

MAREK SZKLARCZYK
WOJCIECH WESOŁOWSKI
MARCELINA WAJDIK
ANNA SZLACHTOWSKA
BEATA DOMNICZ
ANNA BURDA

Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Kierownik Tematu: dr hab. Marek Szklarczyk Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. 12 6625328, e-mail: marek.szklarczyk@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 68.

Analiza czynników genetycznych związanych z przywracaniem płodności roślin buraka ćwikłowego

Analysis of genetic factors linked to fertility restoration in table beet

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, genotypowanie, geny restorerowe, markery molekularne

TEMAT BADAWCZY 1: UZYSKANIE POPULACJI MAPUJĄCYCH TYPU BC1

Cele tematu

Uzyskanie segregujących populacji do mapowania genów przywracających płodność

Opis wyników

Badany materiał roślinny stanowiły cztery kwitnące potomstwa wywodzące się z oryginalnego krzyżowania 4357A × BS. Uprawę prowadzono w polu z wysadków uzyskanych w roku ubiegłym. W czasie kwitnienia roślin wizualnie sprawdzano u nich obecność pyłku. Dla każdej rośliny obserwacje poczyniono minimum dwukrotnie w różnych terminach. Wizualna ocena płodności była weryfikowana poprzez mikroskopową analizę żywotności pyłku. Pomimo, iż wszystkie badane obiekty segregowały na rośliny męskosterylne i męskopłodne, w świetle analizy żywotności pyłku oczekiwane rozszczepienie (1:1) uzyskano tylko dla jednej populacji.

Wnioski

- Segregacja fenotypowa tylko jednej z badanych populacji gwarantuje jej użyteczność w analizie genów restorerowych.

TEMAT BADAWCZY 2: GENOTYPOWANIE SEGREGUJĄCYCH POPULACJI MAPUJĄCYCH PRZY ZASTOSOWANIU METODY GBS

Cele tematu

Masowa identyfikacja polimorfizmów GBS u roślin różniących się statusem płodności

Opis wyników

Genotypowaniu poddano dwie populacje z cytoplazmą S i segregacją pod względem fenotypu płodności — 506 oraz 740. Analiza ta była wykonywana w ramach usługi zleconej firmie Novogene (Chiny). Biblioteki przygotowano z użyciem restryktazy *ApeKI*. Do sekwencjonowania wysokoprzepustowego wykorzystano platformę firmy Illumina. Zastosowano wariant sekwencjonowania ze sparowanymi końcami i 150 cyklami syntezy (PE150). Długość odczytanych sekwencji wahała się od ok. 300 do ok. 550 Mb dla pojedynczej rośliny. Wskaźniki Q20 i Q30 wyniosły odpowiednio 96 i 91%, a udział par GC 36–37%.

Wnioski

- Dla obydwu badanych populacji uzyskano wystarczającą ilość danych sekwencyjnych. Przy założeniu, iż w genomie buraka sekwencje unikalne stanowią ok. 37% (210 Mb, Dohm i in., 2014), ich przeciętne pokrycie u pojedynczej rośliny wyniosło ok. 1,4–2,6×.
- Wysoki procent nukleotydów osiągających wskaźniki jakości Q20 i Q30 gwarantuje przydatność otrzymanych danych sekwencyjnych dla analiz bioinformatycznych zmierzających do identyfikacji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP).

TEMAT BADAWCZY 3: ANALIZA BIOINFORMATYCZNA DANYCH SEKWENCYJNYCH

Cele tematu

Określenie genomowej lokalizacji zidentyfikowanych markerów GBS i genów restorerowych

Opis wyników

Analizom poddawano dane sekwencyjne wygenerowane w bieżącym roku dla populacji 506 oraz 740. Przefiltrowane odczyty sekwencyjne były mapowane do sekwencji genomu referencyjnego (AYZS00000000.2) — średni odsetek zmapowanych odczytów wyniósł 96,4%. Średnio 12,3% genomu referencyjnego było pokryte odczytami sekwencyjnymi (wykazywało pokrycie przynajmniej 1×). W wyniku mapowania odczytów do genomu referencyjnego zidentyfikowano ok. 1,6 mln polimorfizmów sekwencyjnych, które następnie poddawano kilkustopniowej filtracji. Obejmowała ona kolejno selekcję markerów: biallelicznych o wysokiej jakości, z maksymalnie pięcioma nieokreślonymi genotypami, o genotypach odpowiadających charakterowi badanej populacji, o właściwej segregacji oraz oddalonych od siebie o więcej niż 10 kb.

W rezultacie do mapowania genetycznego wykorzystano ok. 2 200 markerów z populacji 506 oraz ok. 1 000 markerów z populacji 740. Uzyskano dziewięć grup sprzężeń odpowiadających dziewięciu chromosomom buraka. W przypadku populacji 506 całkowita długość mapy wynosiła 577,2 cM ze średnią długością pojedynczej grupy sprzężeń wynoszącą 64,1 cM. Gen restorerowy wraz z 61 markerami GBS zmapował się na chromosomie 3. Najbliższy restorerowi marker GBS zmapował się w odległości 1,7 cM. W przypadku populacji 740 całkowita długość mapy wynosiła 526,1 cM ze średnią długością pojedynczej grupy sprzężeń wynoszącą 58,5 cM. W utworzonych grupach sprzężeń nie odnotowano obecności restorera.

Wnioski

- Przy wykorzystaniu technologii GBS otrzymano dane sekwencyjne, które pozwoliły na bardzo wydajną identyfikację markerów i uzyskanie — przynajmniej lokalnie — wysoko wysyconych map genetycznych. Dzięki dostępności sekwencji referencyjnej określono chromosomową lokalizację zidentyfikowanych grup sprzężeń.
- Restorer z populacji 506 zmapował się w obrębie chromosomu 3, co wskazuje, iż jest nim gen *X (Rfl)* Owena.

TEMAT BADAWCZY 4: KONWERSJA POLIMORFIZMÓW SPRZEŻONYCH Z GENAMI RESTOREROWYMI W MARKERY TYPU SCAR, CAPS I TETRA-PRIMER ARMS-PCR

Cele tematu

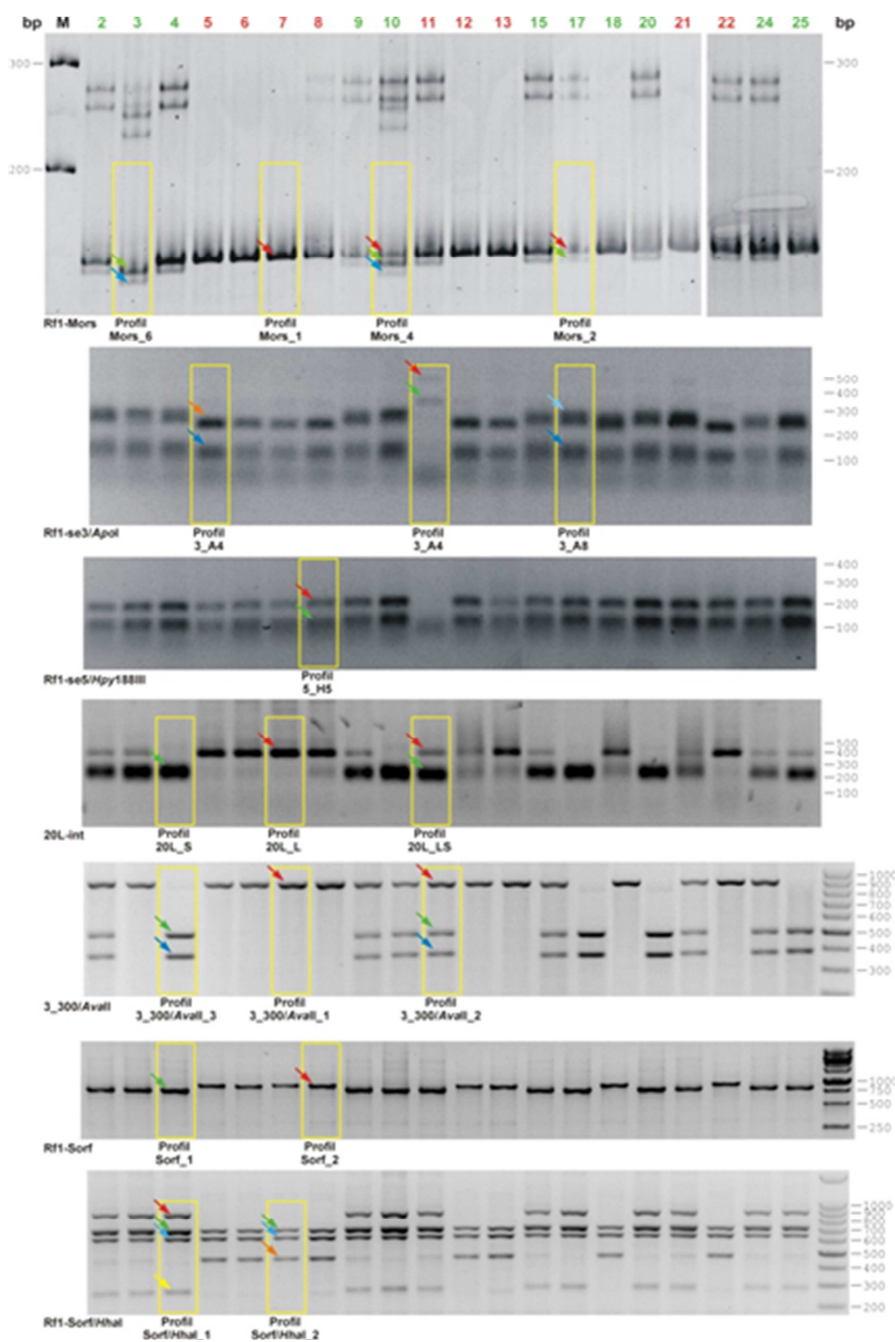
Opracowanie markerów PCR do wnioskowania o obecności alleli restorerowych

Opis wyników

Badany materiał roślinny stanowiły cztery populacje segregujące pod względem fenotypu płodności. Analiza wstępna była prowadzona na 10 roślinach (5 męskopłodnych i 5 męskosterylnych). Markery kosegregujące z fenotypem były użyte do genotypowania całych populacji. Wykorzystywane markery reprezentowały typy CAPS i SCAR. Projektowanie markerów CAPS zautomatyzowano stosując napisany w toku niniejszych prac program VCF2CAPS (Wesołowski). W trzech populacjach testowane markery kosegregowały fenotypem na poziomie do ok. 80%. Były to markery dla genu *X (Rfl)* (rys. 1). W jednej z analizowanych populacji testowane markery najczęściej nie wykazywały polimorfizmu.

Wnioski

- Markery CAPS projektowano na bazie zidentyfikowanych uprzednio markerów GBS. Do tego celu wykorzystano autorski program VCF2CAPS (Wesołowski) umożliwiający masową konwersję wykrytych technikami NGS polimorfizmów sekwencyjnych w markery CAPS.
- W trzech populacjach z fenotypem kosegregowały markery z chromosomu 3, co potwierdza/wskazuje na występowanie w nich restorera *X/Rfl*. Wartość kosegregacji wynosiła średnio ok. 80%.



Rys. 1. Profile siedmiu markerów genu *X* (*Rf1*) u wybranych roślin z populacji 398. Czerwona czcionka — rośliny męskosterylne, zielona czcionka — rośliny męskopłodne. M — wzorec wielkości fragmentów DNA

TEMAT BADAWCZY 5: ANALIZA NIERÓWNOWAGI SPRZĘŻEŃ — GENOTYPOWANIE ZESTAWU MĘSKOSTERYLNYCH OBIEKTÓW HODOWLANÝCH PRZY ZASTOSOWANIU OPRACOWANYCH MARKERÓW PCR

Cele tematu

Określenie, czy genotypy *loci* restorerowych wykazują zależność od genotypów w wybranych *loci* markerowych

Opis wyników

Badany materiał roślinny stanowiła kolekcja 12 linii męskosterylnych, testowano po 10 roślin każdej z linii. Poddano je genotypowaniu czterema markerami dla genu *X* (*Rf1*) i dwoma markerami dla genu *Z* (*Rf2*). Markery te reprezentowały typy CAPS i SCAR. W badanym zestawie linii męskosterylnych markery dla genu *Z/Rf2* (ppr681/*Hpa*II i ppr821/*Fsp*BI) były monomorficzne. Spośród przetestowanych markerów dla genu *X/Rf1* dwa (*Rf1_Mors*, *Rf1-se3/Apo*I) cechowała dominacja jednego profilu elektroforetycznego — w obrębie ośmiu (*Rf1_Mors*) / dziewięciu (*Rf1-se3/Apo*I) linii był on obserwowany u wszystkich badanych roślin. Pozostałe dwa markery dla genu *X/Rf1* cechowała wyraźna segregacja między- i wewnątrz obiektowa obserwowanych profili elektroforetycznych.

Wnioski

— Dane wskazujące na istnienie nierównowagi sprzężeń pomiędzy allelami *loci* markerowych oraz allelem w *locus* restorera uzyskano dla obydwu markerów genu *Z* (*Rf2*) i dwóch (spośród czterech testowanych) markerów genu *X* (*Rf1*).

