



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPOLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Katarzyna Barbara Wyrwa

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Analiza genetyczno-molekularna wybranych genów uczestniczących w wiązaniu azotu atmosferycznego u łąbinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej „Analiza genetyczno-molekularna wybranych genów uczestniczących w wiązaniu azotu atmosferycznego u łąbinu wąskolistnego *Lupinus angustifolius* L.” zmierzają do **określenia sekwencji i struktury oraz lokalizacji fizycznej i genetycznej** w genomie łąbinu wąskolistnego siedmiu genów kluczowych dla procesu biologicznego wiązania azotu. Ponadto analiza porównawcza regionów genomu analizowanego gatunku, w których zlokalizowane są badane geny, z gatunkami modelowymi roślin strączkowych (*Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* i *Lotus japonicus*) pozwoli na **identyfikację regionów syntenicznych** tych gatunków. W ramach programu naukowego Zespołu Genomiki Strukturalnej i Funkcjonalnej Roślin Strączkowych IGR PAN realizowane są projekty dotyczące zarówno nauk podstawowych, jak stosowanych, prowadzone w dużej mierze we współpracy z hodowcami. Stąd też oryginalne wyniki zdobyte w ramach prowadzonych przeze mnie badań na gatunku gospodarczo strategicznym zostaną przekazane z sektora nauki do przedsiębiorstw hodowlanych, a następnie będą miały realne szanse na komercjalizację.

Cechą charakterystyczną wszystkich gatunków łąbinów jest zdolność wiązania azotu atmosferycznego w układach symbiotycznych z bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae*. Symbioza bakterii *Rhizobiaceae* z roślinami z rodzaju *Lupinus* jest oddziaływaniem bardzo specyficznym poddanym procesom regulacyjnym na kilku poziomach. W trakcie inicjacji, rozwoju oraz funkcjonowania oddziaływania pomiędzy łąbinem wąskolistnym a bakteriami *Bradyrhizobium lupini* szereg genów, zwanych ogólnie nodulinami, ulega ekspresji lub podwyższonej ekspresji.

Udział badanych genów w procesie biologicznego wiązania azotu został potwierdzony w szeregu prac naukowych prowadzonych zarówno na łubinach jak i modelowych roślinach strączkowych. Ich wyboru do analiz dokonano na podstawie:

- a) **czasu ich ekspresji** podczas procesu wiązania azotu atmosferycznego, co bezpośrednio odzwierciedla zaangażowanie w omawiane zjawisko na różnych jego etapach,
- b) **występowania genów homologicznych** u roślin nieposiadających zdolności oddziaływania z bakteriami *Rhizobiaceae* i asymilacji azotu atmosferycznego.

Badane geny to:

- **enod40** - odpowiedzialny za inicjację morfogenezy brodawek korzeniowych, stwierdzono występowanie homologów genu u wielu roślin,
- **nod26** – koduje białko strukturalne nodulinę 26, które stanowi główny komponent błony peribakteroidalnej, należy do rodziny białek MIP, jest białkiem brodawkowo-specyficznym,
- grupa genów (**syntetaza glutaminy, aminotransferaza asparaginianowa, syntetaza asparaginy, karboksylaza fosfoenolopirogronianu**), których białkowe produkty katalizują szereg reakcji enzymatycznych umożliwiających metabolizm azotu w komórkach, homologiczne geny występujące u wszystkich organizmów wyższych,
- **nod45** – koduje białko brodawkowo-specyficzne, którego funkcja nie została określona.

Do badań wykorzystano posiadaną przez zespół badawczy **bibliotekę klonów BAC** genomu jądrowego *Lupinus angustifolius*. W celu przeprowadzenia selekcji i poszukiwania klonów BAC niosących sekwencje genów zaangażowanych w proces symbiozy zaprojektowano zestaw siedmiu sond genowo-specyficznych; korzystano z bazy danych sekwencji genowych GenBank. Screening biblioteki klonów BAC sondami umożliwił wygenerowanie siedmiu niezależnych **sub-bibliotek klonów BAC**. Fingerprinting restrykcyjny pozwolił na zestawienie klonów BAC wchodzących w skład każdej z sub-bibliotek w **kontigi**, odzwierciedlające strukturę badanych regionów genomu łubinu wąskolistnego. Analiza z wykorzystaniem metody PCR oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* umożliwiła ocenę poprawności zestawienia klonów w kontigach oraz wstępne określenie liczby kopii badanych genów w genomie łubinu wąskolistnego. Technika qPCR natomiast posłużyła do weryfikacji wyników dotyczących **liczby kopii genów** w genomie łubinu wąskolistnego. Sekwencjonowanie końców insertów klonów BAC wraz z poprzednimi działaniami pozwoliło na wyselekcjonowanie z każdej sub-biblioteki klonów BAC do sekwencjonowania metodą 454. Proces **adnotacji funkcjonalnej** uzyskanych sekwencji z wykorzystaniem automatycznego ciągu analitycznego w systemie COBALT przeprowadził, w ramach wspólnego projektu MNiSW/ NCN, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM dr hab. Wojciech Karłowski, prof. UAM.

Uzyskane dane sekwencyjne stanowią podstawy do **analizy porównawczej regionów łubinu wąskolistnego** z innymi gatunkami roślin zarówno strączkowych, jak i niestrączkowych oraz do wygenerowania szeregu markerów genetycznych odzwierciedlających lokalizację badanych genów oraz ich kopii na mapie genetycznej łubinu wąskolistnego.

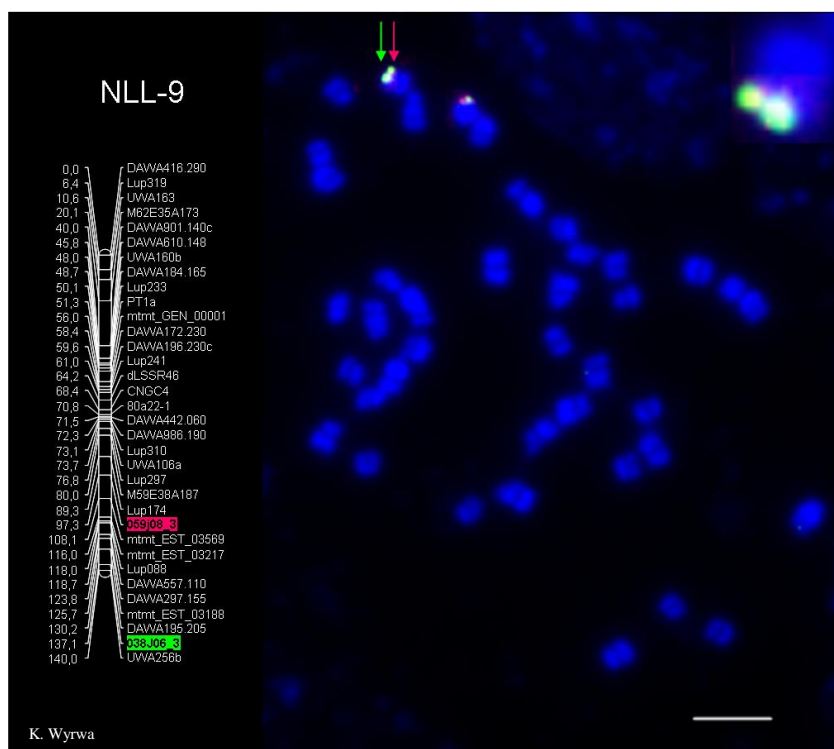
Zdeterminowanie sekwencji nukleotydowych badanych genów u łubinu wąskolistnego oraz określenie liczby ich kopii wraz z charakterystycznymi dla nich blokami sekwencyjnymi oraz pełne scharakteryzowanie regionów genomu badanego gatunku, w których geny te są zlokalizowane, stanowić będzie podstawy do określenia **dynamiki ich zmian ewolucyjnych** i będzie pomocne w **identyfikacji mechanizmów, jakie zaangażowane były w kształtowanie tych obszarów genomowych** u roślin strączkowych. Dodatkowo, analiza porównawcza badanych genów z ich homologami u roślin niestrączkowych umożliwi podjęcie próby wyjaśnienia **mechanizmów odpowiedzialnych za specjalizację kopii badanych genów** w procesie wiązania azotu atmosferycznego. Przypuszcza się bowiem, że geny niezbędne dla prawidłowego metabolizmu roślin w wyniku ewolucji i ustalenia się oddziaływania pomiędzy roślinami strączkowymi, a bakteriami *Rhizobiaceae*, najprawdopodobniej uległy duplikacji, a jednej z kopii genu została przypisana brodawkowo-specyficzna ekspresja.

Lokalizacja badanych genów na mapie genetycznej łubinu wąskolistnego oparta o markery molekularne zaprojektowane na podstawie ich sekwencji wpłynie na zwiększenie zasobu informacji w niej zawartych. Analiza cytogenetyczna umożliwi przypisanie grup sprzężeń mapy genetycznej gatunku do odpowiadających im chromosomów, co będzie krokiem w kierunku **integracji mapy genetycznej i cytogenetycznej genomu *L. angustifolius***. Biorąc pod uwagę brak zróżnicowania morfologicznego chromosomów *Lupinus angustifolius*, jest to istotne dla sprawnego prowadzenia prac zakładających analizy porównawcze oraz mapowanie cytogenetyczne z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* - FISH.

Stworzenie narzędzi genetycznych wykorzystywanych komercyjnie w selekcji odmian roślin strączkowych jest celem, do którego będą mogły być wykorzystane, wyniki mojej pracy doktorskiej. Odpowiada to założeniom Regionalnej Strategii Innowacji dla Wielkopolski. Badania podstawowe prowadzone na gatunku atrakcyjnym z gospodarczego punktu widzenia i odpowiadającym obecnym potrzebom rynku, stwarzają możliwości ich wykorzystania w celu **wrostu zysków płynących z rolnictwa na terenie Wielkopolski**. Optymalizacja plonów łubinu poprzez wykorzystanie markerów genetycznych w celu kompleksowej charakterystyki odmian najwydajniej wiążących azot atmosferyczny, najlepiej plonujących oraz wykazujących najwyższą odporność na szereg chorób grzybowych jest innowacyjnym **podejściem łączącym dokonania sektora nauki z potrzebami**

przedsiębiorstw rolnych czyli sektora gospodarczego, mającego duże znaczenie dla regionu. Propagowanie rotacyjnego systemu upraw łąbinu w plonie upraw zbożowych, które przeważają na terenie Wielkopolski, dodatkowo uzupełnia korzyści płynące z prowadzonych przeze mnie badań

Wyniki mojej pracy mogą przyczynić się do **wzrostu zainteresowania uprawą roślin strączkowych** w Wielkopolsce. Jest to pożądane z punktu widzenia ogólnokrajowej polityki Państwa, w tym prowadzonego programu rządowego: "Ulepszenie krajowych źródeł białka roślinnego, ich produkcji, systemu obrotu i wykorzystania w paszach". Bardzo cenną zaletą wielu roślin strączkowych, w tym łąbinów, jest ich wyjątkowa zdolność do biologicznego wiązania azotu atmosferycznego dzięki symbiozie z bakteriami. Zjawisko to pozwala na minimalizowanie sztucznego nawożenia upraw azotem mineralnym. **Wykorzystanie łąbinu do uprawy w poplonie** podnosi zawartość materii organicznej w glebie poprawiając plonowanie zbóż. Równocześnie uprawa łąbinów na glebach lekkich, zniszczonych monokulturą zbożową czy uprawą kukurydzy istotnie poprawia ich strukturę. Wszystkie te właściwości przemawiają za propagacją uprawy łąbinu na terenie Wielkopolski, gdzie na lekkich, raczej ubogich glebach prowadzona jest intensywna gospodarka rolna, stojąca na wysokim poziomie.



Rycina. Lokalizacja genetyczna i fizyczna markerów molekularnych 059J08_3 oraz 038J06_3 w 9 grupie sprzężeń mapy genetycznej łąbinu wąskolistnego.