

DARIUSZ GRZEBELUS

GABRIELA MACHAJ

ALICJA MACKO-PODGÓRNI

KORNELIA KWOLEK

RAFAŁ BARAŃSKI

WOJCIECH WESOŁOWSKI

MARCELINA WAJDZIK

ANNA SZLACHTOWSKA

BEATA DOMNICZ

PRZEMYSŁAW GIERSKI

MAREK SZKLARCZYK

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kierownik Tematu: prof. dr. hab. Dariusz Grzebelus Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytet Rolniczy w Krakowie Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. 12 6625399, e-mail: d.grzebelus@urk.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.8.2018, Zadanie 45.

Opracowanie metod globalnej analizy polimorfizmów w genomie buraka cukrowego

Development of methods for global analysis of polymorphisms in the genome of sugar beet

Słowa kluczowe: BNYVV, cytoplazmatyczna męska sterylność, ekspresja genów, genotypowanie, markery molekularne, rizomania

PRZYGOTOWANIE I FENOTYPOWANIE SEGREGUJĄCYCH POPULACJI BURAKA CUKROWEGO

Cele tematu

Uzyskanie roślin buraka cukrowego o zróżnicowanej reakcji na rizomanię oraz ich przygotowanie do analiz molekularnych; uprawa roślin rosnących w kontakcie z wirusem BNYVV oraz w warunkach kontrolnych do badań molekularnych; uzyskanie kwitnących roślin F₁ z krzyżowań typu obiekt męskosterylny (MS) × kandydat na linię dopełniającą (linię O) oraz ocena fenotypu płodności tych roślin; uzyskanie nasion BC1 na bazie

wybranych roślin męskopłodnych z potomstw F_1 ; uzyskanie korzeni wysadkowych nowych pokoleń BC1 i BC2 z segregacją genów restorerowych.

Opis wyników

Wszystkie materiały roślinne zostały uzyskane i ocenione zgodnie z harmonogramem. Rośliny o zróżnicowanej reakcji na rizomanię zostały ocenione w komercyjnym teście genetycznym (marker SNP) określającym podatność na BNYVV.

W bieżącym roku w dwóch spośród sześciu kwitnących potomstw nie wystąpiło oczekiwane rozszczepienie na rośliny męskosterylne, męskopłodne i (ewentualnie) częściowo-męskopłodne. Jeden obiekt cechowała wyraźna nadreprezentacja roślin płodnych, co może wynikać z obecności więcej niż jednego restorera. W jednym obiekcie wszystkie rośliny były męskosterylne, co wskazuje na brak genu restorerowego.

Wnioski

- Duża liczba badanych linii hodowlanych pozwoliła na przetestowanie materiału o zróżnicowanym pochodzeniu. Test komercyjny potwierdził, że cechowały się one kontrastującymi genotypami w odniesieniu do rejonu *Rz1* warunkującego odporność na rizomanię.
- Uzyskano korzenie wysadkowe dziesięciu potomstw typu BC, w których oczekuje się segregacji na rośliny męskosterylne i męskopłodne.
- Segregacja fenotypowa w obrębie czterech z sześciu kwitnących potomstw gwarantuje ich użyteczność w analizie genów restorerowych.

ANALIZY BIOINFORMATYCZNE

Cele tematu

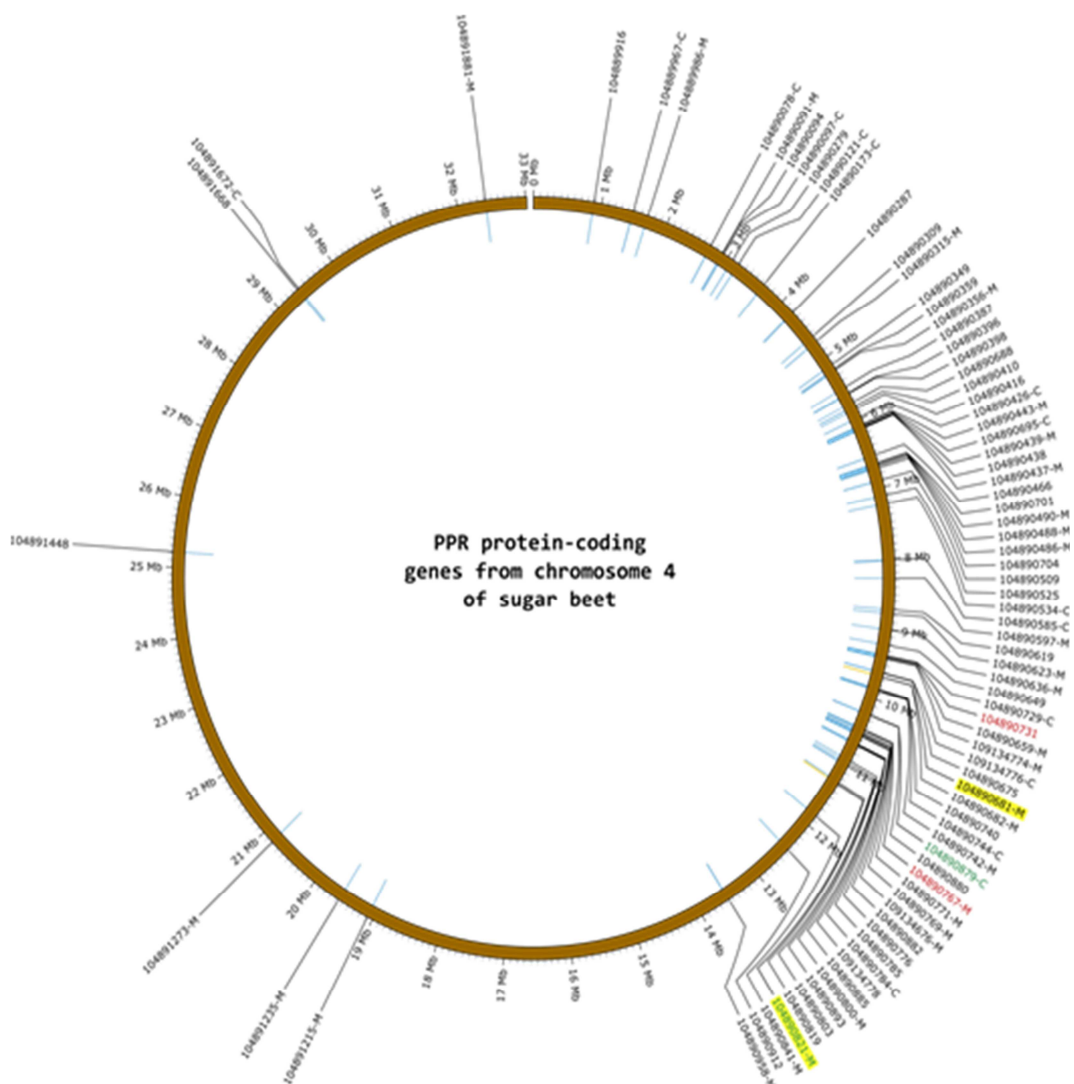
Analiza poziomu ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w warunkowanie odporności na rizomanię u roślin wrażliwych i odpornych; określenie specyficznych cech sekwencji aminokwasowej białek kodowanych w locus *X/x* (*Rfl/rfl*) u roślin męskosterylnych i u roślin z przywróconą płodnością; określenie poziomu transkrypcji genów kodujących białka PPR u roślin męskosterylnych i u roślin z płodnością przywróconą przez gen *Z* (*Rf2*).

Opis wyników

Materiał badawczy stanowiły trzy odporne i trzy wrażliwe na BNYVV rośliny wcześniej poddane genotypowaniu markerami sprzężonymi z genem *Rz1*. Badane rośliny były eksponowane na działanie wirusa podczas wzrostu w warunkach szklarniowych. Kontrolę stanowiły trzy odporne i trzy wrażliwe na BNYVV (wg wyników genotypowania) rośliny, wzrastające na glebie nie zarażonej wirusem. Oceniono ekspresję sześciu genów.

Bazą dla analizy przywracania płodności były dane RNA-seq wygenerowane dla obiektu 3S1185 w roku 2016. Uzyskane dla pojedynczych roślin odczyty sekwencyjne zostały zmapowane do wyekstrahowanych z chromosomu IV 82 genów kodujących białka PPR. Wyliczone dla poszczególnych genów wartości pokrycia były miarą ich ekspresji na poziomie RNA. Wśród genów cechujących się silniejszą ekspresją u roślin męskopłodnych najwyraźniejsze różnice odnotowano dla 104890821 i 104890879.

Z kolei spośród genów cechujących się silniejszą ekspresją u roślin męskosterylnych najwyraźniejsze różnice odnotowano dla 104890731 oraz 104890767 (rys. 1).



Rys. 1. Mapa fizyczna chromosomu 4 buraka cukrowego z zaznaczeniem pozycji genów kodujących białka PPR, czcionka czerwona — geny o wyższej ekspresji u roślin męskosterylnych, czcionka zielona — geny o wyższej ekspresji u roślin męskopłodnych, żółte cieniowanie — geny, których markery CAPS wykazują kosegregację z fenotypem, M — geny dla białek PPR kierowanych do mitochondriów, C — geny dla białek PPR kierowanych do plastydów

Wnioski

- Poziom ekspresji genów wytypowanych jako istotne dla warunkowania reakcji odporności roślin buraka cukrowego na BNYVV (*RPP13-like*; LOC104888806 i LOC104888807) okazał się być różny w zależności od genotypu rośliny i kontaktu z wirusem.
- Wyniki qPCR częściowo potwierdziły zmiany ekspresji obserwowane w oparciu o analizy transkryptomów w odniesieniu do roślin różniących się reakcją na rizomanię.
- Fizycznie sprzężone geny *RPP13-UP* i *RPP13-DOWN* (LOC104888806 i LOC104888807) mogą łącznie warunkować reakcję odporności na BNYVV, konstytuując *locus Rz1*.
- Obecnie najwiarygodniejszym kandydatem na restorer *Z/Rf2* jest gen 104890821 kodujący kierowane do mitochondriów białko PPR.

OPRACOWANIE PLATFORMY GENOTYPOWANIA BURAKA CUKROWEGO DLA SELEKCJI WSPOMAGANEJ MARKERAMI

Cele tematu

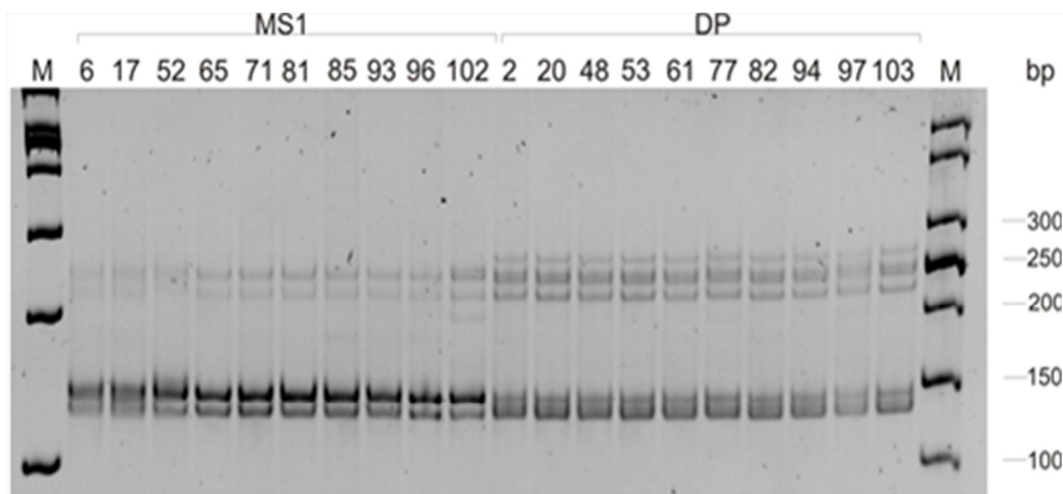
Opracowanie markerów molekularnych identyfikujących polimorfizmy w rejonach kodujących geny o zróżnicowanej ekspresji w grupie roślin odpornych i wrażliwych na rizomanię; określenie, czy genotypy *loci Rf/rf* wykazują zależność od genotypów w wybranych *loci* markerowych; opracowanie kolejnych markerów dla *locus Z/z (Rf2/rf2)*; określenie genów restorerowych obecnych w nowej puli segregujących populacji.

Opis wyników

Walidacja markerów molekularnych obejmowała genotypowanie 299 roślin należących do 59 populacji buraka cukrowego o różnym pochodzeniu i reakcji na wirusa BNYVV. Całościowa analiza populacji pod względem zgodności wyników genotypowania markerami CAPS opracowanymi w ramach niniejszego projektu a komercyjnym markerem SNP wykazała, że w przypadku 38 populacji otrzymano zasadniczo zgodne wyniki.

W ramach analizy nierównowagi sprzężeń dziesięć linii męskosterylnych poddano genotypowaniu trzema markerami dla genu *X (Rf1)* i dwoma markerami dla genu *Z (Rf2)*. Najwięcej przypadków zmienności wewnątrzliniowej odnotowano przy użyciu dwóch markerów dla genu *X*. Ogólnie w badanym zestawie obiektów wszystkie testowane markery cechowała dominacja jednego lub dwóch profili markerowych, a w przypadku jednego z markerów dla genu *Z* w ogóle nie stwierdzono polimorfizmu. Profile tego typu należy uznać za związane z allelami dopełniającymi analizowanych *loci* restorerowych.

Identyfikację genów restorerowych wykonano dla czterech populacji segregujących na rośliny męskosterylne i męskopłodne — wykorzystano do tego po cztery markery dla genów *X* i *Z*. Kosegregację z fenotypem obserwowano wyłącznie dla przy wykorzystaniu markerów dla genu *X*, co wskazuje, iż w badanych populacjach występuje właśnie ten restorer (rys. 2).



Rys. 2. Obraz markera Rfl-Mors uzyskany dla wybranych roślin męskosterylnych (MS1) i męskopłodnych (DP) z populacji 3s 13 175. M — wzorzec wielkości fragmentów DNA

Wnioski

1. Wyniki genotypowania markerami CAPS sprzężonymi z rejonem *Rz1* w genomie buraka cukrowego, warunkującym odporność na rizomanię, są zasadniczo zgodne z wynikami genotypowania komercyjnym systemem SNP.
2. Obserwowane rozbieżności dotyczyły ok. 30% genotypowanych roślin i były związane przede wszystkim z:
 - nadreprezentacją heterozygot w systemie komercyjnym (15%),
 - określeniem roślin jako wrażliwych w teście komercyjnym, ale odpornych w systemie CAPS (9%), przy czym wyniki takie były ograniczone do 10 badanych populacji, co wskazuje na mniejszą uniwersalność jednego z testów,
 - prawdopodobnymi sporadycznymi błędami technicznymi w obu testach.
3. Nowo opracowany marker InDel dla rejonu *Rz1* pozwolił na skuteczne rozróżnienie roślin odpornych i wrażliwych w populacjach, które cechowały się haplotypem determinującym wrażliwość z obecnością insercji. W pozostałych przypadkach wynik genotypowania InDel roślin wrażliwych nie różnił się od wyniku uzyskanego dla roślin odpornych. Marker InDel jest zatem mniej uniwersalny niż markery CAPS.
4. Genotypowanie linii męskosterylnych wykazało u większości roślin obecność profili charakterystycznych dla fenotypu męskosterylnego, bądź profili do tej pory nieobserwowanych. Tylko w przypadku markera 20L-int u ponad 60% przebadanych roślin stwierdzono obecność profili wcześniej korelowanych z fenotypem męskopłodnym. Wynik taki wskazuje na równowagę sprzężeń pomiędzy *loci* markera i restorera.

5. Genotypowanie czterech segregujących populacji ośmioma markerami dla *loci* restorerowych wykazało, iż w badanym materiale roślinnym za przywracanie płodności odpowiada gen *X*. Maksymalny odnotowany poziom kosegregacji testowanych markerów z fenotypem przekraczał 90%.