

Opracowanie nowych narzędzi biotechnologicznych pozwalających na skuteczną ocenę odporności buraka cukrowego na pośpiechowatość oraz wybór form rodzicielskich do hodowli heterozyjnej tego gatunku

Zespół realizujący projekt:

dr inż. Michał Nowak, dr hab. Kamila Nowosad, prof. UPWR, dr inż. Justyna Leśniowska-Nowak, dr inż. Tomasz Ociepa, dr Kamil Kostyn, mgr inż. Karolina Różaniecka

E-mail: *michal.nowak@up.lublin.pl*

Projekt finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach Programu badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w latach 2021-2026

Zadanie nr 24



Cele projektu w roku 2023

Lp.	Cel	Czy zrealizowany
1.	Walidacja poprawności funkcjonowania zaprojektowanego uprzednio markera dla SNP zlokalizowanego w obrębie sekwencji kodującej genu BvBTC1 na szerokim zakresie materiałów hodowlanych, obejmującym 200 linii o zróżnicowanej tendencji do pośpiechowatości	CZĘŚCIOWO [#]
2.	Projektowanie markerów molekularnych pozwalających na identyfikację zmian typu SNP zidentyfikowanych w transkryptomie buraka cukrowego, które wykazały najsilniejszą asocjację z tendencją do pośpiechowatości	CZĘŚCIOWO ^{\$}
3.	Genotypowanie 100 form buraka cukrowego z wykorzystaniem markerów SNP przeznaczonych do identyfikacji grup heterogennych	TAK

[#] W związku z koniecznością modyfikacji metodyki na dzień 27.11.2023 r. zadanie nie zostało ukończone. Szacowany stopień realizacji wynosi 80%, a planowany termin zakończenia 15.12.2023 r.

^{\$} W związku z wysokim kosztem zakupu materiałów realizację zadania rozpoczęto po otrzymaniu decyzji o finansowaniu. Szacowany stopień realizacji na dzień 27.11.2023 r. wynosi 70%, a planowany termin zakończenia 15.12.2023 r.

Materiał i metody

Materiał badawczy:

- Linie hodowlane buraka cukrowego (200) pochodzące z kolekcji spółki Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o., które zostały uprzednio scharakteryzowane pod kątem tendencji do uzyskiwania roślin pośpiechowatych [*tematy badawcze 1 i 2*];
- Dane dotyczące SNP zidentyfikowanych w obrębie transkryptów asocjowanych z tendencją do pośpiechowatości [*temat badawczy 2*];
- Dane transkryptomiczne uzyskane w wyniku sekwencjonowania transkryptomu 100 genotypów buraka cukrowego [*temat badawczy 3*].

Metody badawcze:

- Genotypowanie 200 form techniką qPCR z wykorzystaniem różnicujących sond molekularnych typu TaqMan. Zastosowano zestaw składający się z dwóch primerów flankujących region, w którym zlokalizowany jest SNP oraz dwóch sond molekularnych. Sondy zaprojektowano uprzednio w dwóch wariantach (dla każdego z nukleotydów różnicujących) i znakowano barwnikami fluorescencyjnymi: FAM lub VIC [*temat badawczy 1*];
- Amplifikacji kompletnych sekwencji wybranych genów i konstrukcja bibliotek do sekwencjonowania. Sekwencjonowanie biblioteki za pomocą techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) firmy Illumina na aparacie iSeq100, kontrola jakości i obróbka danych [*temat badawczy 2*];
- Analiza sekwencyjna i projektowanie systemów detekcji składających się z dwóch primerów flankujących region, w którym zlokalizowany jest SNP oraz dwóch sond molekularnych w obrębie sekwencji których jest on zlokalizowany. Sondy zaprojektowano w dwóch wariantach (dla każdego z nukleotydów różnicujących) i wyznakowano barwnikami fluorescencyjnymi FAM oraz VIC [*temat badawczy 2*];
- Analizy bioinformatyczne, wybór markerów SNP o największej informatywności i obliczenie użyteczności kombinacji krzyżówkowej, co pozwoliło na ocenę potencjału hodowlanego różnych par genotypów buraka cukrowego [*temat badawczy 3*].

Wyniki – temat badawczy 1.

Genotypowanie analizowanych form buraka cukrowego

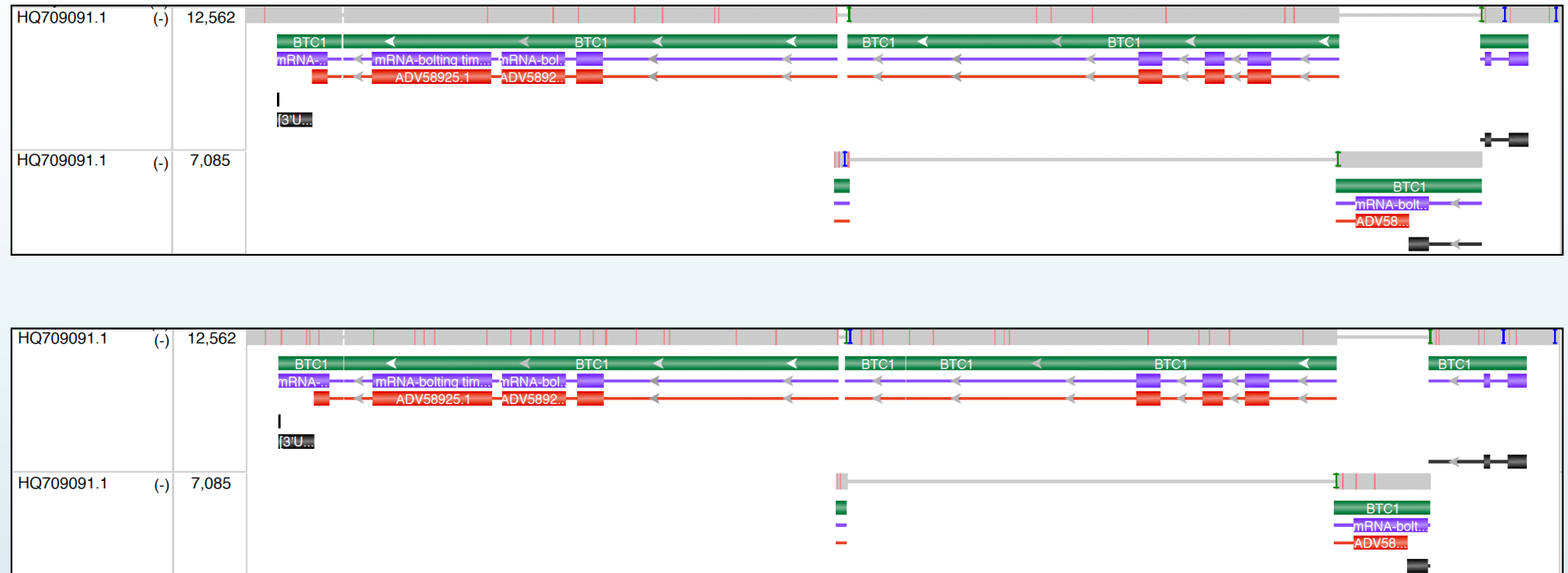
Początkowo do genotypowania zastosowano zaprojektowany w roku 2022 system oparty o identyfikację modyfikacji typu SNP zlokalizowanej w pozycji 380 eksonu 8. genu *BvBTC1*. W wyniku przeprowadzonych prac wykazano, że marker ten poprawnie identyfikował formy pośpiechowate w przypadku gdy odsetek pośpiechów był bardzo duży, natomiast w przypadku mniejszej ilości roślin pośpiechowatych nie pozwolił na odróżnienie tych genotypów od form dla których nie stwierdzono pojawiania się pośpiechów.

Zaprojektowano dwa systemy detekcji stosując jako zmienności różnicujące SNP zlokalizowane w pozycji 164 eksonu 7. oraz pozycji 79 eksonu 8. genu *BvBTC1*. Do projektowania zastosowano metodykę analogiczną jak w roku ubiegłym. Dodatkowo potwierdzono również specyficznosc każdej z sekwencji zaplanowanych do wykorzystania jako matryca do projektowania systemu detekcji, wykluczając możliwość występowania w genomie buraka cukrowego sekwencji homologicznej z wykorzystaniem narzędzia BLAST

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Beta vulgaris subsp. vulgaris genome assembly, chromosome: 2	Beta vulgaris su...	481	481	100%	4e-134	99.62%	53658750	OX392557.1
✓	Beta vulgaris subsp. vulgaris genome assembly, chromosome: 2	Beta vulgaris su...	481	481	100%	4e-134	99.62%	52064164	OX392548.1
✓	Beta vulgaris subsp. vulgaris genotype KWS2320 bolting time control 1 (BTC1) gene, complete cds	Beta vulgaris su...	481	481	100%	4e-134	99.62%	14333	HQ709091.1
✓	Beta vulgaris subsp. vulgaris genotype TR520 bolting time control 1 (BTC1) gene, complete cds	Beta vulgaris su...	475	475	100%	2e-132	99.24%	12919	HQ709092.1
✓	Beta vulgaris subsp. vulgaris genotype A906001 bolting time control 1 (BTC1) mRNA, complete cds	Beta vulgaris su...	331	331	69%	4e-89	99.45%	2367	HQ709093.1
✓	Beta vulgaris BvBTC1 gene for bolting time control 1, partial cds	Beta vulgaris	326	326	69%	2e-87	98.90%	2003	LC440565.1
✓	PREDICTED: Beta vulgaris subsp. vulgaris two-component response regulator-like PRR73 (BTC1), trans...	Beta vulgaris su...	326	326	69%	2e-87	98.90%	2954	XM_010694798.4
✓	Beta vulgaris subsp. vulgaris two-component response regulator-like PRR73 (BTC1), mRNA	Beta vulgaris su...	326	326	69%	2e-87	98.90%	2367	NM_001303071.1
✓	Beta vulgaris subsp. vulgaris genotype 93167P bolting time control 1 (BTC1) mRNA, complete cds	Beta vulgaris su...	326	326	69%	2e-87	98.90%	2367	HQ709094.1

Potwierdzenie unikalności sekwencji wykorzystywanej do projektowania systemu detekcji SNP w obrębie genu *BvBTC1*.

Wyniki – temat badawczy 1.



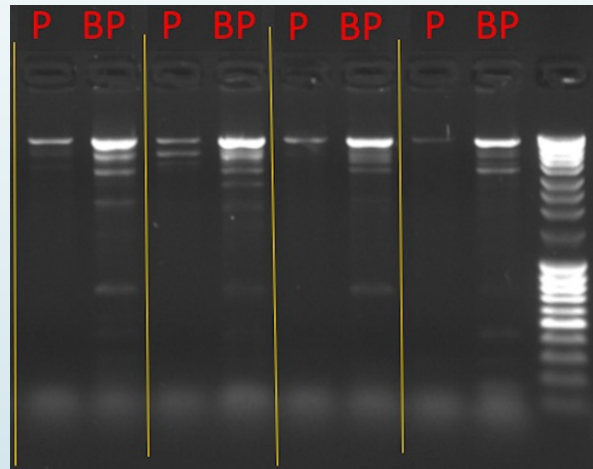
Analiza sekwencyjna genu BvBTC1 dla genotypu IHAR 7/20 (góra) oraz KTA 1802 (dół).

W górnej części schematu pionowymi kreskami oznaczono lokalizację SNPs w porównaniu z formą niepośpiechowatą.

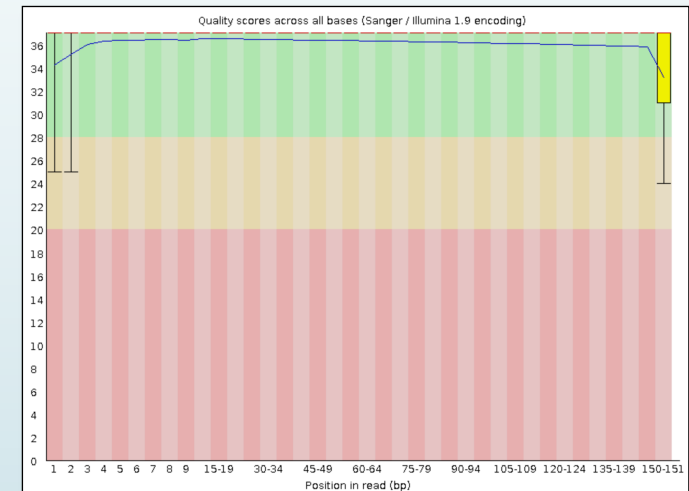
Wyniki – temat badawczy 2.

W ramach dotychczasowych prac dokonano amplifikacji pełnej sekwencji dla wszystkich 8 badanych genów. Dla 5 z nich uzyskano ponadto biblioteki do NGS, wykonano sekwencjonowanie oraz zaprojektowano system detekcji w oparciu o sondy znakowane fluorochromami. Zastosowana metodyka pozwoliła na uzyskanie amplikonów o oczekiwanych długościach dla wszystkich 8 analizowanych genów.

Zastosowanie zaplanowanej metodyki badawczej umożliwiło uzyskanie bibliotek do sekwencjonowania o wysokiej jakości i oczekiwanej dystrybucji fragmentów, a analiza QC uzyskanych wyników sekwencjonowania potwierdziła bardzo wysoką jakość uzyskanych odczytów.



Analiza poprawności amplifikacji pełnej sekwencji genu KMT 14391 dla 8 badanych genotypów buraka cukrowego (P – formy pośpiechowate; BP – formy nie tworzące pośpiechów).



Analiza jakości uzyskanych odczytów sekwencji wykonana w programie FastQC.

Wyniki – temat badawczy 2.

Na podstawie wyników analizy sekwencyjnej scharakteryzowano strukturę każdego z analizowanych genów

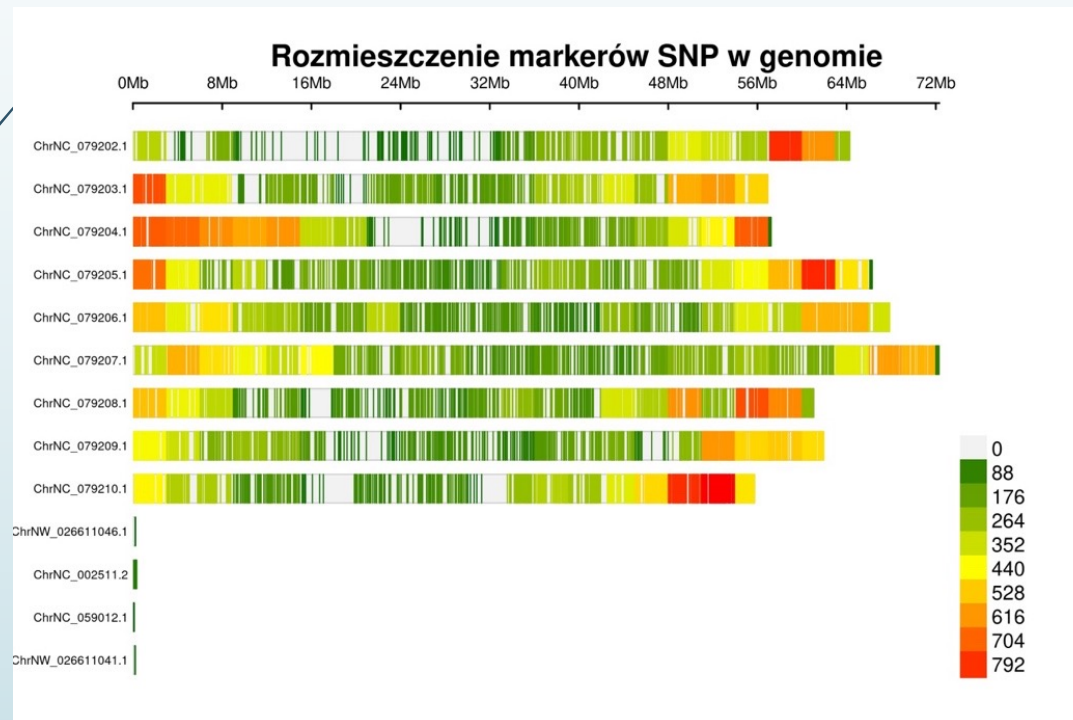
W oparciu o uzyskane wyniki dla analizowanych transkryptów opracowany został system detekcji SNPs. Opracowane rozwiązania poddane zostaną walidacji na kolejnym etapie realizacji projektu. Obecnie systemy detekcji opracowano dla 7 SNPs zlokalizowanych w obrębie sekwencji kodujących 5 genów.

Charakterystyka strukturalna analizowanych genów w obrębie których zidentyfikowano SNPs asocjowane z tendencją roślin buraka cukrowego do pośpiechowości.

Symbol transkryptu	Liczba eksonów	Pozycja SNP	Ekson w obrębie którego zlokalizowany jest SNP	Wariant niepośpiechowaty	Wariant pośpiechowaty
KMT 14391	3	1942	3.	G	T
KMT 14391	3	479	1.	T	C
KMT 14391	3	1557	3.	C	T
KMT 00925	4	422	2.	G	S
KMT 14205	7	1383	6.	T	C
KMT 19544	13	1239	10.	C	S
KMT 07885	15	703	1.	G	S

Wyniki – temat badawczy 3.

W wyniku genotypowania populacji 100 genotypów buraka cukrowego metodami *in silico* otrzymano 214168 wysoce wiarygodnych polimorfizmów SNP. Do dalszych analiz zdecydowano o wyborze markerów o współczynniku zmienności powyżej 0.32, aby wykorzystać tylko najbardziej informatywne warianty. Po selekcji uzyskano 53274 wysoce wiarygodnych i wysoce informatywnych wariantów pojedynczego polimorfizmu. Selekcja markerów nie wpłynęła na rozmieszczenie markerów i wyselekcjonowany zestaw nadal rozmieszczony jest w całym genomie.



Rozmieszczenie w genomie wybranego zestawu markerów o wysokiej wartości współczynnika PIC.

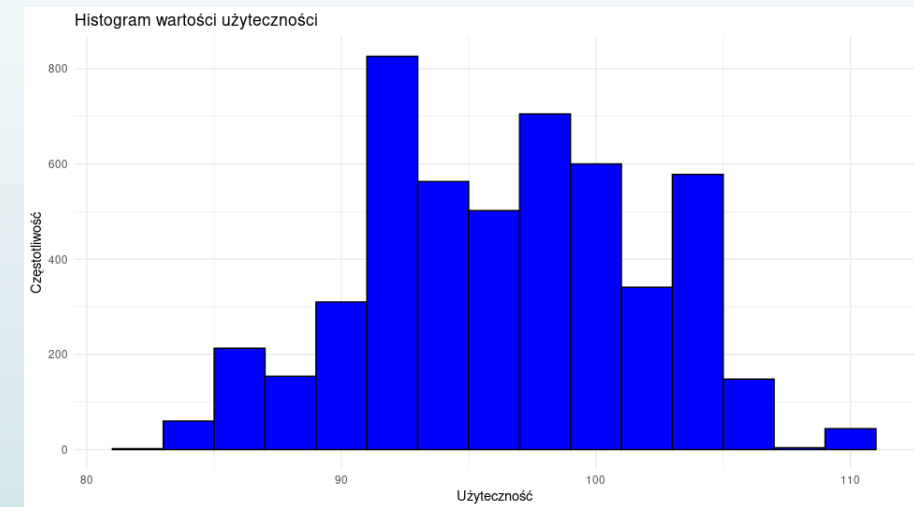
Wyniki – temat badawczy 3.

Na podstawie wyników uzyskanych z wyselekcjonowanej frakcji markerów można zaobserwować, że w analizowanej populacji występuje stosunkowo wysoka zmienność, wartości dystansu w przedziale 0,4 – 0,5. Niemniej jednak można wyróżnić 4 klastry genotypów o niskim dystansie, co sugeruje, że są one ze sobą spokrewnione i nie powinny być wykorzystywane w dalszych programach hodowlanych. W ramach klastrów zgrupowane są genotypy:

- SD_1454xDH_17-68; SD_1454xDH_17-66; SD_1454xDH_17-61; SD13 5 x RWD18 17; SD13 5 x RWD18 18
- SD13 5 x RWD18 20; SD_1454xDH_17-73; SD_1454xDH_17-74
- SD_1454xDH_17-47; SD_1454xDH_17-34
- RWD12_290_x_FMS09_4; RWD12_258_x_FMS09_4

Większość kombinacji krzyżowań przyjmuje wartości 100 i mniej, jednak istnieją wartości kombinacji, dla których wartość użyteczności przyjmuje wartości ok 110. Takie kombinacje mają potencjał osiągnąć ok 10% wyższe wartości plonu w stosunku do pokolenia rodzicielskiego. Pięć najlepszych kombinacji krzyżowań to:

- [SD_1454xDH_17-35] x [SD1454xRWD17-13] użyteczność: 109.7415
- [SD_1454xDH_17-45] x [SD1454xRWD17-13] użyteczność: 109.6994
- [SD_1454xDH_17-4] x [SD1454xRWD17-13] użyteczność: 109.6582
- [SD1454xRWD17-13] x [SD1454xRWD17-162] użyteczność: 109.6508
- [SD1454xRWD17-13] x [SD1454xRWD17-217] użyteczność: 109.6508



Histogram wartości użyteczności

Publikacja wyników projektu

Doniesienia konferencyjne (prezentacja):

„Analiza zmienności allelicznej genu *BvBTC1* warunkującego pośpiechowość roślin buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*)” - XII Międzynarodowe Sympozjum „Genetyka Ilościowa i Hodowla Roślin Uprawnych”, 28.02-03.03 2023 r., Karpacz

Mierniki realizacji projektu w roku 2023 (na dzień 27.11.2023 r.)

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
Temat badawczy 1				
1.1.	Liczba linii hodowlanych buraka cukrowego zgenotypowanych z wykorzystaniem markera SNP zlokalizowanego w obrębie genu <i>BvBTC1</i>	200	160	0,80
Temat badawczy 2				
2.1	Liczba zaprojektowanych markerów identyfikujących SNPs asocjowane z tendencją roślin buraka cukrowego do pośpiechowości	10	7	0,70
Temat badawczy 3				
3.1	Ranking indeksu użyteczności dla kombinacji krzyżówkowych materiałów kolekcyjnych	1	1	1,00
			% REALIZACJI ZADANIA	83,0%