

Opracowanie nowych narzędzi biotechnologicznych pozwalających na skuteczną ocenę odporności buraka cukrowego na pośpiechowość 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. Magdalena Sozoniuk, 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

Zadanie nr 24



Cele projektu w roku 2021

Lp.	Cel	Czy zrealizowany
1	Analiza sekwencji transkryptomów uzyskanych dla 12 form buraka cukrowego o zróżnicowanej tendencji do pośpiechowatości i identyfikacja transkryptów, które wykazują asocjację z tendencją do pośpiechowatości	TAK
2	Złożenie transkryptomu referencyjnego buraka cukrowego <i>de novo</i>	TAK
3	Fenotypowanie zestawu materiałów hodowlanych buraka cukrowego, określenie ich skłonności do pośpiechowatości oraz wybór genotypów skrajnie różnych pod kątem tej cechy	TAK
4	Określenie sekwencji kodującej genu <i>BvBTC1</i> dla 6 linii hodowlanych buraka cukrowego o zróżnicowanej tendencji do pośpiechowatości	TAK

Material i metody

Material badawczy:

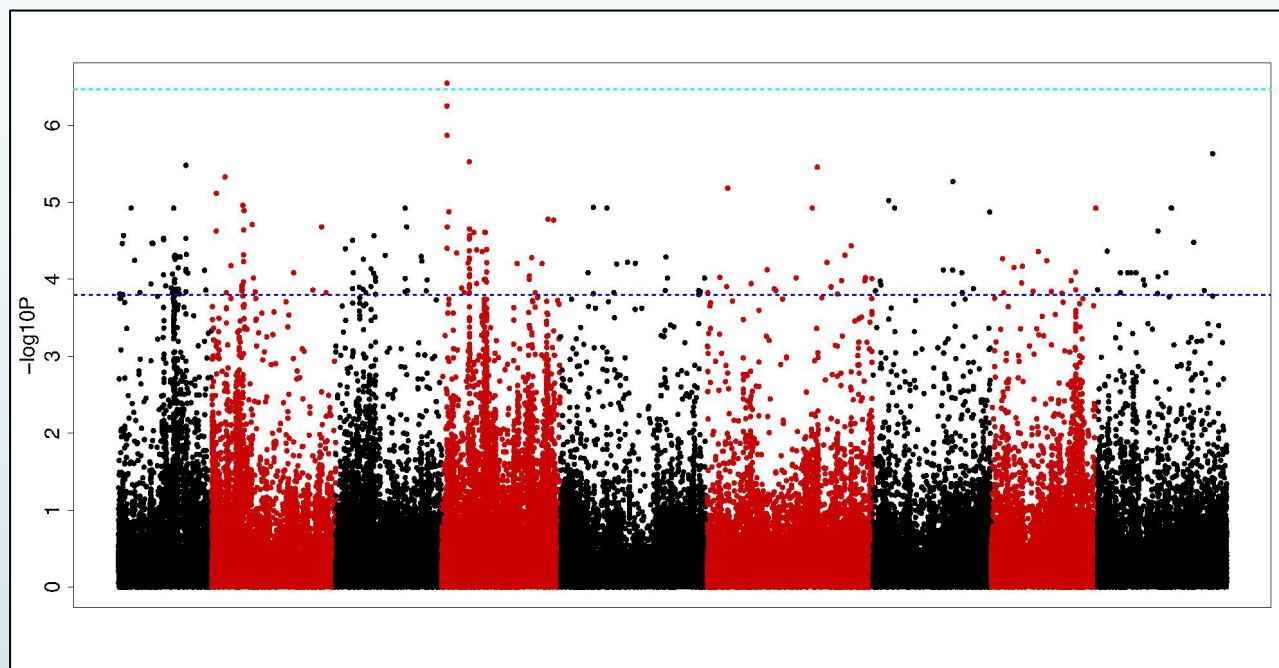
- Dane obejmujące sekwencje transkryptomów 100 linii hodowlanych buraka cukrowego pochodzących z kolekcji spółki Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o. Spośród badanych linii 12 zostało uprzednio scharakteryzowane pod kątem tendencji do uzyskiwania roślin pośpiechawatych na podstawie wieloletnich obserwacji [*tematy badawcze 1 i 2*];
- 20 linii hodowlanych buraka cukrowego pochodzących z kolekcji spółki KHBC Sp. z o.o. [*tematy badawcze 3 i 4*].

Metody badawcze:

- Analiza i ocena polimorfizmów typu SNP oraz zmian na poziomie funkcjonalnym asocjowanych ze skłonnością do pośpiechowości techniką Associative Transcriptomics [*temat badawczy 1*];
- Kontrola jakości danych pochodzących z RNAseq dla 100 linii hodowlanych, ich obróbka [*temat badawczy 2*];
- Doświadczenie polowe na poletkach o powierzchni 10 m². W lipcu dokonano oceny i zliczania roślin, które wytworzyły pęd kwiatowy. W sierpniu dokonano powtórnej obserwacji w celu weryfikacji, czy na poletkach nie pojawiły się tzw. pośpiechy późne [*temat badawczy 3*].
- Izolacja DNA, ocena jakościowa i ilościowa, projektowanie primerów, amplifikacji kodujących sekwencji genu *BvBTC1* dla badanych genotypów [*temat badawczy 4*].

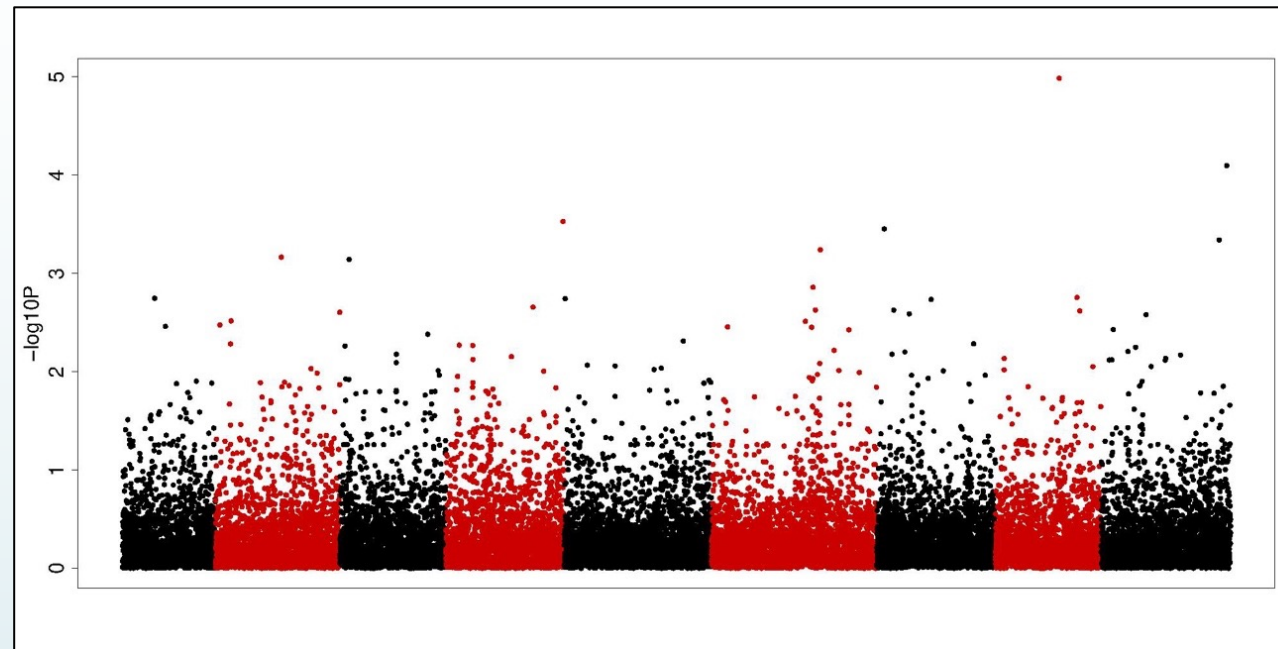
Wyniki – temat badawczy 1.

W wyniku przeprowadzonych prac zidentyfikowano transkrypty różnicujące formy, które charakteryzowały się kwitnieniem w pierwszym roku uprawy od form nie wykazujących takich tendencji. Wyniki zaprezentowano w formie wykresów typu Manhattan plot odpowiednio dla zmian strukturalnych (SNP) oraz funkcjonalnych (GEM).



Wykres asocjacji analizowanych markerów strukturalnych SNP w obrębie transkryptomu z tendencją buraka cukrowego do pośpiechowości.

Wyniki – temat badawczy 1.



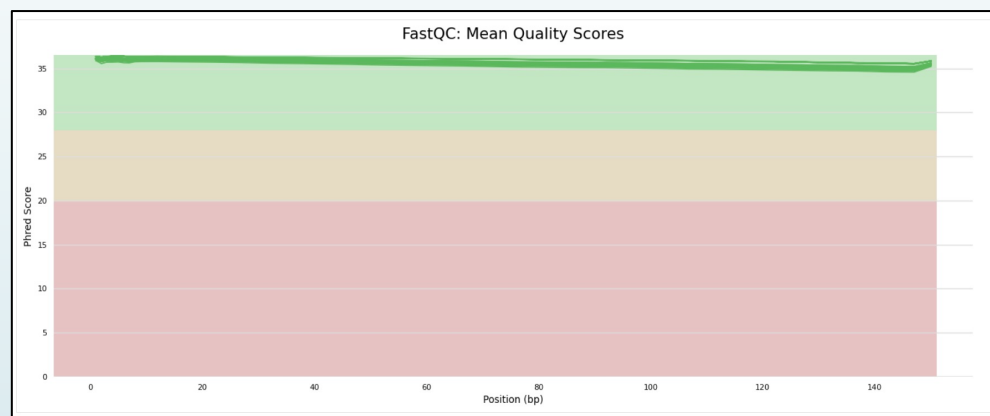
Wykres asocjacji analizowanych markerów funkcjonalnych GEM w obrębie transkryptomu z tendencją buraka cukrowego do pośpiechowatości.

WNIOSKI:

1. Najsilniejszą asocjację z tendencją do pośpiechowatości na poziomie markerów SNP wykazują transkrypty genów zlokalizowanych na chromosomie 4. buraka cukrowego.
2. Dla markerów funkcjonalnych GEM transkrypty o najsilniejszej asocjacji zlokalizowane były na chromosomach 8. oraz 9.

Wyniki – temat badawczy 2.

W pierwszym etapie dane pochodzące z RNAseq poddane zostały procesowi czyszczenia. Do tych czynności wykorzystane zostało oprogramowanie Trimmomatic. Po czyszczeniu uzyskano oczyszczone odczyty dla których wykonano raport jakości za pomocą programu fastqc. Analogicznie jak dla surowych danych raport dla każdej próbki został manualnie przeanalizowany pod kątem najważniejszych parametrów. Następnie z wszystkich otrzymanych raportów utworzono raport zbiorczy w programie multiqc:



Tak przygotowane wyniki zostały wykorzystane jako dane wejściowe do złożenia transkryptomu referencyjnego. Zastosowano standardowy potok analityczny w oparciu o program Trinity. Łączna liczba złożonych transkryptów wyniosła 196 537, a transkryptów reprezentujących najdłuższe izoformy 90 984.

Wyniki – temat badawczy 2.

Statystyki bazujące na całym transkryptomie i jedynie najdłuższych izoformach przedstawia poniższa tabela:

Statystyka bazująca na kontigach całego transkryptu		Statystyka bazująca jedynie na najdłuższych izoformach 'na gen'	
Contig N10:	3401	Contig N10:	3414
Contig N20:	2646	Contig N20:	2611
Contig N30:	2190	Contig N30:	2099
Contig N40:	1849	Contig N40:	1662
Contig N50:	1542	Contig N50:	1226

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że jest 1 537 białek, z których każde pasuje do opracowanego transkryptu w przedziale > 80% i <= 90% długości białka. Jest 7 660 białek, które są reprezentowane przez transkrypty prawie pełnej długości, mające powyżej 80% pokrycia dopasowania. Dodatkowo jest 6 123 białek, które są pokryte przez ponad 90%. W przeprowadzonych analizach odnotowane zostało jedynie pojedyncze, najlepsze dopasowanie transkryptu dla każdego najlepiej pasującego wpisu bazy danych SwissProt.

W kolejnym kroku odczyty po kontroli jakości przyrównane zostały do transkryptomu opracowanego w poprzednim kroku. Do mapowania odczytów wykorzystano oprogramowanie bowite2. Analizy wykonano dla wszystkich 100 próbek. Dla większości próbek uzyskano mapowanie na poziomie 90%, co jest wynikiem zadowalającym i powyżej zakładanej minimalnej wartości na poziomie 80%. W wyniku mapowania uzyskano mapy aligmentu (pliki SAM), które następnie przekształcono w pliki binarne BAM. Następnie do nagłówka każdego pliku dodano informacje o numerze próbki. Modyfikację tę wykonano za pomocą funkcji AddorReplaceReadGroup z pakietu Picard. Tak przygotowane pliki zostały następnie posortowane i zindeksowane za pomocą narzędzi samtools.

WNIOSKI:

1. Opracowany transkryptom jest wysokiej jakości, spełnia wszystkie zakładane parametry i będzie stanowił referencję do dalszych analiz prowadzonych w projekcie.

Wyniki – temat badawczy 3.

Na podstawie obserwacji wykonanych w lipcu określono odsetek roślin pośpiechowatych dla każdego z 20 badanych genotypów. Najwyższy zanotowany odsetek wyniósł 17,2% dla linii 2SODMB1M19 267. W przypadku 10 badanych linii nie zaobserwowano roślin tworzących pędy kwiatowe. W wyniku weryfikacji obserwacji polowych w drugim terminie dla trzech genotypów, dla których nie obserwowano uprzednio roślin pośpiechowatych zaobserwowano pojawienie się pojedynczych roślin posiadających pędy kwiatowe: FANTAZJA V2 ZP20 4 (1 szt.), ALICJA ZP20 15 (1 szt.) oraz KUJAVIA KTA20 16 (2 szt.).

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych prac wytypowano po 3 stabilne genotypy skrajne:

Pośpiechowate	Nie tworzące pośpiechów
2SODMB1M19 267	PRESLEY ZP20 23
2SODMB1M19 291	FRh19 1
KTA1802 ZP20 11	FRh20 13

WNIOSKI:

1. Analizowany zestaw 20 linii hodowlanych charakteryzował się zmiennością w tendencji do pośpiechowatości. Odsetek roślin pośpiechowatych wahał się w granicach od 17,2% do 0%.
2. Fenotypowanie roślin buraka cukrowego pod kątem pośpiechowatości wymaga weryfikacji po około dwóch miesiącach od obserwacji. W badanym materiale dla trzech spośród 10 linii dla których fenotypowanie nie wykazało tendencji do pośpiechowatości zidentyfikowano pojedyncze rośliny tworzące tzw. pośpiechy późne.

Wyniki – temat badawczy 4.

Analiza elektroforegramów uzyskanych w wyniku rozdziału produktów reakcji uzyskanych po włączeniu do reakcji analizowanych par primerów specyficznych dla sekwencji kodującej genu *BvBTC1* wykazała, że dla zdecydowanej większości testowanych linii hodowlanych uzyskano pojedynczy, specyficzny amplikon o oczekiwanej długości.

Po amplifikacji z parą specyficznych sekwencyjnie primerów BTC1_1-F i BTC1_1-R w przypadku linii KTA1802 ZP20 na żelu zaobserwowano dodatkowy, krótszy produkt o długości ok. 1200 bp. W przypadku primerów BTC1_4-F i BTC1_4-R oczekiwany amplikon występował w 5 badanych próbkach, a amplifikacji nie zaobserwowano w próbce pochodzącej z linii 2SODMB1M19 291.

Zbiornicze zestawienie wyników amplifikacji uzyskanych w wyniku wszystkich przeprowadzonych reakcji zaprezentowane zostało w tabeli:

Genotyp	Specyficzne sekwencyjnie primery			
	BTC1_1-F BTC1_1-R	BTC1_2-F BTC1_2-R	BTC1_3-F BTC1_3-R	BTC1_4-F BTC1_4-R
2SODMB1M19 267	+	+	+	+
2SODMB1M19 291	+	+	+	-
KTA1802 ZP20 11	++	+	+	+
PRESLEY ZP20 23	+	+	+	+
FRh19 1	+	+	+	+
FRh20 13	+	+	+	+

WNIOSKI:

1. Zaprojektowane pary primerów umożliwiły amplifikację sekwencji kodującej genu *BvBTC1* w badanym materiale genetycznym buraka cukrowego.
2. W wyniku złożenia sekwencji uzyskanych amplikonów uzyskano sekwencję kodującą genu *BvBTC1* o pełnej długości wynoszącej 2 367 nukleotydów dla wszystkich badanych linii buraka cukrowego.

Publikacja wyników projektu

Doniesienia konferencyjne:

1. „Identyfikacja polimorfizmów asocjowanych z tendencją do pośpiechowości w transkryptomie buraka cukrowego” – „Genetyka aplikacyjna roślin - wyzwania XXI wieku”, 22-24.09.2021, Warszawa

Mierniki realizacji projektu w roku 2021

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
Temat badawczy 1				
1.1	Wykonanie analizy sekwencji transkryptomów 12 linii hodowlanych buraka cukrowego o zróżnicowanej tendencji do pośpiechowości	1	1	1,00
Temat badawczy 2				
2.1	Opracowany transkryptom referencyjny dla buraka cukrowego	1	1	1,00
Temat badawczy 3				
3.1	Liczba linii hodowlanych buraka cukrowego o określonej na podstawie doświadczenia polowego tendencji do pośpiechowości	20	20	1,00
Temat badawczy 4				
4.1	Liczba uzyskanych sekwencji kodujących genu BvBTC1 pochodzącego z linii hodowlanych buraka o niskiej tendencji do pośpiechowości	3	3	1,00
4.2	Liczba uzyskanych sekwencji kodujących genu BvBTC1 pochodzącego z linii hodowlanych buraka o wysokiej tendencji do pośpiechowości	3	3	1,00
			% REALIZACJI ZADANIA	100,0%