

# 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

Zadanie nr 24



# Cele projektu w roku 2022

Lp.	Cel	Czy zrealizowany
1.	Analiza porównawcza transkryptów asocjowanych z tendencją do pośpiechowatości na poziomie strukturalnym i funkcjonalnym	TAK
2.	Złożenie transkryptomu referencyjnego buraka cukrowego de novo	TAK
3.	Fenotypowanie zestawu materiałów hodowlanych buraka cukrowego w warunkach doświadczenia polowego, określenie ich skłonności do pośpiechowatości oraz wybór genotypów skrajnie różnych pod kątem tej cechy	TAK
4.	Analiza sekwencji kodującej genu <i>BvBTC1</i> dla 6 linii hodowlanych buraka cukrowego o zróżnicowanej tendencji do pośpiechowatości i opracowanie systemu detekcji dla zmian powiązanych ze zwiększoną skłonnością do pośpiechowatości	TAK

# Materiał i metody

## ***Materiał 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 pośpiechowatych 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:***

- Charakterystyka w obrębie transkryptów zmienności typu SNP asocjowanych z tendencją do pośpiechowatości (identyfikacja pełnej sekwencji transkryptu, lokalizacja zmienności typu SNP, określenie potencjalnych produktów białkowych) oraz analiza poziomu ekspresji transkryptów charakteryzujących się największym stopniem zmienności na poziomie funkcjonalnym (analiza korelacji pomiędzy danymi fenotypowymi dla analizowanej cechy, a poziomem ekspresji 10 wybranych uprzednio transkryptów wyrażonym współczynnikiem RPKM, określenie potencjalnych produktów białkowych) [*temat badawczy 1*];
- Genotypowanie 100 obiektów buraka *in silico* za pomocą markerów SNP i mapowanie odczytów do transkryptomu referencyjnego. Określenie struktury populacji badanych obiektów oraz wizualizacja wyników [*temat badawczy 2*];
- Doświadczenie polowe na poletkach o powierzchni 10 m<sup>2</sup>. Ocena i zliczanie roślin, które wytworzyły pęd kwiatowy w czerwcu, powtórna obserwacja w sierpniu w celu weryfikacji, czy na poletkach nie pojawiły się tzw. pośpiechy późne [*temat badawczy 3*].
- Analizy sekwencji kodującej genu *BvBTC1* i identyfikacja zmian strukturalnych, które powiązane są ze zwiększonym odsetkiem pośpiechów. Projektowanie systemów detekcji pozwalających na ich wykrywanie w materiale genetycznym buraka cukrowego, analiza poprawności funkcjonowania zaprojektowanych markerów molekularnych oraz ich skuteczność w detekcji SNPs [*temat badawczy 4*].

# Wyniki – temat badawczy 1.

## Analiza zmienności strukturalnych (SNP)

Spośród 12 zidentyfikowanych polimorfizmów 4 charakteryzowały się trwałą substytucją nukleotydu. W przypadku pozostałych 8 tendencja do pośpiechowości związana była z heterozygotycznością w danym locus.

Charakterystyka analizowanych polimorfizmów typu SNP asocjowanych z tendencją do pośpiechowości.

Symbol transkryptu	Pozycja SNP	Wariant niepośpiechowaty	Wariant pośpiechowaty	Produkt białkowy	Substytucja aminokwasu
<b>KMT 14391</b>	1942	G	T	Bromodomain-containing protein	G > C
<b>KMT 14391</b>	479	T	C	Bromodomain-containing protein	V > A
<b>KMT 14391</b>	1557	C	T	Bromodomain-containing protein	G > G
<b>KMT 00925</b>	422	G	S	GATase domain-containing protein	
<b>KMT 14205</b>	1383	T	C	ATP-dependent DNA helicase Q-like SIM	D > D
<b>KMT 19544</b>	1239	C	S	Glyco_transf_28 domain-containing protein	
<b>KMT 07885</b>	703	G	S	CLP protease regulatory subunit CLPX1, mitochondrial-like	
<b>KMT 18416</b>	599	A	R	Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.6-like	
<b>KMT 04841</b>	1185	G	R	Developmentally-regulated G-protein 2	
<b>KMT 09597</b>	344	G	R	Calmodulin-lysine N-methyltransferase	
<b>KMT 18257</b>	927	T	Y	Peroxisomal nicotinamide adenine dinucleotide carrier-like	
<b>KMT 06766</b>	1004	G	S	Alcohol acetyltransferase	

# Wyniki – temat badawczy 1.

## Analiza zmienności funkcjonalnych (GEM)

W przypadku zmian funkcjonalnych dla większości z badanych transkryptów poziom ekspresji w formach pośpiechowanych przewyższał odnotowany dla form niepośpiechowanych. Jedynie w przypadku transkryptu KMT 16665 odnotowano schemat odwrotny.

Zidentyfikowane zmienności funkcjonalne charakteryzujące się najsilniejszą asocjacją z tendencją do pośpiechowości w badanych roślinach buraka cukrowego.

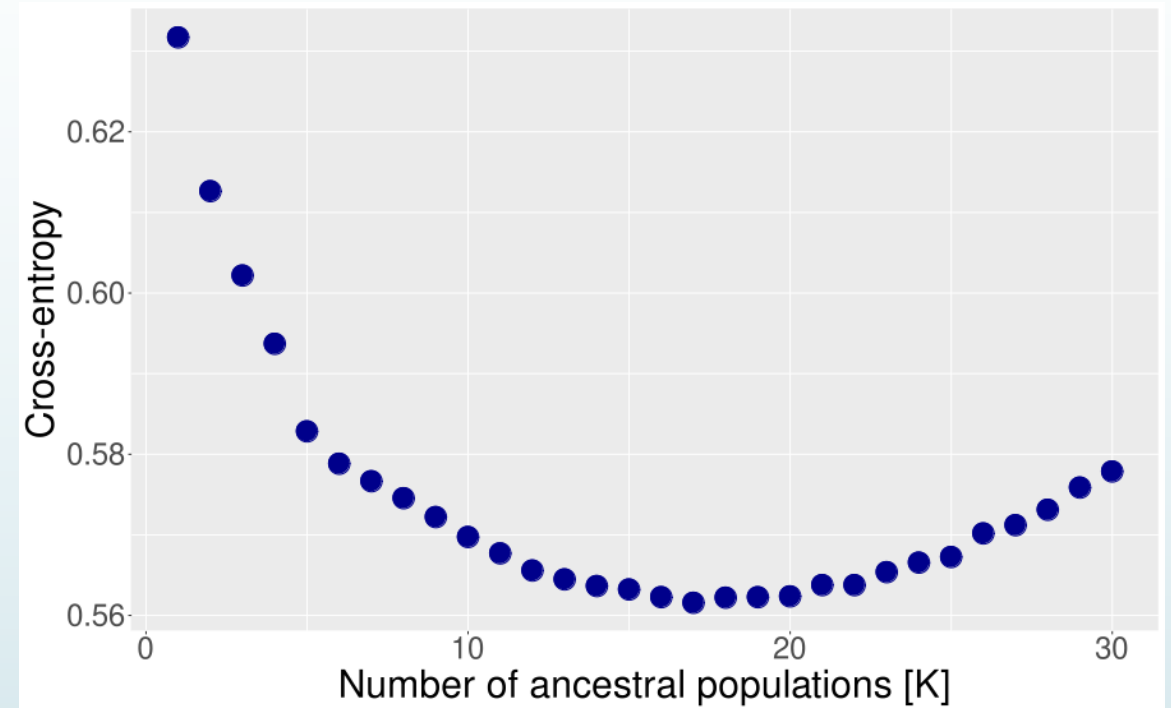
Symbol transkryptu	Średni poziom ekspresji dla form niepośpiechowanych [RPKM]	Średni poziom ekspresji dla form pośpiechowanych [RPKM]	Produkt białkowy
<b>KMT 03505</b>	0,01	0,69	Isocitrate lyase
<b>KMT 01115</b>	0,47	2,82	BHLH domain-containing protein
<b>KMS 95718</b>	3,80	10,39	DOMON domain-containing protein
<b>KMT 12652</b>	0,00	0,29	DUF5734 domain-containing protein
<b>KMT 06609</b>	0,00	0,09	RING-H2 finger protein ATL46-like
<b>KMT 00976</b>	0,02	0,15	Aa_trans domain-containing protein
<b>KMT 07868</b>	11,11	23,57	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
<b>KMT 17921</b>	0,00	0,05	KIX_2 domain-containing protein
<b>KMT 16665</b>	12,36	8,48	PHD-type domain-containing protein
<b>KMT 08034</b>	0,11	0,63	Hydrolase_4 domain-containing protein

## WNIOSKI:

1. Modyfikacje strukturalne białka zawierającego bromodomenę kodowanego przez transkrypt KMT14391 związane są z regulacją kwitnienia i tendencją do pośpiechowości roślin buraka cukrowego.
2. Analiza na poziomie ekspresji genów wykazała, że dla większości transkryptów asocjowanych z tendencją do pośpiechowości cecha ta jest związana ze wzmocnieniem ekspresji określonych genów, a nie ich wyciszaniem.

# Wyniki – temat badawczy 2.

Optymalna liczba klastrow w badanej populacji wyznaczona została po analizie drzewa dystansu oraz za pomocą algorytmu 'k-means', który znajduje zadaną liczbę grup (k), maksymalizując wariancję między grupami. Aby wyznaczyć optymalną liczbę klastrow (grup) algorytm 'k-means' uruchomiony został przy różnych (wzrastających) wartościach k, a otrzymane wyniki zostały porównane ze sobą za pomocą indeksu BIC (ang. Bayesian Information Criterion). Dodatkowo optymalna liczba grup w badanej populacji została wyznaczona za pomocą algorytmu cross-entropy criterion. Wyniki obydwu analiz (BIC, cross-entropy) porównane zostały poprzez analizę molekularnej wariancji (AMOVA) w celu wskazania optymalnej struktury badanej populacji.

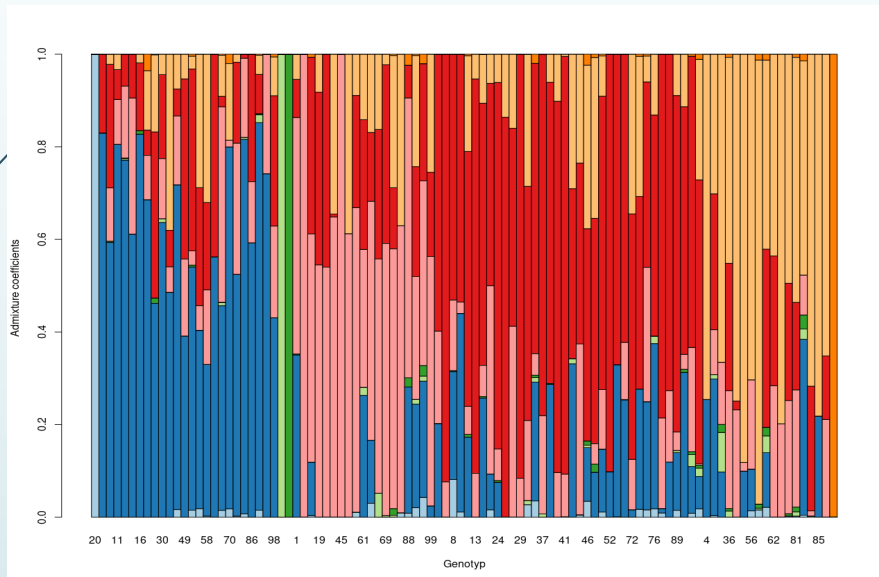


Wyniki analizy Cross-Entropy – optymalna liczba subpopulacji [K] wynosiła 8.

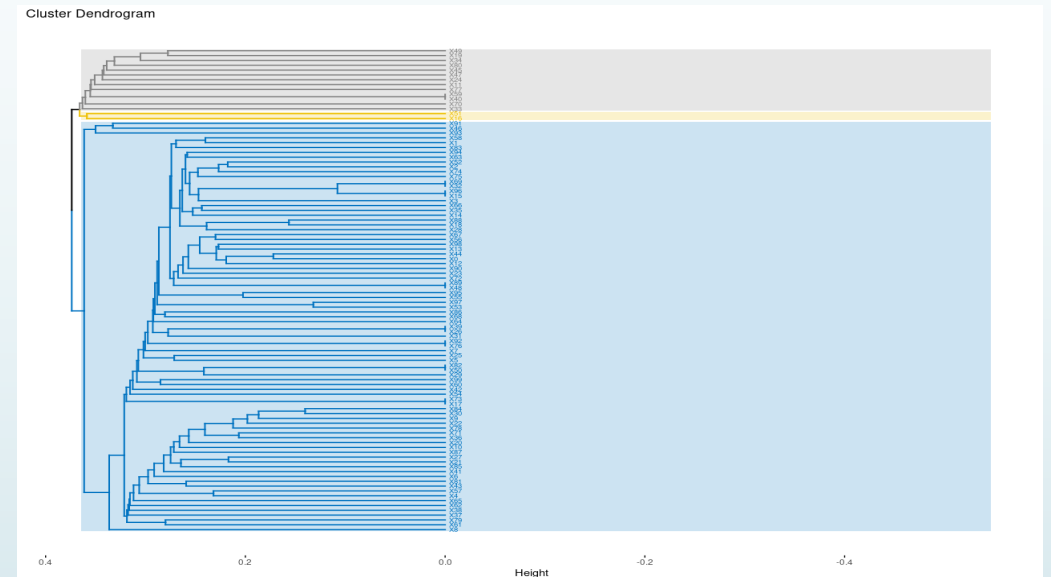
# Wyniki – temat badawczy 2.

Analiza structure-like pozwoliła na podział badanych obiektów na 8 subpopulacji.

Na podstawie wyników genotypowania obliczono dystans genetyczny pomiędzy analizowanymi genotypami za pomocą dwóch algorytmów Nei oraz Roger'a. Wartość korelacji między otrzymanymi macierzami dystansu wynosi 0,998 co sugeruje, że oba zastosowane algorytmy wskazują praktycznie identyczne wartości dystansu między badanymi obiektami. Ponieważ wartości dystansu były bardzo zbliżone do stworzenia drzewa dystansu użyto macierzy uzyskanej dla metody Nei. Drzewo dystansu utworzono za pomocą metody UPGMA i wizualizowano za pomocą pakietów programu R.



Udział poszczególnych subpopulacji – wykres typu structure.



Drzewo dystansu genetycznego – metoda UPGM, macierz dystansu Nei.

## WNIOSKI:

1. Analiza molekularnej wariancji (AMOVA) w celu wskazania optymalnej struktury badanej populacji pozwoliła na ocenę różnicowania genetycznego i wskazanie grup heterogennych w badanym materiale.

# Wyniki – temat badawczy 3.

Na podstawie obserwacji wykonanych w czerwcu określono odsetek roślin pośpiechowatych dla każdego z badanych genotypów. W wyniku weryfikacji obserwacji polowych w drugim terminie dla czterech genotypów, sklasyfikowanych uprzednio jako formy niepośpiechowate zaobserwowano pojawienie się roślin posiadających pędy kwiatowe.

Wyniki fenotypowania uzyskane dla 5 spośród 6 wytypowanych do dalszych badań w roku 2021 genotypów były w roku bieżącym zbieżne. Jedynie w przypadku genotypu PRESLEY ZP20 23, który w roku 2021 był całkowicie pozbawiony roślin pośpiechowatych, w roku 2022 stwierdzono pojawienie się 3 szt. roślin pośpiechowatych w drugim terminie oceny. W związku z tym podjęto decyzję o zastąpieniu go genotypem TRADYCJA ZP20 21, dla którego w trakcie żadnej z ocen nie stwierdzono obecności roślin pośpiechowatych.

Finalny zestaw genotypów wykorzystanych do analizy strukturalnej sekwencji kodującej genu *BvBTC1* w zadaniu 4. kształtował się następująco:

Pośpiechowate	Nie tworzące pośpiechów
2SODMB1M19 267	TRADYCJA ZP20 21
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 0% do 100%.
2. Fenotypowanie roślin buraka cukrowego pod kątem pośpiechowatości na potrzeby analiz molekularnych powinno być wykonane w co najmniej dwóch sezonach wegetacyjnych w celu zredukowania szansy uzyskania niejednoznacznych wyników.



# Wyniki – temat badawczy 4.

Analiza sekwencyjna wykazała, że badane formy niepośpiechowane charakteryzowały się typowym haplotypem *btc1a*. Na podstawie analizy sekwencji kodującej genu *BvBTC1* ten sam haplotyp stwierdzono w przypadku pośpiechowanej formy 2SODMB1M19 291, co wskazuje na funkcjonowanie w tym genotypie odmiennego mechanizmu regulacji kwitnienia. W przypadku pozostałych form pośpiechowanych: 2SODMB1M19 267 oraz KTA1802 ZP20 11 w obrębie sekwencji kodującej genu *BvBTC1* zidentyfikowano 9 zmienności typu SNP:

Charakterystyka polimorfizmów typu SNP charakterystycznych dla form pośpiechowanych zidentyfikowanych w obrębie sekwencji kodującej genu *BvBTC1*.

SNP	Ekson	Pozycja
A > C	3	360
A > G	7	74
G > T		163
T > A	8	157
A > G		380
A > G	9	401
C > T		475
G > A		541
A > G	10	132

W wyniku weryfikacji rezultatów stwierdzono, że zaprojektowane w ramach zadania systemy detekcji pozwoliły na skuteczną identyfikację 5 z 9 zidentyfikowanych zmienności typu SNP. Uzyskane dla wytypowanych 5 markerów obrazy prezentowały w większości przypadków oczekiwaną dystrybucję genotypów na formy pośpiechowane i niepośpiechowane.

## WNIOSKI:

1. Modyfikacje strukturalne w obrębie sekwencji genu *BvBTC1* stanowią mechanizm molekularny determinujący tendencję roślin buraka cukrowego do pośpiechowości, niemniej jednak w przypadku części form pośpiechowanych obserwuje się haplotyp typowy dla form niepośpiechowanych. Formy te stanowią cenny materiał do dalszych prac w kierunku identyfikacji nowych mechanizmów regulacji kwitnienia u tego gatunku.

# Publikacja wyników projektu

## Doniesienia konferencyjne:

1. „Identification of SNPs Associated with Low Bolting Tendency in the Transcriptome of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*)” - VI Polski Kongres Genetyki, 27-30.06.2022 r., Kraków

## Mierniki realizacji projektu w roku 2022

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
<b>Temat badawczy 1</b>				
1.1.	Liczba transkryptów ze scharakteryzowanymi zmiennościami typu SNP asocjowanymi z tendencją do pośpiechowatości	10	10	<b>1,00</b>
1.2.	Liczba transkryptów ze scharakteryzowanymi zmianami poziomu ekspresji asocjowanymi z tendencją do pośpiechowatości	10	10	<b>1,00</b>
<b>Temat badawczy 2</b>				
2.1	Macierz dystansu genetycznego wraz z podziałem obiektów na grupy	1	1	<b>1,00</b>
<b>Temat badawczy 3</b>				
3.1	Liczba linii hodowlanych buraka cukrowego o określonej na podstawie doświadczenia polowego tendencji do pośpiechowatości	20	20	<b>1,00</b>
<b>Temat badawczy 4</b>				
4.1	Liczba opracowanych markerów molekularnych zlokalizowanych w obrębie sekwencji kodującej genu <i>BvBTC1</i> powiązanych ze zwiększoną tendencją roślin buraka cukrowego do pośpiechowatości	3	3	<b>1,00</b>
			<b>% REALIZACJI ZADANIA</b>	<b>100,0%</b>