

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. rzecz. PAN

dr hab. Grzegorz Koczyk

dr hab. Agnieszka Kiełbowicz-Matuk

dr hab. Karolina Susek

mgr Katarzyna Czepiel

Okres realizacji:

styczeń 2023 - grudzień 2023



Cele projektu:

1. Finalna charakterystyka i analiza porównawcza transkryptomów w modelu badawczym Brianskij - *iucundus* - *lucundus*, z uwzględnieniem dwóch organów (liście i łodyga) oraz wyselekcjonowanie listy genów zaangażowanych w syntezę/akumulację alkaloidów (Temat badawczy 1).

CEL ZREALIZOWANO.

2. Wstępne przygotowanie do przeprowadzenia doświadczenia DAP-seq, optymalizacja warunków reakcji (Temat badawczy 2).

CEL ZREALIZOWANO.

3. Indukowanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w częściach zielonych rośliny, a niskiej w nasionach, na drodze sztucznej mutagenezy (Temat badawczy 3).

CEL ZREALIZOWANO.

Materiał i metody:

Realizacja Tematu badawczego nr 1:

- Wykorzystanie konsensusowego transkryptomu zrekonstruowanego na podstawie uzyskanych w latach ubiegłych danych PacBio, do oszacowania genów ulegających ekspresji różnicowej z wykorzystaniem dwóch dodatkowych metod: (1) Kallisto+Sleuth oraz (2) RSEM+EBSEQ.
- Uaktualnienie przewidywań funkcji dla konsensusowych transkryptów z wykorzystaniem oprogramowania EnTAP, eggNOG i OmicsBox.
- Różnicowa analiza reprezentacji funkcji molekularnych i biologicznych w zbiorze genów kandydackich z wykorzystaniem pakietu topGO .
- Detekcja i wstępna charakterystyka krótkich polimorfizmów (SNP/indel) w sekwencjach kodujących transkryptów.

Realizacja Tematu badawczego nr 2:

- Nasiona 5 badanych genotypów łubinu wąskolistnego tj. 3 linie pochodzące z Briańska, 1 linię *iucundus*, 1 linię *lucundus* wysiano w warunkach kontrolowanych (Centrum Uprawy Roślin IGR PAN). Na etapie kwitnienia z każdego genotypu pobrano liście do optymalizacji metody izolacji genomowego DNA.
- Przetestowanie wybranych zestawów/odczynników do izolacji DNA genomowego, w celu wyboru najlepszej metody izolacji (Qiagen, Promega, mieszanina fenol:chloroform:alkohol izoamylowy).
- Zoptymalizowanie fragmentacji genomowego DNA metodą sonikacji, celem uzyskania fragmentów o długości 200 bp.
- Optymalizacja procedur przygotowawczych dla translacji białka RAP2-7 *in vitro* (uzyskanie sekwencji kodującej czynnika RAP2-7, klonowanie do wektora pENTR, klonowanie do wektora ekspresyjnego, ekspresja białka w systemie *in vitro*).

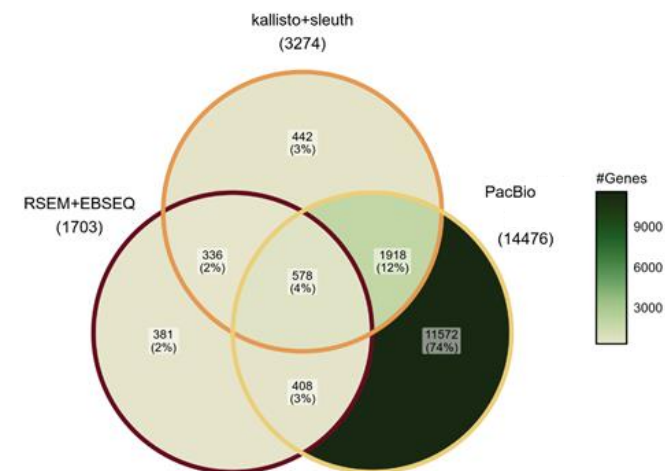
Realizacja Tematu badawczego nr 3:

- Rozmnożenie nasion w pokoleniu M3 po traktowaniu mutagenem
- Doświadczenie polowe prowadzone w Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o., o. Wiatrowo.
- Analiza zawartości alkaloidów w liściach (analiza chromatograficzna, 50 rodzin, analiza 1-5 roślin z rodziny, łącznie 233 analizy).
- Analiza zawartości alkaloidów w nasionach M4 metodą kolorymetryczną (odczynnik Wagnera), prowadzona dla 500 rodzin. Przetestowano do 10 nasion z rodziny (zależnie od ilości dostępnych 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: Charakterystyka transkryptomów w modelu badawczym Brianskij - *iucundus* - *lucundus*

WYNIKI:

Termin	GO Term/ Termin GO	Całkowita liczba genów	Liczba genów istotnych	P-wartość
GO:0080187	floral organ senescence	12	3	0.00029
...
GO:0003333	amino acid transmembrane transport	74	4	0.00302
GO:0009723	response to ethylene	456	12	0.00341
GO:1990961	xenobiotic detoxification by transmembrane export across the plasma membrane	9	2	0.00434
...
GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	719	11	0.009



1. Analiza ekspresji różnicowej prowadzona dla konsensusowego transkryptomu (PacBio) zidentyfikowała wstępnie 578 genów kandydackich istotnie różnicujących łubiny z Brińska od genotypu gorzkiego, typu *lucundus*.
2. Potwierdzono brak istotnych różnic w ekspresji kluczowego (dla fenotypu *lucundus*) czynnika *RAP2-7* u tychże łubinów (PPEE=0.008).
3. Wyniki nie umożliwiły jednoznacznego wskazania pojedynczego genu-kandydata, warunkującego atypowy fenotyp o obniżonej zawartości alkaloidów u łubinów z Brińska.
4. Wykonana różnicowa analiza reprezentacji poszczególnych funkcji molekularnych i biologicznych wskazała istotnie niższą ekspresję zbioru 12 genów-kandydatów związanych z odpowiedzią na etylen (termin GO:009723, P=0.00341) u łubinów z Brińska.
5. W powyższym zbiorze, jako szczególnie obiecujące, zidentyfikowano trzy geny o istotnej homologii do znanych, związanych z odpowiedzią na etylen, czynników transkrypcyjnych należących do rodzin białkowych: MYB (2 geny), AP2-like (1 gen).
6. W jednym z czynników MYB zaobserwowano nagromadzenie krótkich mutacji, wspólnych dla łubinów pochodzących z Brińska, o potencjalnej roli funkcjonalnej (2 sprzężone delecje ze zmianą ramki odczytu, o charakterze wzajemnie kompensującym, 2 substytucje niesynonimiczne oraz pojedyncza krótka delecja nie zmieniająca ramki odczytu).

WNIOSKI:

1. Wykorzystanie dostępnych danych NGS pozwoliło zwalidować zbiór genów ulegających ekspresji różnicowej z wykorzystaniem dwu dodatkowych metod (oprócz uprzednio stosowanego zliczania wiarygodnych transkryptów uzyskanych z sekwencjonowania PacBio). Wykorzystane metody (kalisto+sleuth/RSEM+DESeq2) zapewniały oszacowanie statystycznej istotności zaobserwowanych różnic w ekspresji.
2. Wyselekcjonowano 12 genów kandydackich, należących do istotnie nadreprezentowanej (test dokładny Fishera, $P=0.00341$), w transkryptomie łubinu gorzkiego, kategorii funkcjonalnej genów odpowiedzi na etylen (GO:0009723).
3. Pozyskano zbiór krótkich polimorfizmów różnicujących genotypy *iucundus*, *lucundus* i łubiny pochodzące z Briańska, także o możliwym znaczeniu funkcjonalnym dla akumulacji alkaloidów (pojedynczy czynnik transkrypcyjny MYB).

Temat badawczy 2: Optymalizacja metody DAP-seq, mającej na celu identyfikację miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego RAP2-7 w genomie łubinu wąskolistnego.

WYNIKI:

Optymalizacja etapów metodyki zmierzających do syntezy białka w warunkach *in vitro*:

1. Na matrycy cDNA badanych linii zamplifikowano sekwencję kodującą genu *RAP2-7*, którą następnie wklonowano do wektora pENTR/SD/D-TOPO. Na podstawie wyników sekwencjonowania wybrano kolonie bakteryjne niosące plazmidowy DNA z sekwencją kodującą badanego genu. Plazmidy te wykorzystywano w dalszych etapach badań, jako wektory wejściowe (ang. entry clone) do rekombinacji z wektorem ekspresyjnym (docelowym).
2. Utworzono konstrukt ekspresyjny w reakcji rekombinacji pomiędzy DNA wektora wejściowego (DNA wektora pENTR niosący sekwencję kodującą genu *RAP2-7*) i DNA wektora docelowego. Jako wektor docelowy wykorzystano wektor plazmidowy pIX-HALO (system rekombinacji DNA Gateway, Thermo). Potwierdzenie na podstawie sekwencjonowania obecności insertu w wektorze docelowym, umożliwiło przejście do kolejnego etapu prac, tj. przetestowania systemu umożliwiającego syntezę białka *RAP2-7* w warunkach *in vitro*.
3. Syntezę białka prowadzono przez wprowadzenie konstrukt pIX-HALO-*RAP2-7* do systemu umożliwiającego sprzężoną transkrypcję i translację *in vitro*, opartego o lizat z retikulocytów królika (TnT Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega). Uzyskane wyniki wykazały obecność białka *RAP2-7*-HALO-tag o spodziewanej wielkości ok. 81 kDa, w próbach badanych, w stosunku do kontroli negatywnej.

Optymalizacja etapów metodyki opartej o pracę z DNA

1. Sprawdzone kilka metod izolacji DNA i wybrano metodę reagentową (fenol:chloroform:alkohol izoamylowy) do izolacji wysokocząsteczkowego DNA badanych linii. Uzyskano DNA genomowe o dobrej koncentracji i jakości, co pozwoliło na dalsze zoptymalizowanie protokołu fragmentacji DNA metodą sonikacji.


Temat badawczy 2: Optymalizacja metody DAP-seq, mającej na celu identyfikację miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego RAP2-7 w genomie łubinu wąskolistnego.

WNIOSKI:

1. Wykonano szereg eksperymentów zmierzających do optymalizacji procedury DAP-seq, dotyczącej syntezy białka *in vitro*. W wyniku realizowanych prac sekwencję kodującą genu RAP2-7 wprowadzono do wektora ekspresyjnego, który następnie został wykorzystany jako matryca do syntezy białka RAP2-7 w warunkach *in vitro*. Detekcja produktu białkowego o spodziewanej wielkości (ok. 81 kDa), pozwala z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że jest to białko fuzyjne RAP2-7-HALO-tag.
2. Optymalizacja etapów metodyki DAP-seq opartej o pracę z DNA, umożliwiła wybór i dopracowanie metody izolacji genomowego DNA. Uzyskano genomowe DNA o koncentracji i jakości umożliwiającej jego zastosowanie w kolejnych etapach pracy. Ponadto, zoptymalizowano protokół sonikacji genomowego DNA, który umożliwia uzyskanie pożądanej długości fragmentów DNA o długości ok. 200 pz.
3. Uzyskane wyniki związane z optymalizacją metody ułatwią przeprowadzenie właściwego doświadczenia DAP-seq w roku 2024.

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

WYNIKI:

1. Rozmnożenie nasion M3  Zbiór nasion z indywidualnych roślin **Zbiór 500 rodzin nasion w pokoleniu M4**
2. Wykonano analizę zawartości alkaloidów w liściach dla 50 rodzin, wybranych na podstawie obiecujących wyników z lat poprzednich. Całkowita zawartość alkaloidów w liściach poszczególnych prób badanych mieściła się w zakresie od 0,04% do 12,41% suchej masy.
3. Dla 500 rodzin zebranych nasion M4 wykonano analizę zawartości alkaloidów metodą kolorymetryczną. Wybarwienie większości ocenionych materiałów wskazywało na wysoką zawartość alkaloidów (ocenione jako 2) lub zawartość nieznacznie niższą od Karo (ocenione jako 1). Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla 29 linii, dla których większość testowanych nasion wybarwiała się jak odmiana słodka (ocenione jako 0).
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 danych zaobserwowano kilka ciekawych linii mutacyjnych, wyniki których wymagają dalszego potwierdzenia np.:
 - dla kilku rodzin zaobserwowano możliwą, dalszą segregację badanej cechy, tj. zidentyfikowano nowe pojedynki, dla których odnotowana zawartość alkaloidów w nasionach była niska, a w liściach wysoka.
 - 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.

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

WYNIKI:

Przykłady ciekawych linii mutacyjnych, które zidentyfikowano po zestawieniu wyników obu metod analizy zawartości alkaloidów:

Lp.	Obiekt	Liczba zebranych nasion M4 [szt.]	Analiza kolorymetryczna nasion											Analiza chromatograficzna liści		
			Lp. próby Wagner	Liczba testowanych nasion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Lp. próby chromatografia	Całkowita zawartość (% suchej masy)
1	1066/9	6	54	1	0											
2	1069/15	20	105	5	0	2	2	2	2							
3	1069/17	10	107	5	0	0	0	0	1							
4	1070/1	19	112	5	0	0	0	1	1					30	6.269	
5	1081/1	11	186	5	0	0	0	0	0					77	5.144	
6	1092/1	3												125	8.574	
7	1092/2	4												126	11.545	
8	1109/6	6	451	1	0											

WNIOSKI:

1. Zidentyfikowane wstępnie w roku ubiegłym linie o niskiej zawartości alkaloidów w nasionach okazały się mieć również obniżoną zawartość tych związków w liściach. Uzyskane wyniki świadczą o skuteczności działania czynnika mutagennego w generowaniu nowej zmienności w badanej populacji. Jednocześnie wskazuje to również na długotrwały i pracochłonny proces selekcyjny w dalszej identyfikacji poszukiwanego fenotypu.
2. W badanym materiale zidentyfikowano nowe linie o potencjalnie korzystnym, poszukiwanym fenotypie. Uzyskane wyniki wymagają dalszego potwierdzenia w kolejnych pokoleniach. Mając na uwadze, że osiągnięcie tego celu miałyby bardzo duże znaczenie dla hodowli i w konsekwencji praktyki rolniczej, zasadna jest kontynuacja prowadzonych badań.

Wykaz publikacji wyników projektu w 2023

Doniesienie konferencyjne:

Kroc M., Koczyk G., Czepiel K., Susek K., Święcicki W.

“Understanding the biosynthesis and accumulation of quinolizidine alkaloids in atypical accessions of narrow-leafed lupin”.

XVI. International Lupin Conference „Breeding, Cultivation and Use of Lupins for a Sustainable Agriculture - Recent Developments”, 19 - 23 czerwca 2023, Rostock, Niemcy.

Książka abstraktów str. 54. Wyniki badań z 2021-2023; Temat badawczy 1.

Poster:

Czepiel K., Święcicki W., Rybiński W., Barzyk P., Juszczak K., Kroc M.

“Combining the benefits: the use of mutagenesis as an attempt to obtain lupins characterized by sweet seeds and bitter leaves”.

XVI. International Lupin Conference „Breeding, Cultivation and Use of Lupins for a Sustainable Agriculture - Recent Developments”, 19 - 23 czerwca 2023, Rostock, Niemcy.

Książka abstraktów str. 98. Wyniki badań z 2021-2023; Temat badawczy 3.

[I nagroda w konkursie na najlepszy poster przyznana mgr Katarzynie Czepiel].