

## Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej

- zadanie nr 108:

„Badania nad gametyczną embriogenezą u *Lupinus angustifolius* L. - indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu”

Łubin wąskolistny obok łubinu żółtego jest podstawowym gatunkiem uprawnym z rodzaju *Lupinus*. Do wzrostu jego znaczenia w ostatnich latach przyczyniło się obniżenie poziomu alkaloidów w nasionach i wyselekcjonowanie form o polowej odporności na antraknozę. Jest on głównie uprawiany, jako roślina rotacyjna ze zbożami, oraz pastewna wykorzystywana w żywieniu zwierząt (Stawiński 2007, Dolata i Wiatr 2007). Przełomem w badaniach genetycznych u łubinu wąskolistnego było wyprowadzenie przez badaczy australijskich rekombinowanych linii wsobnych RILs (Nelson i in. 2010), co umożliwiło opracowanie – pierwszej mapy genetycznej. Kolejnym krokiem w badaniach genetycznych było zsekwencjonowanie genomu odmiany Tanjil, której genom został przyjęty jako referencyjny dla tego gatunku. Istotnym również etapem było wyprowadzenie linii RILs techniką SDS w oparciu o rodzime tło genetyczne (KGHRiN) i skonstruowanie następnej mapy genetycznej (Kozak 2014).

Oczekuje się, że zastosowane metody biotechnologiczne takie jak techniki haploidyzacji roślin w kulturach *in vitro* oraz diagnostyki molekularnej do identyfikacji haploidów i materiałów homozygotycznych pozwolą na przyspieszenie procesu otrzymywania materiałów wyjściowych dla hodowli i badań genetycznych.

Techniki haploidyzacji wykorzystywane i stosowane do uzyskiwania u roślin homozygotycznych linii opierają się przede wszystkim o cztery podstawowe procesy biologiczne: partogenezę, eliminację chromosomów, androgenezę *in vitro* i gynogenezę *in vitro*. Proces otrzymywania linii homozygotycznych poznano u bielunia, jęczmienia, ryżu, tytoniu, rzepaku, pszenicy (Foster i in. 2007). Równolegle z badaniami podstawowymi następowało praktyczne wykorzystanie podwojonych haploidów w programach hodowlanych różnych gatunków uprawnych (Małuszyński i in. 2003, Foster i in. 2007).

Na tle osiągnięć u innych gatunków próby uzyskania haploidów u *Fabaceae* są ciągle na etapie wstępnych badań (Croser i in. 2006). Z kilkuset gatunków zaliczanych do tej rodziny, zaledwie u 16 otrzymano zregenerowane pojedyncze rośliny haploidalne na drodze androgenozy wykorzystując kultury pylnikowe lub izolowane mikrospory. Przeprowadzone dotychczas prace skupiały się nad podniesieniem wydajności procesu haploidyzacji. Pierwsze haploidalne tkanki kalusa w androgenicznej kulturze pylników *Pisum sativum* otrzymali Gupta i współpracownicy 1972 roku. Następnie Mokhtaarzaden i Constantin (1978) opisali możliwość zastosowania kultur pylnikowych do wyprowadzenia haploidalnych roślin u *Trifolium alexandrinum*, *Glycine max*. W rodzaju *Lupinus* podejmowane były próby indukcji haploidów również w kulturach pylnikowych oraz izolowanych mikrospor, ale kończyły się tylko otrzymaniem wielokomórkowych struktur prazarodków (Caligari i Omerod 1994, Cambos i Andrada 1994, Galek i in. 2006, Skrzypek i in. 2008 Kozak i in. 2012).

W pierwszej części projektu zaplanowane jest poznanie wpływu pyłku obcego gatunku – łubinu żółtego (52 chromosomy) oraz łubinu andyjskiego (48 chromosomów) na rozwój struktur w woreczku zalążkowym po zapyleniu roślin łubinu wąskolistnego. W tym przypadku będziemy mogli mieć do czynienia z partenogenezą indukowaną lub eliminacją chromosomów z zarodka mieszańcowego. Wcześniejsze badania związane z otrzymywaniem mieszańców oddalonych w rodzaju *Lupinus* nie dały jednoznacznej odpowiedzi czy mamy do czynienia z procesem haploidyzacji czy otrzymywaniem mieszańców oddalonych (Przyborowski i Packa 1997, Przyborowski 2003, Wilson i in. 2008, Galek 2010). Jednocześnie na tym samym materiale przewidujemy zbadanie czy zachodzi proces gynogenezy. W niniejszym projekcie proponujemy również opracowanie systemów weryfikacji przy użyciu markerów molekularnych i stwierdzenie czy mamy do czynienia z haploidem, podwojonym haploidem czy mieszańcem.

W drugiej części projektu proponuje się poznanie wpływu czynników stresowych (temperatury, składu pożywek) na indukcję oraz przebieg androgenozy *in vitro*. Dokonana zostanie analiza profilu ekspresji genów na różnych etapach rozwoju mikrospory, w początkowych etapach rozwoju w kierunku struktury generatywnej (ziarno pyłku), a także struktury wegetatywnej (zarodki i/lub kalus androgeniczny). Zbadany zostanie wpływ poszczególnych czynników stresowych indukujących proces

androgenezy na ekspresję genów w początkowych etapach rozwoju mikrospory. Po przeprowadzonej analizie bioinformatycznej wskazane zostaną geny, których ekspresja zmienia się w momencie zmiany szlaku rozwojowego (generatywnego na wegetatywny). Do analizy profilu ekspresji wykorzystana zostanie technika sekwencjonowania nowej generacji (NGS) RNAseq. Technika ta w ostatnich latach zyskuje na popularności stając się coraz powszechniej wykorzystywaną alternatywą dla klasycznych metod opartych o mikromacierze. Technika RNAseq posiada wiele zalet takich jak: niski koszt analiz, wysoką jakość uzyskanych wyników, możliwość analizy ilościowej wyników (Wang i in. 2009, Ozsolak i Milos 2011, Wilhem i Landry 2009, Nookaew i in. 2012). Do analiz bioinformatycznych zostaną zastosowane narzędzia (programy, skrypty oraz procedury) dostępne na otwartej licencji. W razie konieczności możliwa będzie modyfikacja tych narzędzi, tak aby najlepiej służyły analizie otrzymanych danych. Dodatkowo w analizach będzie zastosowane 5 różnych algorytmów statystycznych (DEseq, NOISeq, Cuffdiff, baySeq, edgeR), z których każdy opiera się na innych założeniach i wykorzystuje inne algorytmy statystyczne (Nookaew i in. 2012). Pozwoli to na ocenę tych algorytmów i wybór najodpowiedniejszego do analiz profilu ekspresji genów u łubinów, a szerzej u roślin strączkowych.

W rodzaju *Lupinus* nie poznano i nie opracowano jak dotąd wydajnych technik umożliwiających indukcję haploidów, przydatnych do tworzenia linii podwojonych haploidów. Opracowanie takich metod przyczyniłoby się do postępu w badaniach genetyczno-hodowlanych u łubinu wąskolistnego. Proponowany projekt badawczy stanowi nowość, ponieważ w światowej literaturze brak jest aktualnych informacji na temat poznania procesów gametycznej embriogenezy u tego gatunku.