

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 inż. Alicja Macko-Podgórn, prof. URK

Cele projektu w 2023 r.

W temacie badawczym 1 (Identyfikacja wariantów strukturalnych):

- eksperymentalna weryfikacja wyników bioinformatycznej identyfikacji polimorfizmów insercji miniaturowych ruchomych elementów genetycznych (ang. Miniature Inverted-repeat Transposable Elements; MITE)

W temacie badawczym 2 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego gen jednonasienności):

- identyfikacja rejonu lub rejonów genomu buraka determinującego cechę jednonasienności w oparciu o strategię BSA-seq

W temacie badawczym 3 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego geny restorerowe):

- określenie, czy obecność restorera X ($Rf1$) jest skorelowana z poziomem mRNA dla otwartych ramek odczytu tego locus;
- uzyskanie kolejnej puli klonów bakteryjnych z wklonowaną do wektora ekspresyjnego otwartą ramką odczytu genu X ($Rf1$);
- wskazanie genów kandydujących mogących odpowiadać restorerowi Z ($Rf2$)

Wszystkie założone cele zostały zrealizowane

Materiały i metody

W temacie badawczym 1 (Identyfikacja wariantów strukturalnych):

Materiały roślinne

- 45 populacji buraka cukrowego o różnym pochodzeniu

Metody

- PCR przy wykorzystaniu 60 par starterów zakotwiczonych w egzonach genów flankujących introny z insercjami kopii elementów MITE z nadrodzin *BvSto* i *BvhAT*

W temacie badawczym 2 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego gen

Materiały roślinne

jednonasienności):

- Rośliny z 35 populacji F2 uzyskanych w wyniku przekrzyżowania rośliny jednonasiennej z wielonasienną (materiały hodowlane KHBC), dla których po wyizolowaniu genomowego DNA sporządzono próby łączone (5 dla roślin jednonasiennych i 5 dla wielonasiennych)

Metody

- Wysokowydajne sekwencjonowanie prób łączonych (BSA-seq), analizy bioinformatyczne

W temacie badawczym 3 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego

Materiały roślinne

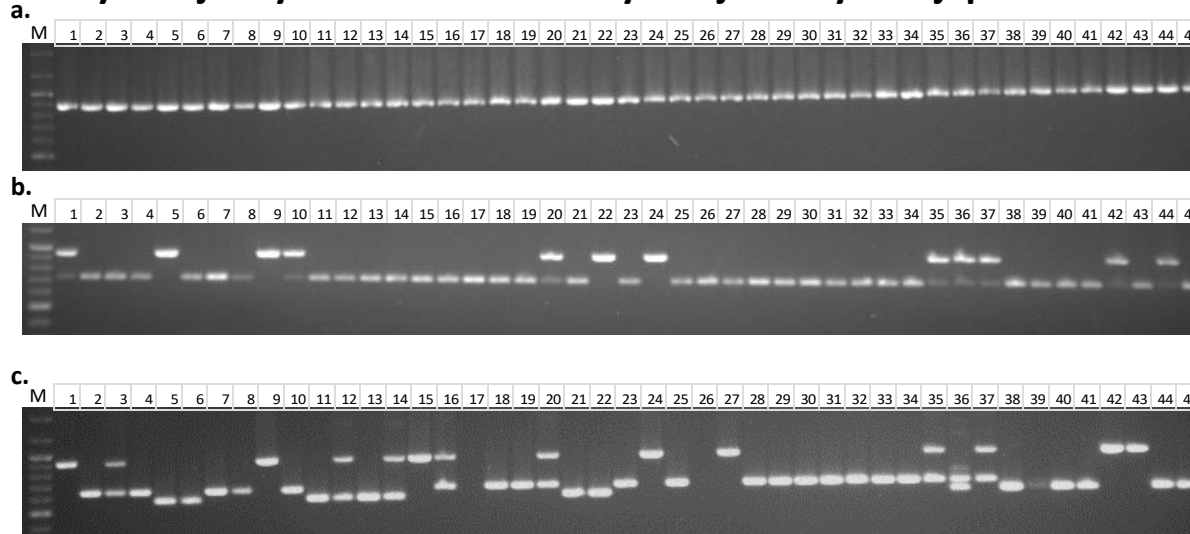
geny restorerowe):

- Populacje segregujące na rośliny męskosterylne i męskopłodne z płodnością przywróconą przez gen *X/Rf1* (3S 18 40, 3S MS 10L O77) lub *Z/Rf2* (S 04 786)

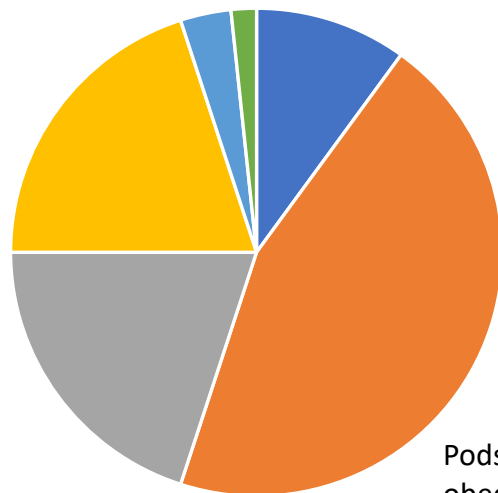
Metody

- klonowanie ekspresyjne z użyciem NEBExpress MBP Fusion and Purification System (New England Biolabs), SDS-PAGE, immunoblotting
- real-time RT-PCR z detekcją na bazie SYBR Green I, oznaczenie względne
- amplifikacja całogenomowa przy użyciu REPLI-g Screening Kit (Qiagen)

Eksperymentalna weryfikacja wyników bioinformatycznej identyfikacji polimorfizmów insercji MITE



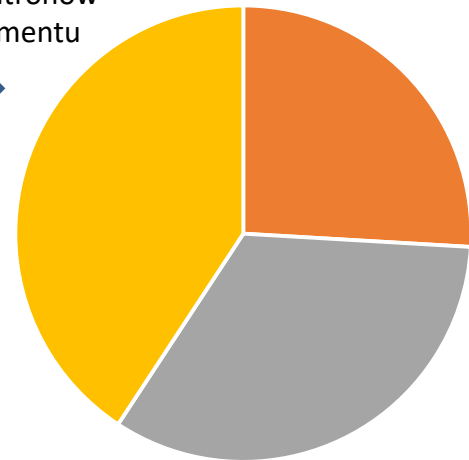
Przykładowe profile elektroforetyczne uzyskane dla (a.) locus nie wykazującego polimorfizmu; *Bv_chr3_hAT_28_1_3* – długość produktu odpowiada obecności kopii elementu *BvhAT28*; (b.) segregacji biallelicznej; *Bv_chr8_Sto3_2_171* – długości produktów odpowiadają obecności (dłuższy produkt) lub brakowi (krótszy produkt) insercji kopii elementu *BvSto3*; (c.) segregacji multiallelicznej; *Bv_chr2_Sto4_25* – trzy allele, z których najdłuższy odpowiada obecności elementu *BvSto4*, krótszy reprezentuje miejsce puste, a najkrótszy jest związany z obecnością innej, nieokreślonej delekcji



Podsumowanie wyników weryfikacji obecności polimorfizmów długości intronów w genach buraka cukrowego

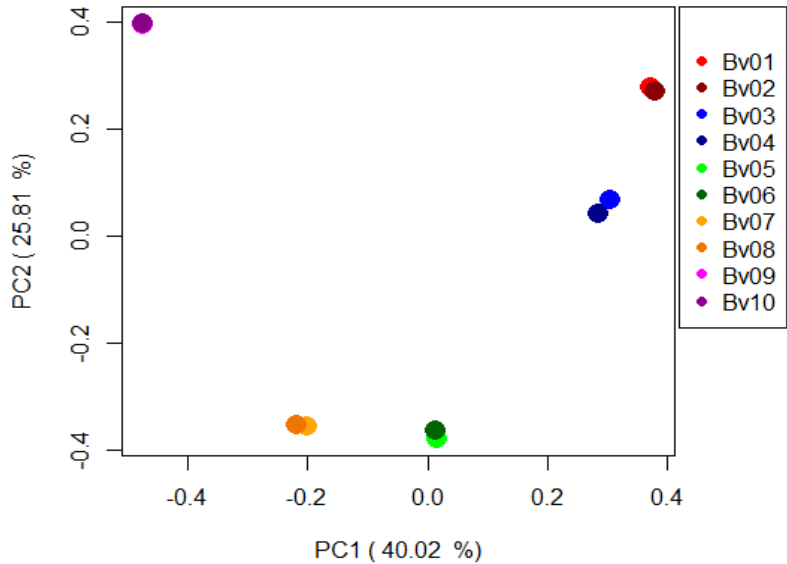
- brak amplifikacji
- brak polimorfizmu
- dwa warianty
- trzy warianty
- cztery warianty
- pięć wariantów

Podsumowanie wyników weryfikacji związku polimorfizmów długości intronów z obecnością lub brakiem kopii elementu MITE



- insercja MITE
- insercja MITE + dodatkowe warianty
- inny polimorfizm

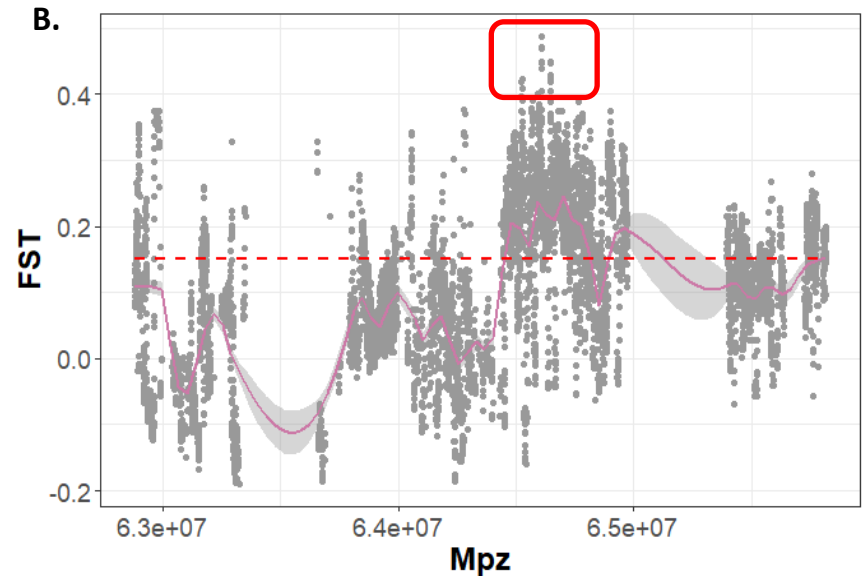
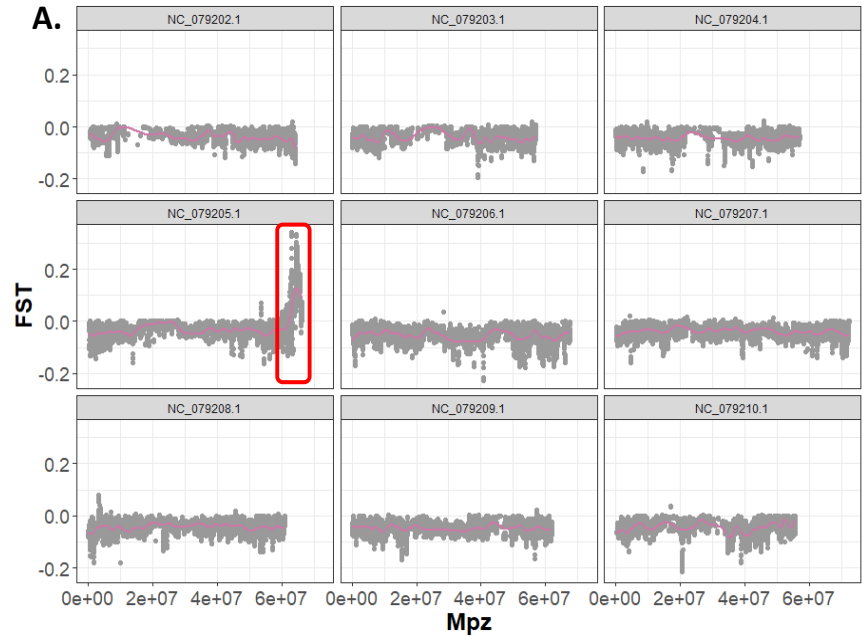
Identyfikacja rejonu lub rejonów genomu buraka determinującego cechę jednonasienności w oparciu o strategię BSA-seq



Wynik analizy głównych składowych przeprowadzonej na podstawie przefiltrowanego zestawu polimorfizmów SNP. Ciemniejszym kolorem zaznaczone są próby łączone sporządzone dla wielonasiennych roślin buraka cukrowego

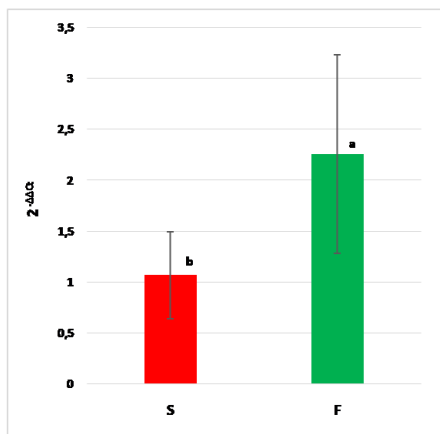


Wykres wartości zróżnicowania prób łączonych roślin jedno- i wielonasiennych buraka cukrowego. A. wynik dla całego genomu; B. wynik dla dystalnej części chromosomu IV obejmującego rejon o najwyższej wartości FST



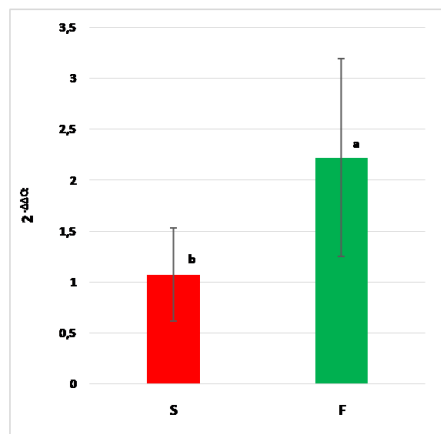
Analiza akumulacji mRNA genu *X/Rf1* metodą real-time RT-PCR

Startery
Rf1-Lorf-f/Rf1-Sorf-frev



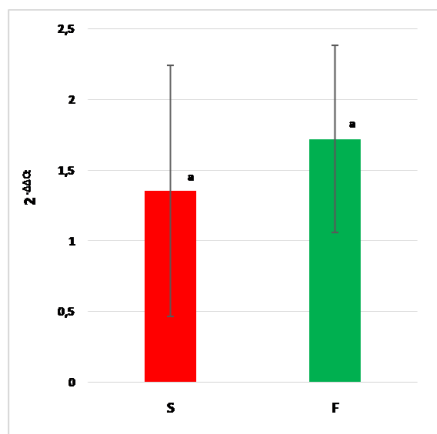
Populacja 3S 18 40

Startery
Rf1-RT-3f1/Rf1-Lorf-r



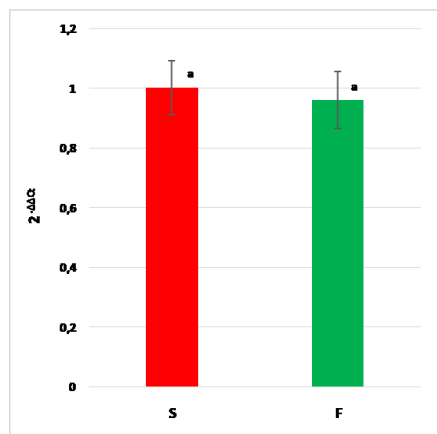
Wyrażona wartością $2^{-\Delta\Delta Ct}$ akumulacja transkryptów genu *Rf1* u męskosterylnych (S) i męskopłodnych (F) roślin populacji 3S 18 40 oraz MS 10L 077; a i b - grupy jednorodne według testu Duncana dla $\alpha = 0,05$.

Startery
Rf1-Lorf-f/Rf1-Sorf-frev



Populacja MS 10L 077

Startery
Rf1-RT-3f1/Rf1-Lorf-r



Klonowanie ekspresyjne fragmentu otwartej ramki odczytu genu *X/Rf1*

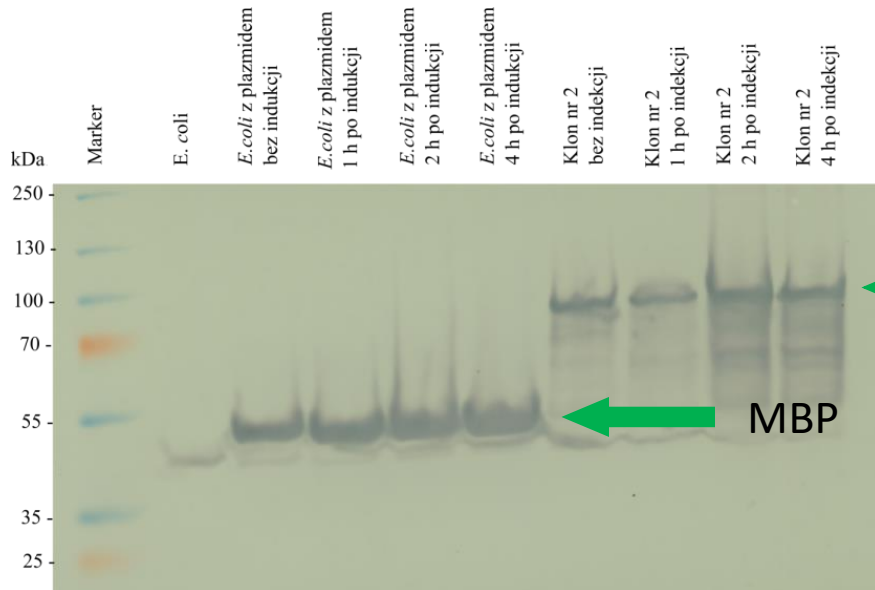
```
imkihHHHHHeegklviwingdkgynglaevgkkfekdtgikvtvehpdkleekfpqvaatg
dgpdiifwahdrfggyaqsgllaeitpdkafqdklypftwdavryngkliaypiavealsli
ynkdllpnpktweeipaldkelkakgsalmlfnlqepyftwpliaadggyafkyengkydi
kdvgvdnagakagltflvdlknkhmnadt dysiaeaafnkggetamtingpwawsnidtskv
nygvvtvlptfkgqpskpfvgvlsaginaaspnkelakeflenylltdegleavnkdkplgav
alksyeeelvkdpriaatmenaqkgeimpnipqmsafwyavrtavinaasgrqtvdealkda
qtNSSSSNNNNNNNNNlgenlyfqmlmigrdVHSNSSSLFYNQSTKCSGLFGSAKSGYFNGF
KHHQEISSFSGFARRNYHGKTEVSVELRVEKLLGLIALIISHSGMIAFFYLHPVVVYPYTR
KHYVILST'THENENGESEKRKIQPATHPDTERVRSIFQHILESLEREINHHELELELELERD
ETFKEKTIWKEETDHDKDSRKKHSGAKITTNHEGMNWEIFVVDKPVWESSCIFGGKIVVYTG
LLNHCISDAELATIIAHQVGHAVARHEAEHWTLLWSILLVIYMTIFQYLFTAPEFANAISK
LLSRHPLLQKVWKIIQARFHQLLPRTTLHLGFLGLSSLVFILYFGRKEIEADHIGdrrriri
pcr
```



Metka ekspresyjna –
białko wiążące maltozę
(MBP)

xxxxx - translacja sekwencji wektora
XXXXX - translacja sekwencji insertu

Zrekonstruowana sekwencja aminokwasowa białka rekombinantowego uzyskana poprzez wirtualną translację sekwencji nukleotydowej klonu 2 oraz sekwencji wektora ekspresyjnego (pMAL-c6T).

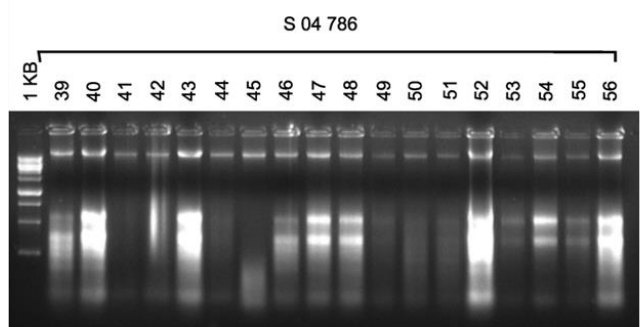
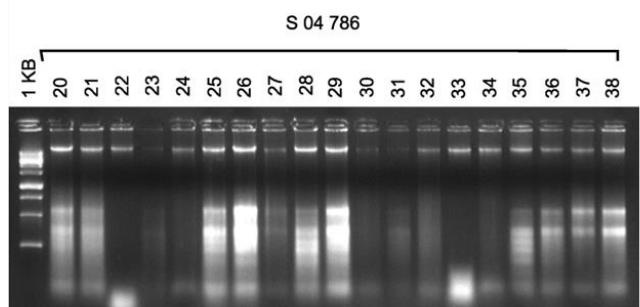
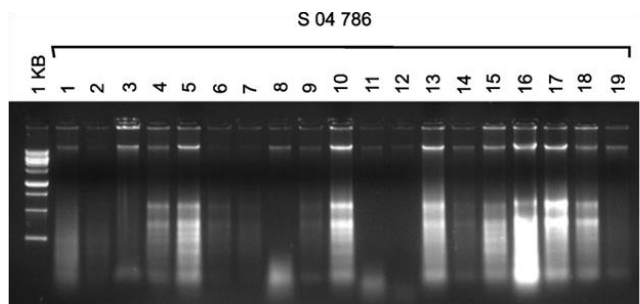


← MBP-RF1

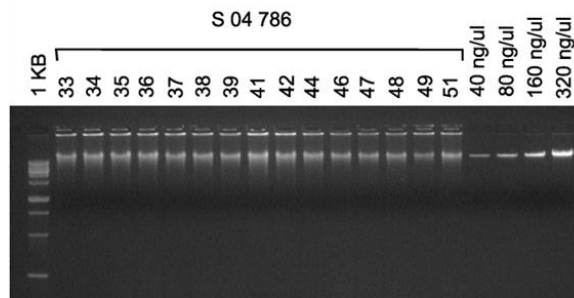
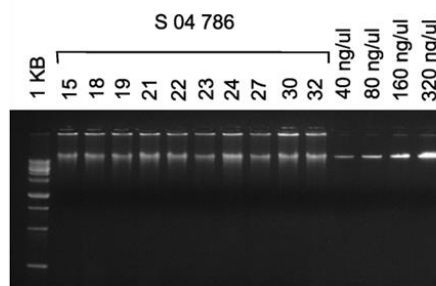
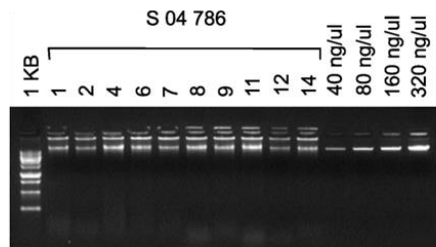
← MBP

Immunodetekcja białka rekombinantowego przy użyciu przeciwciał Anty-MBP wykonana dla klonu 2.

Całogenomowa amplifikacja DNA roślin populacji S 04 786



Przed REPLI-g



Po REPLI-g

Wynik całogenomowej amplifikacji DNA z roślin populacji S 04 786 przy zastosowaniu zestawu REPLI-g Screening Kit (Qiagen).

W temacie badawczym 1 (Identyfikacja wariantów strukturalnych):

1. Polimorfizmy długości intronów stanowią bogate źródło prostych technicznie do identyfikacji markerów molekularnych o znanej fizycznej lokalizacji genomowej.
2. Wiele wytypowanych do analizy intronów zawierających insercje elementów MITE cechowało się obecnością wariantów o różnej długości, co jednak nie było związane z polimorfizmem insercji MITE wytypowanych do analiz, ale obecnością innych insercji. Stwierdzenie molekularnego podłoża obserwowanych polimorfizmów będzie wymagało sekwencjonowania ampikonów.

W temacie badawczym 2 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego gen jednonasienności):

1. Sekwencjonowanie NGS prób łączonych DNA (BSA-seq) jest skutecznym narzędziem dla identyfikacji rejonów genomu determinujących prosto dziedziczne cechy fenotypowe.
2. Czynniki genetyczne determinujące jednonasienność buraka jest zlokalizowany w dystalnej części długiego ramienia chromosomu IV buraka cukrowego. Zasocjowany rejon obejmuje ok. 220 Kpz.

W temacie badawczym 3 (Identyfikacja rejonu genomu obejmującego geny restorerowe):

1. W jednej z analizowanych populacji rośliny męskopłodne z allelem *Rf1* wykazują ok. 2-krotnie wyższą akumulację transkryptów tego locus w porównaniu do roślin męskosterylnych. Wynik ten wskazuje na udział efektów ilościowych w przywracaniu płodności przez gen *Rf1*. W drugiej populacji rośliny męskosterylne i męskopłodne nie różniły się istotnie akumulacją tych mRNA.
2. Uzyskano kolejną pulę klonów rekombinantowych do produkcji białka RF1 – bazuje ona na wykorzystaniu systemu ekspresyjnego pMAL z firmy New England Biolabs. Wyniki analizy elektroforetycznej i immunoblottingu wskazują, iż pożądane białko rekombinantowe jest produkowane.
3. Z resztek DNA roślin populacji S 05 786 udało się uzyskać preparaty nadające się do konstrukcji bibliotek sekwencyjnych. Zastosowano do tego metodę amplifikacji całogenomowej (ang. *WGA – whole genome amplification*).

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 weryfikowanych polimorfizmów insercji MITE	60	60	1,00
1.2	Liczba roślin buraka wykorzystanych do badań	45	45	1,00
temat badawczy 2				
2.1	Liczba prób łączonych wykorzystanych do BSA-seq	10	10	1,00
temat badawczy 3				
3.1	Liczba populacji objętych analizą ekspresji	2	2	1,00
3.2	Liczba pozytywnie zweryfikowanych klonów bakteryjnych do produkcji białka rekombinantowego	4	4	1,00
3.3	Liczba roślin objętych analizą GBS	80	80	1,00
ŚREDNIA				1,00
% REALIZACJI ZADANIA				100%

Wykaz publikacji 2023;

Doniesienie konferencyjne:

Szklarczyk M., Domnicz B., Biel J. „Quantitative effects associated with male fertility restoration by the *Rf1* gene in sugar beet”; poster; Plant Biology Europe 2023, 3 - 6 lipca, Marsylia, Francja