawczy 3: Poszukiwanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w liściach, a niskiej w nasionach

WYNIKI:

Tab.3 Wybrane linie mutacyjne zidentyfikowane na podstawie wyników obu metod analizy zawartości alkaloidów (kolorymetria, chromatografia).

Lp.	Obiekt	Liczba zebranych nasion M5 [szt.]	Analiza kolorymetryczna nasion					Analiza chromatograficzna liści			
			Lp. próby Wagner	Liczba testowanych nasion	1	2	3	4	5	Lp. próby chromatografia	Całkowita zawartość (% suchej masy)
1	1230/1	35	6	5	0	0	0	1	1		
2	1230/2	21	7	5	0	0	0	0	0		
3	1243/6	31	107	5	0	0	0	0	0		
4	1243/7	27	73	5	0	0	0	0	0		
5	1231/3									8	5.43989
6	1237/5									28	5.27457
7	1240/2									35	4.16376
8	1260/4	13	208	5	2	2	2	2	2	128	0.06240

WNIOSKI:

1. Zaobserwowana wysoka liczba rodzin cechujących się obniżoną zawartością alkaloidów w nasionach świadczy o skuteczności działania czynnika mutagennego w generowaniu nowej zmienności w badanej populacji.
2. Zidentyfikowane w roku bieżącym linie o niskiej zawartości alkaloidów w nasionach okazały się mieć również obniżoną zawartość tych związków w liściach, co wskazuje na długotrwały i pracochłonny proces selekcyjny w dalszej identyfikacji poszukiwanego fenotypu.
3. W badanym materiale zidentyfikowano linie o potencjalnie korzystnym, poszukiwanym fenotypie oraz interesujące obiekty badawcze. Uzyskane wyniki wymagają jednak potwierdzenia w kolejnych pokoleniach. Biorąc pod uwagę istotne znaczenie osiągnięcia tego celu dla hodowli oraz praktyki rolniczej, kontynuacja prowadzonych badań wydaje się w pełni uzasadniona.

Mierniki dla zadania - stopień realizacji

Lp.	miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.	Liczba przeanalizowanych szczegółowo transkryptomów pod kątem transkryptów liniowo specyficznych oraz segregujących zmian SNP.	5	5	100%
temat badawczy 2				
2	Liczba genotypów, dla których wykonane zostanie sekwencjonowanie DAP-seq	5	5	100%
temat badawczy 3				
3.1	Rozmnożenie populacji roślin M4	Zbiór 200 rodzin w pokoleniu M5	Zbiór 200 rodzin w pokoleniu M5	100%
3.2	Selekcja mutantów z zastosowaniem metody kolorymetrycznej	Testowanie od 1 o 10 nasion w 200 rodzinach pokolenia M5 (zależnie od dostępności nasion dla rodziny, łącznie 1000 analiz)	Testowanie od 1 o 10 nasion w 200 rodzinach pokolenia M5 (zależnie od dostępności nasion dla rodziny, łącznie 1000 analiz)	100%
			Średnia	100%
			% realizacji zadania	100%