

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 hab. inż. Magdalena Simlat, prof. URK

Dr hab. Stefan Stojałowski, prof. ZUT

Cele projektu w 2023 r.

W temacie badawczym 1 (Opracowanie markerów DNA dla alleli S-locus kapusty)

- opracowanie markerów PCR dla cechy samozgodności u kapusty.

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników GBS):

- identyfikacja polimorfizmów sekwencyjnych u roślin marchwi różniących się statusem płodności oraz określenie lokalizacji genomowej tych polimorfizmów,
- wskazanie genów kandydujących dla przywracania płodności u marchwi.

W temacie badawczym 3 (Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie transkryptomu (GBS-t) w kontekście mapowania restorerów cebuli)

- uzyskanie sekwencji transkryptomu cebuli dla roślin męskosterylnych i roślin z przywróconą płodnością.

Cele zostały zrealizowane.

Materiały i metody

W temacie badawczym 1

Materiały roślinne

- Dwie populacje kapusty (*Brassica oleracea* L.): 650 i K1 (Plantico Zielonki).

Metody

- Izolacja całkowitego DNA.
- Amplifikacja DNA: konwencjonalny PCR i elektroforeza w standardowym żelu agarozowym.
- Trawienie restrykcyjne produktów PCR.
- Analiza produktów PCR: elektroforeza w żelu poliakrylamidowym.

W temacie badawczym 2

Materiały roślinne

- Dwie populacje marchwi (172 i 510-14) otrzymane poprzez zapylenie rośliny męskosterylnej z cytoplazmą sterylizującą *Sp* pyłkiem rośliny męskopłodnej.

Metody

- Identyfikacja polimorfizmów sekwencyjnych (program VCFtools; program VCFtools; skrypt napisany w języku Awk; program Excel (MS Office 2007)).
- Mapowanie odczytów sekwencyjnych do sekwencji chromosomu 3 marchwi (NC_030383.1) (program BWA).

W temacie badawczym 3

Materiały roślinne

- rośliny cebuli reprezentujące populacje: 107a, 107b i 441 segregujące ze względu na męską płodność

Metody

- Izolacja RNA.
- Sekwencjonowanie cDNA.
- Obliczanie statystyk sekwencjonowania.

Wyniki

Opracowanie markerów DNA dla alleli S-locus kapusty

Typowanie polimorficznych markerów

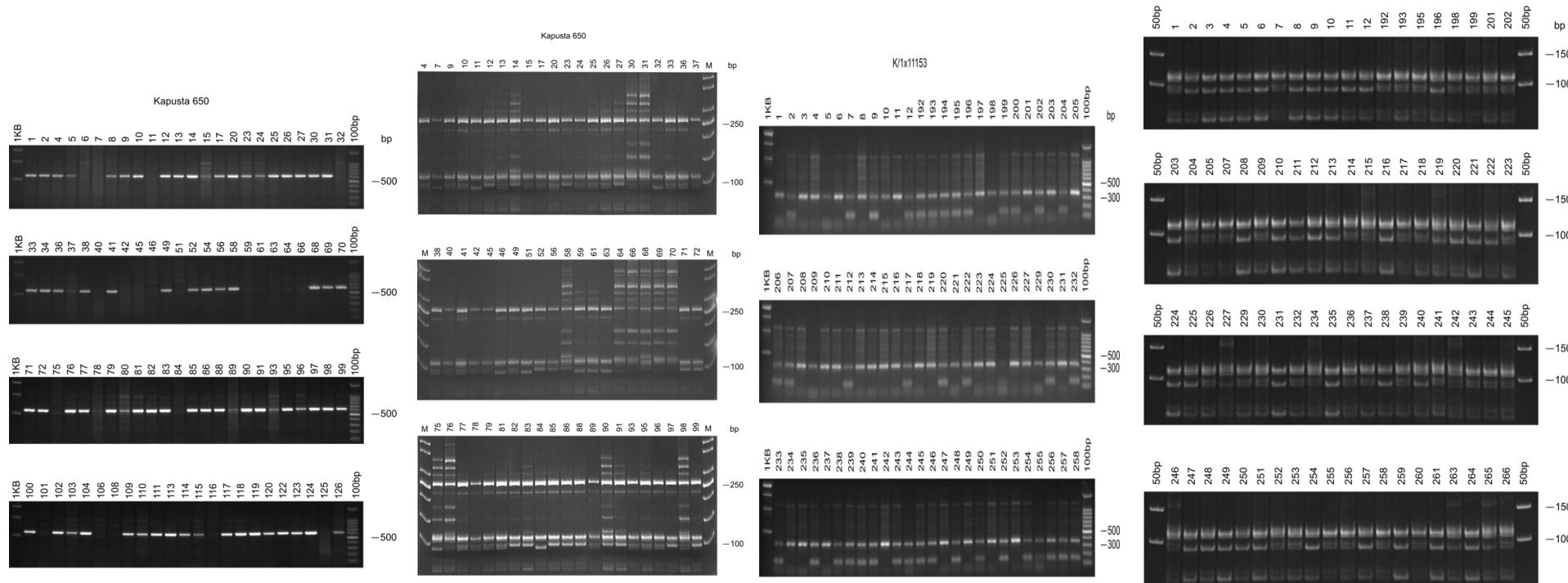
Populacja 650

Nazwa Markera	Zastosowany enzym restrykcyjny
C1-277-f/C1-277-r	CviKI
C1-531-f/C1-531-r	CviKI
C1-636-f/C1-636-r	CviKI
C1-676-f/C1-676-r	CviKI
C1-880-f/C1-880-r	-

Populacja K1

Nazwa Markera	Zastosowany enzym restrykcyjny
C1-277-f/C1-277-r	CviKI
C1-531-f/C1-531-r	CviKI
C1-636-f/C1-636-r	CviKI
C1-676-f/C1-676-r	CviKI
C1-880-f/C1-880-r	-
PK1 PK4	-

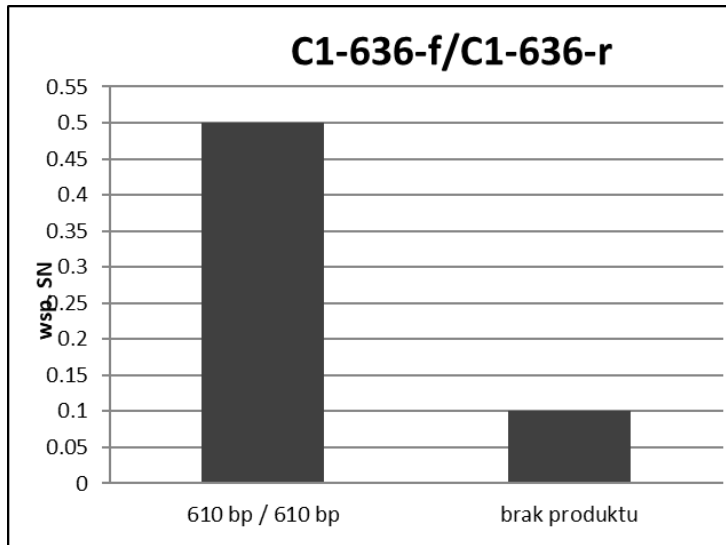
K/1x11153



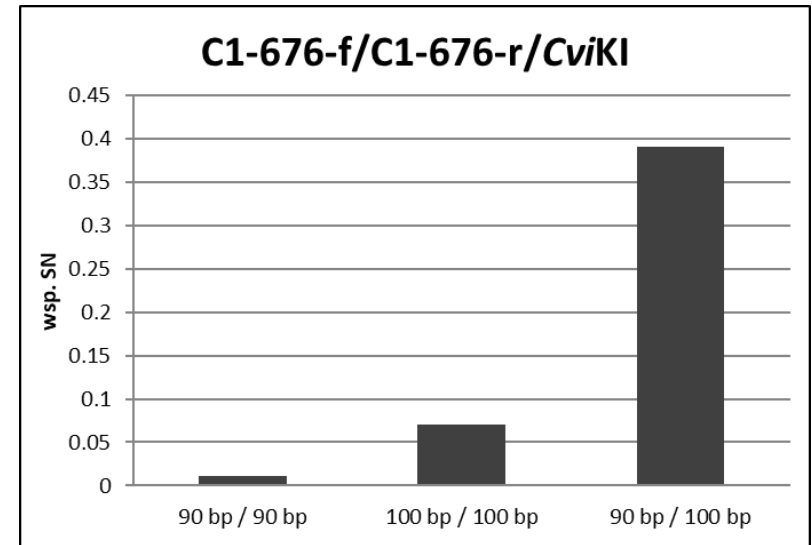
Weryfikacja polimorficznych markerów – populacja 650

Średni współczynnik samoniezgodności (wsp. SN) w populacji 650 wyrażony jako stosunek liczny nasion do liczby łuszczyn.

Wyższy średni współczynnik samoniezgodności u roślin, u których zaobserwowano produkt 610 bp, niż u roślin, u których produkt ten nie był obecny



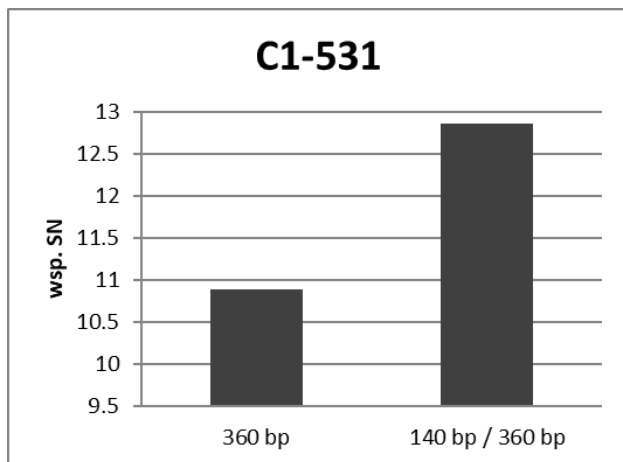
Najwyższy średni współczynnik samoniezgodności u heterozygot, u których zaobserwowano oba produkty 90 i 100 bp, niższy u roślin homozygotycznych wolnych, u których zaobserwowano produkt 100 bp, a najniższy u homozygot szybkich, cechujących się obecnością produktu 90 bp



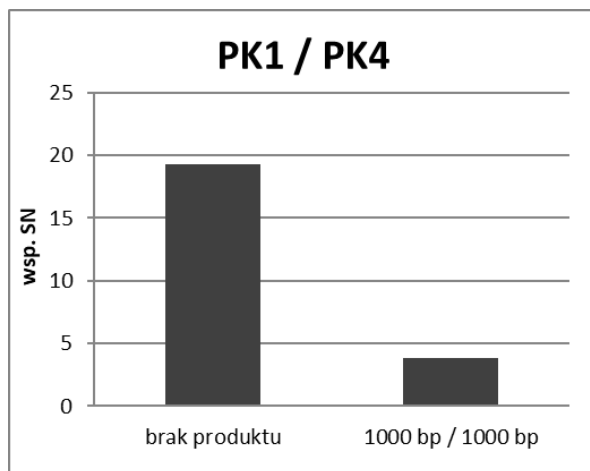
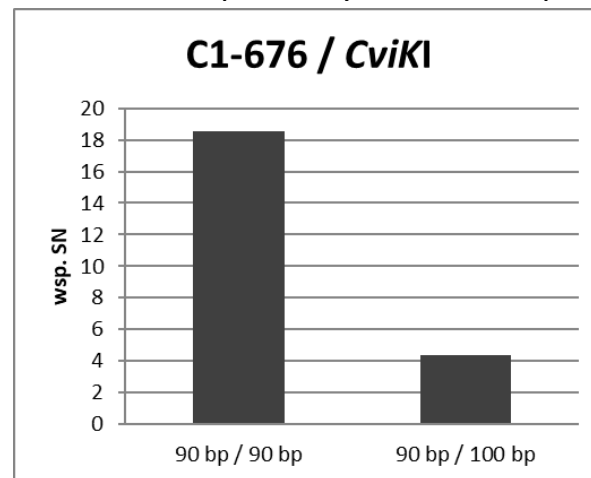
Weryfikacja polimorficznych markerów – populacja K1

Średni współczynnik samoniezgodności (wsp. SN) w populacji K1
wyrażony jako stosunek liczny nasion do liczby łuszczyn.

Wyższy średni współczynnik samoniezgodności u heterozygot, u których zaobserwowano oba produkty 140 i 360 bp, a niższy u homozygot cechujących się obecnością jedynie produktu 360 bp.



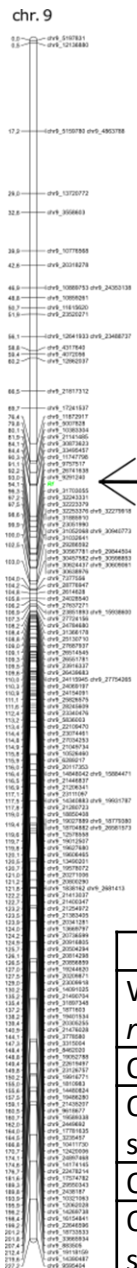
Wyższy średni współczynnik samoniezgodności u homozygot, u których zaobserwowano produkt 90bp, a niższy u roślin heterozygotycznych, u których były obecne oba produkty – 90 i 100 bp.



Wyższy średni współczynnik samoniezgodności u roślin, u których produkt różnicujący nie był obecny, a niższy u roślin, u których był obecny produkt 1000 bp

Wyniki

Analizy bioinformatyczne wyników GBS

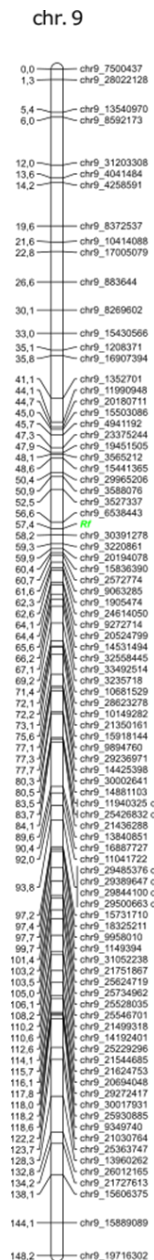


Mapa genetyczna chromosomu 9 marchwi skonstruowana na bazie segregacji polimorfizmów sekwencyjnych w populacji 172.

Pozycja restorera płodności

Statystyka mapowania odczytów do sekwencji referencyjnej (populacja 172)

Parametr	Liczba	Procent
Wszystkie odczyty (<i>forward & reverse</i>)	37 994 670	100,0
Odczyty zmapowane	18 489 157	48,7
Odczyty zmapowane i sparowane	16 938 712	44,6
Odczyty niezmapowane	19 505 513	51,3
Odczyty prawidłowo sparowane	14 400 511	37,9



Mapa genetyczna chromosomu 9 marchwi skonstruowana na bazie segregacji polimorfizmów sekwencyjnych w populacji 510-14

Pozycja restorera płodności

Statystyka mapowania odczytów do sekwencji referencyjnej (populacja 5120-14)

Parametr	Liczba	Procent
Wszystkie odczyty (<i>forward & reverse</i>)	41 480 501	100,0
Odczyty zmapowane	20 118 681	48,5
Odczyty zmapowane i sparowane	18 291 531	44,1
Odczyty niezmapowane	21 361 820	51,5
Odczyty prawidłowo sparowane	15 401 415	37,1

Wyniki

Analizy bioinformatyczne wyników GBS

Geny PPR sąsiadujące z polimorfizmami sekwencyjnymi wykazującymi sprzężenie z genem restorerowym .

populacja 172

Polimorfizm	Pozycja polimorfizmu [cM]	Najbliższy gen PPR	Odległość od najbliższego genu PPR [bp]
chr9_11872917	76.372	LOC108201277	44627
chr9_5007828	79.799	LOC108202514	95997
chr9_10383304	80.101	LOC108201264	638286
chr9_21141485	81.873	LOC108200571	42019
chr9_30873623	84.095	LOC108201708	1048183
chr9_33495457	84.437	LOC108202954	147851
chr9_11747798	90.346	LOC108201277	78735
chr9_9757517	91.139	LOC108201264	1264073
chr9_26741638	92.210	LOC108201623	835289
chr9_9291240	92.995	LOC108202973	1004902
Fenotyp (restorer)	94.077	-	-
chr9_31703055	96.343	LOC108201708	218751
chr9_32243331	97.225	LOC108200643	31375
chr9_32223379	97.497	LOC108200643	51327
chr9_32253376	98.598	LOC108200643	21330
chr9_32279918	98.598	LOC108200643	1592
chr9_31885910	98.598	LOC108201708	35896
chr9_23051990	99.935	LOC108200444	1724019
chr9_31052068	100.003	LOC108201708	869738
chr9_30940773	100.003	LOC108201708	981033
chr9_31032641	100.003	LOC108201708	889165

populacja 538

Polimorfizm	Pozycja polimorfizmu [cM]	Najbliższy gen PPR	Odległość od najbliższego genu PPR [bp]
chr9_15503086	44.986	LOC108202209	601092
chr9_4941192	45.651	LOC108202514	29361
chr9_23375244	47.284	LOC108201555	1747645
chr9_19451505	47.948	LOC108201390	30886
chr9_3565212	48.051	LOC108201065	0
chr9_15441365	48.613	LOC108202209	662813
chr9_29965206	50.441	LOC108200670	396393
chr9_3588076	50.883	LOC108200981	0
chr9_3527337	52.518	LOC108201090	0
chr9_6538443	56.574	LOC108202972	267639
Fenotyp (restorer)	57.441	-	-
chr9_30391278	58.212	LOC108200670	822465
chr9_3220861	59.334	LOC108201056	13911
chr9_20194078	59.914	LOC108200241	511492
chr9_15836390	60.351	LOC108202209	267788
chr9_2572774	60.673	LOC108200248	216087
chr9_9063285	61.594	LOC108202973	776947
chr9_1905474	62.261	LOC108202764	64179
chr9_24614050	62.553	LOC108201555	508839
chr9_9272714	64.109	LOC108202973	986376
chr9_20524799	64.363	LOC108202128	301480

Wyniki

Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie transkryptomu (GBS-t) w kontekście mapowania restorerów cebuli

Parametry statystyczne uzyskanych odczytów sekwencyjnych
populacja 170a

Parametr	Wartość	
Zsumowana długość odczytów*	554 667 900,00	
Liczba odczytów*	3 697 786,00	
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC	41,7	
N50	150	
N95	150	
%Q20	96,2	
%Q30	90,1	
Phred	min.	35,00
	maks.	70,00
	średni	68,3

populacja 170b

Parametr	Wartość	
Zsumowana długość odczytów*	606 966 360,80	
Liczba odczytów*	4 046 442,40	
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC	41,8	
N50	150	
N95	150	
%Q20	97,5	
%Q30	93,1	
Phred	min.	35,00
	maks.	70,00
	średni	68,8

populacja 444

Parametr	Wartość	
Zsumowana długość odczytów*	578 924 479,50	
Liczba odczytów*	3 859 496,5	
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC	42,5	
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 (Opracowanie markerów DNA dla alleli S-locus kapusty):

1. Zidentyfikowano pięć markerów o genotypie korelującym z wartością współczynnika samo niezgodności – dwa dla populacji 650 i trzy dla populacji K1.
2. Jeden z tych markerów – C1-676/CviKI – wykazywał korelację w obydwu badanych populacjach. Zaskakująco, w populacji 650 heterozygoty w locus tego markera cechował najwyższy współczynnik samoniezgodności (wyższy od obydwu homozygot).

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników GBS):

1. U dwóch populacji marchwi udało się zmapować gen restorerowy w grupie sprzężeń odpowiadającej analizowanemu chromosomowi – był to chromosom 9. Obydwie populacje zawierały cytoplazmę Sp wywołującą sterylność typu płatkowego.
2. Dysponując fizyczną lokalizacją markerów sprzężonych z restorerem (w genomie referencyjnym) wytypowano cztery geny PPR, które mogą odpowiadać restorerowi dla cytoplazmy Sp. Są to geny opatrzone identyfikatorami: LOC108201623, LOC108202973, LOC108200670 oraz LOC108202972.

W temacie badawczym 3 (Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie transkryptomu (GBS-t) w kontekście mapowania restorerów cebuli):

1. W przeprowadzonym eksperymencie GBS-t dla pojedynczej rośliny uzyskano ok. 600 Mb danych transkryptomicznych.
2. Parametry statystyczne uzyskanych danych wskazują na ich wysoką jakość, co wynika m.in. z rygorystycznej filtracji odczytów sekwencyjnych przez dostawcę usługi.