

Zadanie 104

Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.) na stres niedoboru wody

W roku 2020 badania prowadzono w ramach trzech tematów.

Temat badawczy 1

Ocena reakcji wybranych populacji cebuli na stres suszy w różnych fazach wzrostu i rozwoju

Badania miały na celu ocenę poziomu tolerancji/wrażliwości wybranych linii/odmian cebuli na stres suszy zadawany w fazie kiełkowania, siewek i wiązania cebul. Materiałem roślinnym było 96 linii/odmian pochodzących z polskich i zagranicznych firm hodowlano-nasiennych oraz z Banku Genów Instytutu Ogrodnictwa - PIB w Skierniewicach. Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych (faza kiełkowania i faza siewek) oraz w warunkach szklarniowych (faza wiązania cebul). Badane obiekty cebuli charakteryzowały się poszukiwaną zmiennością pod względem tolerancji na stres suszy w różnych fazach wzrostu i rozwoju wegetatywnego. Dzięki temu stanowiły cenny materiał do genotypowania, a następnie identyfikacji regionów genomu odpowiedzialnych za tolerancję cebuli na deficyt wody. Na podstawie średnich wartości z wszystkich linii cebuli stwierdzono, że stres niedoboru wody najmniej ograniczył masę cebul – o 27%, następnie długość korzeni i kiełkowanie nasion – odpowiednio o 37 i 38%, natomiast świeża masa siewek i długość liścieni były zahamowane odpowiednio o 54 i 58%. Stwierdzono silną korelację między świeżą masą siewek a długością ich liścieni i korzeni w warunkach niedoboru wody, o czym świadczą wartości wynoszące odpowiednio 0,9354 i 0,7835. Zanotowano także istotny związek liścieni z długością korzeni (0,6631). Natomiast zależność pomiędzy kiełkowaniem a parametrami opisującymi wzrost siewek (świeża masa, długość liścieni i korzeni) oraz masą cebul w stresie deficytu wody okazała się nieistotna. Potwierdzają to niskie wartości współczynnika korelacji wynoszące odpowiednio 0,1113, 0,2781, 2697 i 0,0615. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy masą cebul a cechami określającymi stadium siewek. Może to wskazywać na zupełnie inne mechanizmy warunkujące tolerancję cebuli w poszczególnych fazach wzrostu.

Wytypowano obiekty cebuli, które mogą być cennym materiałem wyjściowym do wykorzystania w programach hodowli twórczej nowych odmian cebuli tolerancyjnych na suszę. Linia 171026 oraz odmiana Bonus wyróżniły się wysokim poziomem tolerancji na deficyt wody we wszystkich trzech badanych fazach (kiełkowanie, stadium siewek, faza wiązania cebul).

Temat badawczy 2

Mapowanie asocjacyjne genomu cebuli (GWAS) przy pomocy technologii DArTseq

Celem badań była identyfikacja regionów genomu *Allium cepa* odpowiedzialnych za tolerancję tego gatunku na deficyt wody z wykorzystaniem mapowania asocjacyjnego (GWAS). Do analizy GWAS wykorzystano 188 populacji cebuli o zróżnicowanej odpowiedzi na stres suszy w trzech fazach rozwojowych: faza kiełkowania nasion i siewek, oraz w stadium wiązania cebul. Mapowanie asocjacyjne na potrzeby wykrywania istotnych statystycznie asocjacji marker-cecha (MTA) wykonano w oparciu o ogólny model liniowy (ang. general linear model, GLM) połączony z analizą głównych składowych (ang. principal component analysis, PCA). W analizach asocjacji uwzględniano tylko te markery, które charakteryzowały się asocjacjami na poziomie $p \leq 0.01$.

Genotypowanie 188 populacji cebuli przy pomocy technologii DArTseq pozwoliło na identyfikację 19 711 markerów silico-DArT oraz 11 353 markerów typu SNP. Po odrzuceniu markerów z dużym (>20%) udziałem brakujących danych i występujących z częstościami $0.95 < p < 0.05$ do analiz asocjacyjnych wykorzystano: 10 892 markery silico-DArTseq oraz 6 454 - typu SNP. Czynniki częstości występowania markerów był bardziej selektywny dla silicoDArT niż SNP i taki udział rzadkich alleli stanowił odpowiednio 44% i 35%. Markery SNP wykorzystano również do oceny

poziomu loci heterozygotycznych w badanych populacjach. Stwierdzono, że średnio badane linie/odmiany miały 34 % loci w stanie heterozygotycznym (zakres od 1% dla P15 do 72% dla '171342'). Z rozkładu heterozygotyczności wynika, że 1/3 (57) badanych populacji miała od 15 do 25 % loci w stanie heterozygotycznym, a u 42% (72) badanych populacji heterozygotyczność była w zakresie od 35 do 55%.

Przeprowadzona w następnym etapie analiza składowych głównych wykazała, że rozkład badanych populacji cebuli dla dwóch pierwszych składowych zmienności wyznaczonych dla macierzy kowariancji badanych markerów 10892 silico-DArT sugerował obecność struktury populacji, natomiast w przypadku 6454 markerów SNP - dwóch subpopulacji.

Z wykorzystaniem danych fenotypowych 188 odmian i linii cebuli przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego oraz danych genotypowych uzyskanych metodą DArTseq przeprowadzono analizę asocjacyjną z zastosowaniem metody GLM. Do przeprowadzenia analizy asocjacyjnej wykorzystano dane fenotypowe otrzymane w poprzednich sezonach wegetacyjnych z testów szalkowych przeprowadzonych w warunkach kontrolowanych oraz testu szklarniowego oceniającego reakcję roślin cebuli w warunkach suszy glebowej. W przypadku testów szalkowych, cechami fenotypowymi dla których szukano asocjacji z markerami, były: redukcja liczby skielkowanych nasion na skutek czynnika stresowego względem optymalnego nawadniania (KIEL%) w fazie kiełkowania, oraz redukcja świeżej masy siewek (SMS%), długości korzeni (DKS%) i liścieni siewek (DLS%) względem kontroli (optymalne nawadnianie) w fazie siewek. Natomiast w przypadku testów szklarniowych brano pod uwagę % utraty masy cebuli (deficyt wody vs optymalne nawodnienie).

Analiza asocjacyjna pozwoliła na identyfikację 70 markerów silicoDArT ($p < 0.001$), w tym: 27 markerów, które asocjowały z % kiełkujących nasion, 20 - dla świeżej masy siewek, 18 - dla długości korzenia siewek, oraz 5 - dla długości liścieni siewek. Sześć markerów: 9338284, 57819108, 57819143, 100003634, 100006175, 100097152 było istotnie związanych równocześnie z kilkoma cechami. Markery te wyjaśniały od 7.0 do 12.5% obserwowanej zmienności fenotypowej w badanych populacjach cebuli. Marker o najwyższym poziomie istotności (100003634, $8.97E-07$) wykazywał asocjację z % nasion kiełkujących. W przypadku testów przeprowadzonych w warunkach szklarniowych metodami GLM i MLM zidentyfikowano 42 markery silicoDArT istotnie związane z masą cebul, w tym 11 przy poziomie $p < 0.0001$. Markery te wyjaśniały od 2.29 do 1.63% obserwowanej zmienności fenotypowej w badanych populacjach cebuli.

W przypadku markerów SNP zastosowanie modelu GLM pozwoliło zidentyfikować 33 markery ($p < 0.001$), w tym: 11 - dla świeżej masy siewek (SMS%), 17 - dla długości korzenia (DKS%), oraz 5 - dla długości liścieni (DLS%). Zidentyfikowane markery SNP wyjaśniały stosunkowo wysoki % obserwowanej zmienności fenotypowej dla badanych cech siewek: DKS: od 9.9 do 18.8%; DLS: od 8.8 do 11.4%; SMS: od 7.9 do 13.7%. Podobnie zidentyfikowano 11 markerów SNP związanych z masą cebul które wyjaśniały od 9.5 do 41.2% zmienności oraz trzy markery SNP związane z kiełkowaniem nasion (KIEL%).

Temat badawczy 3

Oznaczenie wybranych parametrów fizjologicznych w reakcji populacji cebuli krańcowo zróżnicowanych pod względem tolerancji na niedobór wody

Celem badań była ocena parametrów fizjologicznych określających (i) sprawność aparatu fotosyntetycznego (natężenie fotosyntezy, fluorescencja i zawartość względna chlorofilu w liściach, przewodność szparkowa) oraz (ii) stosunki wodne (natężenie transpiracji) w roślinach poddanych stresowi suszy względem kontroli. Materiałem doświadczalnym było 11 linii/odmian cebuli wytypowanych na podstawie ich zróżnicowanej reakcji na stres suszy fizjologicznej w fazie kiełkowania nasion i w fazie liścieni. Badania przeprowadzono w warunkach szklarniowych z zastosowaniem tradycyjnej suszy glebowej. Niedobór wody zadawano od rozpoczęcia wiązania

cebul (6-8 liści właściwych) do momentu załamywania szczypioru. Zastosowano dwa poziomy wilgotności podłoża: optymalny (kontrola; 100% pojemnikowej pojemności wodnej - PPW) oraz deficytowy (stres, 50% pojemnikowej pojemności wodnej - PPW). Niezależnie od analizowanego parametru fizjologicznego zarówno w warunkach optymalnego nawadniania (kontrola), jak i w stresie suszy obserwowano duże zróżnicowanie pomiędzy badanymi obiektami cebuli. Stwierdzono, że u większości ocenianych linii/odmian niedobór wody obniżył określone parametry fizjologiczne. Wyjątek stanowiła linia ZS140, u której pod wpływem stresu suszy obserwowano wzrost natężenia fotosyntezy i transpiracji, wskaźnika fluorescencji Fv/Fm oraz wzrost natężenia zielonej barwy liści, natomiast przewodność szparkowa była na poziomie kombinacji kontrolnej. Analizując reakcje poszczególnych linii, największe obniżenie natężenia fotosyntezy, transpiracji i przewodności szparkowej obserwowano u odmiany Polanowska. Spośród pięciu ocenianych parametrów fizjologicznych, natężenie transpiracji zostało w najmniejszym stopniu zredukowane pod wpływem stresu suszy. Na wyróżnienie zasługują cztery linie ZS140, ZS134, ZS116 i P22, u których odnotowano wzrost natężenia transpiracji o ok. 15-40% względem kontroli. Wartości wskaźnika fluorescencji Fv/Fm były wyższe w warunkach deficytu wody u dwóch linii P22 i ZS140, u dwóch kolejnych linii 171027 i 171036 - na poziomie roślin kontrolnych, natomiast u pozostałych siedmiu obiektów były wyższe w warunkach optymalnego nawadniania.

Podsumowanie i najważniejsze osiągnięcia projektu

1. Opracowano metodę testowania cebuli na stres niedoboru wody w warunkach laboratoryjnych (faza kiełkowania nasion i faza siewek) oraz w warunkach szklarniowych (faza wiązania cebul), która umożliwiła efektywną selekcję genotypów tolerancyjnych i wrażliwych.
2. Wytypowano obiekty cebuli, które mogą być cennym materiałem wyjściowym do wykorzystania w programach hodowli cebuli z tolerancją na stres suszy.
3. Zanotowano, iż zwiększenie długości korzenia pod wpływem stresu suszy może być wskaźnikiem tolerancji cebuli na deficyt wody.
4. Stwierdzono silną korelację między świeżą masą siewek a długością ich liścieni i korzeni w warunkach niedoboru wody. Natomiast zależności pomiędzy kiełkowaniem a parametrami opisującymi wzrost siewek (świeża masa, długość liścieni i korzeni) oraz masą cebul w stresie suszy okazały się nieistotne. Nie stwierdzono także korelacji pomiędzy masą cebul a cechami określającymi stadium siewek. Może to wskazywać na zupełnie inne mechanizmy warunkujące tolerancję cebuli w poszczególnych fazach wzrostu.
5. Uzyskano markery DArTseq, które można wykorzystać do bezpośredniej selekcji roślin w celu poprawy wartości ocenianych cech fenotypowych, lub można konwertować te markery w celu opracowania prostych oznaczeń bazujących na reakcji PCR do wspomaganie selekcji.
6. Otrzymane wyniki badań zostały opublikowane:
Kłosińska U. 2020. Zróżnicowanie reakcji obiektów cebuli (*Allium cepa* L.) na stres suszy w fazie kiełkowania i wzrostu siewek. Biuletyn IHAR, 291: 93-99
<http://ojs.ihar.edu.pl/index.php/biul/article/download/531/446/>