

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 Stojałowski, 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

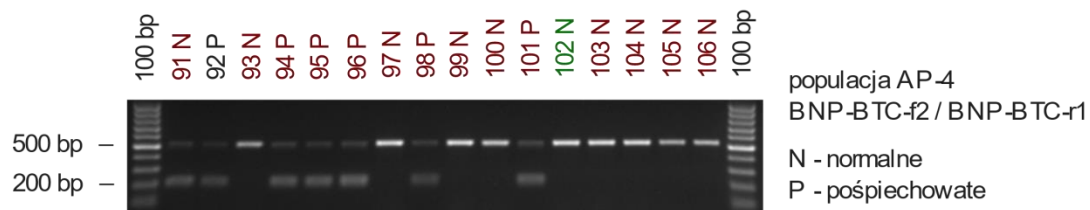
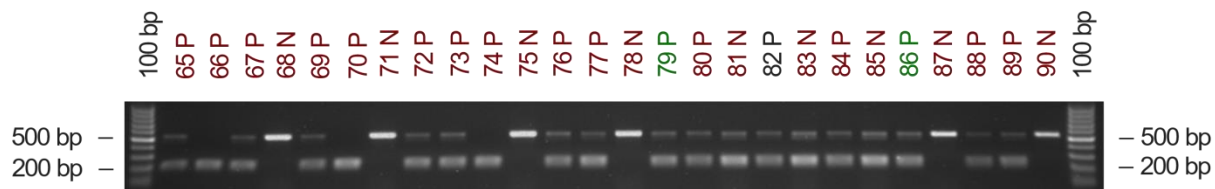
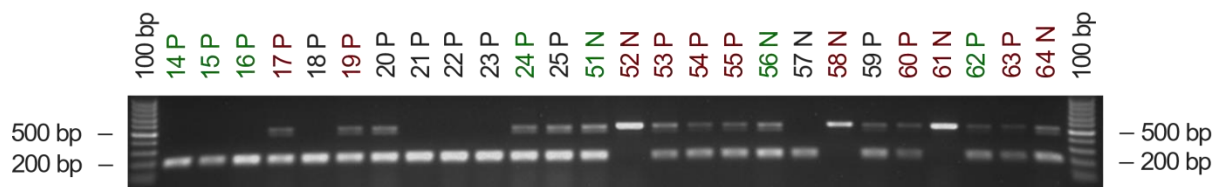
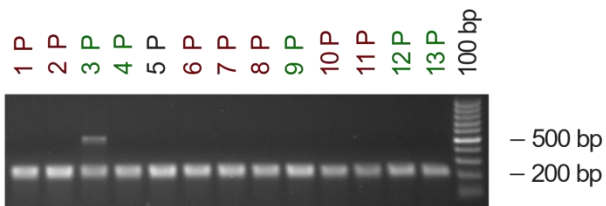
- populacje 593a i 593b segregujące na rośliny jedno- i wielokiełkowe

Metody

- platforma NGS Illuminy, PE150

Wyniki

Opracowanie markerów DNA dla genów pośpiechowatości



Produkty PCR uzyskane z użyciem starterów BNP-BTC-f2/BNP-BTC-r1 dla populacji A (AP-4)

Obecność markerów wskazanej wielkości u roślin populacji A i B segregujących ze względu na fenotyp pośpiechowatości (P-pośpiechowate, N-normalne).

Fenotyp roślin	Liczba [%]	Produkty PCR [pz] ze starterami BNP-BTC-f2/BNP-BTC-r1		
		212	525	212/525
		Genotyp / locus B/b		
		BB	bb	Bb
Populacja A				
Liczba roślin normalnych [N]	26 [32,1%]	1 [3,8%]	18 [69,2%]	7 [26,9%]
Liczba roślin N z przebarwieniem		0	17	5
Liczba roślin N bez przebarwienia		0	1	2
Liczba roślin N nieokreślonych		1	0	0
Liczba roślin pośpiechowatych [P]	55 [67,9%]	22 [40,0%]	0 [0,0%]	33 [60,0%]
Liczba roślin P z przebarwieniem		10	0	23
Liczba roślin P bez przebarwienia		7	0	5
Liczba roślin P nieokreślonych		5	0	5

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 <i>bvORF</i> [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

Wnioski

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

1. Spośród testowanych trzech genów markery, najskuteczniejsze w identyfikacji roślin pośpiechowatych/normalnych zidentyfikowano w oparciu o gen *BTC1*.
2. Odnotowano wysoką ko-segregację markerów wygenerowanych z użyciem kombinacji starterów **BTC1-5UTR-f2/BTC1-ex6-r** i **BNP-BTC1-f2/BNP-BTC-r1** z badanym fenotypem. Tylko dla roślin normalnych populacji A (1 roślina, 3,8%) i populacji B (2 rośliny, 4,4%) dystrybucja markera nie była zgodna z fenotypem.
3. Kombinacja starterów **BNP-BTC1-f2/BNP-BTC-r1**, w obrębie obu populacji, pozwoliła na wygenerowanie produktu zgodnego w 100% z fenotypem roślin pośpiechowatych, przy czym możliwa była identyfikacja homozygot i heterozygot.
4. Przyjmując, że pośpiechowatość warunkowana genem *BTC1* jest cechą dominującą, heterozygotyczność roślin niewykazujących tego zjawiska można wytłumaczyć niepełną dominacją w obrębie locus B/b. Prawdopodobnie w ekspresji cechy uczestniczą także inne geny, które u heterozygot mogą odgrywać istotną rolę w kształtowaniu fenotypu.
5. Częstotliwość występowania braku wybarwienia antocyjanowego była większa dla roślin wykazujących pośpiechowatość w porównaniu do roślin normalnych u obu badanych populacji.

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.