

Zadanie nr 37:

Charakterystyka determinant genetycznych dla wybranych cech związanych z biologią kwitnienia u buraka ćwikłowego

Okres realizacji: **48 miesięcy (lata 2021-2024)**

Zespół wykonawców projektu:

Dr hab. Marek Szklarczyk, prof. URK – kierownik; e-mail: marek.szklarczyk@urk.edu.pl

MSc Ajeeth Prakash Vairamuthu

Dr hab. Stefan Stojalowski, prof. ZUT

Dr hab. Hieronim Golczyk, prof. KUL

Cele projektu w 2023 r.

W temacie badawczym 1 (Opracowanie markerów DNA dla genów pośpiechowatości):

- opracowanie markerów PCR do wnioskowania o skłonności roślin buraka ćwikłowego do pośpiechowatości)

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania locus restorera *X (Rf1)*):

- wskazanie różnic pomiędzy sekwencjami przeciwstawnych alleli locus *X/x (Rf1/rf1)*

W temacie badawczym 3 (Celowane genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) w kontekście identyfikacji genu jednonasienności):

- wskazanie genów kandydujących, które mogą odpowiadać genowi *m* warunkującemu jednonasiennosc

Cele zostały zrealizowane.

Materiały i metody

W temacie badawczym 1 (Opracowanie markerów DNA dla genów pośpiechowatości):

Materiały roślinne

- populacje A i B segregujące na rośliny normalne i pośpiechowate.

Metody

- markery SCAR i CAPS

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania locus restorera *X (Rf1)*):

Materiały roślinne

- rośliny homozygotyczne typu *Rf1/Rf1* oraz *rf1/rf1* z segregującego potomstwa nr 538

Metody

- BLASTn, BLASTp, wirtualna translacja.

W temacie badawczym 3 (Celowane genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) w kontekście identyfikacji genu jednonasienności):

Materiały roślinne

- populacje 593a i 593b segregujące na rośliny jedno- i wielokiełkowe

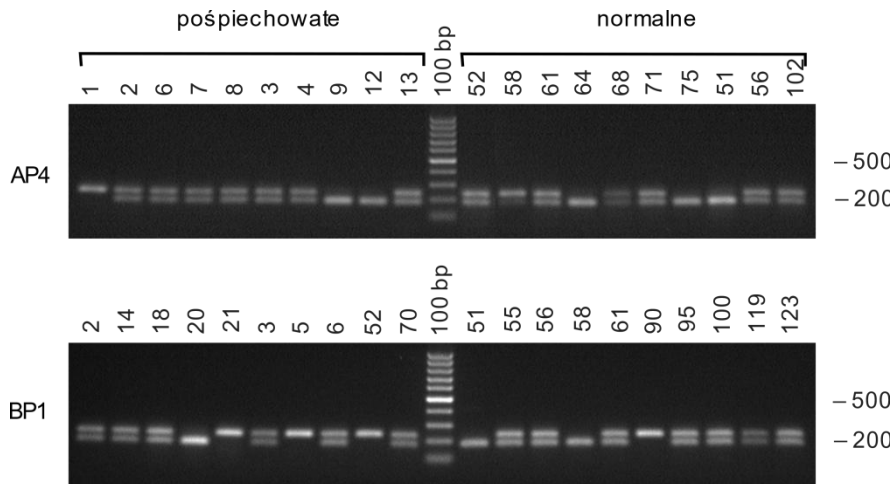
Metody

- platforma NGS Illuminy, PE150

Wyniki

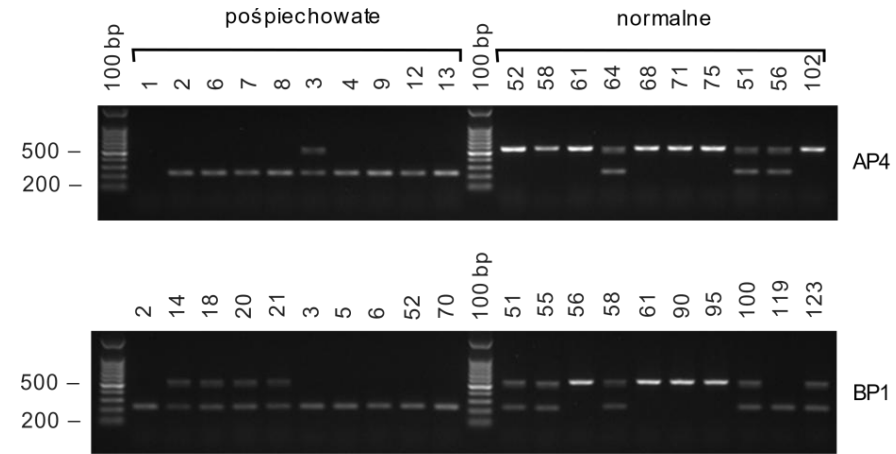
Opracowanie markerów DNA dla genów pośpiechowatości

Typowanie polimorficznych markerów



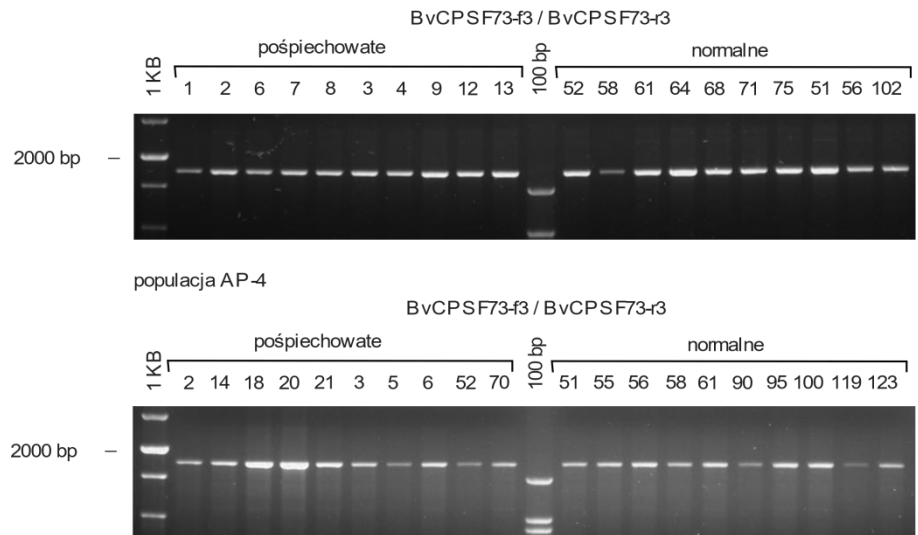
BNP BBx19-f2/BNP BBx19-r1

gen *BvBBX19*



BNP-BTC-f1 /BNP-BTC-r1

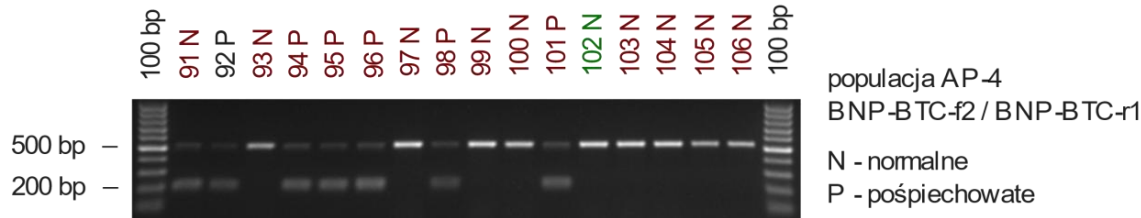
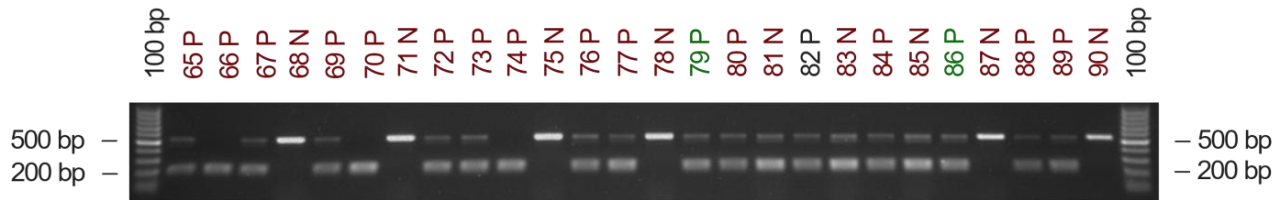
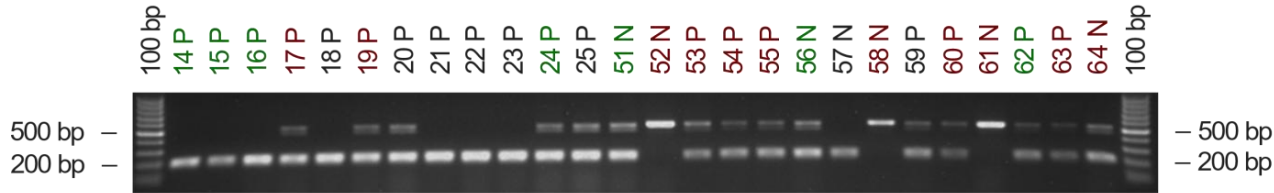
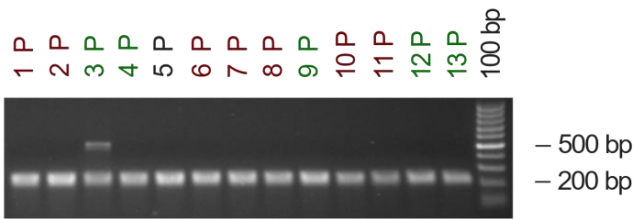
gen *BvBTC1*



populacja BP-1

gen *BvCPSF73*

Weryfikacja polimorficznych markerów



gen *BvBTC1*

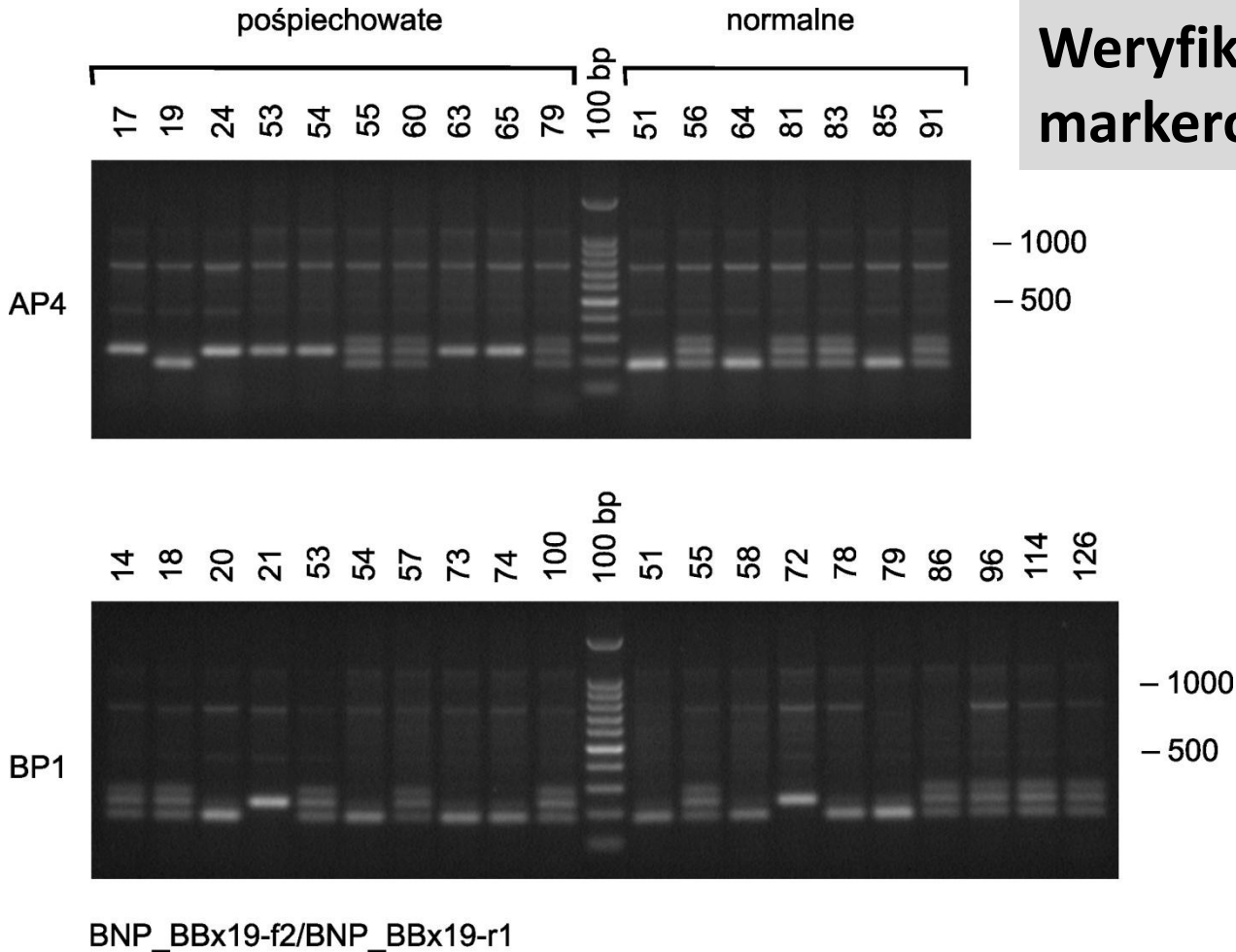
kosegregacja [%]:

90,1

87,2

Fenotyp roślin	Liczba [%]	Produkty PCR [pz] ze starterami BNP-BTC-f2/BNP-BTC-r1		
		210	525	210/525
		Genotyp locus <i>B/b</i>		
		<i>BB</i>	<i>bb</i>	<i>Bb</i>
Populacja A				
normalne	26 [32,1%]	1 [1,2%]	18 [22,2%]	7 [8,6%]
pośpiechowane	55 [67,9%]	22 [27,2%]	0 [0,0%]	33 [40,7%]
Populacja B				
normalne	45 [38,5%]	2 [1,7%]	30 [25,6%]	13 [11,1%]
pośpiechowane	72 [61,5%]	36 [30,8%]	0 [0,0%]	36 [30,8%]

Weryfikacja polimorficznych markerów – cd.



Genotypowanie heterozygot *Bb* markerem dla genu *BvBBx19*

Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania locus restorera *X (Rf1)*

Lista produktów amplifikacji z homologiami do otwartych ramek odczytu locus *Rf1/rf1 (bvORF)*

Nazwa sekwencji	Długość sekwencji [nt]	Długość odcinka homologicznego do bvORF [nt]	Allel źródłowy
k141_230474	987	824	<i>Rf1</i>
k141_450613	1 062	1062	<i>Rf1</i>
k141_839348	646	646	<i>Rf1</i>
k141_547503	4 679	58	<i>Rf1</i>
k141_406409_1+4	791	703	<i>Rf1</i>
k141_406409_2	791	703	<i>Rf1</i>
k141_406409_3	791	697	<i>Rf1</i>
k141_313464	7 614	53	<i>Rf1</i>
k141_584771	927	50	<i>Rf1</i>
k141_584769	850	50	<i>Rf1</i>
k141_491217	7 543	2 086	<i>rf1</i>

Celowane genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) w kontekście identyfikacji genu jednonasienności

Parametry statystyczne uzyskanych odczytów sekwencyjnych

Populacja 593a

Parametr		Wartość
Zsumowana długość odczytów*		1 374 935 800,4
Liczba odczytów*		9 166 238,7
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC		36,4
N50		150
N95		150
%Q20		96,7
%Q30		91,4
Phred	min.	35,00
	maks.	70,00
	średni	68,5

Populacja 593b

Parametr		Wartość
Zsumowana długość odczytów*		1 681 054 916,7
Liczba odczytów*		11 207 032,8
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC		36,6
N50		150
N95		150
%Q20		96,5
%Q30		91,0
Phred	min.	35,00
	maks.	70,00
	średni	68,4

Wnioski

W temacie badawczym 1 (Opracowanie markerów DNA dla genów pośpiechowatości):

1. W obydwu testowanych populacjach cecha pośpiechowatości jest determinowana obecnością genu *BvBTC1*.
2. Gen ten wykazuje ograniczoną penetrację – głównie w przypadku heterozygot. Może to wynikać z obecności innych segregujących determinant pośpiechowatości np. *BvBBX19*.
3. Źródłem pośpiechowatości w obydwu analizowanych populacjach było niekontrolowane zapylenie pyłkiem buraka cukrowego lub pastewnego.

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania locus restorera X (*Rf1*)):

1. Wśród fragmentów DNA zamplifikowanych z homozygot *Rf1/Rf1* oraz *rf1/rf1* wyselekcjonowano wykazujące homologię do otwartych ramek odczytu locus *Rf1/rf1* (*bvORF*).
2. Sekwencje te są obecnie porównywane w celu identyfikacji polimorfizmów różniących allel dopełniający od restorerowego.

W temacie badawczym 3 (Celowane genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) w kontekście identyfikacji genu jednonasienności):

1. W przeprowadzonym eksperymencie GBS dla pojedynczej rośliny uzyskano ok. 1,5 Gb danych sekwencyjnych.
2. Parametry statystyczne uzyskanych danych wskazują na ich wysoką jakość, co wynika m.in. z rygorystycznej filtracji odczytów sekwencyjnych przez dostawcę usługi.

Założone mierniki zostały zrealizowane.

Prezentacja wyników

Wesołowski W., Domnicz B., Szklarczyk M. RNA-seq reveals massive down-regulation of genes in cytoplasmic male-sterile beet plants; IV Kongres Polskiego Towarzystwa Biochemicznego BIO2023, Szczecin, 13-16.09.2023; poster

Podziękowania

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi – finansowanie
Plantico Zielonki Sp. z o.o. – materiały roślinne



**Segregacja roślin
z badanych populacji**



Powstanie analizowanych materiałów z pośpiechowością

