

## SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 roku

Tytuł zadania: Fenotypowanie i genotypowanie łubinu wąskolistnego pod względem wybranych cech morfologicznych, plonotwórczych i parametrów technologicznych nasion (93) Zespół badawczy: Renata Galek r. hab. inż., Bartosz Kozak dr inż., Dariusz Zalewski dr inż.

Celem zadania było: scharakteryzowanie materiałów kolekcyjnych pod względem cech jakościowych i wybranych elementów struktury plonu, ocena odziedziczalności wybranych cech morfologicznych i elementów struktury plonu u populacji  $F_2$  (R004x R001; R001x R004) oraz wyprowadzenie pokolenia  $F_3$  (R004x R001; R001x R004; R009xR005; R005xR009), a także przeprowadzenie genotypowania oraz określenie struktury kolekcji łubinu wąskolistnego przy wykorzystaniu markerów SNP.

Doświadczenie polowe zostało założone na terenie stacji Hodowli Roślin Smolice sp. z o.o. Oddział Przebudowo, metodą pasów prostokątnych w trzech powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 3,9 m<sup>2</sup>. Określono wybrane elementy struktury plonu (na 10 roślinach z każdego powtórzenia), takie jak: długość kwiatostanu pędu głównego i bocznego, liczba okółków, liczba zawiązanych strąków na kwiatostanie pędu głównego i bocznego, liczba rozgałęzień bocznych I-rzędu oraz wysokość całej rośliny i pędu głównego. Określono również wysokość roślin i pędu głównego. Po zbiorze oceniono takie elementy jak: masa 1000 nasion oraz plon z poletka. Dla zweryfikowania hipotezy zerowej o braku zróżnicowania badanych obiektów pod względem analizowanych cech przeprowadzono analizę wariancji. W przypadku wykazania istotnych różnic obliczono wartość NIR, podano wartość minimalną i maksymalną oraz współczynnik zmienności.

Poszczególne parametry jakościowe ziarna dla 50 genotypów oznaczono następującymi metodami:

- białko na podstawie polskiej normy PN-EN ISO 5983-2 lipiec 2006, metoda Kjeldahla
- zawartość włókna surowego oznaczono metodą wendeńską, podwójnej hydrolizy kwasowej
- tłuszcz na podstawie normy PN-76/R-64753, metoda ekstrakcyjna Soxhleta, w przeliczeniu na suchą masę
- alkaloidy zostały oznaczone na podstawie metody udostępnionej COBORU przez Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, i stosowanej rutynowo przez COBORU.

Dla wybranych 7 genotypów - (wytypowanych pod względem grubości okrywy nasiennej, zawartości białka i alkaloidów) z 50, które wzięto pod uwagę do programu krzyżowań przeprowadzono dodatkowe analizy. Obejmowały one określenie profilu elektroforetycznego SDS-PAGE wyizolowanych białek. Poszczególne grupy białek zostały rozdzielane za pomocą elektroforezy jednokierunkowej SDS-PAGE prowadzonej według metody opisanej przez Laemmli (1970), stosując 12% (w/v) i 5% (w/v) żele poliakrylamidowe. Supernatant zawierający wszystkie białka rozpuszczalne był analizowany ilościowo za pomocą metody Lowry i in. (1951). Ponadto określono udział poszczególnych aminokwasów oraz węglowodanów rozpuszczalnych. Zawartość aminokwasów określono po kwaśnej hydrolizie 6M HCl w 110°C przez 24 h przy użyciu automatycznego analizatora aminokwasów AAA (company INGOS, Czech Republic). Zawartość węglowodanów rozpuszczalnych w nasionach wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii gazowej (HRGC), zgodnie z metodyką Piotrowicz-Cieślak (2005).

Rośliny pokolenia  $F_2$  posłużyły do założenia doświadczeń w Przebędowie i we Wrocławiu dla określenia odziedziczalności analizowanych cech dla dwóch populacji mapujących. Z 240 osobników  $F_2$  wysianych w każdej miejscowości wykorzystano 200 do przeprowadzenia fenotypowania. Po wykonaniu pomiarów na pojedynczych roślinach  $F_2$  obu populacji, w dwóch środowiskach oraz roślinach form rodzicielskich określono zakres zmienności analizowanych cech, wyznaczając: wartości średnie, wartości minimalne i maksymalne, wariancje, odchylenia standardowe i współczynniki zmienności. Uzyskane wyniki z dwóch środowisk posłużyły do obliczenia współczynnika odziedziczalności wg wzoru Mahmuda i Kramera dla analizowanych cech (wysokości pędu głównego, wysokości rośliny, liczby rozgałęzień bocznych, długości kwiatostanu pędu głównego i bocznego, liczby okółków na pędzie bocznym i głównym, oraz liczby strąków i nasion z rośliny, a także masy nasion z rośliny i masy tysiąca nasion).

Oprócz wysiewu w populacji  $F_2$  wysiano we Wrocławiu w rozstawie 10x21 nasiona  $F_2$  dwóch kolejnych populacji uzyskanych ze skrzyżowania linii o wysokiej zawartości białka (R009) jednocześnie niskiej alkaloidów x linia o niskiej zawartości białka (R005) i wysokiej zawartości alkaloidów oraz linii o wysokiej zawartości alkaloidów (R005) x linii o niskiej zawartości alkaloidów (R009).

Materiał badawczy do analiz genetycznych stanowiły genomowe DNA kolekcji 47 genotypów (odmian i linii łubinu wąskolistnego w tym dwa genotyp kontrolne Emir i LAE-1 dla których znana jest sekwencja w analizowanych loci SNP). Genomowe DNA, wyizolowano z metodą CTAB Doyl i Doyl 1990). Do genotypowania wykorzystano 100 markerów SNP wytypowanych na podstawie wyników z roku 2015.

Analiza skupień przeprowadzona na podstawie średnich z roku 2016 pozwoliła na porównanie analizowanych obiektów pod względem ich podobieństwa fenotypowego, analizowane genotypy zostały pogrupowane w trzy klastry. Najliczniejsza grupa objęła 20 genotypów. Ta sama analiza, ale przeprowadzona na średnich z dwulecia potwierdziła w znacznym stopniu uzyskane wyniki, rozkład grup był podobny. Przeprowadzona analiza składowych głównych pozwoliła na redukcję badanych 16 cech do 5 składowych, które łącznie wyjaśniały 73,32% ogólnej zmienności, a kolejno poszczególne składowe opisywały 23,85%, 17,78%, 13,41%, 9,65% i 7,92% zmienności. Największy udział w kształtowaniu zmienności pierwszej składowej miały takie cechy jak: wysokość pędu głównego, długość kwiatostanu pędu głównego oraz liczba okółków i kwiatów na pędzie głównym. W drugiej składowej zasadniczą rolę odegrały takie cechy jak: wysokość całej rośliny i liczba okółków na pędzie bocznym, w trzeciej zaś liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym, w czwartej zawartość białka, a w piątej zawartość tłuszczu. Dla wyników z dwulecia 3 składowe wyjaśniły obserwowaną zmienność - łącznie w 68,65% (pierwsza 31,10%, druga 22,19% i trzecia 15,36%). Największy udział w kształtowaniu zmienności pierwszej składowej odegrały cechy takie jak: wysokość pędu głównego, zawartość tłuszczu i zawartość sumy alkaloidów w [%] suchej masy. W drugiej składowej istotną rolę odegrały takie cechy jak: wysokość do I rozgałęzienia, długość kwiatostanu pędu głównego, liczba okółków na pędzie głównym, zawartość białka w [%] suchej masy, a w trzeciej: długość kwiatostanu pędu bocznego, liczba zawiązanych strąków na pędzie bocznym.

Uzyskane wyniki fenotypowania w dwóch latach badań pozwoliły na przeprowadzenie analizy wariancji z możliwością oceny interakcji genotyp x lata. Okazała się ona nieistotna tylko dla dwóch cech, długości kwiatostanu pędu bocznego i liczby okółków na pędzie głównym. W przypadku pozostałych właściwości reakcja badanych genotypów na zmieniające się warunki pogodowe była odmienna. Nieistotne zróżnicowanie średnich badanych obiektów stwierdzono tylko dla wysokości do I produkcyjnego rozgałęzienia.

Uzyskane wyniki fenotypowania na podstawie elementów struktury plonu wskazują na istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów wszystkich analizowanych cech w roku

2016. Wartości współczynników zmienności uwidaczniają dużą zmienność w obrębie poszczególnych cech. Największe zróżnicowanie występuje w przypadku długości kwiatostanu pędu bocznego (współczynnik zmienności V- 39%) gdzie zakres zmienności mieści się w zakresie od 2,43 do 16,0 cm. Badane genotypy różnią się też w dużym stopniu plonem (V – 27%). Najmniejsze zróżnicowanie stwierdzono dla MTN i wysokości pędu głównego – 8%. Podobnie jak dla wyników z roku 2016 w analizie na średnich z dwóch lat badań największą zmiennością badane genotypy charakteryzowały się pod względem długości kwiatostanu pędu bocznego (35,3%) i wysokości plonu (28,1%). Niskie plonowanie potwierdził genotyp R004 (0,26 kg). Najwyższy wynik uzyskał obiekt R048 – 1,27 kg. Genotyp R041 najlepiej plonujący w roku 2016, słabiej plonował w roku 2015 i średnio w 2 latach badań uzyskał plon 1,18 kg na poletko.

Generalnie obiekty w roku 2016 charakteryzowały się mniejszym zakresem wartości analizowanych cech jakościowych, o czym świadczą wartości minimalne i maksymalne. Średnia zawartość białka była wyższa w roku 2016 w porównaniu do 2015, a średnia zawartość alkaloidów dużo niższa. Największą zmiennością charakteryzowały się genotypy pod względem zawartości alkaloidów, a następnie tłuszczu. Analizując genotyp R021, który w roku 2015 charakteryzował się najwyższą zawartością białka, nie powtórzył tej zależności w roku 2016. Podobnie genotyp R032, który w roku 2016 odznaczał się zawartością białka powyżej 37% w roku 2015 miał go o 4,47 % mniej. Pod względem zawartości tłuszczu w suchej masie wartości minimalne i maksymalne w obydwu latach badań były podobne, aczkolwiek ekspresja tej cechy w latach była wyraźnie zróżnicowana u niektórych obiektów. Średnia zawartość włókna w poszczególnych latach kształtowała się na zbliżonym poziomie, aczkolwiek statystycznie istotnym – 15,98% w 2015 roku oraz 15,39% w roku 2016.

Procentowy udział alkaloidów w roku 2016 wyniósł średnio: 61% lupaniny, 29% 13OHlupaniny, 10% angustifoliny, 6,8% izolupaniny, 2,7% hydroxylupaniny oraz 0,3% isoangustifoliny. W roku 2015 lupanina wystąpiła u wszystkich badanych genotypów (100%), 13OH lupanina u 98%, angustifolina - 54% , izolupanina - 46%, hydroxylupanina - 28%, a izoangustifolinę stwierdzono u 8% linii. Natomiast w roku 2016 wszystkie linie zawierały lupaninę oraz angustifolinę, izolupaninę, 13OH lupaninę. Tylko u 4% badanych linii stwierdzono obecność izoangustifoliny, a u 28% hydroxylupaniny. Największą zmienność w roku 2016 powyżej 66% oraz 79% odnotowano dla izoangustifoliny oraz hydroxylupaniny.

Zastosowana technika izolacji białek pozwoliła na uzyskanie profili różnicujących badane 7 genotypów R001 (Lane 2), R004 (Lane 3), R005 (Lane 4), R006 (Lane 5), R007 (Lane 6), R008 (Lane 7), R009 (Lane 8) pod względem wszystkich analizowanych frakcji. Odnotowano też zróżnicowany udział poszczególnych frakcji w obrębie genotypu. W porównaniu do wyników ubiegłorocznych zaobserwowano nieco odmienną ekspresję genów, co skutkowało otrzymaniem większej ilości białek 121 dla 7 analizowanych genotypów w porównaniu do 75 w roku 2015 (załącznik nr 1). Wielkość produktów w 2016 wyniosła od 6,5 kDa do 200 kDa, a w roku 2015 6,5 do 97 kDa. Większość produktów zarówno w roku 2016 jak i 2015 była polimorficzna.

Badane genotypy pod względem składu poszczególnych aminokwasów różniły się istotnie z wyjątkiem fenyloalaniny, której średnia zawartość wyniosła 3,63. Największą zmienność pod względem zawartości poszczególnych aminokwasów. Współczynnik zmienności dla tyrozyny wyniósł 10% a dla treoniny 7% czyli podobnie jak w roku 2015. Zróżnicowanie średnich zawartości pozostałych aminokwasów była niższe a zwłaszcza zwraca uwagę małe zróżnicowanie pod względem zawartości lizyny (1,9%) podczas gdy w roku 2015 było to 10,0%. Pod względem zawartości węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie stwierdzono znaczne zakresy zmienności ich zawartości. Największą zmienność obserwowano dla fruktozy (26%) i D-*chiro*-inozytolu (22%), D-pinitolu, *myo*-inozytolu i

galaktinolu (14-16%) (tabela 6). Podobnie największe zróżnicowanie stwierdzono dla tych cukrów w roku 2015. Najmniej zróżnicowane genotypy były pod względem zawartości stachiozy i cicerliolu ( $V=6\%$ ) oraz werbaskozy i rafinozy – współczynnik zmienności ( $V$ ) na poziomie 8-9%. Tylko dwa genotypy zawierał nieznaczne ilości glukozy i galaktozy.

Najwyższą odziedziczalność stwierdzono dla takich cech jak liczba nasion i waga oraz masa tysiąca nasion – od 53 do 0,95 bez względu na kierunek krzyżowania i środowiska (Wrocław, Przebędowo). Kolejną cechą dla której współczynnik odziedziczalności wahał się od 0,23 do 0,50 była wysokość rośliny, aczkolwiek dla populacji  $F_2$  W\_R001xR004 nie wyznaczono go. Dla takiej cechy jak liczba strąków z rośliny populacja W\_R004xR001 oraz P\_R004xR001 w obydwu analizowanych środowiskach wykazała stopień odziedziczalności na poziomie 0,48 oraz 0,40, a zatem zbliżony. Generalnie populacja W\_R001xR004 charakteryzowana we Wrocławiu pokazała, że analizowane cechy są bardzo słabo odziedziczalne, z wyjątkiem masy 1000 nasion. Dla wielu cech morfologicznych nie wyznaczono współczynnika odziedziczalności, z uwagi na fakt, że wariancja  $F_2$  była niska. Dla dwóch analizowanych populacji  $F_2$  w dwóch miejscowościach wyraźnie widać bardzo silny wpływ lokalizacji na ekspresję analizowanych cech, zwłaszcza dotyczących wysokości pędu głównego, długość kwiatostanu pędu głównego i bocznego, liczbą zawiązanych strąków na pędzie głównym czy liczby okółków. Na podstawie obliczonych współczynników zmienności odnotowano znaczna zmienność dla cech związanych z plonowaniem a pod względem cech mierzalnych takich jak wysokość rośliny czy pędu głównego, oraz długości kwiatostanów obserwowana zmienność była na dużo niższym poziomie. Biorąc pod uwagę fakt stosunkowo wysoką odziedziczalność liczby i masy nasion z rośliny będzie można podjąć selekcję w kierunku poprawienia plonowania.

W kolejnej części zadania wygenerowano nasiona  $F_3$  również dla populacji R009xR005; R005xR009. Liczba uzyskanych osobników dla czterech populacji zawiera się w zakresie od 195 do 197. Zaobserwowano niską zmienność w populacji pod względem masy tysiąca nasion– 15-16%, a dla pozostałych cech współczynniki zmienności wyniosły od 59,7 do 70%. Otrzymane osobniki  $F_2$  wszystkich 4 populacji mapujących posłużą do wyprowadzenia homozygotycznych linii przydatnych do mapowania.

Otrzymane pozytywne wyniki genotypowania w niniejszym projekcie (wyraźny sygnał, jednoznaczny podział na dwa klastry) dla 72,3% testowanym markerów jest wynikiem satysfakcjonującym, choć w literaturze dostępne są informacje o nawet 91% skuteczności (Soraya i in. 2015). Wyniki genotypowania wskazują na homozygotyczność badanego materiału na co wskazywały już wstępne wyniki z 2015 roku. Jest to zgodne z oczekiwaniem, ponieważ badania prowadzono na odmianach zarejestrowanych w krajowym rejestrze oraz wsobnych formach kolekcyjnych.

Wyniki analiz DAPC, pozwoliły na podział analizowanego materiału na grupy. Grupowanie poszczególnych obiektów do grup (klastrów) był silnie uzależniony od zestawu danych wykorzystanych do tych analiz. Wyniki fenotypowe z poszczególnych lat dla części obiektów różniły się istotnie. W związku z tym analiza dla danych z roku 2015, 2016 oraz średnich z dwulecia dawała odmienne rezultaty. W związku z tym celowe wydaje się wykorzystanie danych z genotypowania do podziału badanego materiału na grupy oraz do określenia struktury populacji badanego materiału. Dane z genotypowania nie podlegają wpływowi środowiska. Markery genetyczne są cechami dziedzicznymi, na które środowisko nie ma wpływu w związku z tym wyniki uzyskane dla tego typu danych są bardziej jednoznaczne.