

Tytuł zadania:

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

Okres realizacji:

Rok 2022

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

dr Piotr Plewiński

mgr inż. Jolanta Belter (pracownik techniczny)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

dr hab. inż., prof. UP Renata Galek

dr Bartosz Kozak

dr Sandra Rychel-Bielska

mgr inż. Barbara Wiśniewska, mgr Marta Buzar,

mgr Agnieszka Łącka, mgr Alicja Trybuła, Mariusz Skrzyński,
(pracownicy techniczni)

Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o.

mgr Paweł Barzyk (pracownik techniczny)

Hodowla Roślin Smolice Spółka z o.o.

mgr Krystyna Spychała (pracownik techniczny)

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 zestawu markerów polimorfizmu pojedynczego nukleotydu metodą genotypowania przez sekwencjonowanie linii wsobnych populacji mapujących Emir × LAE-1 i Graf × Mutant cienkościenny.

*Cele tematów nr 1 i 2 zostały zrealizowane,
temat badawczy nr 3 jest w trakcie realizacji.*

Materiał:

- **populacja mapująca łubinu wąskolistnego Emir × LAE-1 (130 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
- **266 linii z kolekcji łubinu wąskolistnego**: populacje dzikie (91), odmiany lokalne (3), odmiany hodowlane (84), linie hodowlane (82), mutanty (6)
- **80 linii hodowlanych** (po 40 z Poznańskiej Hodowli Roślin i Hodowli Roślin Smolice)

Metody:

- doświadczenia polowe: wysiew nasion (siewnikiem lub ręczny) w dwóch powtórzeniach i dwóch lokalizacjach (Przebędowo i Wiatrowo), zbiór strąków (ręczny/automatyczny)
- obserwacje polowe: 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;
- izolacja DNA przy użyciu Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega)
- ocena stężenia i czystości DNA - Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- genotypowanie przez sekwencjonowanie (DArT-seq)
- mapowanie odczytów do sekwencji pangenu 55 odmian łubinu wąskolistnego

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

- W 2022 roku wysiano **250** linii kolekcyjnych na polu w Przebędowie i **115** na polu w Swojcu.
- **Plon** uzyskano dla **178** linii, średnio po 1799 nasion w Przebędowie i 605 nasion w Swojcu.
- Wysokość plonu była silnie skorelowana ze stopniem udomowienia – najwyższa w odmianach i liniach hodowlanych, a najniższa w populacjach dzikich (**Tab. 1**).

Tab. 1. Plon nasion w liniach kolekcyjnych łąbinu wąskolistnego uzyskany w 2022 r.

Stopień udomowienia	Liczba nasion - Przebędowo	Odchylenie standardowe	Liczba nasion - Wrocław	Odchylenie standardowe
linia dzika	1065	758	301	369
linia hodowlana	1504	1159	779	612
mutant	2100	495	375	402
odmiana hodowlana	2407	1378	641	389
odmiana lokalna	2730	-	626	-

- **Termin kwitnienia** wynosił od **61** do **81** dni, przy czym 97% linii zakwitło do 70 dnia.
- **Zawartość białka** wynosiła od **24,6%** do **35,5%** suchej masy. Maksymalny poziom białka w liniach hodowlanych był na zbliżonym poziomie (**33,2-33,4%**), przy czym był on niższy od maksymalnego poziomu białka zmierzonego w materiałach kolekcyjnych (**34,8-35,5%**).
- **Poziom włókna** wynosił od **12,1%** do **19,1%** suchej masy – najniższy w liniach hodowlanych z Przebędowa (średnio **14,9%**) a najwyższy w liniach hodowlanych z Wiatrowa (**16,5%**).
- **Zawartość tłuszczu** wynosiła od **4,0%** do **8,6%**, przy czym najwyższa była w materiałach dostarczonych przez stacje hodowlane (**7,1-7,3%**), zaś najniższa w liniach dzikich (**6,3%**).
- **Zawartość tłuszczu** wykazała istotną statystycznie negatywną korelację z zawartością białka (współczynnik korelacji **-0,30**, wartość p-value **0,00007**).

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

- Analiza **zawartości i składu alkaloidów** jest jeszcze w opracowaniu, zaobserwowano, że zakres zmienności tej cechy jest znaczny (**min. 0,0052%, maks. 2,19%**).

Tab. 2. Linie posiadające minimalną i maksymalną zawartość badanych składników nasion.

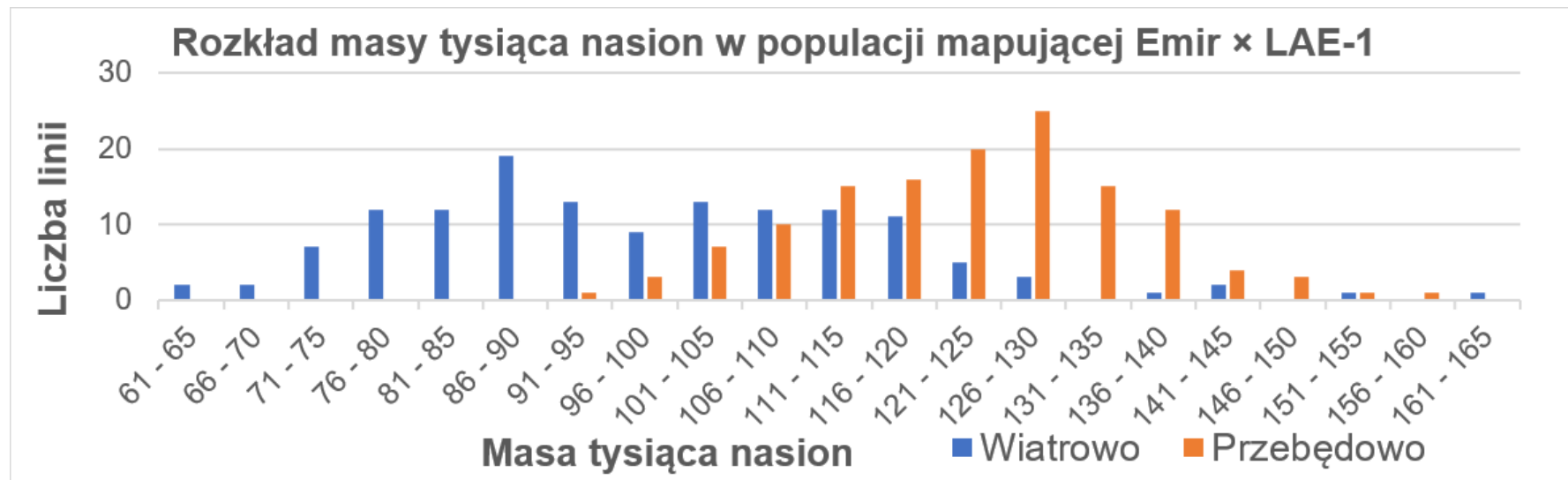
Nr	Typ	Białko	Włókno	Tłuszcz	Alkaloidy
96226	odmiana hodowlana	35.48	15.36	5.42	
95925	linia hodowlana	35.09	14.74	6.98	0.5437
96235	odmiana hodowlana	34.99	15.82	5.98	
R591/19	linia hodowlana Przebędowo	32.74	12.11	8.11	
R760/19	linia hodowlana Przebędowo	28.31	12.78	7.31	
R578/19	linia hodowlana Przebędowo	31.44	13.16	7.00	
96206	linia hodowlana	31.98	17.40	8.63	
96197	odmiana hodowlana	32.90	16.32	8.50	
96133	linia hodowlana	29.89	17.32	8.33	0.2587
96116	odmiana hodowlana	33.59	16.44	7.18	0.0052
96164	linia hodowlana	33.07	15.51	7.19	0.0057
95849	linia dzika	32.01	15.72	6.78	0.0077
95765	linia hodowlana	33.82	16.34	6.54	0.0103
96148	linia hodowlana	33.15	16.80	5.02	0.1897
95898	linia dzika	30.54	15.84	4.02	0.6249
96119	linia hodowlana	31.68	19.09	5.96	0.7365
95892	linia dzika	30.53	15.88	6.14	1.3500
95865	linia dzika	32.99	14.37	5.65	1.4674
95773	linia dzika	31.51	14.44	6.46	2.1880
R870/19	linia hodowlana Przebędowo	24.55	16.97	7.14	
W-489	linia hodowlana Wiatrowo	30.32	18.39	6.61	
R622/19	linia hodowlana Przebędowo	29.02	18.90	6.19	
96242	odmiana hodowlana	31.82	16.59	4.67	

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

- **Termin kwitnienia** wyniósł **1-12.06** w Wiatrowie i **1-6.06** w Przebędowie. Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,999 w Wiatrowie (p-value $1,4 \times 10^{-170}$) i 0,41 w Przebędowie (p-value $2,6 \times 10^{-6}$), zaś między środowiskami 0,2 (p-value 0,026).
- **Termin dojrzewania** był wyrównany ze względu na przebieg warunków meteorologicznych w sezonie (różnice między liniami wynosiły maksymalnie kilka dni).
- **Wysokość roślin** wykazała duże zróżnicowanie pomiędzy liniami wsobnymi i wynosiła od **10 do 35 cm** na polu w Wiatrowie i od **30 do 61 cm** na polu w Przebędowie. Wyraźnie zaznaczył się wpływ środowiska (suszy i różnicy w rodzaju gleby) w postaci mniejszej wysokości roślin na polu w Wiatrowie (20,1 cm vs 48,8 cm). Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,43 w Wiatrowie (p-value $2,5 \times 10^{-7}$) i 0,55 w Przebędowie (p-value $4,2 \times 10^{-11}$), zaś między środowiskami 0,43 (p-value $5,7 \times 10^{-7}$).
- **Cecha pęknięcia strąków** uwidoczniła się od trzeciego terminu obserwacji (18.07.2022) i wykazała znaczne zróżnicowanie pomiędzy liniami wsobnymi oraz wysoką powtarzalność wyników - współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami wyniósł 0,56 w 3 terminie (p-value $4,6 \times 10^{-12}$), 0,66 w 4 terminie (p-value $1,4 \times 10^{-17}$) i 0,73 w 5 terminie (p-value $2,0 \times 10^{-22}$).
- **Masa tysiąca nasion (MTN)** również wykazała znaczne zróżnicowanie pomiędzy liniami wsobnymi i wynosiła **od 51 do 215,4 g** na polu w Wiatrowie i **od 92 do 161 g** na polu w Przebędowie. Wyraźnie zaznaczył się wpływ środowiska - prawdopodobnie nierównomiernych warunków na polu w Wiatrowie, który spowodował, że współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami był w tej lokalizacji relatywnie niewielki 0,23 (p-value 0,009). Współczynnik korelacji między powtórzeniami w Przebędowie wyniósł 0,59 (p-value $2,9 \times 10^{-13}$), zaś między środowiskami osiągnął 0,49 (p-value $1,6 \times 10^{-9}$).

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

- Dwie z badanych cech, **masa tysiąca nasion** oraz **plon nasion z poletka** były także obserwowane w ubiegłym roku na polu Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz na polu w Przebędowie. W związku z tym możliwe było policzenie korelacji pomiędzy wynikami z różnych lat i środowisk.
- W przypadku **masy tysiąca nasion**, współczynnik korelacji dla Przebędowa pomiędzy 2021 a 2022 rokiem wyniósł 0,64 (p-value $1,3 \times 10^{-16}$), pomiędzy Przebędowem w 2022 r. a Swojcem w roku ubiegłym 0,59 (p-value $8,4 \times 10^{-14}$), zaś pomiędzy Wiatrowem w 2022 r. a Swojcem w roku ubiegłym 0,57 (p-value $1,6 \times 10^{-12}$).
- W przypadku **plonu nasion** współczynnik korelacji pomiędzy 2021 a 2022 rokiem dla Przebędowa wyniósł 0,30 (p-value 0,0006), pomiędzy Przebędowem w 2022 r. a Swojcem w roku ubiegłym 0,31 (p-value 0,0004), zaś pomiędzy Wiatrowem w 2022 r. a Swojcem w roku ubiegłym 0,21 (p-value 0,02). Otrzymane wartości współczynnika korelacji były więc w tym przypadku wyraźnie niższe niż dla masy tysiąca nasion, ale wciąż **istotne statystycznie**.



Genotypowanie przez sekwencjonowanie populacji mapującej łąbinu wąskolistnego Emir × LAE-1 oraz Mutant cienkościenny x Graf (temat 3):

- Z sekwencji genomu wyodrębniono regiony posiadające niską gęstość markerów, które wraz z kontigami utworzyły zestaw do analizy loci SNP. W tym zestawie sekwencji specjalnie opracowany algorytm wybierał losowo markery w oknie 10 kbp (po jednym dla mapującej Graf × Mutant cienkościenny i Emir × LAE-1).
- W 2022 roku opublikowany został pangénom referencyjny łąbinu wąskolistnego (Garg i in. 2022). Dla każdego markera z zestawu opracowanego w roku 2021 została przypisana pozycja w sekwencji pangénom referencyjnego na podstawie analiz bioinformatycznych.
- Wykonano izolację DNA dla tych linii wsobnych z populacji mapujących Emir × LAE-1 oraz Graf × Mutant cienkościenny, dla których było zbyt mało DNA z ubiegłego roku. Dla linii wsobnych z populacji mapującej Emir × LAE-1 uzyskano stężenie DNA powyżej 300 ng/μl, zaś dla populacji mapującej Graf × Mutant cienkościenny powyżej 270 ng/μl.
- Wszystkie wyniki były powyżej minimalnego progu wymaganego dla sekwencjonowania metodą DArT-seq, czyli 70 ng/μl.
- Wszystkie próby przeszły pozytywnie kontrolę jakości DNA i zostały poddane sekwencjonowaniu (130 linii wsobnych populacji mapującej Emir × LAE-1 oraz 129 linii wsobnych populacji mapującej Graf × Mutant cienkościenny).
- Analizy genotypowania populacji mapujących są w trakcie realizacji (stan na dzień 5 grudnia 2022) i zostaną zakończone w bieżącym roku.
- Po uzyskaniu wyników sekwencjonowania prezentacja zostanie uzupełniona o ich krótkie podsumowanie.

Wnioski:

1. W kolekcji nasiennej łąbinu wąskolistnego występuje znaczne zróżnicowanie potencjału plonowania, ujawniające się w szczególności w niekorzystnych warunkach atmosferycznych na początku sezonu oraz podczas suszy. Zróżnicowanie to stanowi cechę ilościową, którą będzie można poddać mapowaniu asocjacyjnemu w kolejnych latach realizacji tego zadania.
2. W kolekcji nasiennej oraz w puli linii hodowlanych łąbinu wąskolistnego występuje znaczne zróżnicowanie składu jakościowego nasion (białka, tłuszczu, włókna i alkaloidów), co jest korzystnym wynikiem w kontekście zaplanowanego mapowania asocjacyjnego.
3. Poziom białka jest istotnie statystycznie negatywnie skorelowany z poziomem tłuszczu, co utrudnia uzyskanie odmian zawierających wysoką zawartość tłuszczu (powyżej 8%) i białka (powyżej 32%), przy jednocześnie niskiej zawartości włókna (około 12%). W badanej puli materiałów hodowlanych jest jedna linia o takich parametrach.
4. Populacja Emir × LAE-1 segreguje w zakresie koloru kwiatów, barwy nasion, terminu kwitnienia, wysokości roślin, pęknięcia strąków, masy tysiąca nasion i plonu nasion.
5. Wysokie istotne statystycznie wartości współczynnika korelacji badanych cech pomiędzy środowiskami i/lub powtórzeniami biologicznymi wskazują na relatywnie wysoką odziedziczalność, co jest korzystną przesłanką w kontekście mapowania loci QTL.
6. Wyniki uzyskane w 2022 roku dla barwy kwiatów i nasion, terminu kwitnienia, wysokości roślin, pęknięcia strąków, masy tysiąca nasion oraz plonu nasion będą mogły być bezpośrednio użyte do mapowania loci QTL po skonstruowaniu konsensusowej mapy genetycznej dla populacji mapującej Emir × LAE-1.
7. Uzyskany w latach 2021-2022 zestaw markerów SeqSNP i DArT-seq jest wystarczający do konstrukcji map genetycznych dla populacji mapujących Emir × LAE-1 i Graf × Mutant cienkościenny.

Realizacja mierników:

Temat	Miernik – l.p.	Wartość podana w opisie zadania	Wartość zrealizowana	Stopień realizacji
1	1.1	250	250	1,00
	1.2	200	200	1,00
2	2.1	130	130	1,00
	2.2	2	2	1,00
	2.3	1	1	1,00
3	3.1	130	130	1,00
	3.2	129	129	1,00
	3.3	5 tys.	5 tys.	1,00