

Zadanie nr 38:

## **Analiza genetycznej kontroli cechy CMS u marchwi i cebuli oraz cechy samozgodności u kapusty**

Okres realizacji: **48 miesięcy (lata 2021-2024)**

Zespół wykonawców projektu:

**Dr hab. Marek Szklarczyk, prof. URK – kierownik; e-mail: [marek.szklarczyk@urk.edu.pl](mailto:marek.szklarczyk@urk.edu.pl)**

**Dr inż. Wojciech Wesołowski**

**Dr hab. inż. Magdalena Simlat, prof. URK**

**Dr hab. Stefan Stojałowski, prof. ZUT**

# **Cele projektu w 2023 r.**

## **W temacie badawczym 1 (Opracowanie markerów DNA dla alleli S-locus kapusty)**

- opracowanie markerów PCR dla cechy samozgodności u kapusty.

## **W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników GBS):**

- identyfikacja polimorfizmów sekwencyjnych u roślin marchwi różniących się statusem płodności oraz określenie lokalizacji genomowej tych polimorfizmów,
- wskazanie genów kandydujących dla przywrócenia płodności u marchwi.

## **W temacie badawczym 3 (Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie transkryptomu (GBS-t) w kontekście mapowania restorerów cebuli)**

- uzyskanie sekwencji transkryptomu cebuli dla roślin męskosterylnych i roślin z przywróconą płodnością.

**Cele zostały zrealizowane.**

# Materiały i metody

## W temacie badawczym 1

### **Materiały roślinne**

- Dwie populacje kapusty segregujące pod względem samozgodności/samoniezgodności.

### **Metody**

- Izolacja całkowitego DNA.
- Amplifikacja DNA: konwencjonalny PCR i elektroforeza w standardowym żelu agarozowym.
- Trawienie restrykcyjne produktów PCR.
- Analiza produktów trawienia: elektroforeza w żelu poliakrylamidowym.

## W temacie badawczym 2

### **Materiały roślinne**

- Cztery populacje marchwi segregujące na rośliny męskosterylne i z przywróconą płodnością (męskopłodne).

### **Metody**

- Identyfikacja polimorfizmów sekwencyjnych (program VCFtools; program VCFtools; skrypt napisany w języku Awk; program Excel (MS Office 2007)).
- Mapowanie odczytów sekwencyjnych do sekwencji chromosomu 9 marchwi (program BWA).
- Mapowanie genetyczne (JoinMap).

## W temacie badawczym 3

### **Materiały roślinne**

- Trzy populacje cebuli segregujące na rośliny męskosterylne i z przywróconą płodnością (męskopłodne).

### **Metody**

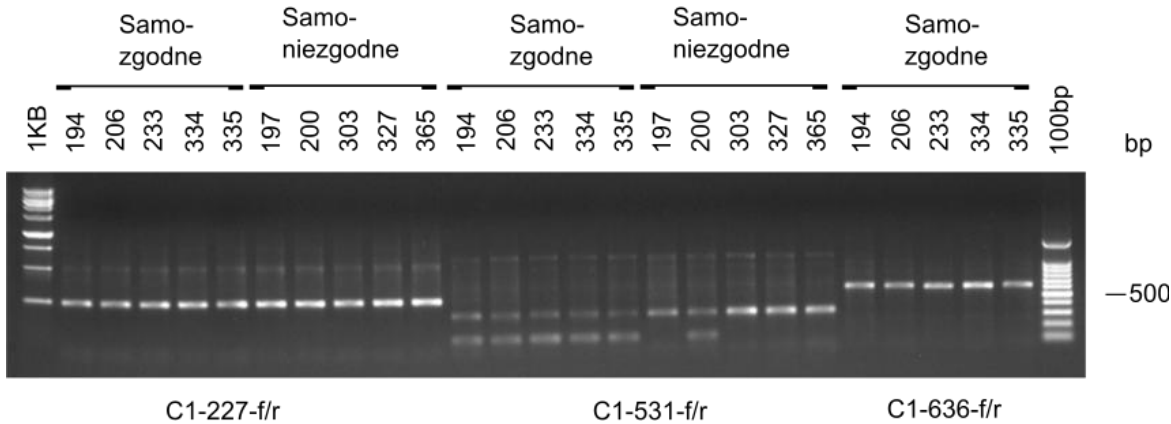
- Izolacja RNA.
- Sekwencjonowanie cDNA (Novogene).
- Obliczanie statystyk sekwencjonowania (skrypt autorski).

# Wyniki

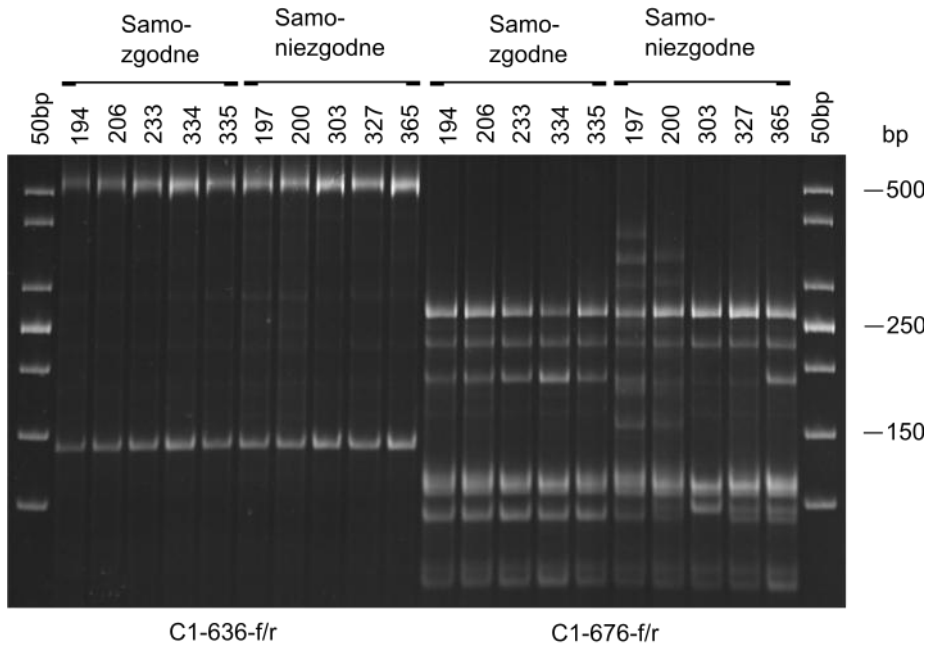
## Opracowanie markerów DNA dla alleli S-locus kapusty

### Typowanie polimorficznych markerów

populacja K1

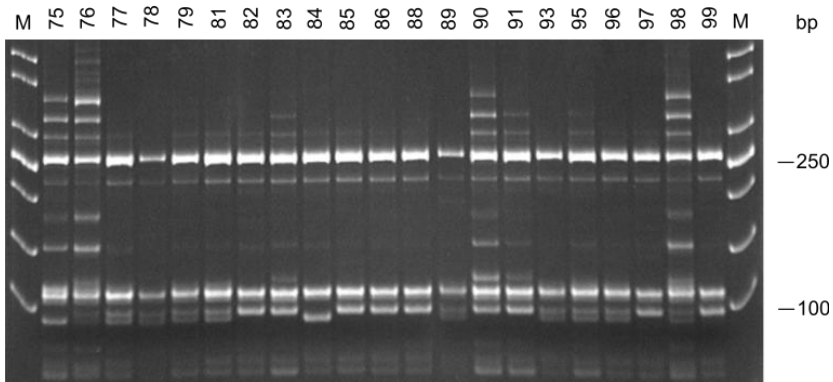
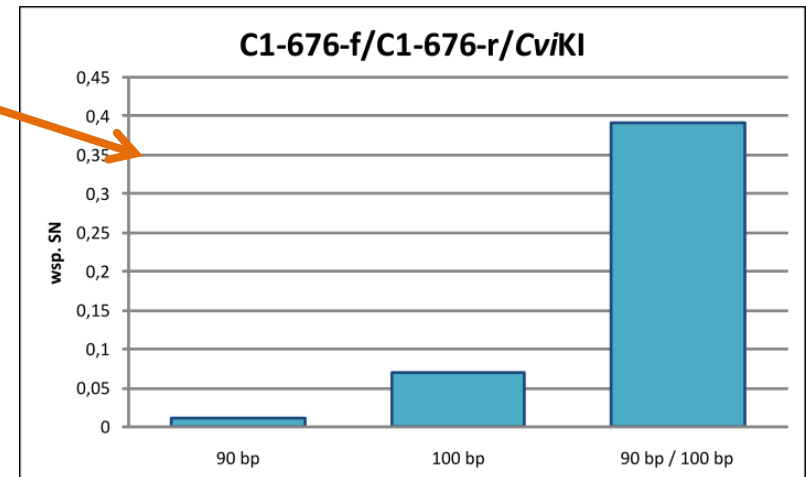
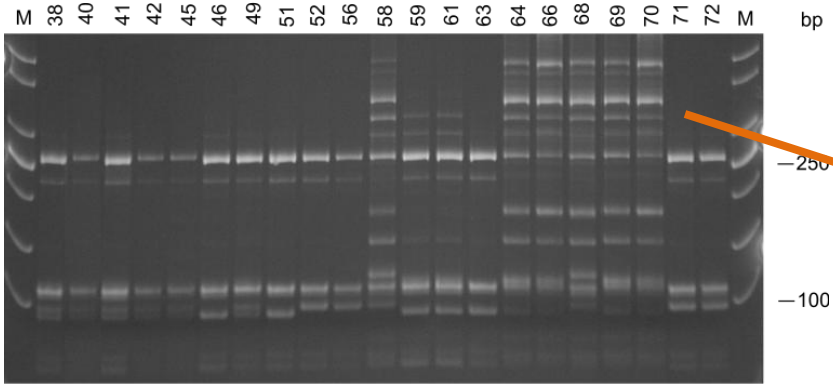
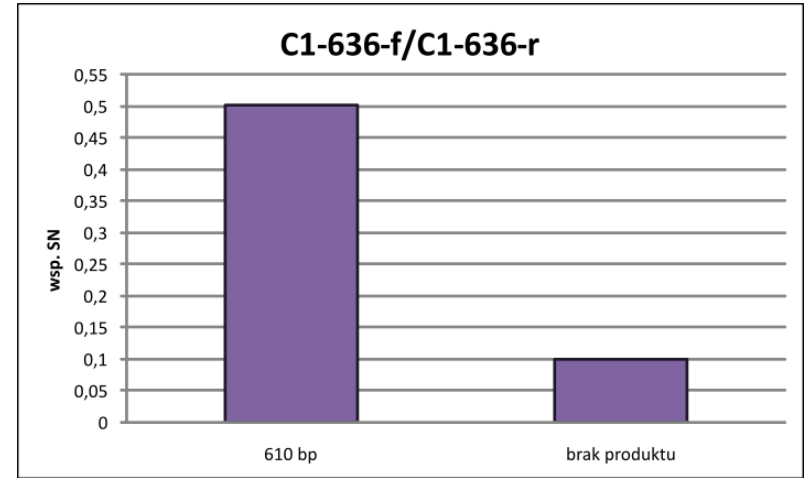
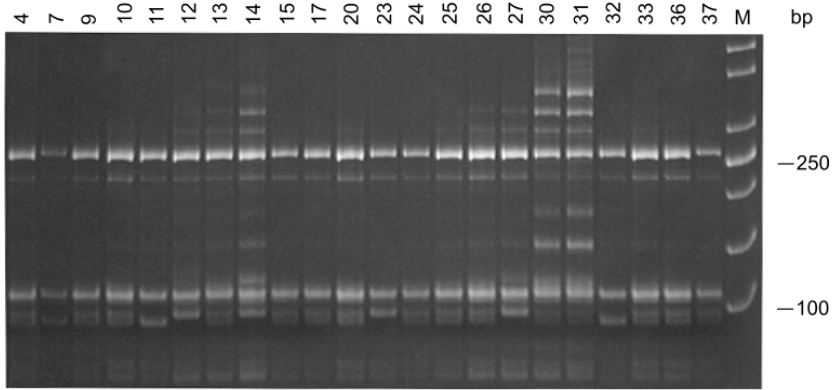


PCR

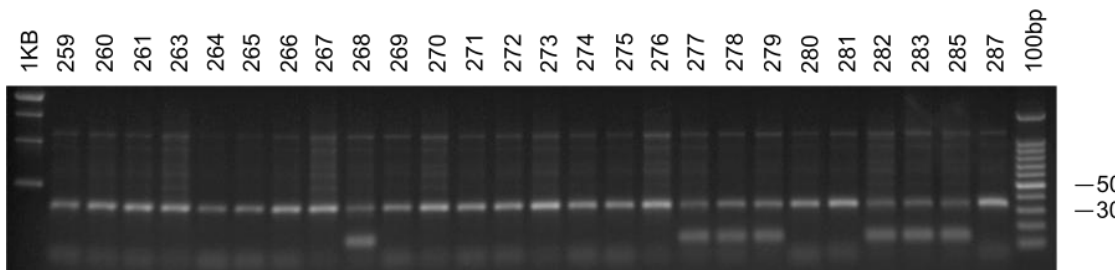
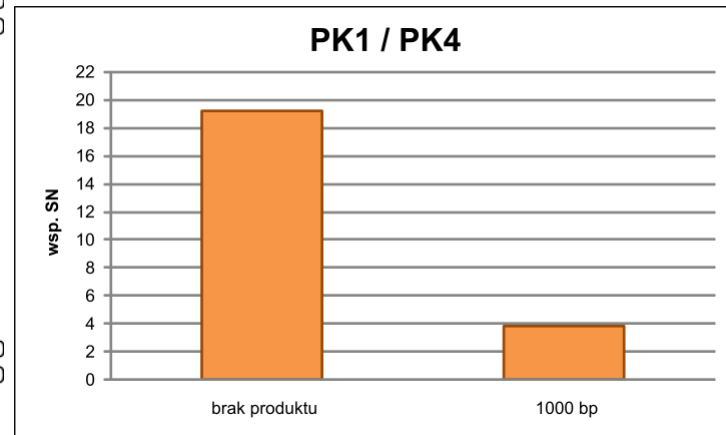
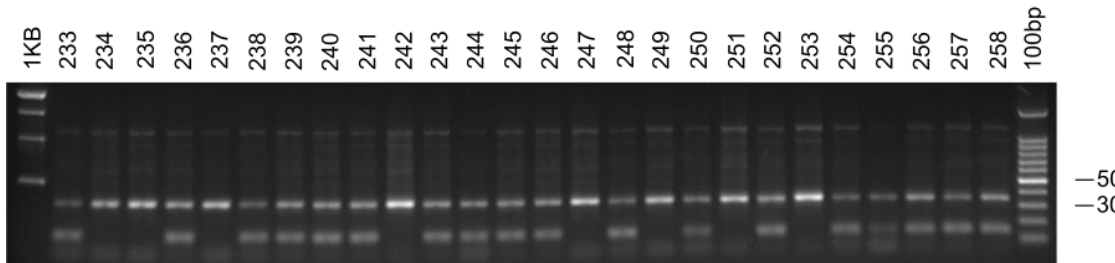
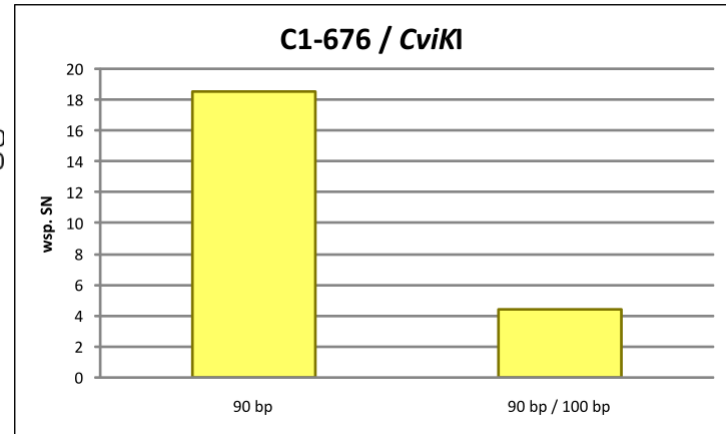
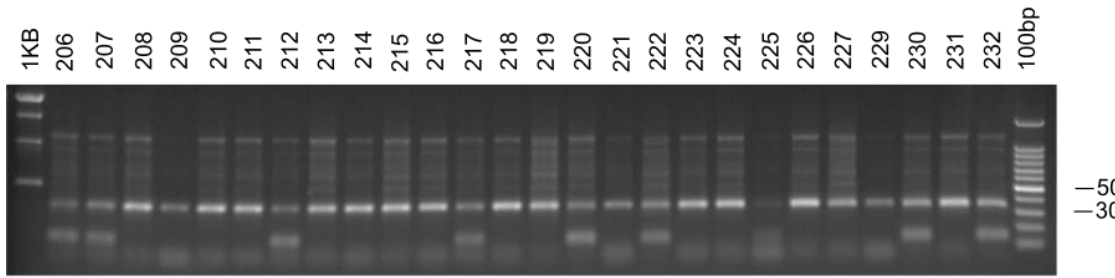
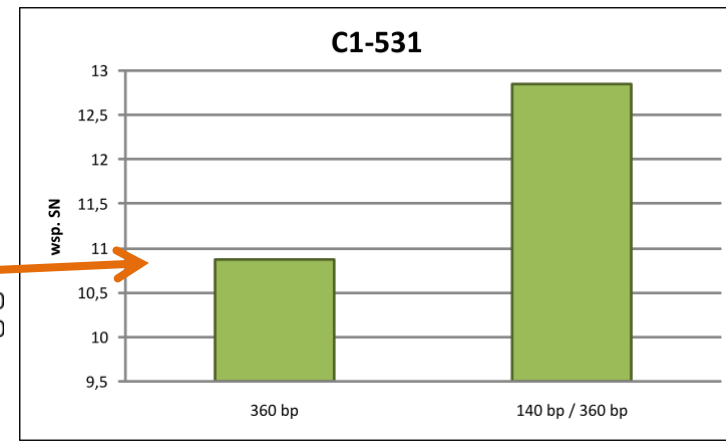
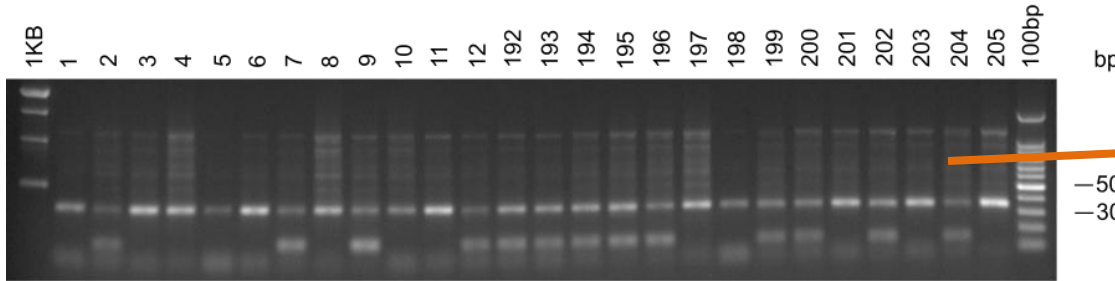


PCR/CviKI

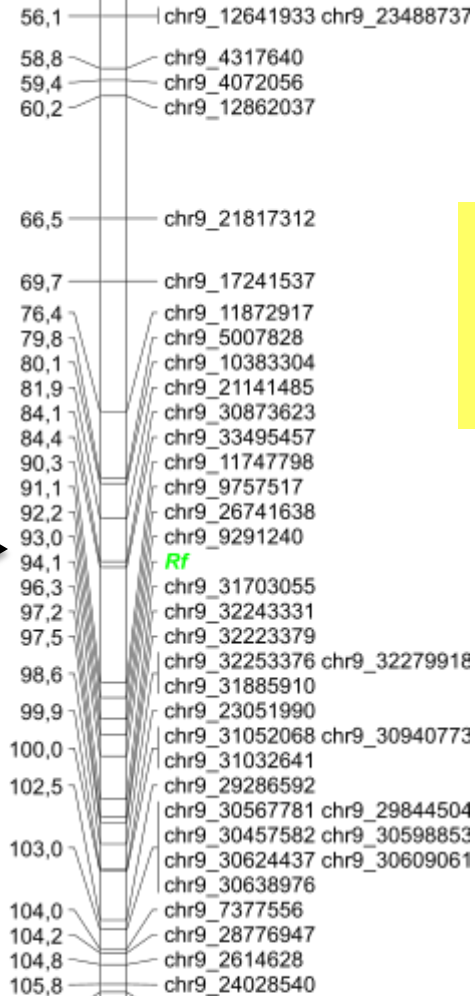
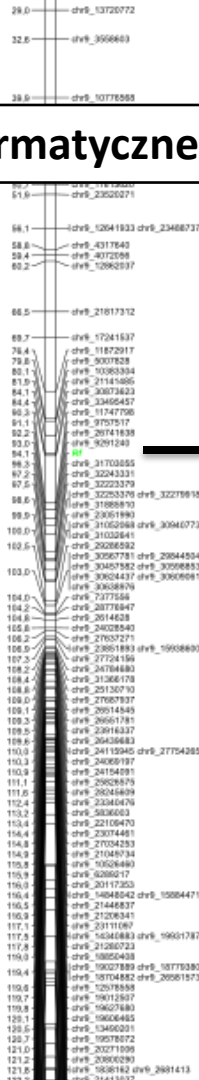
# Weryfikacja polimorficznych markerów – populacja 650



# Weryfikacja polimorficznych markerów – populacja K1



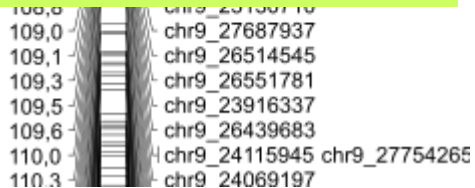
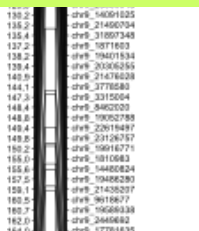
# Analizy bioinformatyczne wyników GBS

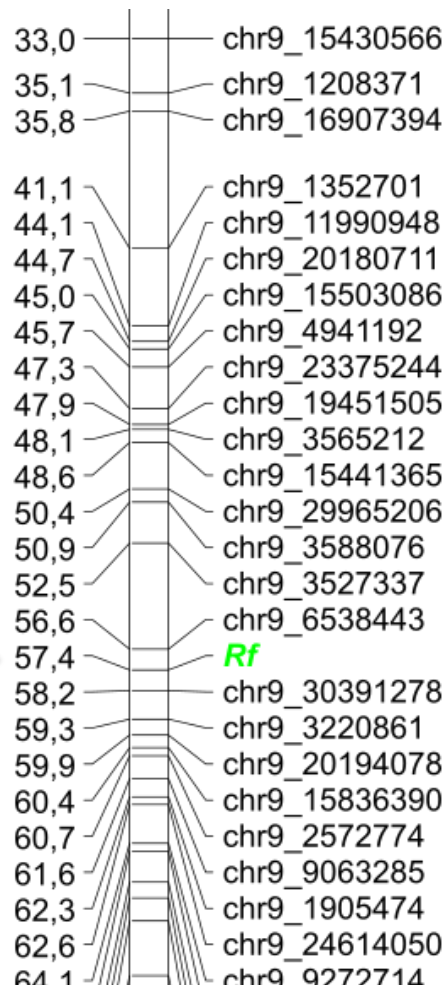
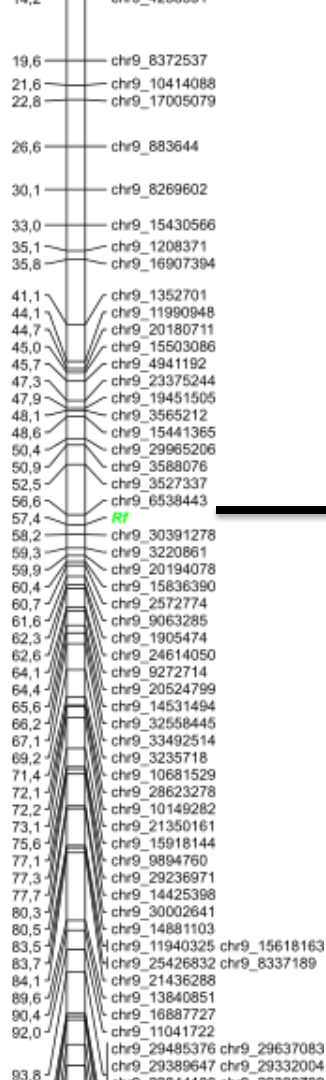


populacja 172

**Chromosom 9**  
156 loci  
227,2 cM  
0,7 locus/cM

Mapa genetyczna chromosomu 9 marchwi skonstruowana na bazie segregacji polimorfizmów sekwencyjnych w populacji 172.





populacja 510-14

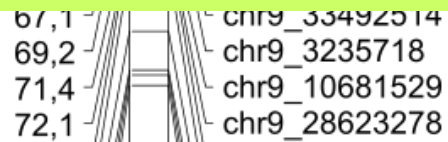
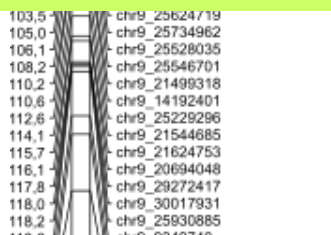
Chromosom 9

97 loci

148,2 cM

0,65 locus/cM

Mapa genetyczna chromosomu 9 marchwi skonstruowana na bazie segregacji polimorfizmów sekwencyjnych w populacji 510-14.





# Wyniki

## Analizy bioinformatyczne wyników GBS

Geny PPR sąsiadujące z polimorfizmami sekwencyjnymi wykazującymi sprzężenie z restorerem dla cytoplazmy Sp

### populacja 172

Polimorfizm	Pozycja polimorfizmu [cM]	Najbliższy gen PPR	Odległość od najbliższego genu PPR [bp]
chr9_11872917	76.372	LOC108201277	44627
chr9_5007828	79.799	LOC108202514	95997
chr9_10383304	80.101	LOC108201264	638286
chr9_21141485	81.873	LOC108200571	42019
chr9_30873623	84.095	LOC108201708	1048183
chr9_33495457	84.437	LOC108202954	147851
chr9_11747798	90.346	LOC108201277	78735
chr9_9757517	91.139	LOC108201264	1264073
chr9_26741638	92.210	LOC108201623	835289
chr9_9291240	92.995	LOC108202973	1004902
<b>Fenotyp (restorer)</b>	<b>94.077</b>	-	-
chr9_31703055	96.343	LOC108201708	218751
chr9_32243331	97.225	LOC108200643	31375
chr9_32223379	97.497	LOC108200643	51327
chr9_32253376	98.598	LOC108200643	21330
chr9_32279918	98.598	LOC108200643	1592
chr9_31885910	98.598	LOC108201708	35896
chr9_23051990	99.935	LOC108200444	1724019
chr9_31052068	100.003	LOC108201708	869738
chr9_30940773	100.003	LOC108201708	981033
chr9_31032641	100.003	LOC108201708	889165

### populacja 510-14

Polimorfizm	Pozycja polimorfizmu [cM]	Najbliższy gen PPR	Odległość od najbliższego genu PPR [bp]
chr9_15503086	44.986	LOC108202209	601092
chr9_4941192	45.651	LOC108202514	29361
chr9_23375244	47.284	LOC108201555	1747645
chr9_19451505	47.948	LOC108201390	30886
chr9_3565212	48.051	LOC108201065	0
chr9_15441365	48.613	LOC108202209	662813
chr9_29965206	50.441	LOC108200670	396393
chr9_3588076	50.883	LOC108200981	0
chr9_3527337	52.518	LOC108201090	0
chr9_6538443	56.574	LOC108202972	267639
<b>Fenotyp (restorer)</b>	<b>57.441</b>	-	-
chr9_30391278	58.212	LOC108200670	822465
chr9_3220861	59.334	LOC108201056	13911
chr9_20194078	59.914	LOC108200241	511492
chr9_15836390	60.351	LOC108202209	267788
chr9_2572774	60.673	LOC108200248	216087
chr9_9063285	61.594	LOC108202973	776947
chr9_1905474	62.261	LOC108202764	64179
chr9_24614050	62.553	LOC108201555	508839
chr9_9272714	64.109	LOC108202973	986376
chr9_20524799	64.363	LOC108202128	301480

Predykcja lokalizacji subkomórkowej i składu domenowego białek PPR, których geny wykazują sprzężenie z restorerem dla cytoplazmy Sa

populacja 536

Gen	Lokalizacja białka	Liczba motywów PPR (TPRpred)	Inne domeny (InterPro)
LOC108210674	chloroplasty	12	-
LOC108211629	mitochondria / chloroplasty	11	E, DYW
LOC108215225	chloroplasty	19	-
LOC108211868	mitochondria	10	E
LOC108215332	mitochondria / chloroplasty	14	-
LOC108214859	mitochondria / chloroplasty	13	-
LOC108211514	mitochondria	15	-
LOC108212012	mitochondria	10	-
LOC108210383	mitochondria / chloroplasty	14	E, E+
LOC108214534	chloroplasty / mitochondria	13	E
LOC108214467	chloroplasty	15	-

Predykcja lokalizacji subkomórkowej i składu domenowego białek PPR, których geny wykazują sprzężenie z restorerem dla cytoplazmy Sa

Gen	Lokalizacja białka	Liczba motywów PPR (TPRpred)	Inne domeny (InterPro)
LOC108211398	mitochondria	11	-
LOC108215037	mitochondria / chloroplasty	13	-
LOC108211424	mitochondria / chloroplasty	14	E, E+, DYW
LOC108214534	chloroplasty / mitochondria	13	E
LOC108211887	mitochondria	9	E, E+, DYW
LOC108214244	mitochondria	23	-
LOC108213741	mitochondria	17	E, E+, DYW
LOC108214336	chloroplasty, cytoplazma, jądro	15	DYW
LOC108213200	chloroplasty / mitochondria	8	E
LOC108215332	mitochondria / chloroplasty	14	-
LOC108214467	chloroplasty	15	-
LOC108210383	chloroplasty	14	E, E+
LOC108211216	mitochondria	3	-

populacja 538

## populacja 170a

Parametr	Wartość	
Zsumowana długość odczytów*	554 667 900,00	
Liczba odczytów*	3 697 786,00	
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC	41,7	
N50	150	
N95	150	
%Q20	96,2	
%Q30	90,1	
Phred	min.	35,00
	maks.	70,00
	średni	68,3

## Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie transkryptomu (GBS-t) w kontekście mapowania restorerów cebuli

Parametry statystyczne uzyskanych odczytów sekwencyjnych

## populacja 170b

Parametr	Wartość	
Zsumowana długość odczytów*	606 966 360,80	
Liczba odczytów*	4 046 442,40	
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC	41,8	
N50	150	
N95	150	
%Q20	97,5	
%Q30	93,1	
Phred	min.	35,00
	maks.	70,00
	średni	68,8

## populacja 444

Parametr	Wartość	
Zsumowana długość odczytów*	578 924 479,50	
Liczba odczytów*	3 859 496,5	
Długość odczytu	min.	150
	maks.	150
	średnia	150
Procent GC	42,5	
N50	150	
N95	150	
%Q20	96,7	
%Q30	91,4	
Phred	min.	35,00
	maks.	70,00
	średni	68,5

\* dla odczytów w jednym kierunku

# Wnioski

## **W temacie badawczym 1 (Opracowanie markerów DNA dla alleli S-locus kapusty):**

1. Zidentyfikowano pięć markerów o genotypie korelującym z wartością współczynnika samoniezgodności – dwa dla populacji 650 i trzy dla populacji K1.
2. Jeden z tych markerów – C1-676/CviKI – wykazywał korelację w obydwu badanych populacjach. Zaskakująco, w populacji 650 heterozygoty w locus tego markera cechował najwyższy współczynnik samoniezgodności (wyższy od obydwu homozygot).

## **W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników GBS):**

1. U dwóch populacji marchwi udało się zmapować gen restorerowy w grupie sprzężeń odpowiadającej analizowanemu chromosomowi – był to chromosom 9. Obydwie populacje zawierały cytoplazmę Sp wywołującą sterylność typu płatkowego.
2. Dysponując fizyczną lokalizacją markerów sprzężonych z restorerem (w genomie referencyjnym) wytypowano cztery geny PPR, które mogą odpowiadać restorerowi dla cytoplazmy Sp. Są to geny opatrzone identyfikatorami: LOC108201623, LOC108202973, LOC108200670 oraz LOC108202972.

## **W temacie badawczym 3 (Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie transkryptomu (GBS-t) w kontekście mapowania restorerów cebuli):**

1. W przeprowadzonym eksperymencie GBS-t dla pojedynczej rośliny uzyskano ok. 600 Mb danych transkryptomicznych.
2. Parametry statystyczne uzyskanych danych wskazują na ich wysoką jakość, co wynika m.in. z rygorystycznej filtracji odczytów sekwencyjnych przez dostawcę usługi.

**Założone mierniki zostały zrealizowane.**

## **Prezentacja wyników**

Szklarczyk M., Wesołowski W., Domnicz B., Cieplak E., Stojalowski S. Search for fertility restoring genes in carrots; 11 Konferencja Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin, Poznań, 19–22 wrzesień 2023 r.; poster

## **Podziękowania**

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi – finansowanie  
Plantico Zielonki Sp. z o.o. – materiały roślinne