

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

Dr inż. Wojciech Wesołowski

Dr hab. Stefan Stojałowski, prof. ZUT

Dr hab. Hieronim Golczyk, prof. KUL

Cele projektu w 2022 r.

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

- funkcjonalna charakterystyka genów jądrowych, których poziom transkrypcji różnicuje rośliny męskosterylne i rośliny z przywróconą płodnością¹⁾
- określenie poziomu transkrypcji genów mitochondrialnych i plastydowych u roślin męskosterylnych i roślin z płodnością przywróconą przez gen *X/Rf1*¹⁾

W temacie badawczym 2 (Sekwencjonowanie genów pośpiechowatości):

- ustalenie sekwencji występujących u buraka ćwikłowego alleli genów *B2/BvBBX19* oraz *BR1/BvCPSF73*

W temacie badawczym 3 (Sekwencjonowanie wariantów allelicznych locus restorera *X (Rf1)*):

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

Cele zostały zrealizowane.

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

- Analizy bioinformatyczne: Blast2GO (Conesa i in. 2005), STAR (Dobin i in. 2013), skrypt autorski (Gierski, niepublikowane).

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

- PCR ze starterami zaprojektowanymi na bazie genów *B2/BvBBX19* oraz *BR1/BvCPSF73* buraka cukrowego.
- Sekwencjonowanie produktów PCR w serwisie zewnętrznym (Genomed, Warszawa).

W temacie badawczym 3 (Sekwencjonowanie wariantów allelicznych locus restorera *X (Rf1)*):

Materiały roślinne

- Męskosterylne i męskopłodne rośliny populacji 582.

Metody

- Sekwencjonowanie DNA trzeciej generacji (platforma PacBio, system Sequel II) w serwisie zewnętrznym (Novogene, Cambridge, UK).

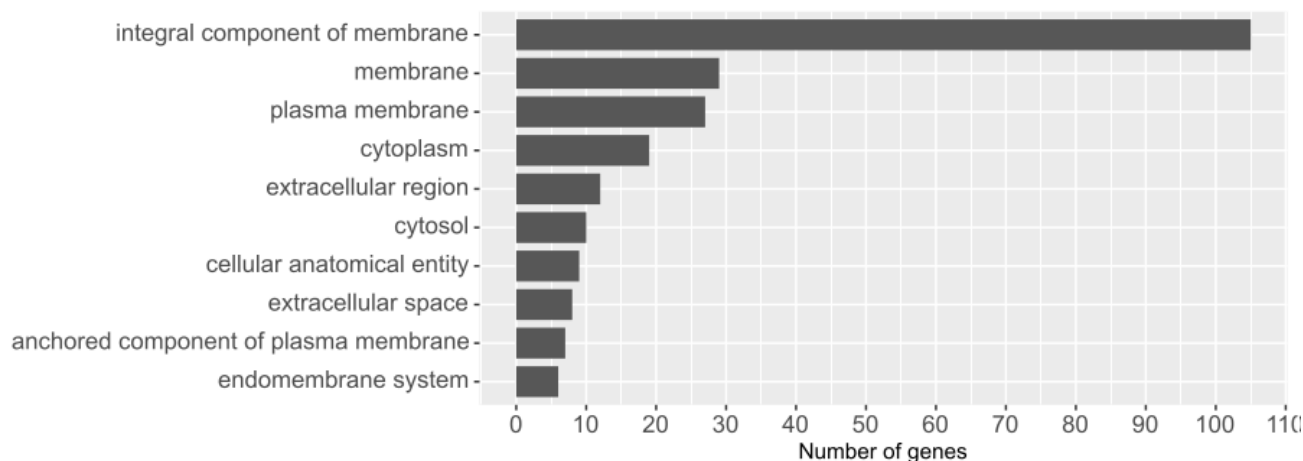
Wyniki

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

Analiza ontologii genów

Badano zidentyfikowane w roku 2021 geny jądrowe ulegające zróżnicowanej ekspresji u roślin męskosterylnych i męskopłodnych. 402 takie geny zostały zaklasyfikowane do przynajmniej jednej kategorii w obrębie przynajmniej jednej z trzech domen : funkcja molekularna, proces biologiczny oraz lokalizacja komórkowa.

GO Cellular Component

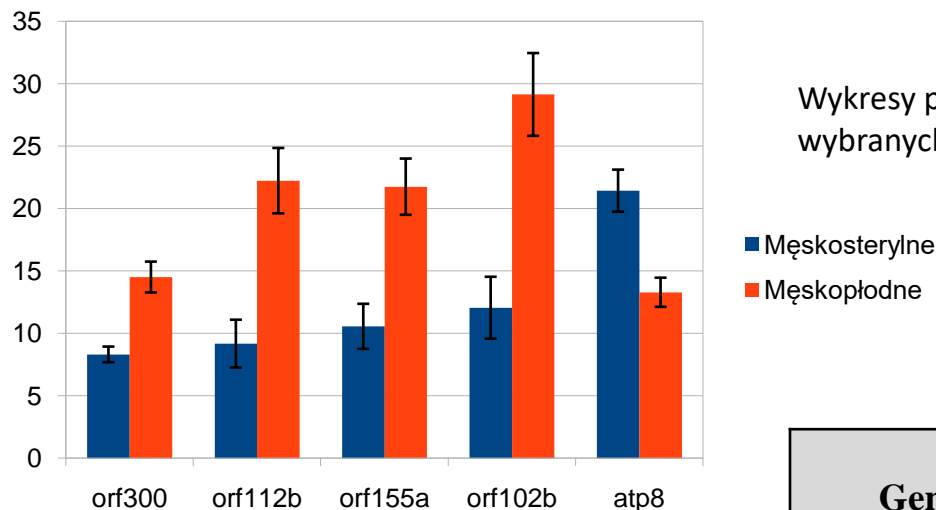


Wynik analizy ontologii genów w domenie „lokalizacja komórkowa”.

Wykazano, iż ponad połowa (55%) genów różnicujących koduje białka błonowe. Pozostałe geny kodują białka będące głównie komponentami cytoplazmy. W obrębie domeny „funkcja molekularna” najliczniej reprezentowaną kategorią były geny, których produkty ekspresji są zaangażowane w procesy wymagające interakcji z cząsteczkami ATP (53 geny). Innymi licznymi kategoriami były geny, których produkty wchodzi w interakcję z kwasami nukleinowymi (39) oraz jonami metali (23). W domenie „procesy biologiczne” najliczniej reprezentowane były kategorie fosorylacja białek (28 genów), integracja DNA (21) oraz transport błonowy (20).

Analiza ekspresji genów mitochondrialnych

Przebadano łącznie 191 sekwencji kodujących. Spośród nich istotne różnice w poziomie ekspresji odnotowano dla 79 genów. Spośród nich 16 genów cechowała zwiększona ekspresja u roślin męskosterylnych. Pozostałe 63 geny cechowała zwiększona ekspresja u roślin męskopłodnych. Najbardziej istotne różnice w wartościach znormalizowanego pokrycia ($p \leq 0,001$) zaobserwowano dla 9 genów. Pośród tej grupy gen *rps3* wykazywał wyższy poziom ekspresji u roślin męskopłodnych, natomiast gen *atp8* ulegał podwyższonej ekspresji u roślin męskosterylnych. Pozostałe 7 genów stanowiły otwarte ramki odczytu (ORF) o nieustalonej funkcji.

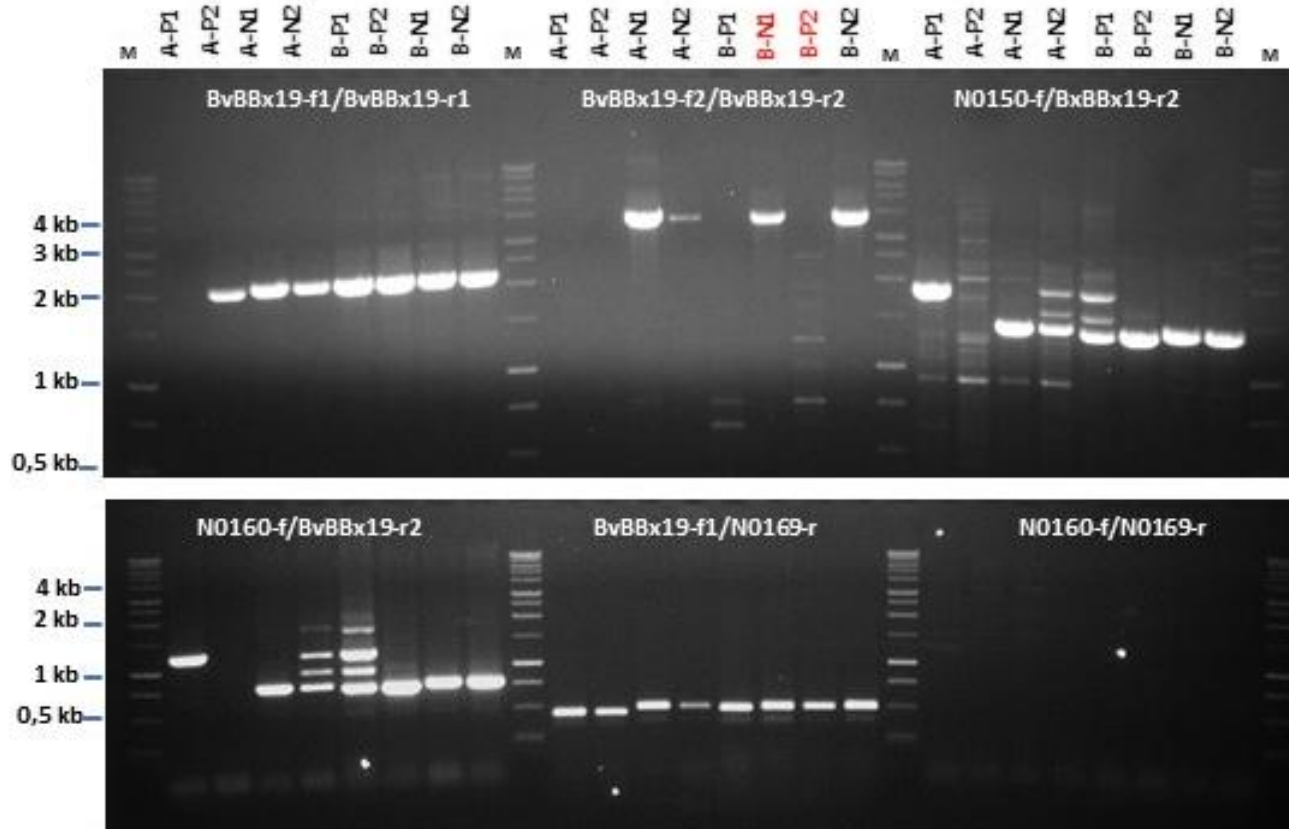


| Gen | Ekspresja: Męskosterylne | Ekspresja: Męskopłodne | p-value |
|----------------|--------------------------|------------------------|----------|
| <i>orf300</i> | 8,309 | 14,511 | 0,000363 |
| <i>orf393</i> | 2,745 | 6,627 | 0,000377 |
| <i>orf102b</i> | 12,050 | 29,141 | 0,000507 |
| <i>orf329</i> | 0,691 | 1,805 | 0,000638 |
| <i>orf112b</i> | 9,173 | 22,232 | 0,000656 |
| <i>rps3</i> | 1,253 | 3,289 | 0,000760 |
| <i>atp8</i> | 21,431 | 13,288 | 0,000780 |
| <i>orf155a</i> | 10,558 | 21,751 | 0,000871 |
| <i>orf166</i> | 0,720 | 1,667 | 0,000992 |

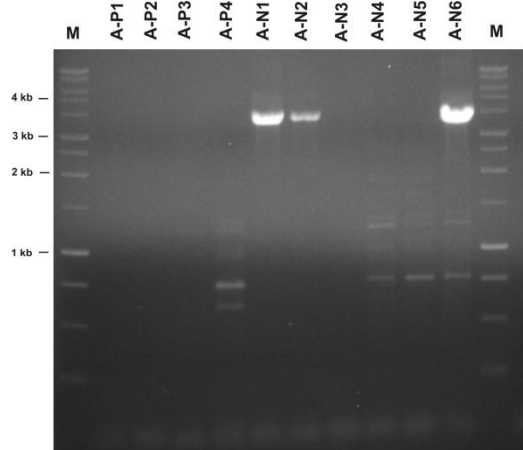
Geny mtDNA o najbardziej istotnych statystycznie różnicach w ekspresji.

Sekwencjonowanie genów pośpiechowości

Do wstępnych 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. Każda z testowanych par starterów pozwoliła na amplifikację produktów o wielkości zbliżonej do wielkości spodziewanej za wyjątkiem pary N0160-f/N0169-r. Obserwowano także zróżnicowanie wielkości lub obecności amplifikowanych fragmentów dla roślin o fenotypie pośpiechowatym i normalnym z wyjątkiem produktów reakcji dla starterów BvBBx19-f1/BvBBx19-r1. Dwie kombinacje starterów: BvBBx19-f2/BvBBx19-r2 oraz BvBBx19-f1/N0169-r przetestowano dla pełnego zestawu roślin z obu odmian.

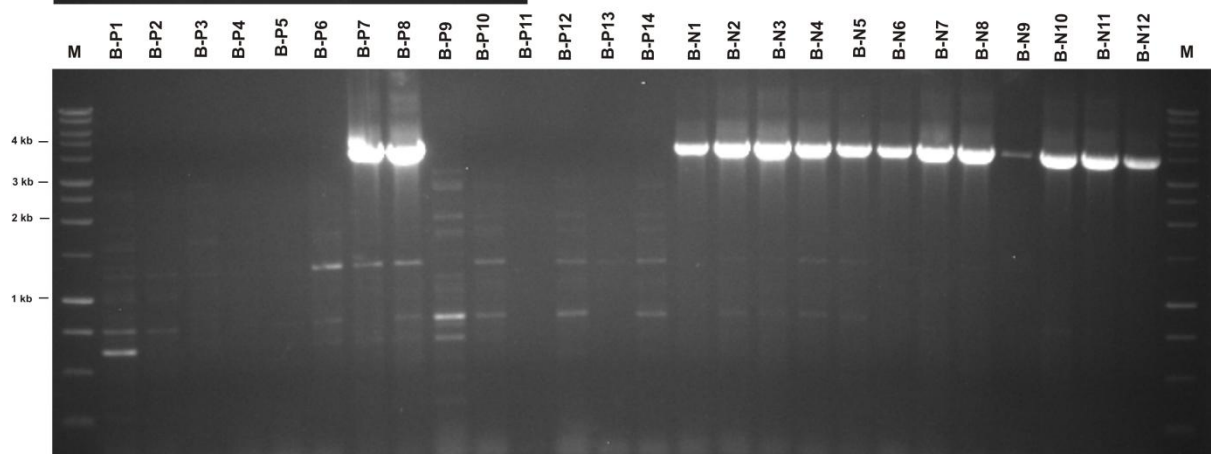


Obraz elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych ze starterami dla genu *BvBBx19*. A, B – odmiany buraka ćwikłowego, P1 i P2 – rośliny o fenotypie pośpiechowatym, N1 i N2 – rośliny o fenotypie normalnym. Nad profilami produktów reakcji zapisano kombinacje starterów użytych do PCR.



Obraz elektroforetyczny produktów PCR, uzyskanych ze starterami BvBBx19-f2/BvBBx19-r2. A, B – odmiany buraka ćwikłowego, P – rośliny o fenotypie pośpiechovatym, N – rośliny o fenotypie normalnym. 1-14 – kolejne numery roślin.

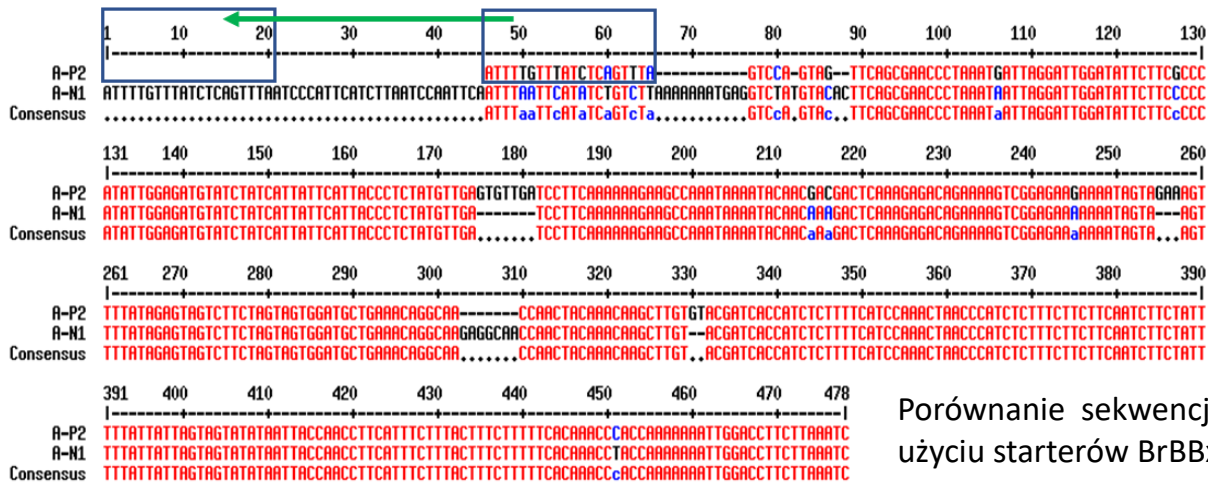
Weryfikacja na pełnym zestawie roślin wykazała, iż oprócz zróżnicowania pomiędzy kategoriami fenotypowymi występuje także zróżnicowanie w obrębie kategorii fenotypowych np. wśród roślin pośpiechovatych.



Następnie poddano sekwencjonowaniu produkty PCR uzyskane przy użyciu starterów:

- BrBBx19-f1/N0169-r, które różnicowały rośliny o fenotypie pośpiechovatym i normalnym odmiany A.
- N0150-f/BvBBx19-r2, różnicujące rośliny o fenotypie pośpiechovatym i normalnym odmiany B.

Porównanie sekwencji produktów BrBBx19-f1/N0169-r wskazało na istnienie u rośliny o fenotypie normalnym insercji o długości 56 nukleotydów oraz kilku krótszych: insercja pojedynczego nukleotydu w pozycji 82, insercja dwóch nukleotydów w pozycji 87-88 oraz insercja siedmiu nukleotydów w pozycji 303-309. Ponadto wykazano także kilka krótkich insercji w sekwencji produktu typu P: 175-181, 255-257 oraz 300-301. Pomiedzy badanymi sekwencjami występują także polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w pozycjach 80, 86, 106, 127, 214, 216, 245 i 451.



W przypadku produktu po starterach N0150-f/BvBBx19-r2 odczytana dla rośliny typu P sekwencja wynosiła 1273 bp, natomiast dla rośliny typu N 1313 bp. Różnica ta wynikała głównie z obecności dłuższej insercji o długości 41 bp w pozycji 954-995 sekwencji B-N1 oraz jednej o długości 2 bp w pozycji 1241-1242 produktu B-P2. Porównanie składu nukleotydowego obu sekwencji wykazało ponadto 27 innych indeli.

Sekwencjonowanie wariantów allelicznych locus restorera X (*Rf1*)

Fragment tabeli wynikowej

| Pozycja nukleotydowa referencji | Wariant: referencja | Wariant: odczyty z roślin płodnych | Pozycja nukleotydowa referencji | Wariant: referencja | Wariant: odczyty z roślin płodnych |
|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 547 | g | g/a | 7189 | a | a/t |
| 551 | t | t/c | 7250 | t | c |
| 554 | t | t/c | 7503 | a | c |
| 560 | g | g/a | 7509 | g | c |
| 1355 | c | c/t | 7516 | a | g |
| 1391 | c | c/g | 7529 | c | t |

Analizy te wykazały 117 polimorfizmów sekwencyjnych, które różnicowały odczyty z roślin męskopłodnych w stosunku do referencji *rf1*. Wśród wykrytych polimorfizmów było 7 indeli (wszystkie warianty bez nukleotydu/nukleotydów pochodziły z roślin płodnych). Wykryto także 1 polimorfizm typu MNP. Pozostałe polimorfizmy (109) miały charakter SNP.

Wnioski

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

1. Analiza ontologii genów wykazała, iż wśród genów różnicujących rośliny męskosterylne i męskopłodne dominują:
 - w domenie „lokalizacja komórkowa” – geny dla białek będących komponentami błon;
 - w domenie „funkcja molekularna” – geny, których produkty ekspresji są zaangażowane w procesy wymagające interakcji z cząsteczkami ATP;
 - w domenie „procesy biologiczne” – geny powiązane z fosforylacją białek.
2. Zidentyfikowano łącznie 76 genów wykazujących istotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy roślinami męskosterylnymi i męskopłodnymi. Większość tych genów (63) ulegała podwyższonej ekspresji u roślin męskopłodnych. Wśród genów wykazujących najistotniejszą różnicę w ekspresji ($p \leq 0,001$) znalazły się *rps3*, *atp8* oraz siedem otwartych ramek odczytu o nieustalonej funkcji.

W temacie badawczym 2 (Sekwencjonowanie genów pośpiechowatości):

1. Kombinacje starterów: BvBBX19-f2/BvBBX19-r2, N0150-f/BvBBX19-r2, N0160-f/BvBBX19-r2, BvBBX19-f1/N0169-r mogą być wykorzystane do weryfikacji skłonności do pośpiechowatości roślin buraka ćwikłowego.
2. Zidentyfikowana różnica w genie *BvBBx19* pomiędzy roślinami o fenotypie pośpiechowatym i normalnym, daje możliwość zaprojektowania starterów specyficznych dla określonego fenotypu.

W temacie badawczym 3 (Sekwencjonowanie wariantów allelicznych locus restorera *X (Rf1)*):

1. Zidentyfikowano 117 polimorfizmów sekwencyjnych różnicujących allele *Rf1* i *rf1*. Są one rozłożone na długości ok. 15 kb.
2. Uzyskane wyniki wskazują na heterozygotyczność badanych roślin płodnych w szeregu pozycjach nukleotydowych locus *X/x (Rf1/rf1)*.

Wyników projektu jeszcze nie publikowano.