

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, prof. dr hab. Kamila Nowosad, dr inż. Justyna Leśniowska-Nowak, dr inż. Tomasz Ociepa, dr Bartosz Kozak, mgr inż. Weronika Grzelak, mgr Wiktoria Jędrys, mgr inż. Gabriela Czarkowska

E-mail: *michal.nowak@up.edu.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 2025

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_1 uzyskanego w wyniku krzyżowań w oparciu o zidentyfikowane uprzednio grupy heterogenne	TAK

Materiał i metody

Materiał badawczy:

- Linie hodowlane buraka pochodzące z kolekcji spółki Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o. - pojedyncze rośliny rosnące w warunkach doświadczenia polowego – oddzielnie rośliny pośpiechowate i rośliny nie tworzące pośpiechów [*temat badawczy 1*];
- Linie hodowlane buraka cukrowego pochodzące z kolekcji spółki Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o., scharakteryzowane pod kątem tendencji do uzyskiwania roślin pośpiechowatych oraz dane dotyczące zidentyfikowanych uprzednio w transkryptomie buraka cukrowego markerów typu GEM asocjowanych z tendencją do pośpiechowatości [*temat badawczy 2*];
- Zestaw danych SNP uzyskanych dla form rodzicielskich wytypowanych do oceny efektu heterozji [*temat badawczy 3*].

Metody badawcze:

- Izolacja genomowego DNA, amplifikacja pełnej sekwencji trzech transkryptów, sekwencjonowanie NGS połączone z analizami jakości odczytu, analiza sekwencji, projektowanie sond TaqMan dla pięciu SNPs [*temat badawczy 1*];
- Izolacja RNA, ocena ilościowa i jakościowa otrzymanych preparatów, odwrotna transkrypcja RNA na cDNA, projektowanie systemu analizy ekspresji dla 10 transkryptów, analiza ekspresji techniką qPCR [*temat badawczy 2*];
- Analizy bioinformatyczne – filtrowaniu pod kątem częstości alleli (MAF), braków danych oraz informatywności markerów, określenie poziomu heterozygotyczności genomowej oraz wyznaczenie dystansu genetycznego między liniami, oszacowanie pokrewieństwa genomowego przy użyciu macierzy G obliczanej metodą VanRadena, symulacja architektury genetycznej cech z wykorzystaniem środowiska R (pakiet AlphaSimR), obliczenie przewidywanej heterozygotyczności genomowej F_1 oraz wartości genetycznych G_{F_1} , analizy PCA, MDS oraz UPGMA [*temat badawczy 3*].

Wyniki – temat badawczy 1.

Sekwencjonowanie wybranych transkryptów asocjowanych z pośpiechowatością

W pierwszym etapie badań z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji uzyskano pełne sekwencje transkryptów KMT 14391, KMT 00925 oraz KMT 14205 oraz dokonano ich analizy sekwencyjnej.

Parametr	Średnia	Zakres
Odczyty po filtracji (%)	91.6%	85.3% - 97.5%
Zasady Q30 (%)	92.2%	85.7% - 95.2%
Duplikacja (%)	7.0%	2.5% - 17.9%
Odczyty z adapterami (%)	27.2%	14.5% - 42.8%

Parametry jakościowe sekwencjonowania NGS dla zestawu badanych próbek.



Frekwencja ilości odczytów o najlepszej jakości dla badanych transkryptów.



Charakterystyka odczytów sekwencji po filtrowaniu za pomocą oprogramowania fastp.

Wyniki – temat badawczy 1.

Projektowanie systemów detekcji

Dla każdego transkryptu zidentyfikowano wstępnie po 3 SNPs różnicujące formy pośpiechowate i nie tworzące pośpiechów, a następnie spośród nich wybrano w sumie 5 zmienności z przeznaczeniem do projektowania systemów detekcji:

- 2 w obrębie sekwencji KMT 14391;
- 1 w obrębie sekwencji KMT 00925;
- 2 w obrębie sekwencji KMT 14205.

Przed projektowaniem systemu detekcji potwierdzono specyficzność każdej z sekwencji zaplanowanych do wykorzystania jako matryca do projektowania systemu detekcji, wykluczając możliwość występowania w genomie buraka cukrowego sekwencji homologicznej.

Wnioski

1. Zaproponowana metodyka badawcza pozwoliła na charakterystykę strukturalną badanych genów i identyfikację zmienności typu SNP z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji.
2. Uzyskane wyniki pozwoliły na opracowanie systemów detekcji zmienności typu SNP dla trzech transkryptów asocjowanych z tendencją do pośpiechowatości. Opracowane systemy poddane zostaną walidacji na kolejnym etapie realizacji projektu.

Wyniki – temat badawczy 2.

W ramach realizacji zadania opracowano i zwalidowano metodykę analizy ekspresji dla 10 transkryptów asocjowanych z pośpiechowatością roślin buraka cukrowego:

Lp.	Symbol transkryptu	Produkt genu
1	KMT 03505	Isocitrate lyase
2	KMT 01115	BHLH domain-containing protein
3	KMS 95718	DOMON domain-containing protein
4	KMT 12652	DUF5734 domain-containing protein
5	KMT 06609	RING-H2 finger protein ATL46-like
6	KMT 00976	Aa_trans domain-containing protein
7	KMT 07868	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
8	KMT 17921	KIX_2 domain-containing protein
9	KMT 16665	PHD-type domain-containing protein
10	KMT 08034	Hydrolase_4 domain-containing protein

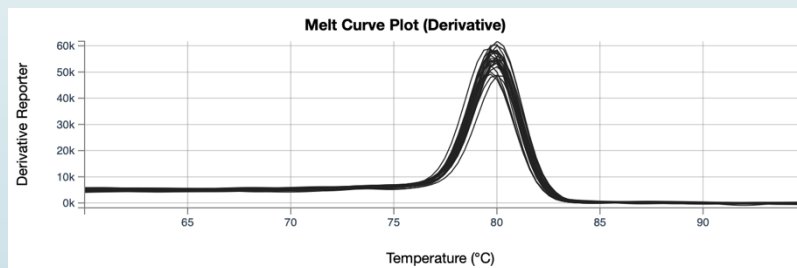
W ramach zadania zaprojektowano zestawy primerów do analiz ekspresji oraz przeprowadzono ich walidację *in silico* pod kątem potencjalnego tworzenia struktur drugorzędowych, przyjmując dla parametru ΔG wartość graniczną -9,0 kcal/mol.

Wyniki – temat badawczy 2.

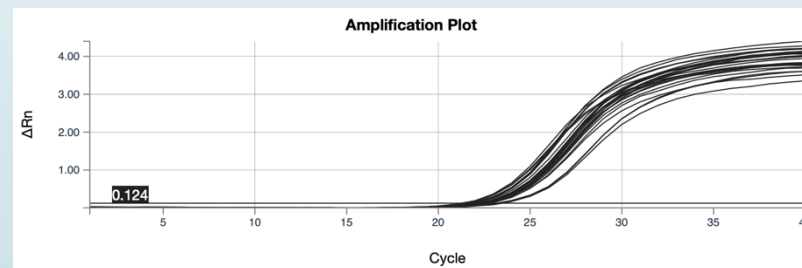
Sekwencja	Starter F	Starter R	Hetero dimer ΔG	Self dimer starter F ΔG	Self dimer starter R ΔG	Hairpin starter F ΔG	Hairpin starter R ΔG
KMT 03505	TTTGGTGCTTTGGACCTGT	TAGGGACTGTGTCGTAGGGG	-1,34→-7,74	-4,41→-1,34	-3,61→-0,96	-0,79	-1,21→-0,25
	TATGTCTCGGGGTGGCAATG	TAGGGACTGTGTCGTAGGGG	-3,61→-0,96	-3,61→-0,96	-3,61→-0,96	0,65→-1,61	-1,21→-0,96
KMT 01115	AATCCATTCTGACGAGGGC	TGACCAGAAATCAGCACCGT	-5,13→-1,47	-4,67→-1,47	-3,61→-1,34	-1,49	0,43→-0,55
	TGGGTCGGGTAAAGAATCCG	GGTGACCCCATTTCTGGTT	-9,06→-1,94	-6,68→-1,47	-5,02→-1,47	-1,9	-1,53→-0,61
KMS 95718	CAACCCCTCCAATTCTCCC	TGTGAGCCAACAGTGCTTGA	-3,9→-1,34	-5,02→-1,47	-3,9→-1,34	2,2	-0,95→0,01
	CAAGGGTGAGTCAACGGTCA	GCAGGTCCGCTATTGGACT	-6,68→-1,34	-3,61→-1,34	-5,99→-1,47	0,35→0,98	-3,57→-2,48

Sekwencje starterów zaprojektowanych do analizy ekspresji wybranych genów oraz wyniki ich walidacji *in silico*.

Zaprojektowane pary primerów zastosowano w reakcji qPCR oraz dokonano optymalizacji parametrów reakcji. W efekcie jego dla każdego z 10 badanych transkryptów opracowano wydajny system profilowania ekspresji w tkance buraka cukrowego charakteryzujący się specyficnością (pojedynczy sygnał na krzywej topnienia) oraz optymalną wydajnością (C_q w zakresie 20-30).



Krzywe dysocjacji potwierdzające specyficzność reakcji qPCR dla transkryptu KMT01115.



Krzywe amplifikacji uzyskane w reakcji qPCR dla transkryptu KMT01115.

Wnioski

- Wybrana metodyka izolacji RNA pozwala na uzyskanie preparatów charakteryzujących się wysokim stężeniem kwasu nukleinowego oraz wysoka jego integralnością i czystością.
- Zaprojektowana w ramach zadania metodyka RTq-PCR pozwala na wiarygodną analizę zmian ekspresji analizowanych transkryptów w tkance roślin buraka cukrowego.

Wyniki – temat badawczy 3.

Modelowanie architektury genetycznej mieszańców F_1

Od danych markerowych do przewidywanej wartości mieszańców

- **Model symulacyjny:** Zastosowano model przypisujący efekty addytywne i dominacyjne do licznych loci, co pozwoliło odtworzyć potencjalną architekturę cech o znaczeniu hodowlanym.
- **Szeroka zmienność F_1 :** Wygenerowano genotypy wszystkich kombinacji krzyżowań. Uzyskany zakres heterozygotyczności (0,20–0,88) potwierdza dużą różnorodność genomową w analizowanym materiale.
- **Wartość G_{F_1} :** Oszacowano przewidywaną wartość genetyczną mieszańców, co umożliwiło ich rankingowanie przed wykonaniem krzyżowań w warunkach polowych.
- **Kluczowa obserwacja:** Z analizy wynika, że przewidywana wartość hybryd wynika z ich unikalnych układów alleli, a nie tylko z prostego uśrednienia wartości rodziców.

Co leży u podstaw przewagi F_1 nad liniami rodzicielskimi?

- **Rola dominacji:** Analiza rozkładu efektów markerowych wskazuje, że w części loci efekt dominacji ma znaczący udział w kształtowaniu wartości mieszańców, wzmacniając działanie korzystnych efektów addytywnych.
- **Zróżnicowanie F_1 :** Analizy relacji genetycznych ujawniły istnienie grup mieszańców różniących się poziomem heterozygotyczności i udziałem komponentów genetycznych, co odzwierciedla komplementarność pul rodzicielskich.
- **Przewaga nad MPV:** Porównanie wartości G_{F_1} z wartościami rodziców potwierdziło, że część kombinacji uzyskuje przewagę typową dla efektu heterozji dzięki korzystnym interakcjom alleli w wybranych regionach genomu.
- **Znaczenie hodowlane:** Zrozumienie udziału addytywności i dominacji w potencjale F_1 umożliwia przejście od intuicyjnego do świadomego projektowania kombinacji krzyżowań o najwyższej wartości użytkowej.

Wnioski – temat badawczy 3.

1. Analizy struktury genetycznej przeprowadzone z wykorzystaniem PCA, MDS oraz klasteryzacji UPGMA wykazały istnienie stabilnych i powtarzalnych podgrup w obrębie badanej populacji form rodzicielskich, co potwierdza, że materiał nie stanowił jednorodnej puli genetycznej.
2. Niewielki klaster form rodzicielskich identyfikowany jako klaster 4 w PCA oraz klaster 9 w MDS wyróżniał się wyraźnym oddzieleniem od pozostałych genotypów, co wskazuje na jego odmienny profil genetyczny i potencjalnie odmienne pochodzenie hodowlane.
3. Dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi był istotnym czynnikiem wpływającym na poziom heterozygotyczności mieszańców F_1 , przy czym zależność ta ulegała wzmocnieniu wraz ze wzrostem dystansu w analizie całej populacji kombinacji.
4. W przypadku najlepszych kombinacji F_1 (TOP20) zależność liniowa pomiędzy dystansem genetycznym a wartością heterozji była wyraźnie słabsza, co wskazuje, że wysoki efekt heterozji nie wynika wyłącznie z dużego zróżnicowania genomowego rodziców.
5. Uzyskane wyniki sugerują, że kluczowe znaczenie dla uzyskania wysokiej heterozji ma łączenie konkretnych, komplementarnych wariantów allelicznych oraz złożona architektura genetyczna cech, obejmująca jednocześnie udział efektów addytywnych i dominacyjnych, a nie sam dystans genetyczny traktowany jako wskaźnik globalny.

Mierniki realizacji projektu w roku 2025

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
Temat badawczy 1				
1.1.	Liczba zaprojektowanych markerów identyfikujących SNPs asocjowane z tendencją roślin buraka cukrowego do pośpiechowości	5	5	1,00
Temat badawczy 2				
2.1	Liczba genów buraka cukrowego z opracowanym i zwalidowanym systemem analizy ekspresji techniką qPCR	10	10	1,00
Temat badawczy 3				
3.1	Zestaw mieszańców scharakteryzowanych pod kątem heterozygotyczności genomowej	1	1	1,00
			% REALIZACJI ZADANIA	100,0%