

Zadanie nr 23:

Globalna analiza wariantów strukturalnych w genomach buraka oraz identyfikacja rejonów powiązanych z jednonasiennością i męską sterylnością

Okres realizacji: **72 miesiące (lata 2021-2026)**

Zespół wykonawców projektu:

Prof. dr hab. Dariusz Grzebelus – kierownik projektu; email: d.grzebelus@urk.edu.pl

Dr hab. Marek Szklarczyk, prof. URK

Dr hab. inż. Alicja Macko-Podgórn, prof. URK

Cele projektu w 2024 r.

W temacie badawczym 1 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego gen jednonasienności):

- charakterystyka wariantów strukturalnych (SV) w dystalnym rejonie chromosomu 4
- wskazanie genu lub genów kandydujących determinujących jednonasiennosc buraka

W temacie badawczym 2 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego geny restorerowe):

- określenie organizacji sekwencyjnej nowych wariantów allelu *X/Rf1*
- oczyszczenie białka rekombinantowego uzyskanego na bazie ekspresji otwartej ramki odczytu genu *X (Rf1)*

W temacie badawczym 3 (Opracowanie markerów molekularnych):

- opracowanie metod identyfikacji polimorfizmów (SV i SNP) w dystalnym rejonie chromosomu 4 różnicujących formy jedno- i wielonasienne
- wyprowadzenie licznej populacji segregującej pod względem jedno/wielonasiennosci
- opracowanie markerów SCAR i CAPS do wnioskowania o składzie allelicznym locus *X/x (Rf1/rf1)* u buraka cukrowego
- identyfikacja markerów SCAR do identyfikacji plazmotypów u buraka pastewnego

Wszystkie założone cele zostały zrealizowane

Materiały i metody

W temacie badawczym 1 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego gen jednonasienności):

Metody

- Bioinformatyczna analiza odczytów sekwencyjnych Illumina, sekwencjonowanie ONT (technologia długich odczytów), przyrównanie do genomu referencyjnego

W temacie badawczym 2 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego geny restorerowe):

Materiały roślinne/bakterie

- rośliny męskopłodne z populacji buraka cukrowego 3S 11 23 oraz 3S 11 50
- *Escherichia coli* ER2523 (New England Biolabs)

Metody

- sekwencjonowanie DNA PacBio Revio
- oczyszczanie białka rekombinowanego z użyciem Anti-Maltose Binding Protein Magnetic Beads (New England Biolabs)

W temacie badawczym 3 (Opracowanie markerów molekularnych):

Materiały roślinne

- 80 jedno- i wielonasiennych roślin buraka cukrowego o różnym pochodzeniu
- segregujące populacje burak cukrowego MSCr 138/17/62 i IL 21 155
- 3 pary linii MS i O buraka pastewnego

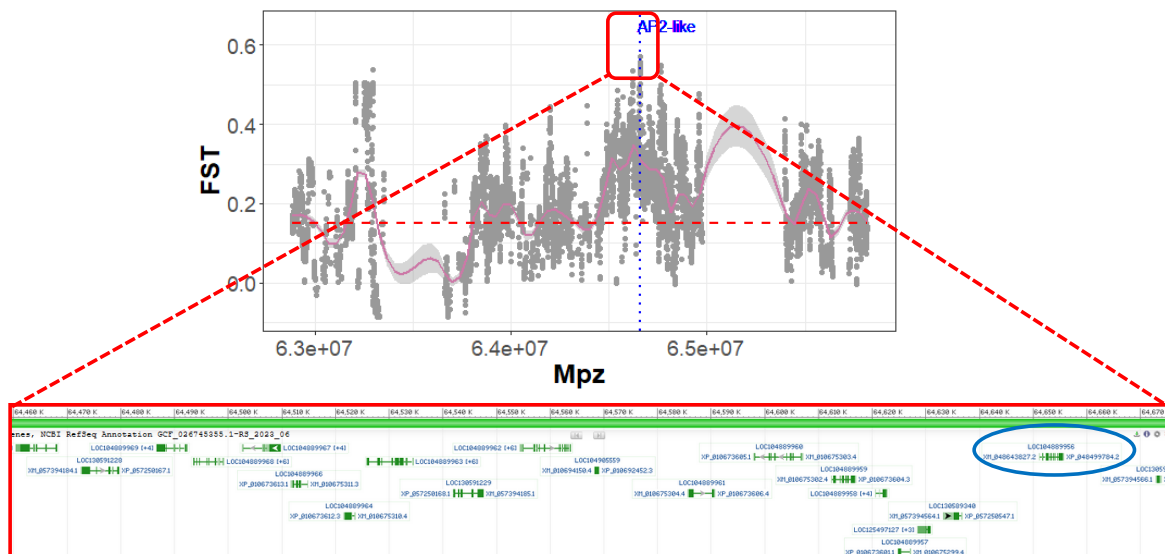
Metody

- TaqMan (genotypowanie SNP); SCAR (genotypowanie indeli)
- Genotypowanie markerami SCAR i CAPS

Charakterystyka wariantów strukturalnych (SV) w dystalnym rejonie chromosomu 4

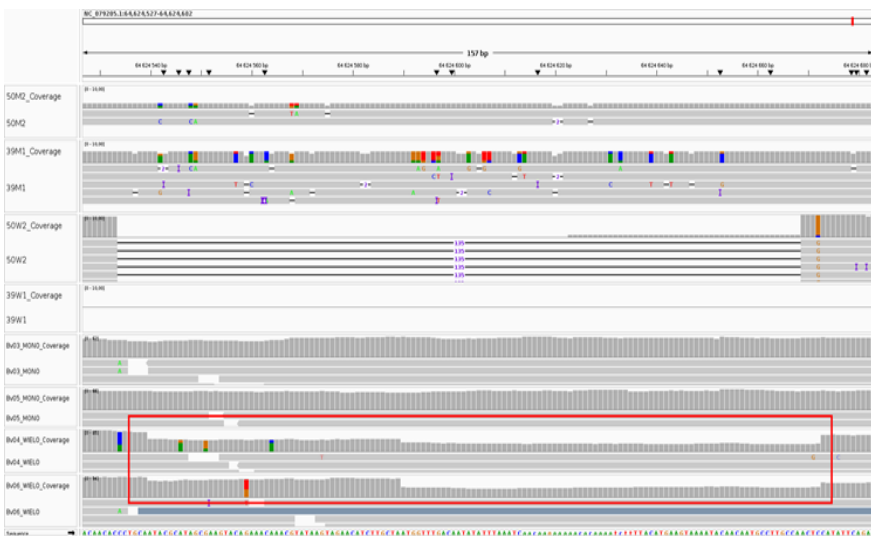
Średnie pokrycie rejonu odczytami ONT wynosiło 5,98x, 3,54x, 3,13x i 0,94x, odpowiednio dla genomów roślin buraka cukrowego 50M2, 50W2, 39M1, 39W1 (M – jednozasienne; W – wielozasienne). Krótkie odczyty uzyskane w technologii Illuminy oraz długie odczyty ONT zmapowano do rejonu chromosomu 4 obejmującego determinantę nasienneści. Przykładowy wynik mapowania wskazujący na obecność wariantu strukturalnego (indela) różnicującego formy jedno- i wielozasienne przedstawiono na rycinie.

Wskazanie genu lub genów kandydujących determinujących jednonasienneść buraka



Powyżej: rozkład wartości zróżnicowania populacji (Fst) roślin jedno- i wielozasienne w rejonie powiązany z nasienneścią na chromosomie 4; poniżej: lokalizacja genów w tym rejonie, gen *AP2-like ERF/PLT2* zaznaczono niebieską elipsą

Rejon chromosomu 4 zlokalizowany w pozycji 64458401-64675800 charakteryzował się najwyższą wartością Fst i zawierał 20 genów. Analiza ich funkcji pozwoliła wytypować gen kodujący czynnik transkrypcyjny AP2-like ERF/PLT2 (LOC104889956) z rodziny MADS-box jako prawdopodobny gen kandydujący



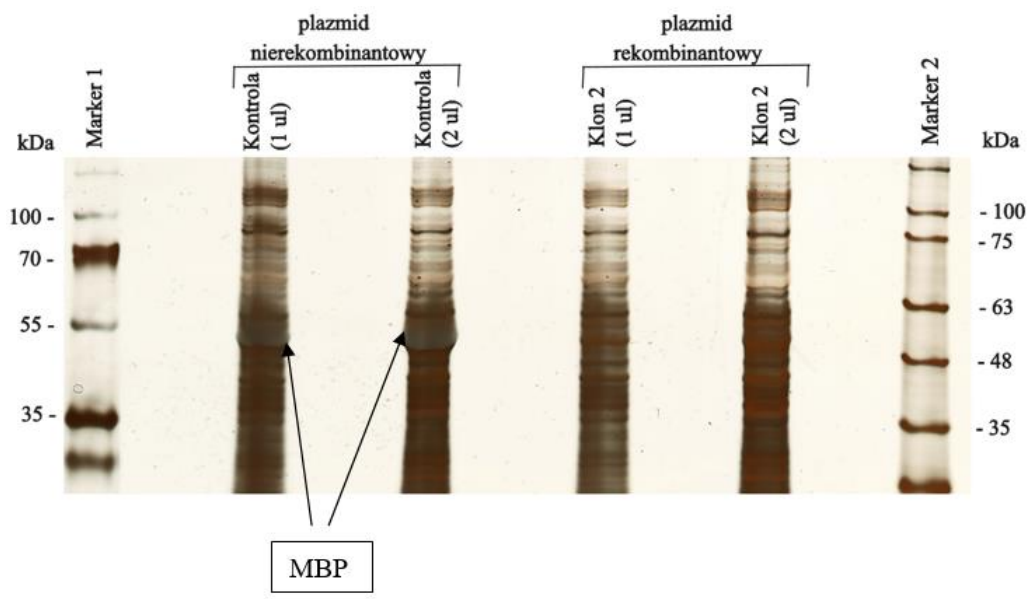
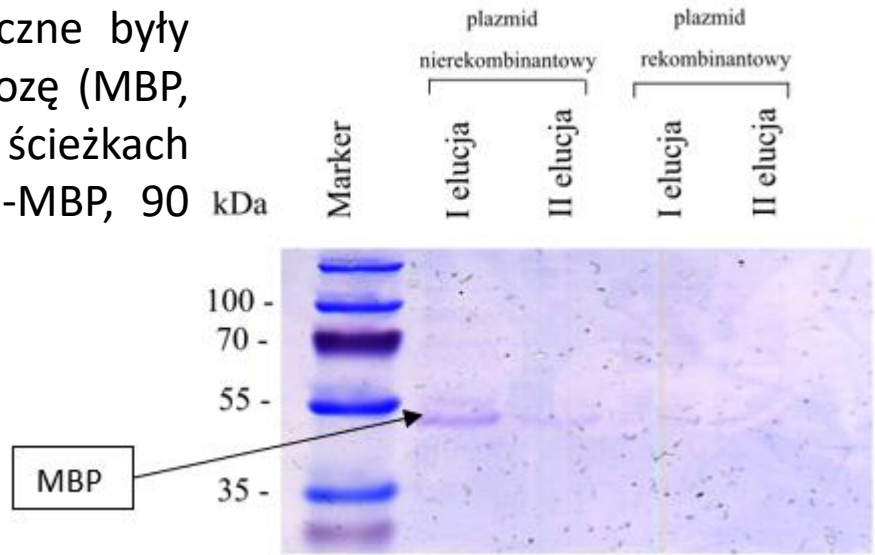
Lokalizacja delekcji DEL00286304 wykorzystanej do opracowania markera SCAR-J (w temacie badawczym 3) w oparciu o krótkie odczyty (Illumina) i długie odczyty (ONT)

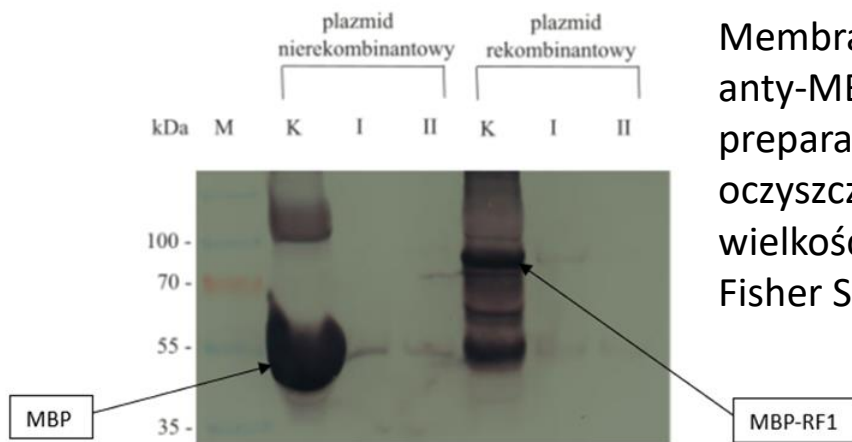
Produkcja białka RF1-MBP

Detekcję przeprowadzono najpierw dla preparatów uzyskanych po oczyszczeniu przez powinowactwo. Po elektroforezie SDS-PAGE żel poliakrylamidowy barwiono błękitem kumazyny oraz srebrno. W żelu widoczne były prążki, które odpowiadały białku wiążącemu maltozę (MBP, 45 kDa). Nie udało się zobaczyć prążków ścieżkach odpowiadających białku rekombinantowemu (RF1-MBP, 90 kDa).

Żel poliakrylamidowy po oczyszczeniu białka za pomocą powinowactwa – barwienie błękitem kumazyny. Marker – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Żel poliakrylamidowy z lizatami bakteryjnymi – barwienie srebrno. Marker 1 – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), Marker 2 – Perfect Tricolor Protein Ladder (EurX).

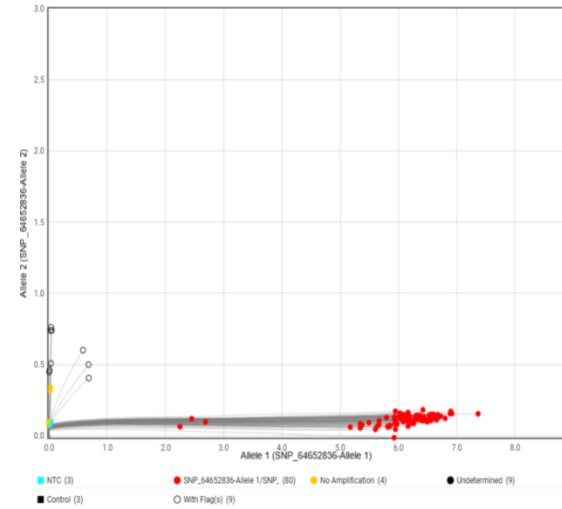
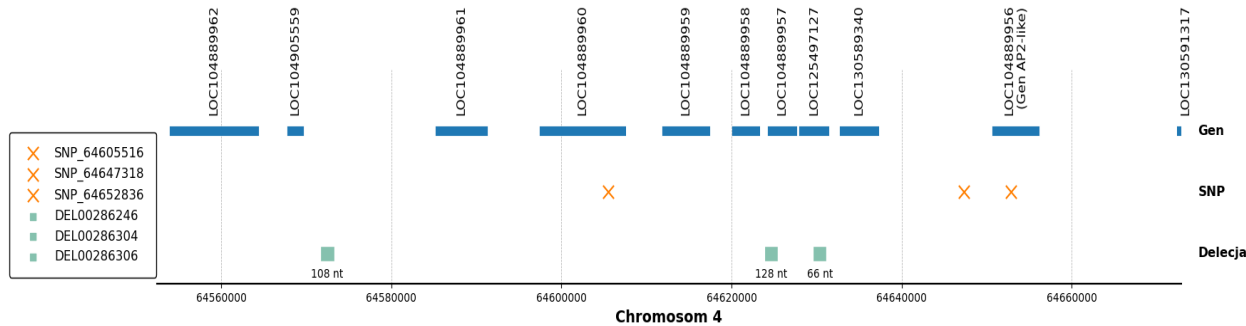




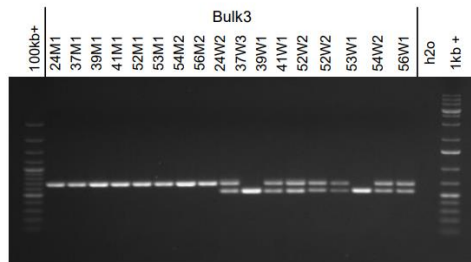
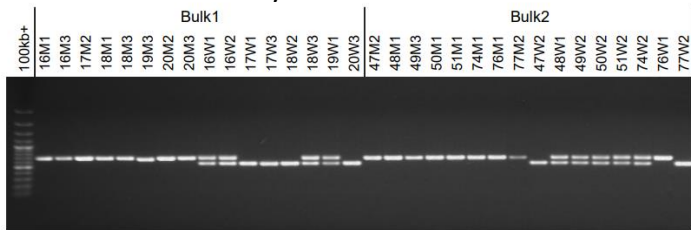
Membrana po detekcji sygnału przy użyciu mysich przeciwciał anty-MBP (NEB, USA). Analizowano lizaty bakteryjne i preparaty po oczyszczaniu przez powinowactwo. K – przed oczyszczaniem, I i II – odpowiednio I i II elucja. M – marker wielkości PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Do weryfikacji obecności białka rekombinantowego w preparatach przed oczyszczaniem wykorzystano też immunoblotting. W bakteriach rekombinantowych wykryto zarówno białko RF1-MBP (90 kDa) jak i produkty jego degradacji (o niższej masie cząsteczkowej). W bakteriach nierekombinantowych wykryto białko MBP (45 kDa) – uzyskany sygnał wskazuje, iż produkcja tego białka jest o wiele wydajniejsza od produkcji RF1-MBP.

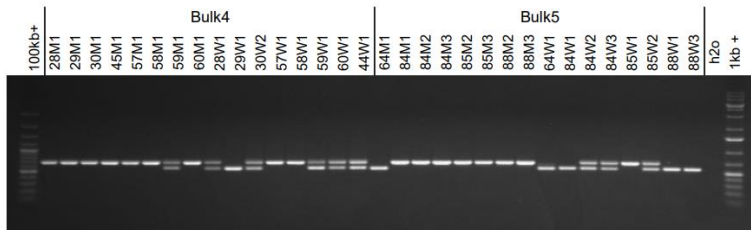
Opracowanie metod identyfikacji polimorfizmów (SV i SNP) w dystalnym rejonie chromosomu 4 różnicujących formy jedno- i wielonasienne



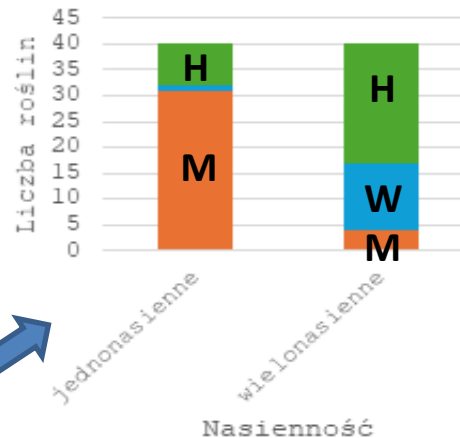
Lokalizacja polimorfizmów SNP i indeli w rejonie chromosomu 4 buraka cukrowego powiązanego z nasiennością – wskazane polimorfizmy zostały wykorzystane do opracowania markerów molekularnych



Profile elektroforetyczne 80 roślin buraka cukrowego dla markera SCAR-J



Spośród trzech markerów identyfikujących indele, SCAR-J ujawnił polimorfizm, który w dużej różnicował formy jedno- (M) i wielonasienne (W lub H-heterozygoty) z precyzją 90-95%



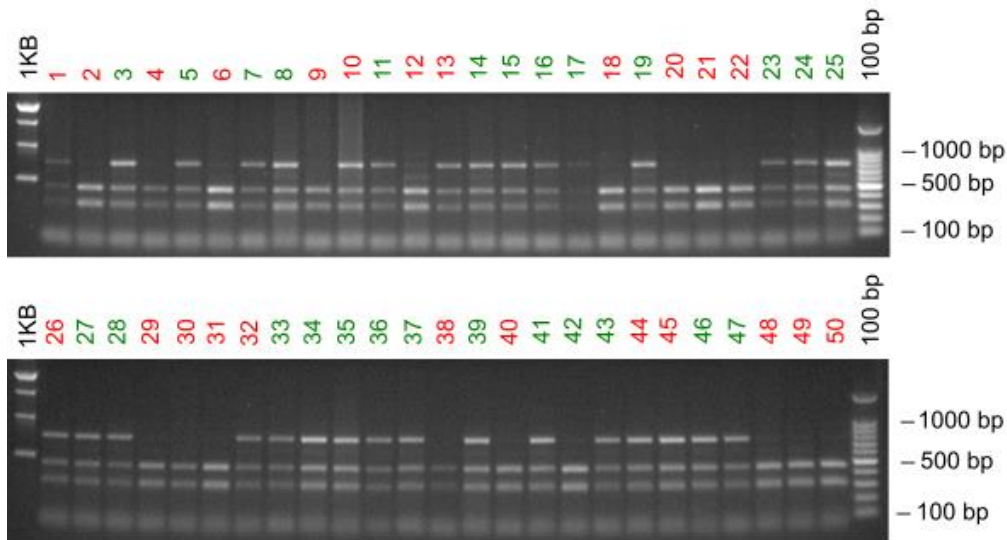
Przykładowy wynik genotypowania SNP 80 roślin na platformie TaqMan: wykres punktowy dyskryminacji allelicznej dla SNP_64652836. Punkty na wykresie oznaczają: czerwony – homozygoty dla allelu referencyjnego, żółty – brak amplifikacji, czarny – nieokreślone genotypy, oraz niebieski – kontrola negatywna.

Genotypowanie SNP umożliwiło jedynie identyfikację obecności alleli referencyjnych, nie uzyskano sygnałów dla alleli alternatywnych

Identyfikacja markerów dla restorera *X/Rf1* u buraka cukrowego

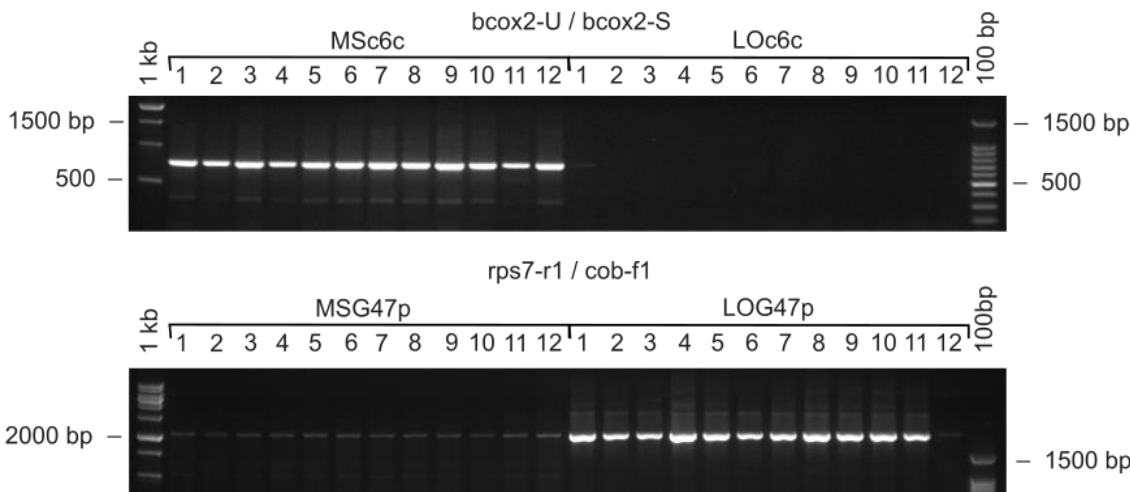
W obydwu populacjach zidentyfikowano po trzy markery z chromosomu 3 wykazujące sprzężenie z cechą przywracania płodności.

Kosegregacja z fenotypem zawierała się w zakresie 60,3 – 88,3%.



Obraz markera 3-363 uzyskany z roślin z populacji MSCr 138/17/62.

Identyfikacja markerów dla plazmotypu u buraka pastewnego



Wszystkie zastosowane markery jakościowo bądź ilościowo różnicowały linie MS i O. Wyniki genotypowania wskazują na sporadyczne występowanie roślin z cytoplazmą S w obrębie linii dopełniających (linii O).

Obraz markerów *bcox2-U / bcox2-S* oraz *rps7-r1 / cob-f1* dla linii MS i O buraka pastewnego.

W temacie badawczym 1 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego gen jednonasienności):

1. Gen *AP2-like ERF/PLT2* kodujący czynnik transkrypcyjny z rodziny MADS-box jest potencjalnym genem kandydującym warunkującym cechę nasienności u buraka cukrowego.
2. Sekwencjonowanie na platformie ONT umożliwiające uzyskanie długich odczytów pozwala na efektywną identyfikację fizycznej organizacji rejonu genomu buraka cukrowego determinującego cechę nasienności.

W temacie badawczym 2 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego geny restorerowe):

1. Białko rekombinantowe RF1-MBP jest produkowane przez bakterie z wielokrotnie mniejszą wydajnością od białka MBP.
2. Niski poziom akumulacji białka RF1-MBP nie pozwolił na uzyskanie jego czystego preparatu.

W temacie badawczym 3 (Opracowanie markerów molekularnych):

1. Markery TaqMan® umożliwiły jedynie identyfikację allelu referencyjnego, konieczne będzie zaprojektowanie nowych starterów po identyfikacji wariantów w oparciu o wyniki sekwencjonowania ONT.
2. Jeden z trzech markerów SCAR (SCAR-J) wykazywał wysoki poziom kosegregacji z cechą nasienności, wynoszący 90-95%. Obecność roślin odbiegających od typu może wskazywać na błąd fenotypowania lub rozerwanie sprzężenia pomiędzy genetyczną determinantą jednonasienności a polimorfizmem diagnostycznym.
3. W obydwu analizowanych populacjach buraka cukrowego cecha przywracania płodności kosegregowała z markerami z chromosomu 3. Dla populacji IL 21 155 obserwowane wartości tej kosegregacji są zaniżone, co wynika z faktu, iż populację tą cechuje nadreprezentacja roślin męskosterylnych (oczekiwano segregacji 1 : 1).
4. W kolekcji linii buraka pastewnego wszystkie testowane markery mitochondrialnego DNA wykazywały korelację w typem cytoplazmy. Większość obserwowanych polimorfizmów miała charakter ilościowy. Najbardziej czytelne rozróżnienie roślin S- i N-plazmatycznych uzyskano przy użyciu markera bazującego na sekwencji genu *cox2*.

6. Miernik zadania – stopień realizacji

l.p.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Liczba bibliotek odczytów short-read (Illumina) poddanych analizie	20	20	1,00
1.2	Liczba genomów sekwencjonowanych metodą ONT	4	4	1,00
temat badawczy 2				
2.1	Liczba sekwencjonowanych bibliotek	2	2	1,00
2.2	Liczba klonów bakteryjnych użytych do oczyszczania białka rekombinantowego	3	3	1,00
temat badawczy 3				
3.1	Liczba roślin buraka genotypowanych w kontekście jednonasienności	80	80	1,00
3.2	Liczba populacji buraka cukrowego genotypowanych w kontekście restorerów	2	2	1,00
3.3	Liczba linii buraka pastewnego genotypowanych w kontekście CMS	6	6	1,00
	Liczba testowanych markerów dla locus <i>X/x (Rf1/rf1)</i>	10	10	1,00
	Liczba testowanych loci	4	4	1,00
ŚREDNIA				1,00
% REALIZACJI ZADANIA				100%

Wykaz publikacji 2024:Doniesienia konferencyjne:

Prezentacja ustna: Skrabucha M., Szewczyk M., Macko-Podgórni A., Grzebelus D. 2024. Elucidating the molecular basis for monogermity in sugar beet. EUROBIOTECH 2024, 27-28 czerwca 2024, Kraków

Poster: Szklarczyk M., Wesołowski W., Cieplak E., Domnicz B. 2024. New aspects of fertility restoration in beets. 13th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB 2024), 26-30 maja 2024 r., Saint-Malo, Francja