

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 roku

Tytuł zadania: Fenotypowanie i genotypowanie łubinu wąskolistnego pod względem wybranych cech morfologicznych, plonotwórczych i parametrów technologicznych nasion (93).

Zespół badawczy: dr hab. inż. Renata Gałek prof. nadzw., dr inż. Bartosz Kozak; dr inż. Dariusz Zalewski

Celem badań było:

- I. scharakteryzowanie materiałów kolekcyjnych pod względem parametrów jakościowych nasion i wybranych elementów struktury plonu; analizy szczegółowe dla wybranych genotypów składu nasion - poszczególne frakcje białka, skład aminokwasowy, węglowodany rozpuszczalne;
 - II. ocena grubości okrywy nasiennej i ścian strąka dla dwóch populacji F_2 wyznaczonych na osobnikach F_3 (R004x R001; R001x R004) oraz wyprowadzenie pokolenia F_4 (R004x R001; R001x R004; R009xR005; R005xR009);
 - III. przeprowadzenie mapowania asocjacyjnego dla kolekcji 47 genotypów łubinu wąskolistnego oraz sporządzenie mapy genetycznej dla populacji mapujących (R004x R001; R001x R004), w tym wytypowanie obszarów QTL związanych z elementami struktury plonu oraz grubością okrywy nasiennej;
- I. 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 m². Określono wybrane elementy struktury plonu (na 10 roślinach z każdego powtórzenia), takie jak: długość kwiatostanu pędu głównego i bocznego, liczbę okółków, liczbę zawiązanych strąków na kwiatostanie pędu głównego i bocznego, liczbę rozgałęzień bocznych I-rzędu oraz wysokość całej rośliny i pędu głównego. Określono również wysokość roślin i pędu głównego. Po zbiorze oceniono takie właściwości 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)

W roku 2017 wystąpiło istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów pod względem cech jakościowych – zawartości białka, tłuszczu, sumy alkaloidów oraz włókna. W porównaniu do poprzednich lat zawartość białka w nasionach była najniższa a tłuszczu najwyższa. Zakresy zawartości sumy alkaloidów były zbliżone do roku 2015. Przeprowadzona analiza wariancji dla trzech lat badań wykazała: istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów, wpływ roku badań oraz istotną interakcję genotyp x rok badań. Najbardziej stabilne okazały się pod względem zawartości białka trzy genotypy: R008, R022, R035 a najmniej stabilne R007, R023, R031 i R044 biorąc pod uwagę odchylenie standardowe (SD) obliczone na podstawie średnich z trzech lat. Pod względem zawartości tłuszczu dwa genotypy wykazały najmniejszą interakcję ze środowiskiem (R010 i R038) a największą trzy (R007, R044, R048) biorąc pod uwagę wartości SD. Pod względem zawartości sumy alkaloidów można zauważyć, że wysokoalkaloidowe genotypy (R002, R005, R006 i R007) charakteryzowały się największymi wahaniami zawartości sumy alkaloidów w nasionach w

poszczególnych sezonach wegetacyjnych. W roku 2017 nasiona zawierały średnio: 65,49% lupaniny, 27,7% 13OHlupaniny, 11% angustifoliny, 6,8% izolupaniny, 3,8% hydroxylupaniny oraz 0,3% isoangustifoliny. W latach 2015, 2016 i 2017 lupanina wystąpiła u wszystkich badanych genotypów (100%) a 13OH lupanina u prawie wszystkich (98% - 100%). Natomiast pozostałe alkaloidy nie były charakterystyczne dla wszystkich genotypów, a najrzadziej wystąpiły we wszystkich latach badań takie alkaloidy jak hydroxylupanina i isoangustifolina. W poszczególnych latach odnotowano różny procentowy udział alkaloidów w przypadku poszczególnych genotypów. Najbardziej stabilnym genotypem pod względem zawartości włókna okazał się R035 – wartość SD poniżej 0,3. U dziewięciu genotypów stwierdzono silne wahania tej cechy w zależności od roku – SD 1-1,42.

Uzyskane wyniki fenotypowania na podstawie elementów struktury plonu wskazują na istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów pod względem wszystkich analizowanych cech w roku 2017. Różnice nieistotne wystąpiły tylko w przypadku liczby rozgałęzień produktywnych I rzędu i liczby okółków na pędzie bocznym. Wartości współczynników zmienności uwiadcniają dużą zmienność w obrębie poszczególnych cech. Największe zróżnicowanie występuje, podobnie jak w latach wcześniejszych, w przypadku długości kwiatostanu pędu bocznego (współczynnik zmienności V- 30,6%), gdzie zakres zmienności mieści się w zakresie od 1,42 do 6,56 cm. Badane genotypy różnią się też w dużym stopniu plonem (V – 26,7%). Najniższy plon uzyskał genotyp R007 – 0,22 kg, a najwyższy R047 – 1,01 kg z poletka o pow. 3,6 m². Najmniejsze zróżnicowanie stwierdzono podobnie jak w latach ubiegłych dla MTN (7,1%) oraz wysokości całej rośliny – 7,9%.

Uzyskane wyniki fenotypowania w trzech latach badań pozwoliły na przeprowadzenie analizy wariancji z możliwością oceny interakcji genotyp x lata. Interakcja okazała się nieistotna dla czterech cech: wysokości całej rośliny, długości kwiatostanu pędu bocznego i liczby okółków na pędzie głównym i bocznym. 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 produktywnego rozgałęzienia. Nieistotne były też różnice średnich w latach badań dla wysokości do I produktywnego rozgałęzienia. Podobnie jak dla wyników z roku 2017 w analizie na średnich z trzech lat badań największą zmiennością badane genotypy charakteryzowały się pod względem długości kwiatostanu pędu bocznego (29,6%) i wysokości plonu (26,5%). Niskie plonowanie potwierdził genotyp R004 (0,30 kg), ale w badanych trzyleciu średnio najniżej plonował genotyp R008 bo 0,28 kg. Najwyższy wynik, podobnie jak w roku 2017 uzyskał obiekt R048 – 1,19 kg. Obliczone współczynniki korelacji, dla średnich z roku 2017, wskazały na istotną dodatnią zależność między wysokością do I produktywnego rozgałęzienia a wysokością pędu głównego i całej rośliny, natomiast ujemną z liczbą rozgałęzień produktywnych I rzędu. Dodatkowo korelacje stwierdzono między: wysokością pędu głównego a wysokością całej rośliny PG, wysokością całej rośliny, długością kwiatostanu PG, liczbą okółków na PG, MTN a wysokością całej rośliny, liczbą okółków na PG. Istotna dodatnia zależność wystąpiła pomiędzy długością kwiatostanu a liczbą okółków i liczbą zawiązanych strąków na pędzie głównym. Ponadto zależne były liczba rozgałęzień z liczbą zawiązanych strąków oraz liczba okółków na PG z liczbą okółków na PB. Korelacja oceniana na podstawie wyników z trzylecia okazała się istotna w przypadku większej ilości par cech. I tak stwierdzono dodatnią zależność pomiędzy MTN a wysokością pędu głównego i całej rośliny. Ponadto dodatnie zależności stwierdzono pomiędzy wysokością pędu głównego a wysokością do I produktywnego rozgałęzienia, wysokością całej rośliny, wysokością całej do I rozgałęzienia i wysokością pędu głównego. Dodatnia zależność wystąpiła pomiędzy liczbą okółków a wysokością PG i całej rośliny oraz długością kwiatostanu PB i liczbą okółków na PG. Liczba zawiązanych strąków korelowała z liczbą okółków i strąków na PG. Stwierdzono ponadto ujemną zależność pomiędzy długością kwiatostanu pędu bocznego a plonem a dodatnią z długością kwiatostanu PB. Analiza skupień przeprowadzona na podstawie średnich z roku 2017 pozwoliła na porównanie analizowanych obiektów pod względem ich podobieństwa fenotypowego. Powstały 3 skupienia. Do najliczniejszego zakwalifikowano aż 29 genotypów. Wyraźnie różniące się od pozostałych skupienie utworzyły 3 genotypy o zdeterminowanym typie wzrostu: R008, R011 i R024. Ta sama analiza, ale przeprowadzona na średnich z trzech lat potwierdziła w znacznym stopniu uzyskane wyniki, rozkład grup był w dużym stopniu podobny. Przeprowadzona analiza składowych głównych pozwoliła na redukcję badanych 12 cech do 4 składowych które wносиły 75,03% zmienności ogólnej, a kolejno poszczególne składowe 33,47%, 19,45%, 12,65% i 9,47%. Największy udział w kształtowaniu zmienności poszczególnych cech to w pierwszej składowej: wysokość do I produktywnego rozgałęzienia, długość kwiatostanu PB, liczba rozgałęzień produktywnych I rzędu, liczba okółków na PB oraz Liczba zawiązanych strąków na PB. W drugiej: wysokość pędu głównego i całej rośliny. W trzeciej liczba zawiązanych strąków na kwiatostanie PG a w czwartej plon. Zastosowanie tej samej metody analizy na wynikach średnich z trzylecia 2015-2017 doprowadziło do redukcji badanej przestrzeni wielowymiarowej do 3 składowych, które wносиły 74,06% zmienności. Pierwsza składowa wносиła 42,52% ogółu zmienności, druga 20,95% a trzecia 10,59%. Największy udział w kształtowaniu zmienności pierwszej składowej miały następujące cechy: wysokość do I produktywnego rozgałęzienia, długość kwiatostanu pędu głównego i bocznego, liczba rozgałęzień produktywnych I rzędu, liczba okółków na pędzie głównym i na bocznym oraz liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym. W drugiej składowej największy udział miały wysokość pędu głównego i całej rośliny. W przypadku czynnika 3 żadna z cech nie miała znaczącego udziału (powyżej 0,70) co wynika z faktu, że udział tej składowej wynosił tylko 10,59%.

Szczegółowe wyniki wielkości produktów białkowych z roku 2017 oraz z poprzednich dwóch lat wskazują, że w roku 2017 liczba produktów była największa – 127, a ich wielkość mieściła się w zakresie 25,7 do 106,1 kDA. W roku 2016 rozpiętość wyników była największa, gdyż otrzymane produkty charakteryzowały się masą od 6,5 do 200,0 kDA, a ich liczba wyniosła 121. W roku 2015 zakres wielkości otrzymanych produktów wyniósł od 6,5 do 97 kDA a ich liczba była najmniejsza 75. W celu porównania podobieństwa poszczególnych genotypów w latach zastosowano dystans Nei. W poszczególnych latach widać zróżnicowanie analizowanych genotypów pod względem występowania poszczególnych produktów białkowych. Najbliższe podobieństwo między analizowanymi latami na podstawie współczynników korelacji można zaobserwować w latach 2015 i 2016. Najmniejszy dystans można zaobserwować między Emir (R001) i Oskar (R006) oraz Karo (R005) i Oskar (R006), Au11257-19-1 (R004) i Sonet (R008). Uzyskane diagramy wyraźnie wskazują na oddalenie form użytych do krzyżowań (zadanie 2) –zwłaszcza R004x R001 (AU x Emir) oraz R005xR009 (Karo x Graf), co potwierdza zmienność wybranych obiektów na poziomie molekularnym. W ciągu najbliższych dwóch lat będzie można wygenerować linie RILs przydatne do mapowania na poziomie F6.

Przeprowadzona jednoczynnikowa (dla roku 2017) oraz dwuczynnikowa analiza wariancji (rok, genotyp) wykazała istotne zróżnicowanie badanych obiektów pod względem zawartości poszczególnych aminokwasów, a zastosowany test Tukey'a pogrupował średnie w grupy jednorodne. Największą zmienność biorąc pod uwagę współczynnik zmienności (V%) pod względem zawartości poszczególnych aminokwasów w roku 2017 odnotowano dla tyrozyny – 6,39%. W roku 2016 ten parametr był na poziomie 10%. Treonina należała też do parametrów o średnio najwyższym współczynniku zmienności biorąc pod uwagę średnie zakresy wartości tej cechy z trzech lat. Zróżnicowanie średnich zawartości pozostałych aminokwasów były niższe - współczynnik zmienności 1-4,5%. Pod względem zawartości waliny i histydyny można stwierdzić najsłabsze zróżnicowanie analizowanych obiektów. Różnice genotypowe w zawartości poszczególnych aminokwasów w nasionach biorąc pod uwagę wartości minimalne i maksymalne były niezbyt wielkie, co znajduje też odzwierciedlenie w wartościach współczynników zmienności. Na uwagę zasługuje genotyp R001, gdyż uzyskał najwięcej korzystnych not (przynależność wartości średnich do grupy a) biorąc pod uwagę zawartość lizyny, metioniny, cystyny czy też fenyloalaniny nie ustępując zasadniczo w porównaniu do innych genotypów pod względem zawartości treoniny, waliny czy leucyny.

Przeprowadzona jednoczynnikowa analiza wariancji dla roku 2017 oraz dwuczynnikowa dla wyników z trzech lat (rok, genotyp) wykazała istotne statystycznie zróżnicowanie analizowanych siedmiu genotypów pod względem zawartości poszczególnych oligosacharydów z wyjątkiem zawartości glukozy. Również dla wszystkich cech, z wyjątkiem zawartości glukozy stwierdzono istotność interakcji Genotyp x rok badań. Zawartość glukozy i galaktozy była znikoma i tylko trzy genotypy zawierały te oligosacharydy. Znaczną część węglowodanów nasion łubinu wąskolistnego stanowiły oligosacharydy, w tym głównie α -galaktozydy: rafinoza, stachioza, werbaskoza, pełniące funkcje materiału zapasowego. Stwierdzono średnią znaczną zawartość stachiozy, a następnie sacharozy. Pod względem zawartości węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie stwierdzono znaczne zakresy zmienności ich zawartości. Największą zmienność obserwowano dla D-chiro-inozytolu podobnie jak w poprzednich latach oraz fruktozy, D-pinitolu, *myo*-inozytolu i galaktinolu. Najmniej zróżnicowane genotypy były pod względem zawartości rafinozy a także werbaskozy, stachiozy, ciceritolu rozpatrując wyniki z 2017 roku oraz z wielolecia.

II. W 2015 roku zostały skrzyżowane dwa genotypy o skrajnej grubości okrywy nasiennej w dwóch kierunkach (R004 x R001, R001 x R004) oraz o zróżnicowanej zawartości alkaloidów i białka (R009xR005; R005xR009). Uzyskano nasiona mieszańcowe F1, które wysiano w szklarni 2015/2016, uzyskując nasiona pokolenia F2. Z uzyskanych pojedynków F2 zebrano nasiona dla wyprowadzenia linii F3 (R004x R001; R001x R004; R009xR005; R005xR009) – 2016 rok. W 2017 roku wysiano we Wrocławiu w rozstawie 10x20 nasiona F3 dwóch populacji uzyskanych ze skrzyżowania o skrajnej grubości okrywy nasiennej oraz zawartości alkaloidów. W przypadku dwóch pierwszych populacji w celu wyznaczenia grubości okrywy nasiennej oraz ścian strąka przeprowadzono analizę zgodnie z metodyką opracowaną wg Clements i in. 2002. Dla wygenerowania populacji F4 dla materiałów zróżnicowanych pod względem alkaloidów zebrano nasiona z roślin F3, określono liczbę nasion i masę nasion z rośliny oraz masę tysiąca nasion z 400 pojedynków populacji R009xR005; R005xR009.

Przeprowadzona jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne zróżnicowanie analizowanych linii pod względem % udziału ścian strąka, okrywy nasiennej i masy 1000 nasion. Wygenerowane populacje mapujące charakteryzowały się zróżnicowanym zakresem udziału ścian strąka w strąku i okrywy nasiennej w nasieniu oraz masy 1000 nasion. W populacji R004xR001 współczynnik zmienności dla pierwszej ocenianej cechy był najwyższy. Największa frekwencja osobników charakteryzowały się klasy o udziale ścian strąka na poziomie 30-32-35-36% u obu populacji mapujących. Również pod względem udziału okrywy nasiennej można zaobserwować, że populacja R004xR001 odznaczyła się większym zakresem tej cechy niż R001xR004. W obu populacjach liczebność osobników o skrajnych wartościach analizowanych cech była niewielka, aczkolwiek w populacji R001xR004 liczba linii o % udziale okrywy nasiennej między 18 a 19 była wyższa (10 linii) niż w odwrotnym układzie krzyżowania (4 linie). Pod względem masy 1000 nasion analizowane populacje pod względem wybranych parametrów statystycznych nie odbiegały od siebie.

Ujemny współczynnik korelacji (-0,42 – R001xR004; -0,38 R004xR001) istotny statystycznie został obliczony dla masy 1000 nasion i udziału okrywy nasiennej. Nie stwierdzono żadnej istotnej statystycznie zależności między udziałem ścian strąka w strąku a okrywy nasiennej czy MTN.

II. Materiał badawczy stanowiło genomowe DNA wyizolowane z roślin pokolenia F₂ populacji mapujących R004xR001 oraz R001xR004. Genomowe DNA, wyizolowane zostało metodą CTAB, z 220 roślin (po 110 dla każdej populacji, łącznie 220 izolacji). Do genotypowania wykorzystywano 100 markerów SNP wytypowanych na podstawie wyników z roku 2015. Markery wybrane do genotypowania charakteryzują się polimorfizmem pomiędzy formami rodzicielskimi (R001, R004). Dodatkowo markery wybrano tak, aby były równomiernie rozmieszczone na mapie ExL (markery SNP pochodzą z tej mapy). Na podstawie rozmieszczenia markerów na genetycznej mapie sprzężeń wytypowano markery reprezentujące 19 z 20 grup sprzężeń. Genotypowanie przeprowadzono na urządzeniu Illumina Eco według protokołu opracowanego w roku 2015. Reakcje przeprowadzono w 48 dołkowych płytkach do PCR (45 badanych genotypów + 2 kontrole – Emir i LAE-1) oraz każda płytka zawiera kontrolę negatywną (NTC). Do identyfikacji loci dla genotypu w każdej próbce i dla każdego analizowanego locus wykorzystano oprogramowanie Illumina Eco Study. W oprogramowaniu wygenerowano z raporty z genotypem każdej próbki. Następnie raporty dla wszystkich analizowanych loci zostały wyeksportowane do specjalnie przygotowanego programu komputerowego (napisanego z wykorzystaniem języka Python oraz Bash). Program ten pozwolił na stworzenie matrycy z genotypem każdej próbki dla każdego locus. Otrzymana w ten sposób matryca została wyeksportowana do programu R, w którym wykonane zostały analizy statystyczne i konstrukcja mapy. Sprawdzony został rozkład każdego markera z oczekiwanym rozkładem 1:2:1 przy pomocy testu χ^2 . Skonstruowano następnie genetyczną mapę sprzężeń. Do konstrukcji mapy genetycznej wykorzystano informacje o lokalizacji poszczególnych markerów na opracowanej już mapie ExL oraz genom referencyjny łubinu wąskolistnego [Hane i in. 2016]. Do konstrukcji mapy wykorzystano pakiet ASmap oraz R/qtl [Broman i in 2003, Taylor i Butler 2017]. Odległości pomiędzy markerami obliczono używając algorytmu Kosambi [Kosambi 1944]. Otrzymane grupy przyrównano do genomu referencyjnego stosując program BLAST. Pozwoliło to na odpowiednie opisanie i orientację otrzymanych grup. Wyniki z fenotypowania (określenie grubości ściany strąków oraz okrywy nasiennej) zostały wyeksportowane do programu R. Przy wykorzystaniu pakietu Rqtl [Broman i in 2003] na podstawie wyników z fenotypowania populacji mapującej oraz genotypowania populacji mapującej (mapa genetyczna) wyznaczone zostały obszary QTL związane z cechą grubości okrywy nasiennej i grubości ścian strąków. Do wyznaczania obszarów QTL wykorzystany został algorytm calc.genoprob oraz scanone z parametrem „hk”, skok 0,5 cM. Poszukiwanie obszarów QTL z użyciem modelu jedno cechowego i regresji Haley–Knott [Broman i in 2003; Feenstra 2006]. Wyniki uzyskane dla populacji R001xR004 zostały porównane z wynikami dla populacji odwrotnej R004xR001.

Równolegle przeprowadzone zostało mapowanie asocjacyjne dla cech morfologicznych i plonotwórczych. Wyniki z genotypowania dla 47 linii zebrane w roku 2016 zostały połączone z wynikami z fenotypowania zebranymi w latach 2015 – 2017. Uzyskane wyniki zostały wprowadzone do programu R. Po przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników fenotypowania przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy poszczególnymi markerami, a cechami morfologicznymi i plonotwórczymi (mapowanie asocjacyjne). Do mapowania asocjacyjnego wykorzystane zostały następujące algorytmy: GLM, SA, ML.

Otrzymana mapa została utworzona w oparciu o 87 markerów ze stu zastosowanych i składała się z 16 grup sprzężeń odpowiadających 16 chromosomom łubinu wąskolistnego. Były to odpowiednio grupy: ExAU_LG02, ExAU_LG03, ExAU_LG04, ExAU_LG05, ExAU_LG06, ExAU_LG07, ExAU_LG08, ExAU_LG09, ExAU_LG10, ExAU_LG12, ExAU_LG13, ExAU_LG15, ExAU_LG16, ExAU_LG18 oraz ExAU_LG19. Łączna długość otrzymanej mapy to 1240,91 cM. Najdłuższą otrzymaną grupą okazała się ExAU_LG03 – 251.7 cM. Podjęta próba wyznaczenia obszarów QTL nie jest satysfakcjonująca. Dla żadnej z badanych populacji nie udało się znaleźć obszaru QTL, który posiadałby wartość LOD choćby zbliżoną do 3 zarówno dla cechy „Udział ścian strąka” jak i „Udział okrywy nasiennej w nasieniu”. Zagęszczenie markerów na mapie nie było wystarczające, a otrzymana mapa reprezentowała jedynie niewielki wycinek genomu łubinu wąskolistnego. Otrzymane wyniki fenotypowania są cennym zasobem wiedzy, który może zostać w przyszłości wykorzystany do zintensyfikowania poszukiwania obszarów QTL. Otrzymane wyniki wskazują na konieczność przeprowadzenia szerszego genotypowania, w celu uzyskania mapy o dużym zagęszczeniu markerów molekularnych i większym pokryciu genomu. Ponowna próba wyznaczenia obszarów QTL na ulepszonej wersji mapy powinna przynieść lepsze rezultaty i pozwolić na wskazanie markerów SNP przydatnych do selekcji cechy grubości okrywy nasiennej czy ścian strąka.

Przeprowadzono analizy mapowania asocjacyjnego dla 16 cech. Dla 4 cech udało się uzyskać wartości korelacji pomiędzy wartościami przewidzianymi modelem a wartościami uzyskanymi w pomiarach. Oznacza to, że dla tych cech markery molekularne pozwalają z co najmniej 80% prawdopodobieństwem przewidzieć wartość cechy. Cechami tymi były: plon, masa tysiąca nasion, wysokość pędu głównego oraz zawartość tłuszczu. Do selekcji wymienionych cech w programach hodowlanych markery molekularne mogą zostać z powodzeniem zastosowane. Dla pozostałych analizowanych cech markery molekularne również mogą zostać wykorzystane do selekcji, należy mieć jednak na uwadze, iż skuteczność tych markerów w tym przypadku jest niższa (prawdopodobieństwo poniżej 80%). Oznacza to, że do selekcji analizowanych cech należy wziąć cały zestaw markerów a nie pojedynczy marker. Cały zestaw pozwala bowiem z dość wysokim prawdopodobieństwem przewidzieć wartość cechy. Pomimo konieczności użycia całego zestawu markerów do genotypowania wyniki uzyskane w projekcie mogą być z powodzeniem wykorzystane w praktyce hodowlanej. Zaproponowana metoda genotypowania w oparciu o markery SNP oznaczane metodą KASP jest szybka, tania i wydajna. Pozwala na określenie genotypu dla dużej liczby obiektów hodowlanych (rzędu kilku tysięcy pojedynków) w krótkim okresie czasu (kilka tygodni) przy niskim nakładzie kosztów (genotypowanie jednego SNP to koszt kilkunastu groszy). Wspomniane koszty możliwe są od osiągnięcia jedynie przy zastosowaniu masowej skali analiz rzędu analizy kilku tysięcy markerów SNP. Mając powyższe na uwadze opracowany w czasie trwania projektu zestaw markerów SNP może z powodzeniem zostać wykorzystany w przyszłych pracach hodowlanych. Opracowany zestaw składa się łącznie z 78 markerów SNP rozmieszczonych w 14 chromosomach łubinu wąskolistnego. Niektóre z chromosomów są wystarczająco pokryte markerami (LG2 – 12 markerów, LG9 – 12 markerów), jednak niektóre chromosomy jak LG1 lub LG20 nie mają ani jednego markera w opracowanym zestawie, inne jak chromosom LG5, LG19 reprezentowane są przez 1-2 markery. Zwiększenie liczby markerów w opracowanym zestawie do genotypowania wiązać się będzie ze zwiększeniem wiarygodności uzyskiwanych wyników. Należy zwrócić uwagę, iż w projekcie opracowano i przetestowano na wybranych genotypach łącznie 400 markerów SNP. Wszystkie te markery mogą zostać włączone do potencjalnej puli markerów używanych w genotypowaniu i selekcji cech morfologicznych oraz plonotwórczych. Będzie się to wiązało z lepszym pokryciem genomu i lepszą jego reprezentacją, a przez to przyczyni się do uzyskania większej wiarygodności wyników i lepszej predykcji analizowanych cech.

Podsumowanie

1. W trzecim roku badań stwierdzono znaczne zróżnicowanie badanych genotypów pod względem cech jakościowych i struktury plonu. Analiza z trzech lat pozwoliła na wskazanie cech, które są zależne od wpływu środowiska na podstawie istniejącej interakcji genotypowo-środowiskowej.
2. Interesujący jest fakt znacznego zróżnicowania wybranych siedmiu genotypów pod względem profili białkowych, co daje podstawę do zintensyfikowania prac z wykorzystaniem elektroforezy 2D dla ich precyzyjnej identyfikacji, aczkolwiek należy wziąć pod uwagę zróżnicowaną ekspresję genów, gdyż nie wszystkie białka wystąpiły w trzech latach badań.
3. Przeprowadzony program krzyżowań dał podstawę do wyprowadzenia pokolenia F_2 a następnie $F_{3,4}$ RILs, niezbędnych do podjęcia w przyszłości szeroko zakrojonego genotypowania i mapowania u *L. angustifolius*.
4. Uzyskane rekombinanty o zróżnicowanym udziale ścian strąka oraz okrywy nasiennej oraz zróżnicowanych cechach jakościowych mogą być wykorzystane w praktycznej hodowli roślin.
5. Szczegółowa ocena materiałów kolekcyjnych okazała się przydatna do mapowania asocjacyjnego i wytypowano markery sprzężone z poszczególnymi cechami.
6. Konieczne jest kontynuowanie badań pod kątem rozszerzenia puli markerów molekularnych, w celu uzyskania lepszego rozpoznania - powiązania genotypu z fenotypem.
7. Utworzono szkielet kolejnej mapy genetycznej, która po zagęszczeniu dodatkowymi markerami może zostać wykorzystana w analizach QTL cech związanych z grubością okrywy nasiennej i ścian strąka.
8. Genotypowanie markerami SNP w oparciu o technikę KASP może być z powodzeniem wykorzystywane w programach hodowlanych łubinu wąskolistnego.