

Zadanie nr 38:

Analiza genetycznej kontroli cechy CMS u marchwi i cebuli oraz cechy samozgodności u kapusty

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

Zespół wykonawców projektu:

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

Dr inż. Wojciech Wesołowski

Dr inż. Magdalena Simlat, prof. URK

Dr hab. Stefan Stojalowski, prof. ZUT

Cele projektu w 2021 r.

W temacie badawczym 1 (Sekwencjonowanie wariantów allelicznych S-locus kapusty):

- ustalenie sekwencji S-haplotypów (alleli S-locus) występujących w populacjach segregujących pod względem cechy samozgodności.

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania S-locus kapusty):

- wskazanie różnic pomiędzy sekwencjami S-haplotypów warunkujących cechy samozgodności i samoniezgodności;
- identyfikacja polimorfizmów DNA, które mogą skutkować upośledzeniem samoniezgodności (i przez to samozgodnością).

Cele zostały zrealizowane.

Materiały i metody

W temacie badawczym 1 (Sekwencjonowanie wariantów allelicznych S-locus kapusty):

Materiały roślinne

- Analizowane rośliny pochodziły z populacji otrzymanych poprzez krzyżowanie samoniezgodnych i samozgodnych roślin kapusty głowiastej białej (*Brassica oleracea* gr. *capitata*): 651 – stanowiącej pokolenie F2 oraz I1 stanowiącej pokolenie BC1 (do formy samozgodnej). Liście wybranych roślin z tej populacji zostały wykorzystane do izolacji DNA.

Metody

- Izolacja DNA: mini-preparatyka bazująca na ekstrakcji organicznej, oczyszczanie przy użyciu kolumn z wkładem krzemionkowym (adsorpcja).
- Amplifikacja DNA w wariacie long PCR ze starterami zaprojektowanymi na bazie sekwencji kodujących S-locus.
- Sekwencjonowanie uzyskanych produktów long PCR u zewnętrznego usługodawcy.

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania S-locus kapusty):

Materiały roślinne

- Analizie poddano sekwencje uzyskane z materiałów roślinnych użytych w temacie badawczym 1.

Metody

- Program MultAlin – ułiniowanie sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych.
- Program Translate z pakietu Sequence Manipulation Suite v. 2 – wirtualna translacja.

Wyniki

Sekwencjonowanie wariantów allelicznych S-locus kapusty

Gen *SRK* (kinazy receptorowej S-locus)

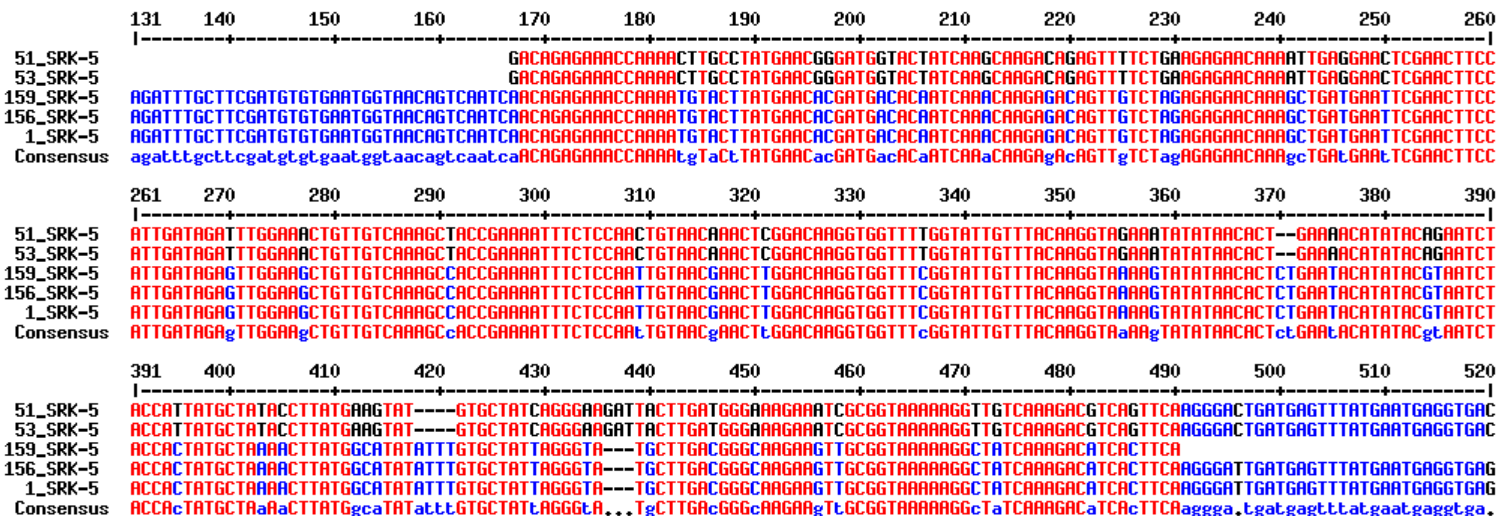
Zidentyfikowane sekwencje z homologią do części 5' genu *SRK* miały długość od 409 do 610 nt. W ich obrębie odnaleziono we fragmentach lub w całości: egzon 2, intron 2, egzon 3, intron 3, egzon 4, intron 4 oraz egzon 5.

> 51_SRK-5'

```
gacagagaaaccaaacttgccctatgaacgggtaggtactatcaagcaagacagagttttct
gaagagaacaaaattgaggaactcgaacttccattgatagatttggaactgttgtaaagc
taccgaaaatttctccaactgtaacaaactcggacaagggtggttttggtattgtttacaagg
tagaaatataataactgaaaacataacagaatctaccattatgctataccttatgaagta
tgtgctatcaggggaagattacttgatggaaagaaatcgcggtaaaaagggtgtcaaaagacg
tcagttcaagggactgatgagtttatgaatgaggtgacattaatcgcgaggcttcagcatat
aaacctgttcaaaattattggctgttgcatgaggcagacragaagatgctgatataatgagt
atttggaaaatttaagcctcgattcttttctcttcgggttagagcttcaattcttttaaaagtt
atgtacaacagttaaatgctcgctagaaataagctaactctgatttgatgtgattgatttgta
ggaaaaactcgaagggtctaagctaaattggaaggagagattcgacattacca
```

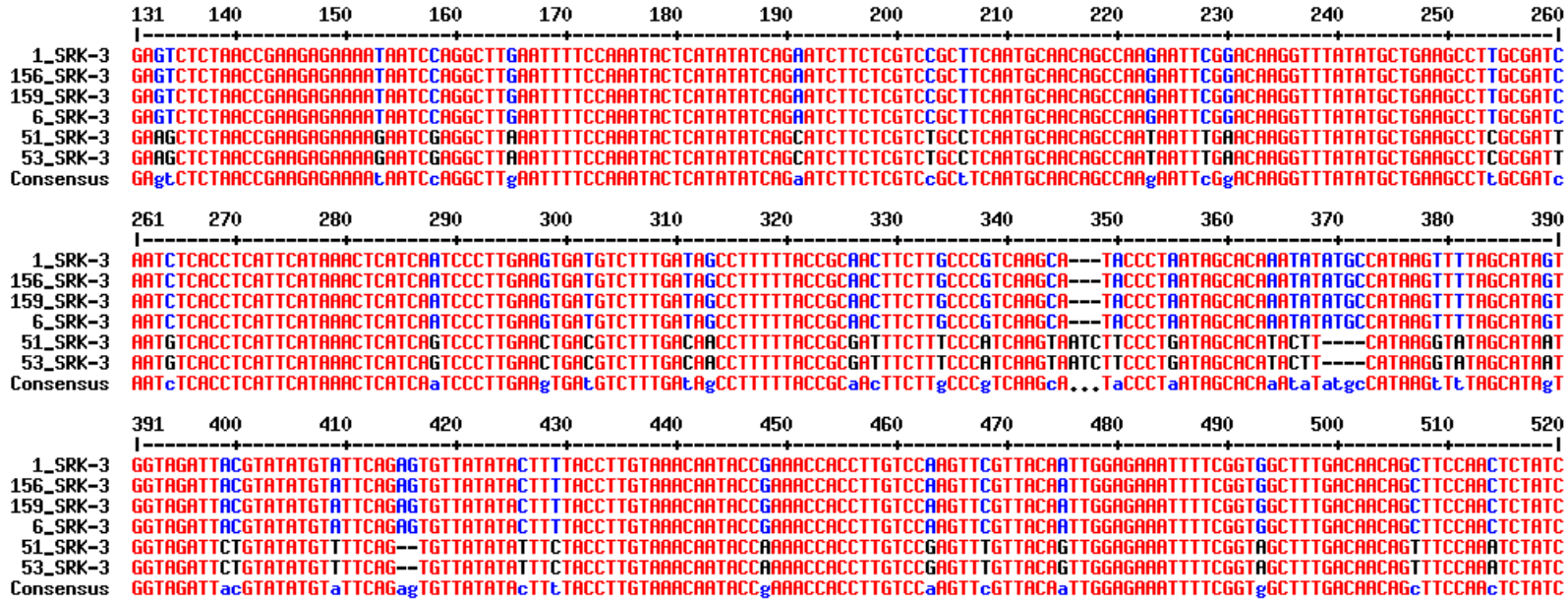
Sekwencja z rejonu 5' genu *SRK* rośliny samozgodnej z populacji 651 (51). Cieniowaniem zaznaczono kolejne egzony – od 3 do 5.

Uliniowanie sekwencji z rejonu 5' genu *SRK* otrzymanych dla roślin samoniezgodnych z populacji 651 (51 i 53) i populacji I1 (156 i 159) oraz dla rośliny samozgodnej z populacji 651 (1).



Uliniowanie otrzymanych sekwencji z rejonu 5' genu *SRK* wykazało, iż reprezentują one dwa typy. Pierwszy z nich wystąpił u roślin samoniezgodnych z populacji 651 i wykazywał najwyższą homologię do genu *SRK* z haplotypu S-3 *Brassica oleracea* (rekord sekwencyjny X79432.1). Drugi wystąpił u roślin samoniezgodnych z populacji I1 oraz u roślin samozgodnych z populacji 651 – najwyższą homologię wykazywał do genu *SRK* z haplotypu S-45 *B. oleracea* (JX416333.1).

Podobne zależności obserwowano dla sekwencji z końca 3' genu *SRK*.



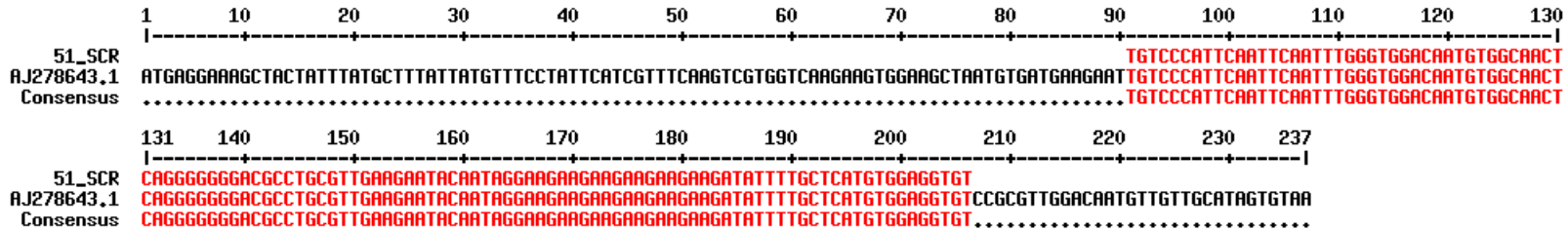
Uliniowanie sekwencji z rejonu 3' genu *SRK* otrzymanych dla roślin samoniezgodnych z populacji 651 (51 i 53) i populacji I1 (156 i 159) oraz dla roślin samozgodnych z populacji 651 (1 i 6).

Gen *SLG* (glikoproteiny *S*-locus)

Zidentyfikowane sekwencje o homologii z genem *SLG* w wielu pozycjach wykazywały niejednoznaczności w odczycie nukleotydów. Przeszukiwanie baz danych przy zastosowaniu fragmentów sekwencji o najlepszej jakości wykazało, iż rośliny samozgodne z populacji I1 posiadają wariant tego genu charakterystyczny dla haplotypu S-2. Segmenty *SLG* z tych roślin są bardzo podobne do swoich odpowiedników z rekordów sekwencyjnych AJ306575.1, AJ306574.1 oraz AJ306573.1. Dane te wskazują, iż samozgodny S-haplotyp roślin z populacji I1 mógł powstać poprzez mutację haplotypu S-2.

Gen *SCR/SP1* (bogatego w cysteinę białka *S*-locus)

W roślinach samoniezdnych z populacji 651 zidentyfikowano fragment DNA mający długość 116 nt i wykazujący identyczność z analogicznym odcinkiem genu *SCR* z haplotypu S-3 *Brassica oleracea* (znalezionym w rekordzie sekwencyjnym AJ278643.1). Wynik ten potwierdził wynik analizy sekwencji genu *SRK* wskazujący, iż rośliny samoniezdne z populacji 651 posiadają haplotyp S-3.



Uliniowanie sekwencji fragmentu genu *SCR* otrzymanej dla rośliny samoniezdnej z populacji 651 (51) i sekwencji tego genu z bazy danych (AJ278643.1).

Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania S-locus kapusty

Wirtualna translacja sekwencji z końca 5' genu *SRK* potwierdziła homologie obserwowane na poziomie DNA. Sekwencje aminokwasowe otrzymane na bazie sekwencji nukleotydowych typu pierwszego (z roślin samoniezgodnych z populacji 651) były niemal identyczne z sekwencją SRK haplotypu S-3 *Brassica oleracea* (X79432.1). Z kolei sekwencje białkowe otrzymane na bazie sekwencji DNA typu drugiego (z roślin samoniezgodnych z populacji I1 oraz samozgodnych z populacji 651) były niemal identyczne z sekwencją SRK haplotypu S-45 *B. oleracea* (AFR53387.1) oraz z odpowiednim rejonem białka SRK u *B. cretica* (KAF3525769.1).

	1	10	20	30	40	50	60																																																					
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----																																																											
51_SRK_ex3	Q	R	N	Q	N	L	P	M	N	G	H	V	L	S	S	K	T	E	F	S	E	E	N	K	I	E	E	L	E	L	P	L	I	D	L	E	T	V	V	K	A	T	E	N	F	S	N	C	N	K	L	G	Q	G	G	F	G	I	V	Y
159_SRK_ex3	N	Q	V	L	M	N	T	H	T	Q	S	N	K	R	Q	L	S	R	E	N	K	A	D	E	F	E	L	P	L	I	E	L	E	R	V	V	K	A	T	E	N	F	S	N	C	N	E	L	G	Q	G	G	F	G	I	V	Y			
Consensus	..	N	Q	N	L	M	N	g	H	t	q	S	n	K	r	#	L	S	r	E	N	K	a	#	E	I	E	L	P	L	I	#	L	E	a	V	V	K	A	T	E	N	F	S	N	C	N	e	L	G	Q	G	G	F	G	I	V	Y		

Uliniowanie sekwencji egzonu 3 białka SRK otrzymanych poprzez wirtualną translację dla rośliny samoniezgodnej z populacji 651 (51) i rośliny samoniezgodnej z populacji I1 (159).

Zgodnie z oczekiwaniami wirtualna translacja znalezionej sekwencji genu *SCR* (w roślinach samoniezgodnych z populacji 651) wykazała pełną zgodność jej sekwencji aminokwasowej z analogicznym regionem białka SCR z haplotypu S-3 *B. oleracea* (AJ278643.1). Sekwencje te wykazywały także podobieństwo do białka SCR z *B. rapa* (AB370010.1).

	1	10	20	30	40	50	60	70	79																																																																				
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----																																																																												
51_SCR							C	P	I	Q	F	N	L	G	G	Q	C	G	N	S	G	G	D	A	C	V	E	E	Y	N	R	K	K	K	K	K	I	F	C	S	C	G	G																																		
AJ278643.1	M	R	K	A	T	I	Y	A	L	L	C	F	L	I	V	S	S	R	G	Q	E	V	E	A	N	V	M	K	N	C	P	I	Q	F	N	L	G	G	Q	C	G	N	S	G	G	D	A	C	V	E	E	Y	N	R	K	K	K	K	K	I	F	C	S	C	G	G	V	R	-	V	G	Q	C	C	C	I	V
AB370010.1							G	Q	E	E	K	A	N	V	L	K	K	C	D	-	S	F	L	G	G	L	C	G	K	L	G	V	S	A	C	V	S	S	Y	N	R	K	K	K	S	D	--	C	S	C	G	N	V	D	G	V	G	T	C	C	C																
Consensus	g	q	e	..	a	n	v	.	k	.	C	p	i	q	f	n	l	g	g	q	c	g	n	s	g	g	d	a	c	v	e	e	y	n	r	k	k	k	k	k	i	f	c	s	c	g	g	v	..	v	g	.c	c	c	..																					

Uliniowanie sekwencji białka SCR otrzymanych poprzez wirtualną translację odpowiednich sekwencji nukleotydowych: z rośliny samoniezgodnej z populacji 651 (51) oraz z rekordów sekwencyjnych AJ278643.1 (AJ278643.1) oraz AB370010.1 (*B. rapa*).

Sekwencjonowanie części 5' genu *SRK* z roślin samozgodnych oraz samoniezgodnych wykazało obecność łącznie 43 polimorfizmów, spośród których najliczniejszą pulę stanowiły polimorfizmy typu SNP (33). Poza polimorfizmami typu pojedynczych nukleotydów zidentyfikowano siedem polimorfizmów typu MNP oraz trzy indela.

W toku sekwencjonowania części 3' genu *SRK* z roślin samozgodnych oraz samoniezgodnych zidentyfikowano łącznie 76 polimorfizmów. Najliczniejszą grupę stanowiły polimorfizmy typu SNP (62). W analizowanych sekwencjach zidentyfikowano również dziewięć polimorfizmów typu MNP oraz pięć indeli.

	358	370-371	375	384-385	395	403	405	412	418-421	429	434	436-438	440	446	450	456	458	471	473	482	486
1	G	CT	T	GT	C	A	A	GCA	ATTT	T	T	-	G	C	C	G	T	C	A	A	C
156	G	CT	T	GT	C	A	A	GCA	ATTT	T	T	-	G	C	C	G	T	C	A	A	C
51	A	-	A	AG	T	T	C	AAG	-	C	A	GAT	A	T	A	A	C	T	G	G	G

← Pozycje sek. konsensusowej

↑ Rośliny reprezentatywne dla wyróżnionych typów

Polimorfizmy sekwencyjne różnicujące części 5' genu *SRK* z roślin samoniezgodnych z populacji 651 (51) i I1 (156) oraz z roślin samozgodnych z populacji 651 (1) (fragment tabeli).

	472	493	507	514	534	538	542-543	554-555	559	564	566	572	578	581	587-588	596	598	600-601	617	622	629	634	637	641
1	A	G	C	C	A	A	GC	CT	C	G	C	T	T	GT	GT	A	T	CA	T	G	A	T	C	T
156	A	G	C	C	A	A	GC	CT	C	G	C	T	T	GT	GT	A	T	CA	T	G	A	T	C	T
51	G	A	T	A	G	C	AT	TC	A	C	G	C	A	AC	CC	G	C	AG	C	C	T	C	G	C

← Pozycje sek. konsensusowej

↑ Rośliny reprezentatywne dla wyróżnionych typów

Polimorfizmy sekwencyjne różnicujące części 3' genu *SRK* z roślin samoniezgodnych z populacji 651 (51) i I1 (156) oraz z roślin samozgodnych z populacji 651 (1) (fragment tabeli).

Wnioski

W temacie badawczym 1 (Sekwencjonowanie wariantów allelicznych S-locus kapusty):

1. Rośliny samoniezgodne z populacji 651 cechuje haplotyp S-3. Świadczą o tym analizy sekwencyjne genów *SRK* i *SCR*.
2. Rośliny samoniezgodne z populacji I1 cechuje haplotyp S-45. Wskazuje na to typ sekwencji *SRK* znaleziony u tych roślin.
3. Samozgodny S-haplotyp roślin z populacji 651 powstał prawdopodobnie poprzez mutację haplotypu S-45. Wskazuje na to typ sekwencji *SRK* znaleziony u tych roślin.

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania S-locus kapusty):

1. Analiza uzyskanych *in silico* sekwencji aminokwasowych potwierdziła dla badanych roślin wskazania S-haplotypów oparte na analizie sekwencji nukleotydowych.
2. W obrębie sekwencji *SRK* zidentyfikowano 119 polimorfizmów sekwencyjnych, które najprawdopodobniej decydują o zróżnicowaniu S-haplotypów na S-3 i S-45.
3. W obrębie sekwencji uzyskanych dla roślin samozgodnych z populacji 651 nie znaleziono sekwencji *SLG*, z kolei w sekwencjach roślin samozgodnych z populacji I1 nie znaleziono sekwencji *SRK*. Wskazuje to, iż dysfunkcja tych genów odpowiada za samozgodność u roślin z wymienionych populacji.

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