

# 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 <i>BvBTC1</i> na szerokim zakresie materiałów hodowlanych, obejmującym 200 linii o zróżnicowanej tendencji do pośpiechowatości	TAK
2.	Projektowanie markerów molekularnych pozwalających na identyfikację zmian typu SNP zidentyfikowanych w transkryptomie buraka cukrowego, które wykazały najsilniejszą asocjację z tendencją do pośpiechowatości	TAK
3.	Genotypowanie 100 form buraka cukrowego z wykorzystaniem markerów SNP przeznaczonych do identyfikacji grup heterogennych	TAK

# 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 pośpiechovatych [*tematy badawcze 1 i 2*];
- Dane dotyczące SNP zidentyfikowanych w obrębie transkryptów asocjowanych z tendencją do pośpiechowości [*temat badawczy 2*];
- Dane transkryptomyczne 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.



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 1.

Analiza sekwencyjna genu *BvBTC1* dla genotypu KTA 1802 (L) oraz IHAR 7/20 (P).

Ekson	Pozycja	SNP	Substytucja aminokwasu
1	77	T / G	UTR
	122	- / T	UTR
3	361	A / C	H > P
	487	A / T	K > N
5	89	C / T	N > N
6	89	T / G	I > S
7	75	A / G	P > P
	164	G / T	G > V
8	79	C / A	T > K
	158	T / A	P > L
	250	G / A	R > H
9	37	A / G	T > T
	402	A / G	H > R
	476	C / T	P > S
	542	G / A	E > K
10	72	A / G	V > V
	133	A / G	UTR
	156	G / A	UTR
	330	T / A	UTR

Ekson	Pozycja	SNP	Substytucja aminokwasu
7	164	G / T	G > V
8	79	C / A	T > K
9	29	G / A	G > S

## Genotypowanie analizowanych form buraka cukrowego

Zaprojektowano dwa systemy detekcji stosując jako zmienności różnicujące SNP zlokalizowane w pozycji 164 eksonu 7. oraz pozycji 79 eksonu 8. genu *BvBTC1*.

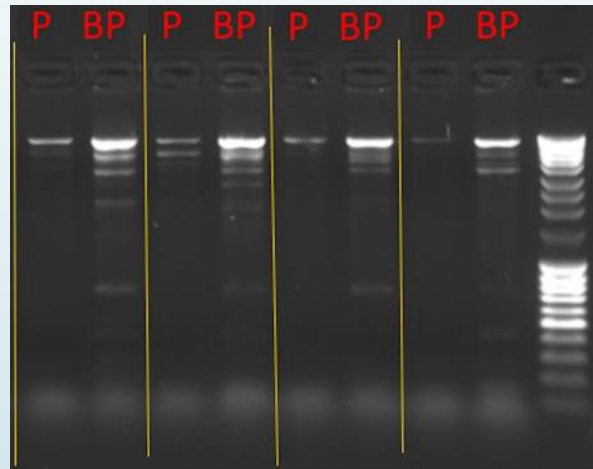
### WNIOSKI:

1. Zaprojektowany marker pozwolił na identyfikację zmian strukturalnych typu SNP w obrębie sekwencji kodującej genu *BvBTC1*, odpowiedzialnego za regulację kwitnienia roślin buraka cukrowego.
2. Zmienność w *BvBTC1* stanowi jeden z mechanizmów determinujących tendencję roślin buraka cukrowego do pośpiechowości, niemniej do pełnego poznania uwarunkowania tego zjawiska konieczna jest szersza analiza innych modyfikacji o podłożu strukturalnym i/lub funkcjonalnym.
3. Uzyskane wyniki sugerują, że nagromadzenie modyfikacji strukturalnych w obrębie sekwencji kodującej genu *BvBTC1* skutkować może zwiększeniem tendencji roślin buraka cukrowego do pośpiechowości i większym odsetkiem genotypów pośpiechowatych w populacji, niemniej wymaga to dalszej weryfikacji.

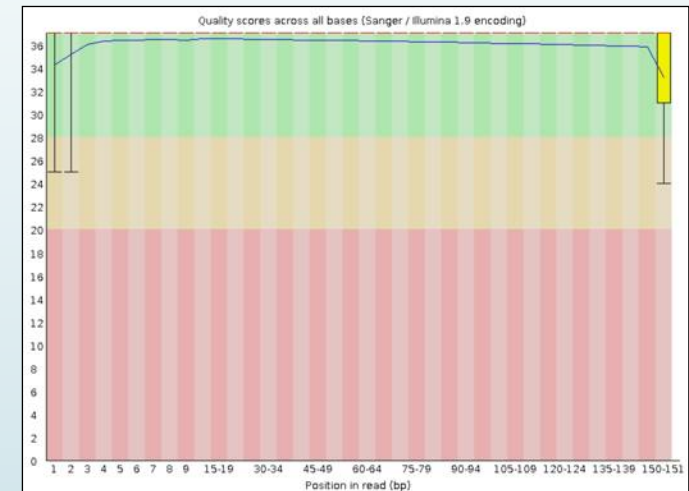
# Wyniki – temat badawczy 2.

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

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
KMT 18416	4	599	2.	A	R
KMT 04841	11	1185	5.	G	R
KMT 09597	7	344	1.	G	R

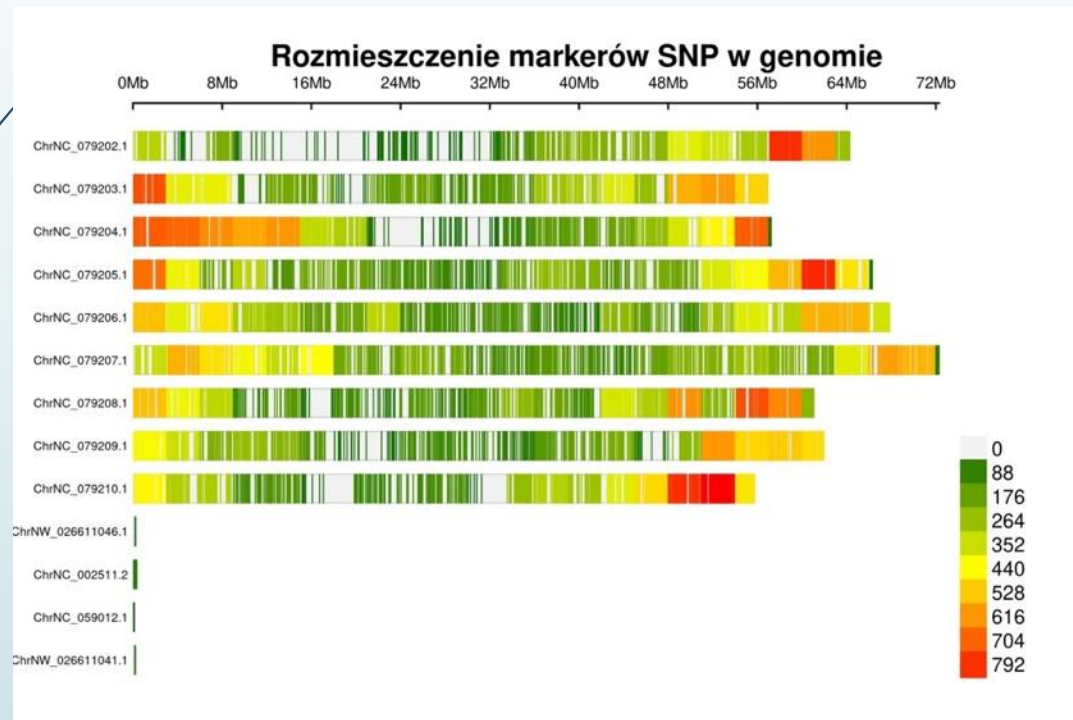
## WNIOSKI:

1. Zaproponowana metodyka badawcza pozwoliła na charakterystykę strukturalną badanych genów i identyfikację zmienności typu SNP z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji.
2. Zidentyfikowane polimorfizmy typu SNP stanowią nowe źródło genetyczne powiązane z regulacją kwitnienia u buraka cukrowego, determinujące tendencję roślin do pośpiechowości.



# 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.



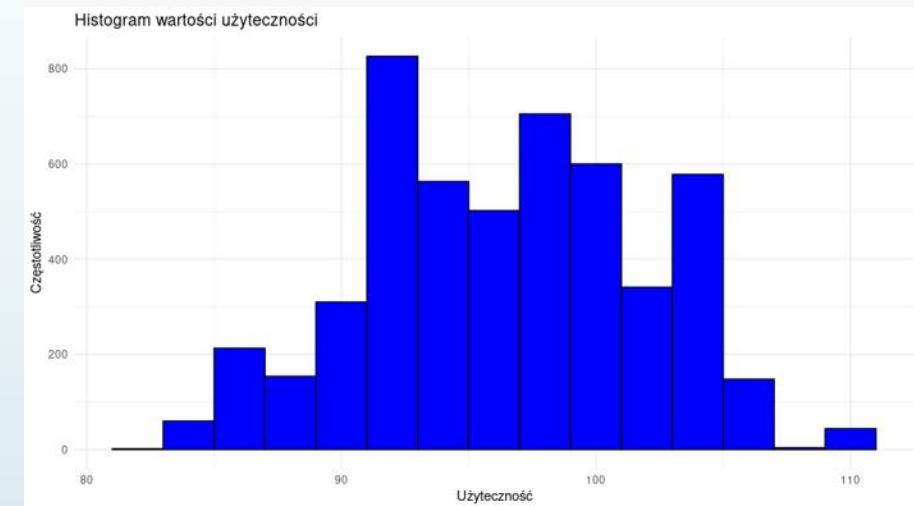
# Wyniki – temat badawczy 3.

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

## WNIOSKI:

1. Analiza krzyżowań wskazuje, że istnieją specyficzne kombinacje genotypów, które mogą przynieść wyższe plony. Pięć najlepszych kombinacji krzyżowań sugeruje istotny potencjał hodowlany dla tych par genotypów, co może prowadzić do zwiększenia wydajności plonów w przyszłych pokoleniach.

# 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

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
<b>Temat badawczy 1</b>				
<b>1.1.</b>	Liczba linii hodowlanych buraka cukrowego zgenotypowanych z wykorzystaniem markera SNP zlokalizowanego w obrębie genu <i>BvBTC1</i>	200	200	<b>1,00</b>
<b>Temat badawczy 2</b>				
<b>2.1</b>	Liczba zaprojektowanych markerów identyfikujących SNPs asocjowane z tendencją roślin buraka cukrowego do pośpiechowości	10	10	<b>1,00</b>
<b>Temat badawczy 3</b>				
<b>3.1</b>	Ranking indeksu użyteczności dla kombinacji krzyżówkowych materiałów kolekcyjnych	1	1	<b>1,00</b>
			<b>% REALIZACJI ZADANIA</b>	<b>100,0%</b>