

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

Dr inż. Wojciech Wesołowski

Dr inż. Magdalena Simlat, prof. URK

Dr hab. Stefan Stojalowski, prof. ZUT

Cele projektu w 2022 r.

W temacie badawczym 1 (Analiza ekspresji S-locus kapusty):

- określenie, czy różnice w sekwencji S-haplotypów kapusty (samozgodności i samoniezgodności) przekładają się na różnice w ekspresji występujących w nich genów¹⁾.

W temacie badawczym 2 (Celowane genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) w kontekście identyfikacji restorerów marchwi):

- wskazanie genów kandydujących dla przywracania płodności u marchwi²⁾.

¹⁾ Cel zrealizowany.

²⁾ Cel zrealizowany częściowo (w toku): Próby DNA dostarczono do usługodawcy, u którego przeszły pozytywnie kontrolę jakości i zostały użyte do konstrukcji bibliotek, obecnie trwa sekwencjonowanie tych bibliotek.

Materiały i metody

W temacie badawczym 1 (Analiza ekspresji S-locus kapusty):

Materiały roślinne

- Populacje otrzymane poprzez krzyżowanie samoniezgodnych i samozgodnych roślin kapusty głowiastej białej (*Brassica oleracea* gr. *capitata*).
- RNA izolowano z pąków kwiatowych zbieranych z roślin rosnących w szklarni.

Metody

- Izolacja RNA: Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich).
- Odwrotna transkrypcja: First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).
- Amplifikacja DNA: konwencjonalny PCR.
- Analiza produktów RT-PCR: elektroforeza w standardowym żelu agarozowym.

W temacie badawczym 2 (Celowane genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) w kontekście identyfikacji restorerów marchwi):

Materiały roślinne

- Cztery populacje segregujące na rośliny męskosterylne i rośliny z przywróconą płodnością.

Metody

- Preparatyka całkowitego DNA: ekstrakcja organiczna, wytracanie izopropanolem.
- Oczyszczanie całkowitego DNA: Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) z kolumnami adsorpcyjnymi Dongsheng Biotech.
- Produkcja biblioteki i jej sekwencjonowanie: usługa zewnętrzna w firmie Novogene.

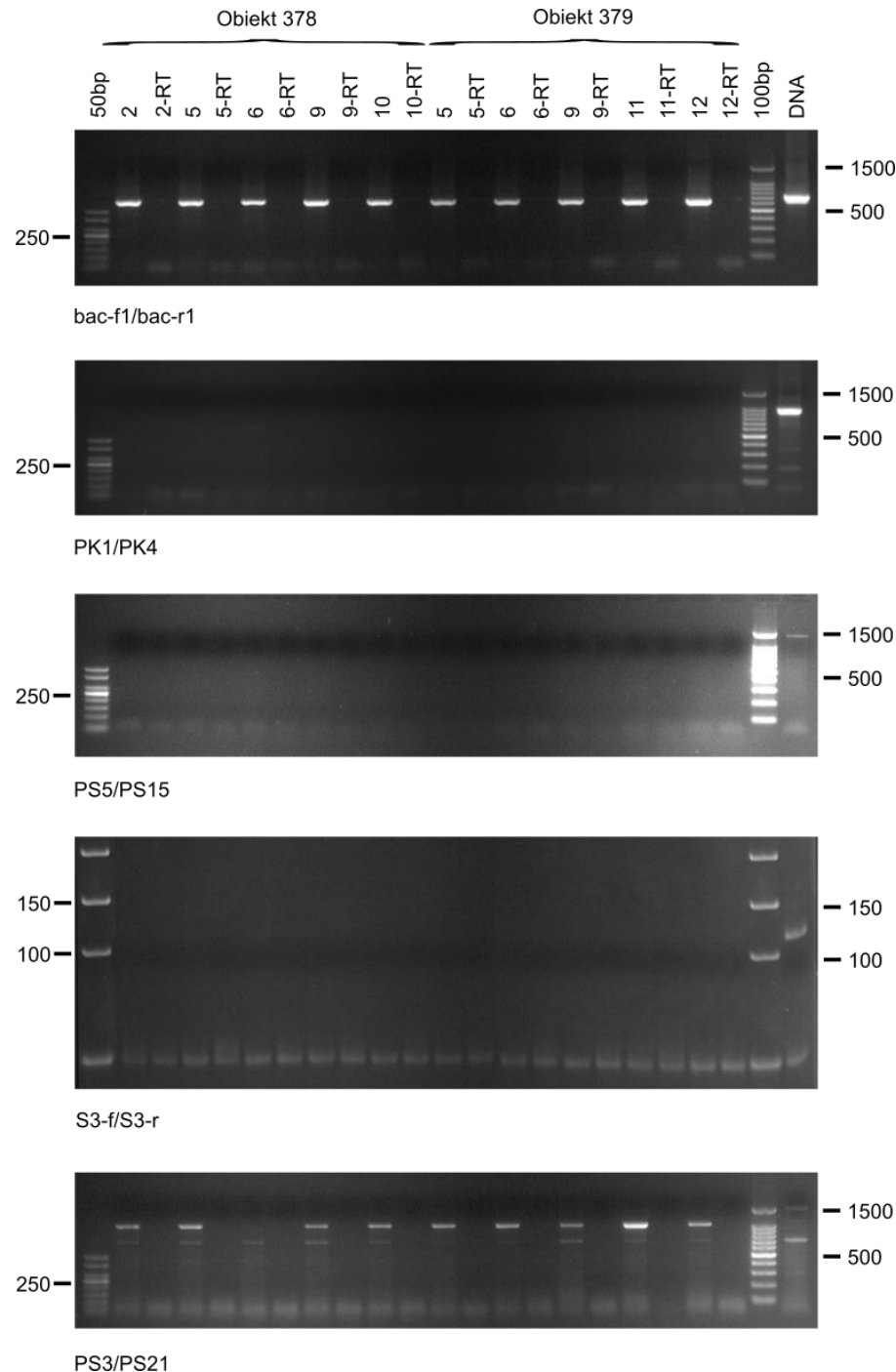
Wyniki

Analiza ekspresji S-locus kapusty

Obiekty 378 i 379

Po użyciu starterów PK-1 / PK-4, PS5 / PS15 oraz S3-f / S3-r nie otrzymano produktu amplifikacji dla żadnej badanej rośliny. W kontrolach zawierających genomowy DNA otrzymano dla tych starterów produkty o wielkościach odpowiednio: 940, 1500 i 120 bp. Startery PS3 / PS-21 generowały produkt o wielkości 1050 bp. Produkt ten pojawił się u wszystkich roślin obu badanych obiektów, oprócz rośliny 6 z obiektu 378. Po użyciu tych starterów u wszystkich badanych roślin otrzymano też mniejszy produkt, o wielkości 750 bp, cechujący się wyraźnie mniejszą wydajnością amplifikacji. W tym przypadku w kontroli zawierającej genomowy DNA otrzymano dwa produkty o wielkościach: 750 i 1700 bp. Po reakcji ze starterami kontrolnymi bac-f1/bac-r1 dla wszystkich badanych prób cDNA otrzymano produkt o wielkości 600 bp, o dużej wydajności, a w kontroli zawierającej genomowy DNA otrzymano produkt o wielkości 620 bp. Amplifikacji wyżej opisanych produktów nie obserwowano u prób stanowiących kontrole negatywne (bez dodatku odwrotnej transkryptazy)

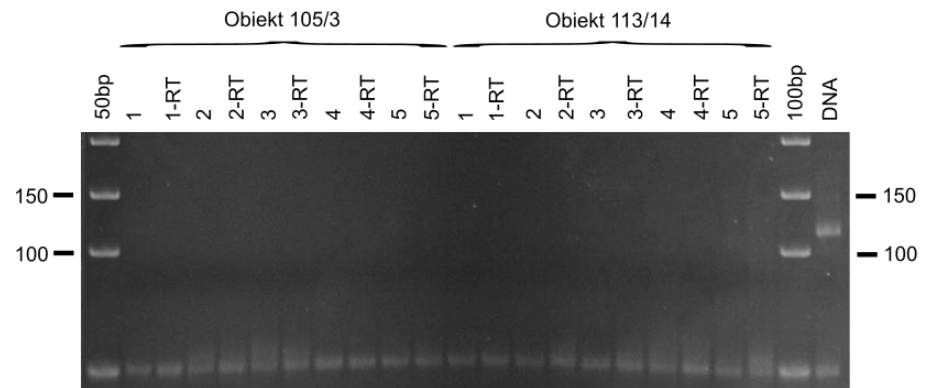
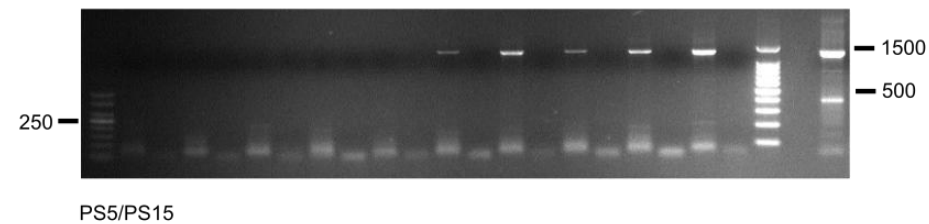
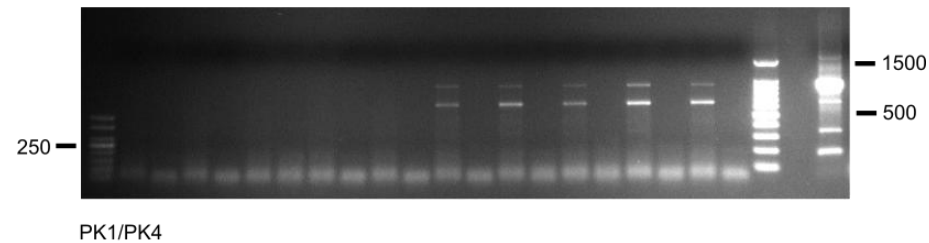
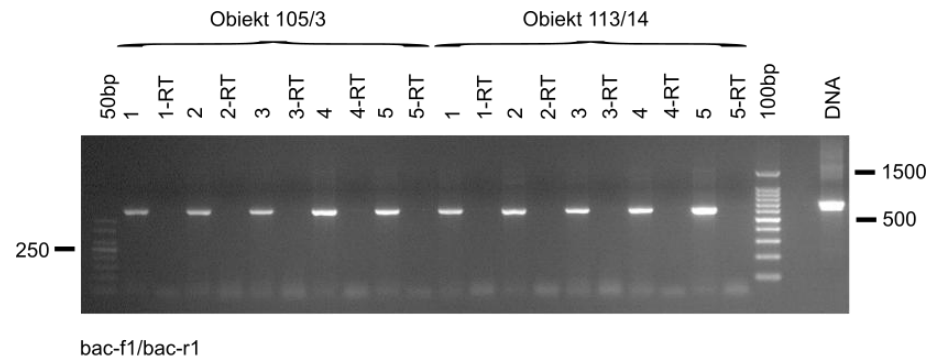
Produkty RT-PCR uzyskane na bazie RNA z pąków kwiatowych dla obiektów kapusty 378 i 379 przy użyciu starterów bac-f1/bac-r1, PK1/PK4, PS5/PS15, S3-f/S3-r oraz PS3/PS21



Obiekty 105/3 i 113/14

Po reakcji ze starterami S3-f / S3-r nie otrzymano produktu w żadnym z badanych obiektów, a w kontroli zawierającej genomowy DNA uzyskano produkt o wielkości 115 bp. Po użyciu starterów PK1 / PK4 u wszystkich roślin obiektu 113/14 otrzymano 2 produkty o wielkości 700 i 1160 bp, z których mniejszy produkt cechował się większą wydajnością amplifikacji. Startery te w kontroli zawierającej genomowy DNA dały produkty o wielkościach: 200, 330, 680 i 870 bp, z których największą wydajnością cechował się produkt 870 bp. Startery PS5 / PS15 generowały u wszystkich roślin obiektu 113/14 produkt o wielkości 1400 bp. W wyniku reakcji z zastosowaniem wymienionych starterów nie otrzymano produktów dla obiektu 105/3. W kontroli zawierającej genomowy DNA startery te generowały produkty o wielkości 400 i 1340 bp. Po reakcji ze starterami kontrolnymi bac-f1 / bac-r1 dla wszystkich badanych prób cDNA otrzymano produkt o wielkości 600 bp. Wydajność amplifikacji dla prób z obu obiektów kapusty była zbliżona. Kontrola zawierająca genomowy DNA generowała produkt o wielkości 620 bp. Amplifikacji wyżej opisanych produktów nie obserwowano u prób stanowiących kontrole negatywne (bez dodatku odwrotnej transkryptazy)

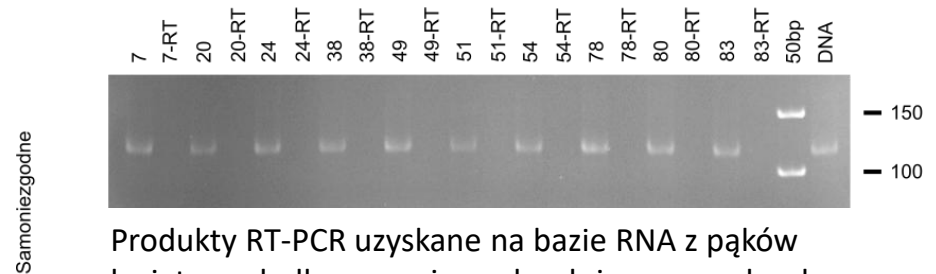
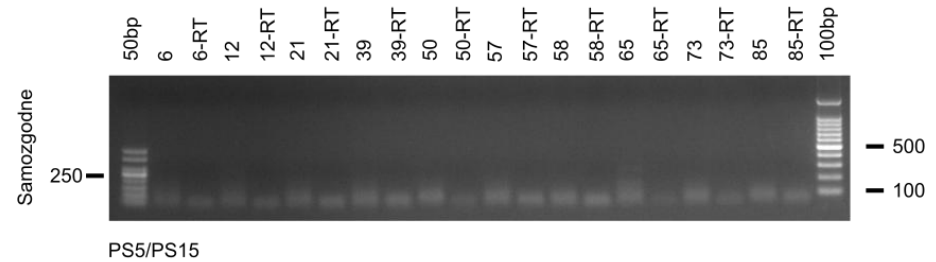
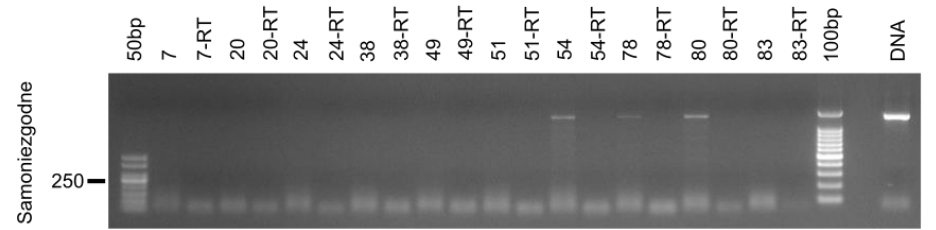
Produkty RT-PCR uzyskane na bazie RNA z pąków kwiatowych dla obiektów kapusty 105/3 i 113/14 przy użyciu starterów bac-f1/bac-r1, PK1/PK4, P/PK4 oraz S3-f/S3r.



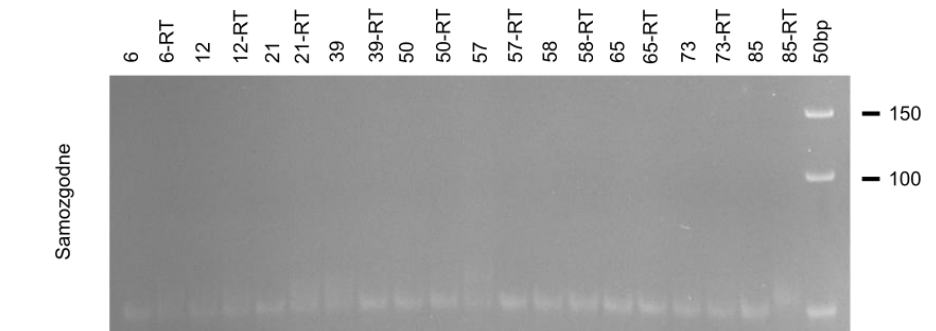
Obiekt 651

Po użyciu starterów PS-5 / PS-15 otrzymano produkt o wielkości 1500 bp. Produkt ten pojawił się u samoniezgodnych roślin o numerach 54, 78 i 80. U roślin samozgodnych nie otrzymano produktów amplifikacji. Kontrola zawierająca genomowy DNA wykonana przy użyciu tych starterów u rośliny samoniezgodnej zawierała produkt o wielkości 1500 bp. Startery S3-f / S3-r generowały produkt o wielkości 120 bp. Produkt ten wystąpił u wszystkich roślin samoniezgodnych. Startery te w kontroli zawierającej genomowy DNA rośliny samoniezgodnej generowały produkt o wielkości 120 bp. Amplifikacji wyżej opisanych produktów nie obserwowano u prób stanowiących kontrole negatywne (bez dodatku odwrotnej transkryptazy).

Po użyciu starterów PK-1 / PK-4 otrzymano produkt o wielkości 690 bp. Jego amplifikację obserwowano u roślin samoniezgodnych o numerach 7, 20, 38, 51, 54, 78 i 80. W przypadku roślin 7, 20, 54 i 80 uzyskana wydajność była znikoma. W kontroli zawierającej genomowy DNA przy użyciu tych starterów u rośliny samoniezgodnej otrzymano produkt o wielkości 1170 bp. Po reakcji ze starterami kontrolnymi bac-f1/bac-r1 dla wszystkich badanych prób cDNA otrzymano produkt o wielkości 600 bp. W tym przypadku wydajność amplifikacji dla roślin samozgodnych i samoniezgodnych była zbliżona. W wyniku kontrolnej amplifikacji genomowego DNA z użyciem tych starterów otrzymano u rośliny samoniezgodnej produkt o wielkości 740 bp. Amplifikacji wyżej opisanych produktów nie obserwowano u prób stanowiących kontrole negatywne (bez dodatku odwrotnej transkryptazy).



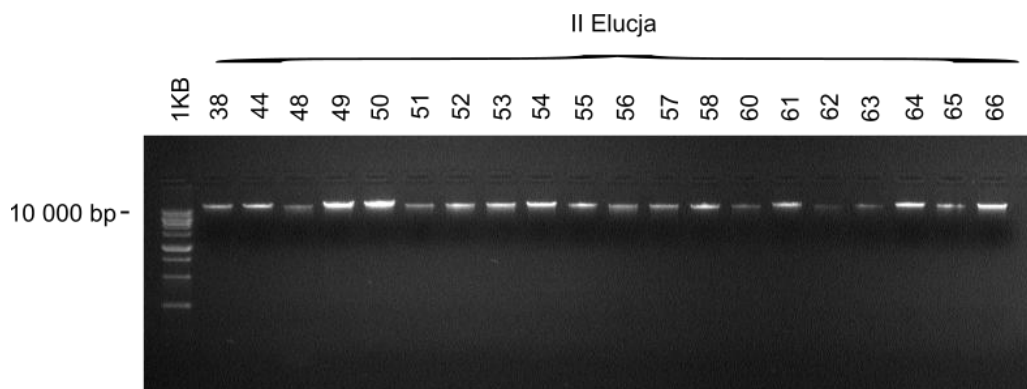
Produkty RT-PCR uzyskane na bazie RNA z pąków kwiatowych dla samoniezgodnych i samozgodnych roślin kapusty z obiektu 651 przy użyciu starterów PS5/PS15 i S3-f/S3-r



S3-f/S3-r

Celowane genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) w kontekście identyfikacji restorerów marchwi

Preparaty całkowitego DNA wyizolowano z pojedynczych roślin marchwi. DNA było następnie oczyszczane na kolumnach adsorpcyjnych. Zmierzone spektrofotometrycznie wartości stężenia DNA otrzymanych preparatów wynosiły w granicach od 11,4 do 271,2 ng/ μ l. Analiza spektrofotometryczna umożliwiła również ocenę jakościową otrzymanych preparatów poprzez pomiar stosunku absorbancji przy 260 i 280 nm. Średnia wartość zmierzonego parametru wynosiła 1,87, co świadczy o braku kontaminacji badanych preparatów DNA związkami absorbującymi promieniowanie o długości fali 280 nm, np. białkami.

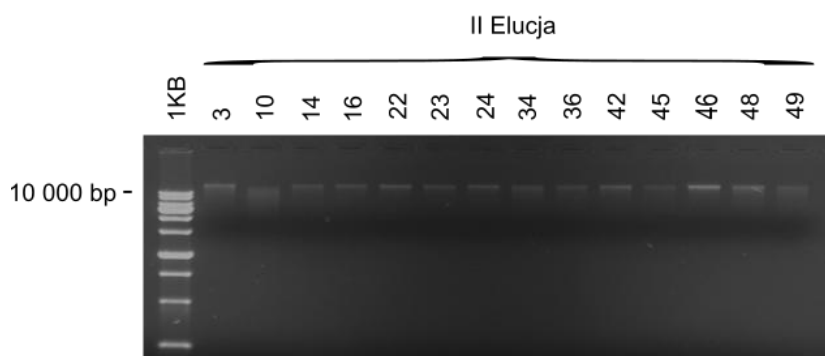
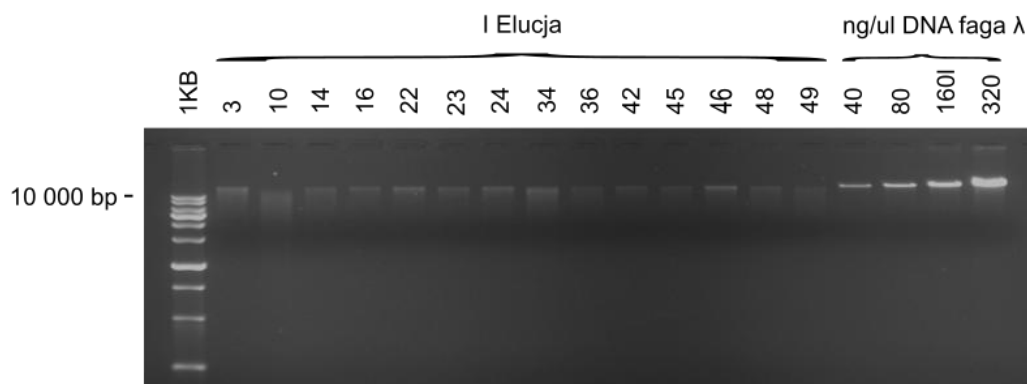


Całkowite DNA wybranych roślin z populacji 536 po oczyszczeniu na kolumnach adsorpcyjnych, rozdzielone w żelu agarozowym.

Nr rośliny	Stężenie DNA [ng/ μ l]		A260/A280	
	I elucja	II elucja	I elucja	II elucja
Populacja 536				
1	178,6	64,6	1,86	1,83
2	74,4	41,7	1,89	1,86
4	65,2	53,6	1,82	1,83
5	31,3	36,9	1,88	1,82
6	149,4	88,7	1,84	1,83
8	163,8	37,2	1,83	1,84
9	225,8	76,1	1,83	1,82
10	43,1	46,9	1,86	1,82
11	33,3	45,2	1,81	1,78
12	153,4	80,4	1,83	1,81
13	29,8	15,9	1,95	1,99
14	124,1	35,4	1,85	1,83
16	22,6	33,9	1,85	1,83
17	266,9	59,7	1,82	1,83
21	66,4	56,6	1,9	1,84

Stężenie przykładowych preparatów całkowitego DNA wyizolowanych z roślin marchwi po oczyszczaniu na mikrokolumnach

Część próbek DNA, dla których nie osiągnięto zadowalającej wydajności oczyszczania na kolumnach adsorpcyjnych (było to ok. 20% wszystkich próbek) zostało oczyszczone z żelu agarozowego po elektroforezie. Zmierzone spektrofotometrycznie wartości stężenia DNA otrzymanych preparatów wynosiły w granicach od 10,2 do 91 ng/μl. Analiza spektrofotometryczna umożliwiła również pomiar jakościowy otrzymanych preparatów poprzez pomiar stosunku absorbancji przy 260 i 280 nm. Średnia wartość zmierzonego parametru wynosiła 1,82, co świadczy o braku kontaminacji badanych preparatów DNA związkami absorbującymi promieniowanie o długości fali 280 nm, np. białkami.



Całkowite DNA roślin z populacji 538 po oczyszczeniu z żelu, rozdzielone w żelu agarozowym wraz ze znanymi ilościami DNA faga lambda.

Otrzymane preparaty całkowitego DNA wysłano do komercyjnego usługodawcy, któremu zlecono wykonanie bibliotek i wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Aktualnie proces przygotowywania bibliotek został ukończony i trwa proces ich sekwencjonowania.

Wnioski

W temacie badawczym 1 (Sekwencjonowanie wariantów allelicznych *S*-locus kapusty):

1. Ekspresję genu *SRK* obserwowano w obiekcie 113/14 oraz na niskim poziomie u części samoniezgodnych roślin obiektu 651.
2. Ekspresję genu *SLG* obserwowano w obiektach 378, 379, 113/14 oraz na bardzo niskim poziomie u nielicznych samoniezgodnych roślin obiektu 651.
3. Ekspresję genu *SCR11* obserwowano wyłącznie u samoniezgodnych roślin obiektu 651.

W temacie badawczym 2 (Analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania *S*-locus kapusty):

1. Uzyskano preparaty całkowitego DNA do sekwencjonowania masowego. Zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym spełniały one kryteria przydatności do konstrukcji bibliotek sekwencyjnych.
2. Preparaty te są obecnie sekwencjonowane w serwisie zewnętrznym.

Publikacja wyników

Poster

Marek Szklarczyk, Wojciech Wesołowski, Beata Domnicz, Magdalena Simlat.
Cechy organizacji i ekspresji S-locus u samozgodnych i samoniezgodnych roślin
kapusty warzywnej (*Brassica oleracea* L.). LIX Zjazd Polskiego Towarzystwa
Botanicznego, Warszawa, 29.06 – 1.07.2022