

# 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**, prof. dr hab. Kamila Nowosad, dr inż. Justyna Leśniowska-Nowak, dr inż. Tomasz Ociepa, dr Kamil Kostyn, mgr inż. Karolina Różaniecka, inż. Weronika Grzelak

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 2024

Lp.	Cel	Czy zrealizowany
1.	Walidacja poprawności funkcjonowania zaprojektowanych markerów dla SNP zlokalizowanych w obrębie transkryptów asocjowanych z tendencją do pośpiechowatości	TAK
2.	Analiza ilościowa wybranych transkryptów, których zmiany wykazały najsilniejszą asocjację z tendencją do pośpiechowatości	TAK
3.	Oszacowanie efektu heterozji na podstawie analizy plonowania pokolenia F <sub>1</sub> uzyskanego w wyniku krzyżowań w oparciu o zidentyfikowane uprzednio grupy heterogenne	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 [*temat badawczy 1*];
- Linie hodowlane buraka cukrowego (85) pochodzące z kolekcji spółki Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o., scharakteryzowane pod kątem tendencji do uzyskiwania roślin pośpiechovatych oraz dane dotyczące zidentyfikowanych uprzednio w transkryptomie buraka cukrowego markerów typu GEM asocjowanych z tendencją do pośpiechowości [*temat badawczy 2*];
- Dane uzyskane w wyniku analizy użyteczności dla każdej możliwej kombinacji krzyżowań uzyskane w ramach realizacji projektu w poprzednim roku oraz dane transkryptomyczne uzyskane w wyniku sekwencjonowania transkryptomu 100 genotypów buraka cukrowego [*temat badawczy 3*].

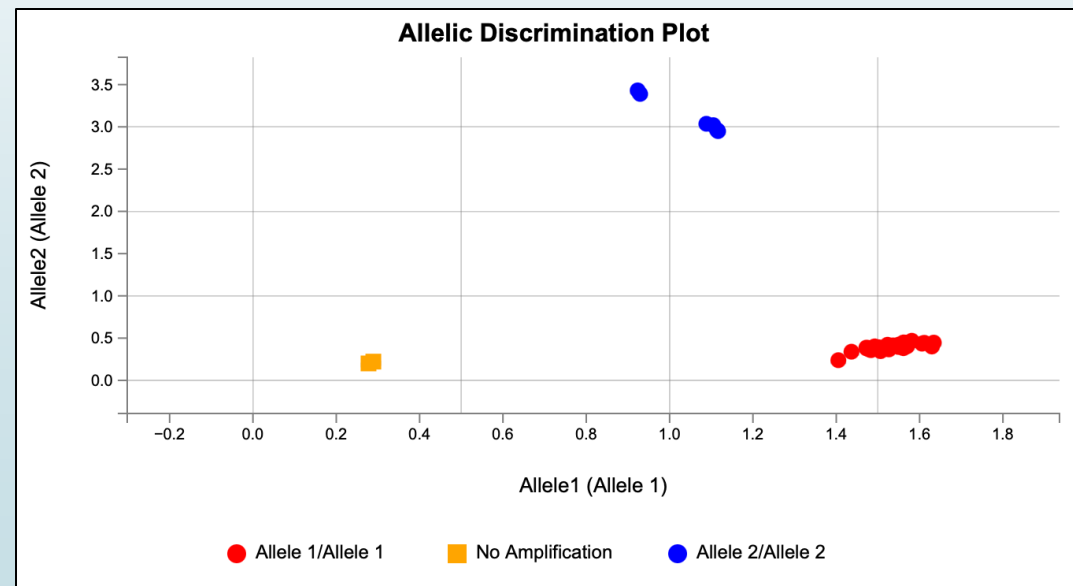
## ***Metody badawcze:***

- Izolacja genomowego DNA, genotypowanie badanych form techniką qPCR z wykorzystaniem różnicujących sond molekularnych typu TaqMan dla trzech SNPs zlokalizowanych w obrębie transkryptu KMT 14391 [*temat badawczy 1*];
- Izolacja RNA, ocena ilościowa i jakościowa otrzymanych preparatów, odwrotna transkrypcja RNA na cDNA, projektowanie systemu analizy ekspresji dla 10 potencjalnych genów referencyjnych, wybór dwóch genów referencyjnych o najwyższej stabilności ekspresji w badanym materiale [*temat badawczy 2*];
- Analizy bioinformatyczne – genotypowanie i predykcja hybryd *in silico*, ocena heterozygotyczności dla markerów typu SNP, analiza dystansu genetycznego oraz Składników Głównych (PCA) i wielowymiarowe skalowanie (MDS). Krzyżowanie wytypowanych form buraka cukrowego w celu uzyskania mieszańców F<sub>1</sub> [*temat badawczy 3*].

# Wyniki – temat badawczy 1.

## Genotypowanie analizowanych form buraka cukrowego

Analiza obecności SNPs w pozycjach: 479, 1557 i 1942 transkryptu KMT 14391, asocjowanych z tendencją do pośpiechowatości wykazała, że część form charakteryzujących się tendencją do pośpiechowatości posiada modyfikacje strukturalne w badanych pozycjach, a zaprojektowane systemy detekcji pozwoliły na skuteczne genotypowanie badanych form buraka cukrowego za pomocą qPCR.

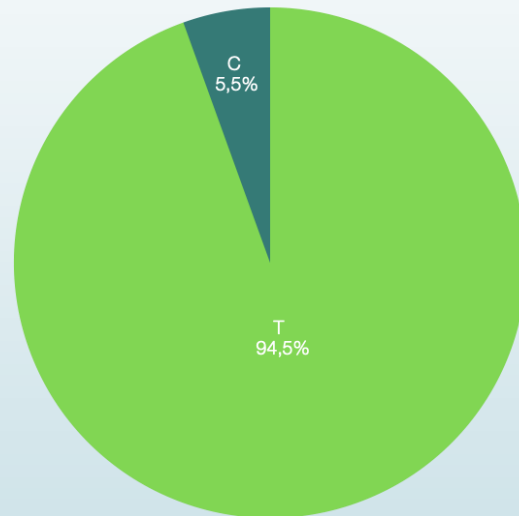


Przykładowy wykres dystrybucji genotypów dla SNP w pozycji 1942 transkryptu KMT 14391.

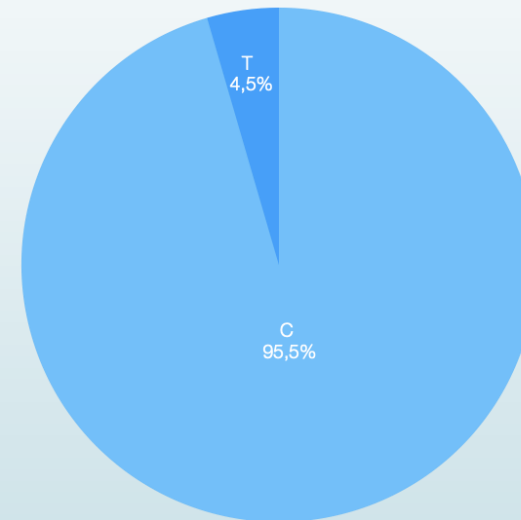
# Wyniki – temat badawczy 1.

## Genotypowanie analizowanych form buraka cukrowego

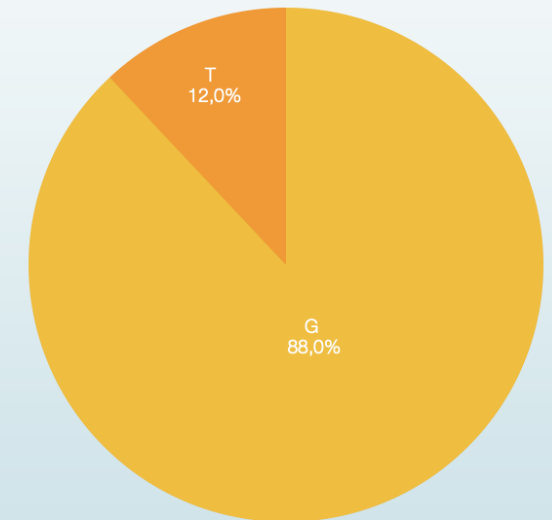
W wyniku przeprowadzonych prac badawczych potwierdzono obecność SNPs charakterystycznych dla form pośpiechowatych w następującej liczbie genotypów buraka cukrowego: poz. 479 – 11 genotypów [5,5%]; poz. 1557 – 9 genotypów [4,5%]; poz. 1942 – 24 genotypy [12%].



Dystrybucja SNP w poz. 479.



Dystrybucja SNP w poz. 1557.



Dystrybucja SNP w poz. 1942.

### WNIOSKI:

1. Zmienność w sekwencji transkryptu KMT 14391 stanowi jeden z mechanizmów determinujących tendencję roślin buraka cukrowego do pośpiechowatości. Mechanizm ten nie został dotychczas poznany i opisany.
2. Zaprojektowane markery typu TaqMan pozwoliły na identyfikację zmian strukturalnych typu SNPs w obrębie badanego transkryptu i stanowią mogą skuteczną narzędzie predykcji tendencji do pośpiechowatości.

# Wyniki – temat badawczy 2.

Do analizy w qPCR wybrano 10 potencjalnych genów referencyjnych. Część z nich stanowiły 'standardowe' geny referencyjne wykorzystywane w badaniach ekspresji genów u roślin kodujące m.in. aktynę, GAPDH oraz tubulinę. Drugi zestaw stanowiły geny wyselekcjonowane na podstawie danych dostępnych w literaturze i bazach danych wykazujące największą stabilność ekspresji w roślinach buraka cukrowego.

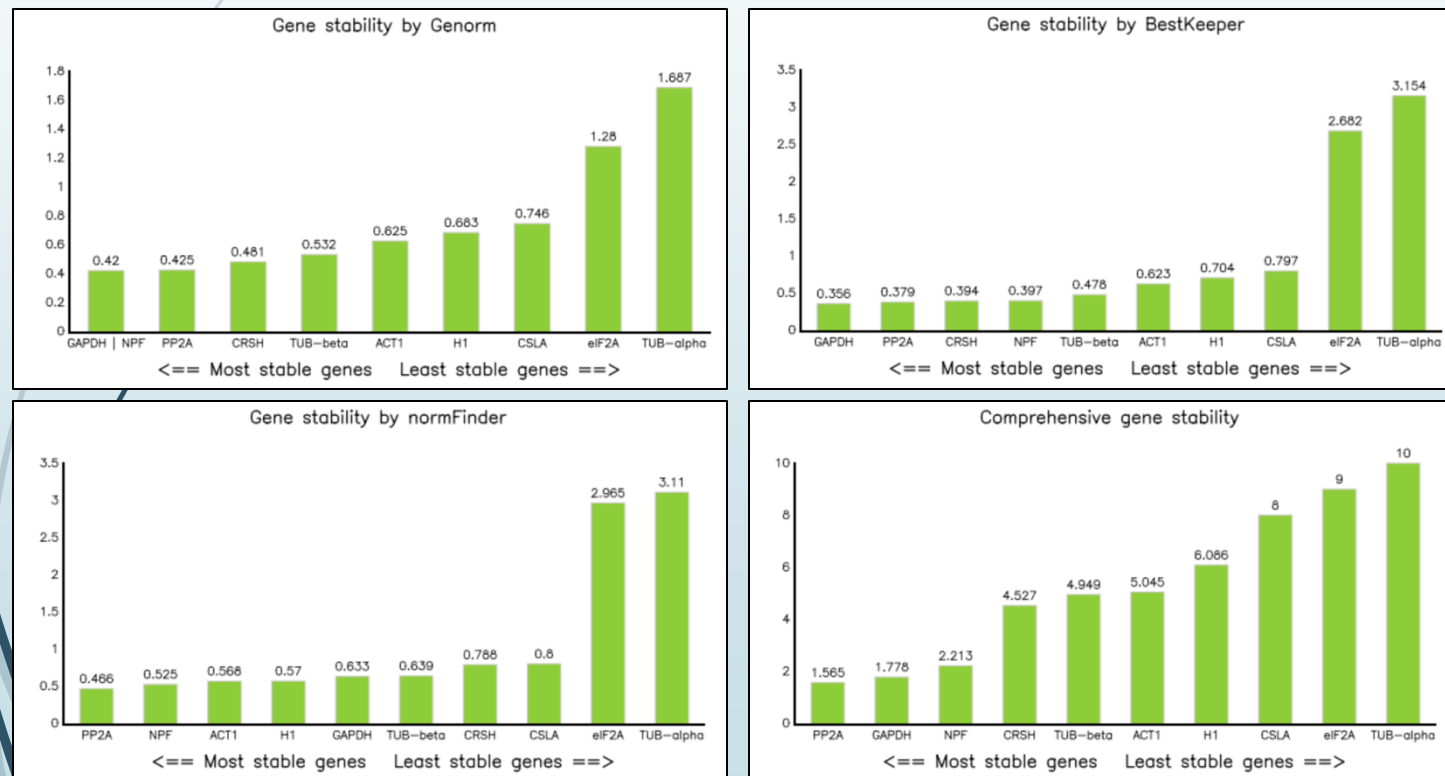
Charakterystykę wybranych potencjalnych genów referencyjnych zaprezentowano w tabeli.

Zestawienie potencjalnych genów referencyjnych analizowanych w ramach zadania.

Lp.	Symbol transkryptu	Symbol genu	Produkt genu
1	KMT18305	<i>ACT1</i>	Actin-1
2	KMT09016	<i>TUB-α</i>	Tubulin alpha-1
3	KMT05146	<i>TUB-β</i>	Tubulin beta-1
4	KMT11247	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
5	KMT14345	<i>PP2A</i>	Serine/threonine-protein phosphatase PP2A
6	KMT15492	<i>eIF2A</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2A
7	KMT10292	<i>H1</i>	Histone H1
8	KMT11780	<i>CRSH</i>	Ca <sup>2+</sup> -activated RelA-spot homolog
9	KMT01642	<i>CSLA15</i>	Cellulose synthase like A15
10	KMT07060	<i>NPF</i>	GDA1/CD39 nucleoside phosphatase family protein

# Wyniki – temat badawczy 2.

W ramach dotychczasowych prac opracowano krzywe standardowe oraz oceniono stabilność ekspresji w badanym materiale dla 10 potencjalnych genów referencyjnych. Stabilność ekspresji badanych genów oceniano w oparciu o 4 różne algorytmy: geNorm, BestKeeper, NormFinder oraz RefFinder.



Ranking stabilności ekspresji genów referencyjnych uzyskany za pomocą 4 algorytmów.

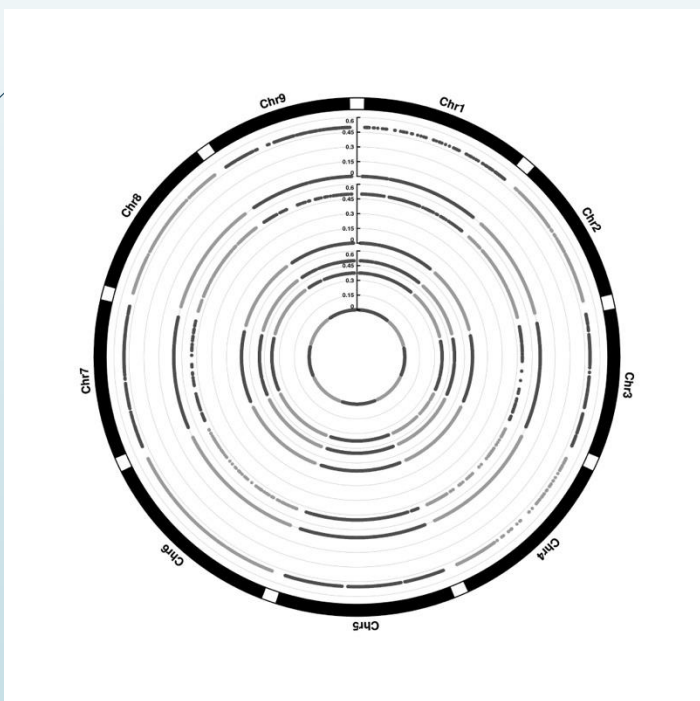
## WNIOSKI:

1. W oparciu o zastosowaną metodykę dokonano wyboru genów charakteryzujących się najwyższą stabilnością ekspresji w badanym materiale, które wykorzystane zostaną jako geny referencyjne w dalszych pracach w projekcie (PP2A oraz GAPDH).
2. Wśród genów o najwyższej stabilności ekspresji znajdował się gen kodujący białko należące do rodziny fosfataz nukleozydowych GDA1/CD39 (NPF), który może w przyszłości znaleźć zastosowanie jako gen referencyjny specyficzny dla roślin buraka cukrowego.
3. Wykazano, że poziom ekspresji niektórych genów kodujących białka metabolizmu podstawowego (eIF2A oraz TUB- $\alpha$ ) charakteryzuje się dużą zmiennością pomiędzy genotypami buraka cukrowego.

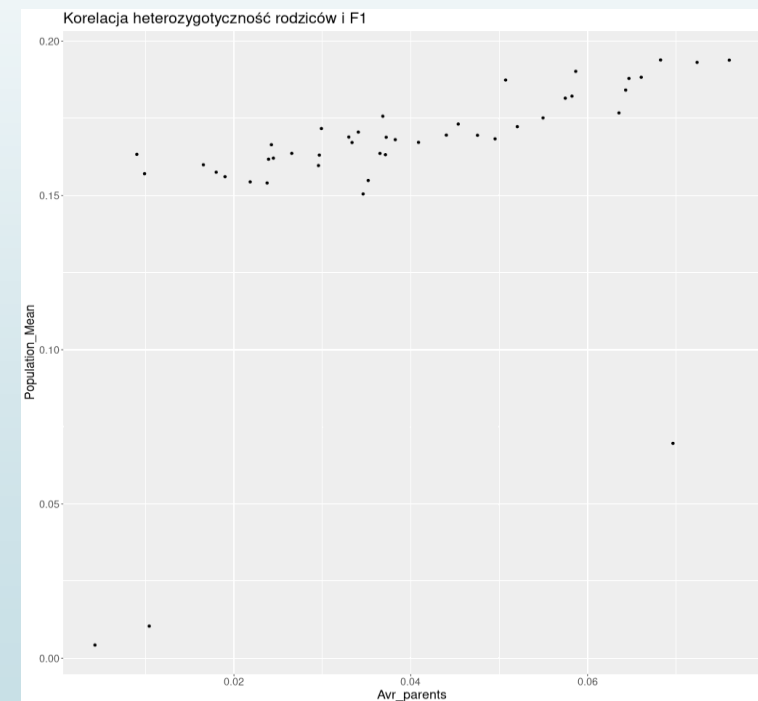
# Wyniki – temat badawczy 3.

Przeprowadzone analizy heterozygotyczności mieszańców  $F_1$  wybranych do krzyżowania wykazały, że kombinacje o wysokiej użyteczności miały wyższe wartości uzyskanego poziomu heterozygotyczności na poziomie  $F_1$ . Najwyższą wartość uzyskano dla kombinacji 2SRhF1M15 17 x SCrB114 4.

Dla badanych kombinacji, za wyjątkiem 2SRhF1M15 30 x F3SWR13 1, zaobserwowano wysoką korelację między średnią heterozygotyczności form rodzicielskich, a populacjami  $F_1$ .



Histogram poziomu heterozygotyczności w poszczególnych chromosomach buraka cukrowego dla kombinacji krzyżowań 2SRhF1M15 17 x SCrB114 4 oraz form rodzicielskich.



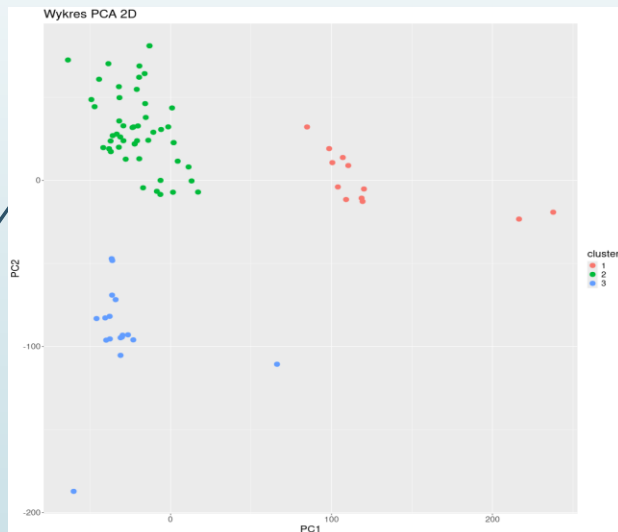
Korelacja między średnim poziomem heterozygotyczności form rodzicielskich, a analizowanych kombinacji  $F_1$  - średnia dla populacji.



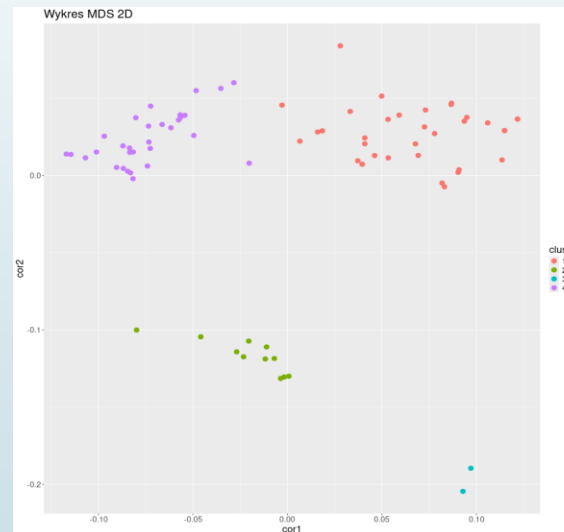
# Wyniki – temat badawczy 3.

Analiza grupowania obiektów za pomocą metod PCA, MSD i UPGMA wykazała istotne różnice i podobieństwa w wynikach, które pozwoliły scharakteryzować strukturę genetyczną badanych populacji. Przeanalizowano 79 populacji, które zostały pogrupowane na różną liczbę grup w zależności od zastosowanej metody.

Podczas analizy wyników udało się zidentyfikować dziesięć zestawów populacji, które zawsze grupowały się razem niezależnie od zastosowanej metody. Przykłady takich populacji obejmują 2SRhF1M15 17 x DH\_17-35, 2SRhF1M15 17 x DH\_17-45, 2SRhF1M15 30 x 2SRhF1M15 97 oraz 2SRhF1M15 82 x DH\_17-71. Obserwacja ta sugeruje, że pewne obiekty mają wyraźną strukturę genetyczną, która jest stabilna i niezależna od przyjętej metody grupowania. Co więcej, formy rodzicielskie, takie jak DH\_17-66, 2SRhF1M15 30 i 2SRhF1M15 82, również wykazywały spójność grupowania, co potwierdza ich bliskie pokrewieństwo genetyczne z ich potomstwem, czyli populacjami F<sub>1</sub>.



Mapa PCA na podstawie wysoce polimorficznych markerów SNP dla populacji F<sub>1</sub> i ich form rodzicielskich.



Mapa MDS na podstawie dystansu genetycznego obliczonego dla najbardziej informatywnych markerów SNP dla populacji F<sub>1</sub> oraz ich form rodzicielskich.

Na podstawie uzyskanych wyników analiz *in silico* wykonano krzyżowania wytypowanych form buraka cukrowego w celu potwierdzenia wyników predykcji dla form mieszańcowych

## WNIOSKI:

1. Dotychczasowe analizy *in silico* pozwoliły na wytypowanie form buraka cukrowego przeznaczonych do krzyżowania i wykonanie krzyżowań w celu uzyskania mieszańców F<sub>1</sub> z przeznaczeniem do oceny skuteczności predykcji wystąpienia zjawiska heterozji.

# Publikacja wyników projektu

Doniesienia konferencyjne (poster):

„Genetic variation analysis of the *BvBTC1* gene determining bolting tendency in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) plants” - Międzynarodowa konferencja naukowa „EUCARPIA General Congress”, 18.08-23.08.2024 r., Lipsk, Niemcy

## Mierniki realizacji projektu w roku 2024

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
<b>Temat badawczy 1</b>				
1.1.	Liczba linii hodowlanych buraka cukrowego scharakteryzowanych pod względem obecności SNPs zlokalizowanych w obrębie transkryptów asocjowanych z tendencją do pośpiechowości	200	200	<b>1,00</b>
<b>Temat badawczy 2</b>				
2.1	Liczba przetestowanych potencjalnych genów referencyjnych	10	10	<b>1,00</b>
<b>Temat badawczy 3</b>				
3.1	Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych	45	45	<b>1,00</b>
			<b>% REALIZACJI ZADANIA</b>	<b>100,0%</b>