

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](mailto:marek.szklarczyk@urk.edu.pl)**

**Dr inż. Wojciech Wesołowski**

**Dr hab. Stefan Stojałowski, prof. ZUT**

**Dr hab. Hieronim Golczyk, prof. KUL**

# Cele projektu w 2021 r.

## **W temacie badawczym 1 (Sekwencjonowanie transkryptomu w kontekście przywracania płodności przez gen *X (Rf1)*):**

- uzyskanie sekwencji transkryptomu dla roślin męskosterylnych i roślin z przywróconą płodnością<sup>1)</sup>
- określenie poziomu ekspresji genów (na poziomie RNA) u roślin męskosterylnych i roślin z przywróconą płodnością<sup>2)</sup>

## **W temacie badawczym 2 (Sekwencjonowanie genów pośpiechowatości):**

- ustalenie sekwencji występujących u buraka ćwikłowego alleli genu *B/BTC1*<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Cel zrealizowany częściowo: prace w laboratorium macierzystym zostały zakończone, dalsze prace – konstrukcja bibliotek i ich sekwencjonowanie – są wykonywane w zewnętrznym laboratorium usługowym.

<sup>2)</sup> Cel jeszcze niezrealizowany: jego osiągnięcie będzie możliwe po otrzymaniu danych sekwencyjnych z laboratorium usługowego, przekazanie tych danych ma nastąpić najpóźniej w połowie grudnia. Opóźnienie wynikało z trudności w otrzymaniu preparatów RNA nadających się do sporządzenia bibliotek.

<sup>3)</sup> Cel zrealizowany.

# Materiały i metody

## W temacie badawczym 1 (Sekwencjonowanie transkryptomu w kontekście przywracania płodności przez gen *X (Rf1)*):

### Materiały roślinne

- Po 10 roślin – 5 męskosterylnych i 5 męskopłodnych – z trzech segregujących populacji: K, L i M; były to populacje F2 uzyskane po krzyżowaniach typu linia CMS x linia ojcowska.

### Metody

- Izolacja całkowitego RNA: TRI Reagent (Zymo Research) / PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific).
- Kontrola jakości RNA: pomiar A260 i A280 (Nanodrop 2000c), elektroforeza w agarozie z formaldehydem, automatyczna elektroforeza kapilarna (Fragment Analyzer, Advanced Analytical Technologies/Agilent).
- RNA-seq: z wykorzystaniem platformy firmy Illumina (wariant PE100), usługa zlecona firmie CeGaT, Tybinga).

## W temacie badawczym 2 (Sekwencjonowanie genów pośpiechowatości):

### Materiały roślinne

- 4 rośliny pośpiechowate i 6 roślin normalnych z odmiany populacyjnej A.
- 14 roślin pośpiechowatych i 12 roślin normalnych z odmiany populacyjnej B.

### Metody

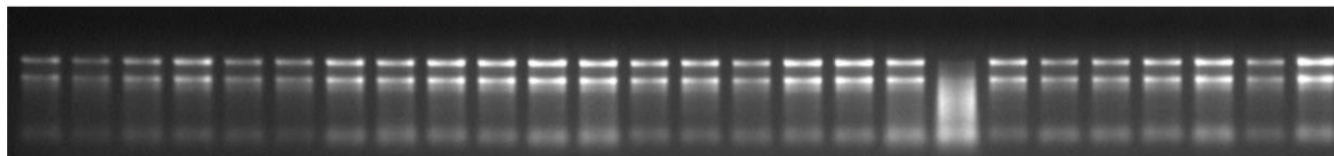
- Izolacja DNA: mini-preparatyka bazująca na ekstrakcji organicznej.
- PCR ze starterami zaprojektowanymi na bazie genu *B/BTC1* buraka cukrowego.
- Sekwencjonowanie produktów PCR w serwisie zewnętrznym (Genomed, Warszawa).

# Wyniki

## Sekwencjonowanie transkryptomu w kontekście przywracania płodności przez gen *X* (*Rf1*)

Preparaty RNA do analizy RNA-seq wybrano z wyjściowej puli 52 (każdy preparat odpowiadał jednej roślinie). W większości tych preparatów analiza elektroforetyczna wykazała obecność dwóch, wyraźnie zaznaczonych prążków rybosomalnego RNA. Średnie stężenie RNA w badanych próbach wynosiło 1,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , a średni stosunek A260/A280 wyniósł 2,1 (Nanodrop). Ogólnie uzyskane dane wskazywały na dobrą jakość analizowanych preparatów RNA.

K1 K2 K3 K4 K5 K6 K7 K8 K9 K10



Elektroforeza (agaroza z formaldehydem) preparatów całkowitego RNA wyizolowanego z pąków kwiatowych roślin buraka ćwikłowego (fragment żelu). Numerację podano wyłącznie dla preparatów wybranych do analizy RNA-seq. Kolor czerwony - rośliny męskosterylne, kolor zielony – rośliny męskopłodne.

Nr rośliny	Stężenie [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	A260	A280	260/280
L1	1.5	38.2	18.1	2.1
L2	1.4	34.3	16.3	2.1
L3	1.6	39.6	18.7	2.1
L4	1.7	42.2	20.2	2.1
L5	1.4	35.9	17.1	2.1
L6	1.6	38.9	18.5	2.1
L7	1.7	43.1	20.4	2.1
L8	1.4	33.9	16.1	2.1
L9	1.1	26.3	12.5	2.1
L10	1.2	31.0	14.7	2.1

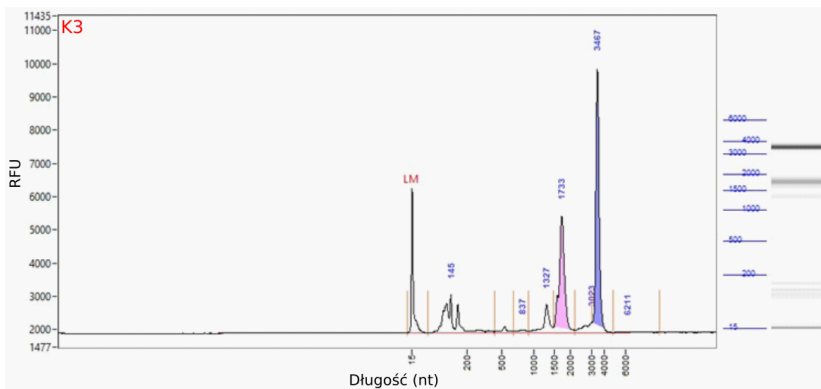
Do analizy RNA-seq wybrano 30 roślin – po 10 z każdej badanej populacji (5 męskosterylnych i 5 męskopłodnych).

Populacja	R. męskosterylne	R. męskopłodne
K	K3, K4, K6, K7, K10	K1, K2, K5, K8, K9
L	L2, L3, L6, L7, L8	L2, L3, L5, L9, L10
M	M2, M5, M6, M7, M9	M1, M3, M4, M8, M10

Wybrane rośliny.

Wyniki analizy spektrofotometrycznej preparatów całkowitego RNA (fragment tabeli).

W firmie CeGaT preparaty RNA poddano kontroli jakości przy wykorzystaniu urządzenia Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies/Agilent). Uzyskane wartości stężeń były średnio 2,3-krotnie ( $\sigma = 0,2$ ) niższe od wartości zmierzonych urządzeniem Nanodrop. Na bazie uzyskanych profili elektroforetycznych dla każdej próbki został wyliczony parametr RQN (ang. *RNA Quality Number*) określający stopień integralności cząsteczek RNA (jego maksymalna wartość wynosi 10). Dla analizowanych preparatów średnia wartość tego parametru wynosiła 9,2 – wskazywało to na ich bardzo dobrą jakość kwalifikującą do konstrukcji sekwencyjnych bibliotek cDNA.



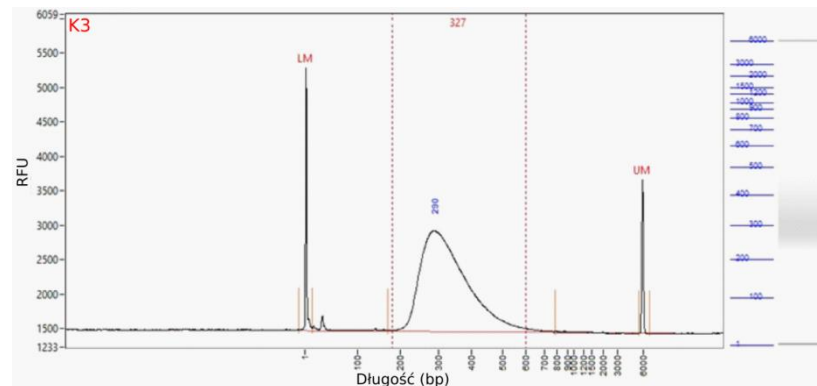
Elektroforegram wygenerowany przy użyciu urządzenia Fragment Analyzer dla jednej z roślin męskosterylnych (K3).

Do kontroli jakości bibliotek również zastosowano elektroforezę kapilarną w urządzeniu Fragment Analyzer. Pík odpowiadający migracji fragmentów biblioteki osiągał maksimum w oczekiwanym zakresie wielkości 273 – 294 bp i praktycznie nie zawierał fragmentów mniejszych niż 200 bp.

Z tego względu wszystkie biblioteki (dla kompletu 30 roślin) zakwalifikowano do sekwencjonowania

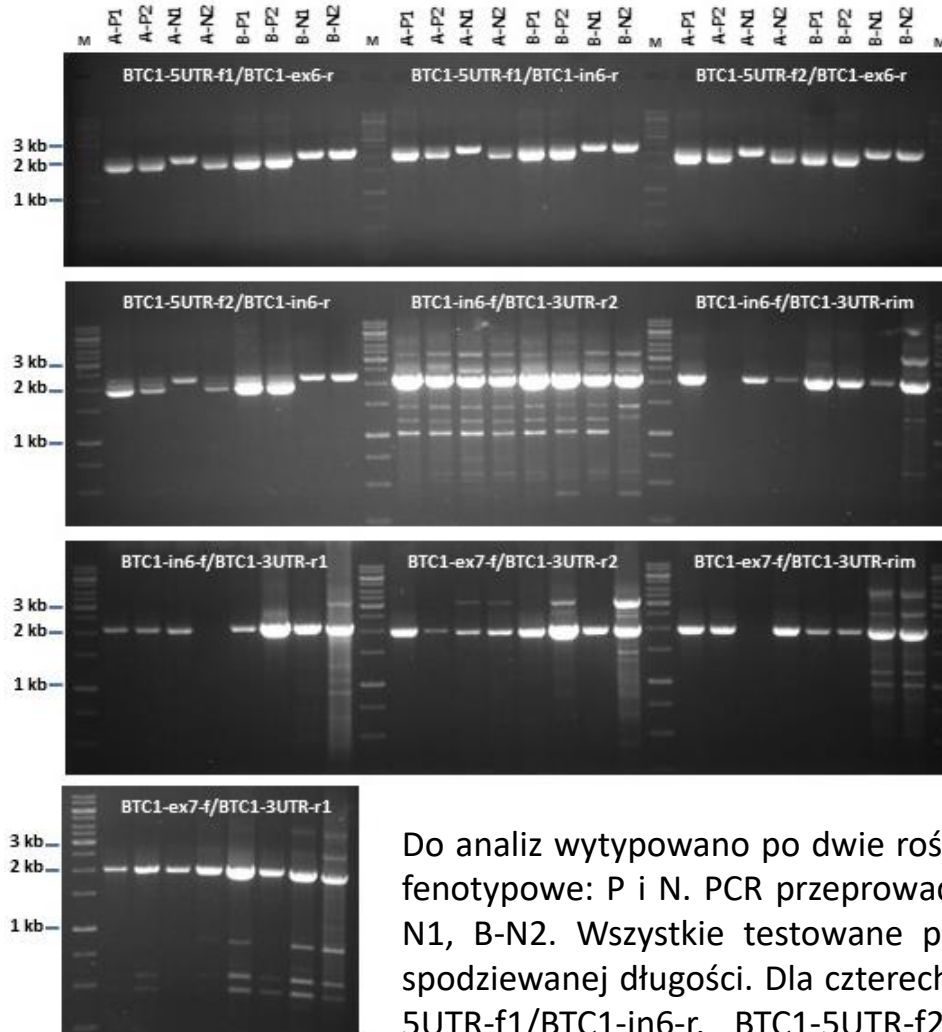
Nr rośliny	Stężenie [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Ilość [ $\mu\text{g}$ ]	RQN
L1	0.7	12.4	9.4
L2	0.6	11.1	9.4
L3	0.6	12.2	8.6
L4	0.2	3.2	9.8
L5	0.6	12.1	8.2
L6	0.6	11.9	9.6
L7	0.7	13.0	9.6
L8	0.6	11.5	9.2
L9	0.5	9.4	8.3
L10	0.6	10.6	10.0

Wyniki analizy preparatów RNA w aparacie Fragment Analyzer.



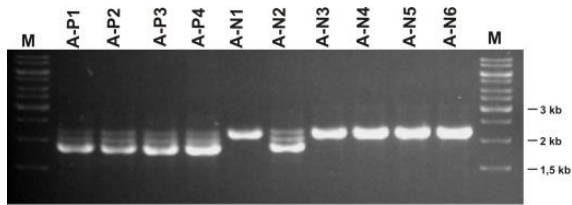
Elektroforegram wygenerowany przy użyciu urządzenia Fragment Analyzer dla jednej z bibliotek sekwencyjnych (roślina K3).

# Sekwencjonowanie genów pośpiechowości

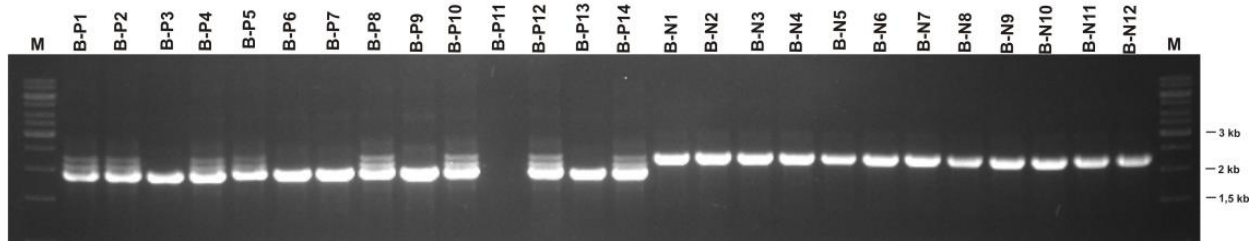


Obraz elektroforetyczny produktów PCR, uzyskanych ze starterami dla genu *BTC1*. A, B – odmiany buraka ćwikłowego, P1 i P2 – rośliny o fenotypie pośpiechowatym, N1 i N2 – rośliny o fenotypie normalnym. Nad profilami produktów reakcji zapisano kombinacje starterów użytych do PCR.

Do analiz wytypowano po dwie rośliny każdej odmiany (A i B) reprezentujące oba warianty fenotypowe: P i N. PCR przeprowadzono dla roślin: A-P1, A-P2, A-N1, A-N2, B-P1, B-P2, B-N1, B-N2. Wszystkie testowane pary starterów pozwoliły na amplifikację produktów o spodziewanej długości. Dla czterech kombinacji starterów: BTC1-5UTR-f1/BTC1-ex6-r, BTC1-5UTR-f1/BTC1-in6-r, BTC1-5UTR-f2/BTC1-ex6-r oraz BTC1-5UTR-f2/BTC1-in6-r uzyskane produkty wyraźnie segregowały u roślin P i N obu odmian. Dwie kombinacje starterów: BTC1-5UTR-f1/BTC1-ex6-r oraz BTC1-5UTR-f1/BTC1-in6-r przetestowano dla pełnego zestawu roślin z obu odmian.



Obraz elektroforetyczny produktów PCR, uzyskanych ze starterami BTC1-5UTR-f1/BTC1-ex6-r. A, B – odmiany buraka ćwikłowego, P – rośliny o fenotypie pośpiechawatym, N – rośliny o fenotypie normalnym. 1-14 – kolejne numery roślin.

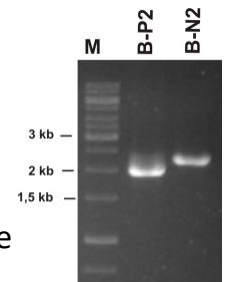


W wyniku reakcji PCR ze starterami BTC1-5UTR-f1/BTC1-ex6-r, u wszystkich roślin odmiany A oraz B wykazujących pośpiechowatość (P), amplifikowano produkt o wielkości ok. 1,8 kb. Dodatkowo u wszystkich roślin P odmiany A oraz ośmiu roślin P odmiany B (B-P1, B-P2, B-P4, B-P5, B-P8, B-P10, B-P12, B-P14) obserwowano dwa nieco dłuższe prążki słabo widoczne na żelu o wielkości ok. 2 kb i 2,2 kb. Z kolei u wszystkich roślin o fenotypie normalnym (N) widoczny był tylko jeden produkt o szacunkowej wielkości ok. 2,2 kb, zarówno u odmiany A jak i B. Wyjątkiem była roślina A-N2, dla której na żelu obserwowano 3 prążki typowe dla roślin pośpiechowatych oraz roślina B-P11, dla której nie uzyskano w ogóle produktów amplifikacji.

Podobny rozkład prążków obserwowano po zastosowaniu kombinacji starterów BTC1-5UTR-f1/BTC1-in6-r, przy czym najsilniejszy produkt u roślin o fenotypie pośpiechawatym (P) miał wielkość ok. 2 kb, a u roślin o fenotypie normalnym (N) ok. 2,3 kb.

Produkty amplifikacji uzyskane ze starterami BTC1-5UTR-f1/BTC1-in6-r dla odmiany B różnicujące rośliny o fenotypie pośpiechawatym i normalnych przeznaczono do sekwencjonowania. Produkty do sekwencjonowania pochodziły z roślin B-P2 i B-N2.

Sekwencjonowane produkty PCR.



```

391   400   410   420   430   440   450   460   470   480   490   500   510   520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
B-P2  CCCTGTTGGATCTCCTAAGGTTTGTCTGTAAGAGTGTGACTCAACTCGTCATATTGTTAGTGCTTTGCTACGGAAATGTAGCTATGAGGTTGATCTGTTTAAATCCCATATATGCATGTCT
B-N2  CCCTGTTGGATCTCCTAAGGTTTGTCTGTAAGAGTGTGACTCAACTCGTCATATTGTTAGTGCTTTGCTACGGAAATGTAGCTATGAGGTTGATCTGTTTAAATCCCATATATGCATGTCT
HQ709091 CCCTGTTGGATCTCCTAAGGTTTGTCTGTAAGAGTGTGACTCAACTCGTCATATTGTTAGTGCTTTGCTACGGAAATGTAGCTATGAGGTTGATCTGTTTAAATCCCATATATGCATGTCT
Consensus CCCTGTTGGATCTCCTAAGGTTTGTCTGTAAGAGTGTGACTCAACTCGTCATATTGTTAGTGCTTTGCTACGGAAATGTAGCTATGAGGTTGATCTGTTTAAATCCCATATATGCATGTCT

521   530   540   550   560   570   580   590   600   610   620   630   640   650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
B-P2  TGTCCTTATCACCCTACTTCARCAARATGATTAGAGAAATGTACTCCCTGTTCCAAARATATAGCAACACTTAGCCCTCCCGTAGACTTTA-----
B-N2  TGTCCTTATCACCCTACTTCARCAARATGATTAGAGAAATGTACTCCCTGTTCCAAARATATAGCAACACTTAGCCCTCCCGTAGACTTTAGGGAGCGTTTGGTTCATATTATGGTATGGGTTTGGAAAT
HQ709091 TGTCCTTATCACCCTACTTCARCAARATGATTAGAGAAATGTACTCCCTGTTCCAAARATATAGCAACACTTAGCCCTCCCGTAGACTTTAGGGAGCGTTTGGTTCATATTATGGTATGGGTTTGGAAAT
Consensus TGTCCTTATCACCCTACTTCARCAARATGATTAGAGAAATGTACTCCCTGTTCCAAARATATAGCAACACTTAGCCCTCCCGTAGACTTTAGGGAGCGTTTGGTTCATATTATGGTATGGGTTTGGAAAT

651   660   670   680   690   700   710   720   730   740   750   760   770   780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
B-P2  AGGAATGAARCCAAGGTGGTATGGGKTGGAACTTGATACTTAATACCTTGATTTGGTTTCATTAGGAATGAARAAATTTCTTTTATTTGATACCTAGAGGTAGGTTATGAGCCATACCCACCTCCCC
B-N2  AGGAATGAARCCAAGGTGGTATGGGKTGGAACTTGATACTTAATACCTTGATTTGGTTTCATTAGGAATGAARAAATTTCTTTTATTTGATACCTAGAGGTAGGTTATGAGCCATACCCACCTCCCC
HQ709091 AGGAATGAARCCAAGGTGGTATGGGKTGGAACTTGATACTTAATACCTTGATTTGGTTTCATTAGGAATGAARAAATTTCTTTTATTTGATACCTAGAGGTAGGTTATGAGCCATACCCACCTCCCC
Consensus aggaatgaaaccaaggtggtatgggkttggaacttgatacttaataacctgatttggtttcatttaggaatgaaaaaattcttttatttgataacctagaggttaaggtatgagccataccacacctcccc

781   790   800   810   820   830   840   850   860   870   880   890   900   910
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
B-P2  CCATGGGTTTCTAARACCCATACCTTATGGGTTTGAGGATGGGTTTAAARATTTAAARATAGTTAAACAACACTAGGTATGTGTTTGTTCATTCCAARCCATACCTCATACCTAARACTAGTGAAC
B-N2  CCATGGGTTTCTAARACCCATACCTTATGGGTTTGAGGATGGGTTTAAARATTTAAARATAGTTAAACAACACTAGGTATGTGTTTGTTCATTCCAARCCATACCTCATACCTAARACTAGTGAAC
HQ709091 CCATGGGTTTCTAARACCCATACCTTATGGGTTTGAGGATGGGTTTAAARATTTAAARATAGTTAAACAACACTAGGTATGTGTTTGTTCATTCCAARCCATACCTCATACCTAARACTAGTGAAC
Consensus ccatgggtttctaaaccataccttatgggtttgaggtatgggtttaaaraattaaaraatagttaaacaacactaggtatggtttgttcattccaarccatacctcatacctaaactagtgaaac

911   920   930   940   950   960   970   980   990   1000  1010  1020  1030  1040
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
B-P2  -----AGGATCTTGGGACAAAGGGAAATCCATTACTAGATCTGGTGACATTAACTACCTAGTTTACATCAGTTTCACCTAARCTCCTCGTTTAAAAAAGTAAAAAACCTGTTAGTCTGA
B-N2  CAARACCCCTTAAAGGATCTTGGGACAAAGGGAAATCCATTACTAGATCTGGTGACATTAACTACCTAGTTTACATCAGTTTCACCTAARCTCCTCGTTTAAAAAAGTAAAAAACCTGTTAGTCTGA
HQ709091 CAARACCCCTTAAAGGATCTTGGGACAAAGGGAAATCCATTACTAGATCTGGTGACATTAACTACCTAGTTTACATCAGTTTCACCTAARCTCCTCGTTTAAAAAAGTAAAAAACCTGTTAGTCTGA
Consensus caaacacccttaaggatcttgggacaaagggaaatccattactagatctggtgacattaaactacactagtttacatcagtttcaccttaarctcctcgtttaaaaaagtaaaaaacctgttagctgta

1041  1050  1060  1070  1080  1090  1100  1110  1120  1130  1140  1150  1160  1170
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
B-P2  GTAAGTTTACTAATTTTGTCTAARATTCACACATTATCTACATGCARGCCTTACTAGTACAACTCAACTCAACAAATATATGCATCCTATCTGTTCCAAATGAAACCRAAACTAATCTTTTCATAC
B-N2  GTAAGTTTACTAATTTTGTCTAARATTCACACATTATCTACATGCARGCCTTACTAGTACAACTCAACTCAACAAATATATGCATCCTATCTGTTCCAAATGAAACCRAAACTAATCTTTTCATAC
HQ709091 GTAAGTTTACTAATTTTGTCTAARATTCACACATTATCTACATGCARGCCTTACTAGTACAACTCAACTCAACAAATATATGCATCCTATCTGTTCCAAATGAAACCRAAACTAATCTTTTCATAC
Consensus GTAAGTTTACTAATTTTGTCTAARATTCACACATTATCTACATGCARGCCTTACTAGTACAACTCAACTCAACAAATATATGCATCCTATCTGTTCCAAATGAAACCRAAACTAATCTTTTCATAC

```

Porównanie sekwencji produktu PCR wygenerowanego przy użyciu pary starterów: BTC1-5UTR-f1/BTC1-in6-r dla roślin B-P2 i B-N2 oraz fragmentu sekwencji genu *BTC1* zamieszczonej w bazie NCBI Nucleotide (fragment uliniowienia).

Otrzymana po złożeniu sekwencja produktu B-P2 liczyła 2001 pz, natomiast sekwencja produktu B-N2 - 2314 pz. Różnica wynikała z insercji o długości 313 pz, znajdującej się wewnątrz sekwencjonowanego produktu PCR B-N2, od nukleotydu w pozycji 613. Porównanie otrzymanej sekwencji z sekwencją HQ709091 z bazy NCBI wykazało, że insercja ta odpowiada fragmentowi intronu trzeciego. Obie sekwencje (B-P2 i B-N2) wykazywały także polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) – pozycji takich zidentyfikowano 12 i były one rozproszone w całej sekwencji. Cztery spośród nich znajdowały się w obrębie sekwencji kodujących. W obrębie insercji produktu B-N2 zidentyfikowano także miejsce, w którym z jednakowym prawdopodobieństwem mógł być obecny nukleotyd typu G lub T, przy czym w sekwencji HQ709091 zamieszczonej w bazie NCBI znajduje się G.



# Wnioski

## W temacie badawczym 1 (Sekwencjonowanie transkryptomu w kontekście przywracania płodności przez gen *X (Rf1)*):

1. Otrzymane preparaty charakteryzowały się wystarczającą ilością i stężeniem RNA do konstrukcji bibliotek sekwencyjnych.
2. Preparaty posiadały bardzo wysokie parametry jakościowe:
  - średnia wartość parametru 260/280 wynosząca 2,1 wskazuje na brak obecności zanieczyszczeń DNA,
  - średnia wartość parametru RQN (ang. *RNA Quality Number*) wynosiła 9,2, co wskazuje na bardzo niski poziom degradacji cząsteczek RNA w badanych preparatach.
3. Wszystkie otrzymane biblioteki charakteryzowały się pożądanym profilem składowych fragmentów DNA i zostały zakwalifikowane do sekwencjonowania.

## W temacie badawczym 2 (Sekwencjonowanie genów pośpiechowatości):

1. Kombinacje starterów: BTC1-5UTR-f1/BTC1-ex6-r, BTC1-5UTR-f1/BTC1-in6-r, BTC1-5UTR-f2/BTC1-ex6-r oraz BTC1-5UTR-f2/BTC1-in6-r pozwalają na amplifikację fragmentu genu *BTC1*, różnicującego rośliny buraka ćwikłowego o fenotypie pośpiechowatym i normalnym.
2. Kombinacje starterów: BTC1-5UTR-f1/BTC1-ex6-r, BTC1-5UTR-f1/BTC1-in6-r, BTC1-5UTR-f2/BTC1-ex6-r oraz BTC1-5UTR-f2/BTC1-in6-r mogą być zatem wykorzystane do identyfikacji roślin buraka ćwikłowego ze skłonnością do pośpiechowatości, nawet we wczesnych etapach rozwoju roślin.
3. Różnica pomiędzy fenotypem pośpiechowatym i normalnym jest związana z obecnością w genie *BTC1* indelu o długości 313 pz zlokalizowanego w III intronie oraz kilku polimorfizmów pojedynczego nukleotydu.

*W roku 2021 (pierwszy rok realizacji projektu)  
nie planowano prezentacji doniesień konferencyjnych i publikacji*