



# Ocena materiałów hodowlanych buraka cukrowego z zastosowaniem markerów związanych z odpornością na rizomanię oraz identyfikacja cytoplazmy typu dzikiego w badanych materiałach

Anna Litwiniec<sup>1</sup>, Ostrowska Judyta<sup>1</sup>, Choińska Beata<sup>1</sup>, Łukanowski Aleksander<sup>2</sup>

1 - Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Oddział Bydgoszcz, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych, Pracownia Biotechnologii, ul. Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz, a.litwiniec@ihar.bydgoszcz.pl

2 - Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Zakład Fitopatologii Molekularnej, ul. Ks. A. Kordeckiego 20, 85-225 Bydgoszcz

## WPROWADZENIE

W toku realizacji Programu Wieloletniego I HAR-PIB na lata 2015-2020, Zad.2.4 prowadzone są prace mające na celu podniesienie odporności buraka cukrowego na rizomanię powodowaną przez wirus nekrotycznego zółknięcia nerwów BNYVV. Ze względu na pojawiające się patotypy wirusa posiadające zdolność do przelamywania istniejącej odporności konieczne jest łączenie różnych jej źródeł w jednej odmianie. Odporność na rizomanię wywodzi się z zasobów genowych buraka dzikiego *Beta vulgaris* ssp. *maritima*.

## CEL I METODY

Celem niniejszej pracy była identyfikacja materiałów posiadających odporność na BNYVV, ocena występowania wybranych produktów PCR w materiałach hodowlanych buraka oraz porównanie do źródeł odporności wywodzących się z gatunków dzikich. W niniejszym badaniu analizowano materiały hodowlane buraka cukrowego F1. Przeprowadzono reakcje PCR z zastosowaniem wybranych starterów segregujących z odpornością. Następnie dokonano rozdzielenia elektroforetycznego uzyskanych produktów, oszacowano ich wielkość z zastosowaniem oprogramowania QuantityOne w systemie Gel-Doc 2000 (BIO-RAD), a następnie skonstruowano dendrogram podobieństwa genetycznego na bazie uprzednio opracowanego dendrogramu dla gatunków dzikich. Z pomocą metod RFLP - polimorfizmu długości fragmentu restrykcyjnego (ang. *restriction fragment length polymorphism*), HRM (ang. *high resolution melting*) - w systemie LightCycler 480 (Roche) oraz sekwencjonowania ujawniono obecność wybranych SNP w rejonach opisywanych jako związane z różnymi źródłami odporności. Przeprowadzono również analizę regionów minisatelitarnego DNA mitochondrialnego, która pozwoliła na oznaczenie typu cytoplazmy.

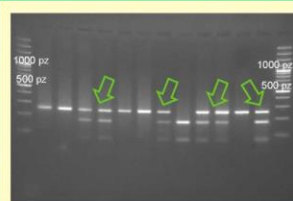
## WYNIKI I WNIOSKI

- Na podstawie dendrogramu podobieństwa genetycznego oraz zgodnie z dostępnym opisem dwa podstawowe skupienia materiałów hodowlanych były determinowane głównie jednym z komponentów rodzicielskich (Ryc.1).
- Z zastosowaniem markerów mtDNA ujawniono obecność nietypowego dla materiałów buraka cukrowego profilu minisatelit dla jednego z badanych obiektów, co wskazuje na obecność cytoplazmy odbiegającej od typu Owena oraz od dotychczas opisanych typów wg Fénart i in. (2008) (Ryc.2).
- Bazując na danych fenotypowych zidentyfikowano materiały cenne, które mimo wysokiej zawartości wektora charakteryzowały się niską oznaczoną zawartością wirusa (Ryc.3).
- Dokonano wyodrębnienia kilku grup profili HRM, wskazujących na nagromadzenie SNP w badanym obszarze opisywanym jako posiadający SNP typowe dla Rz2 (Ryc.4), co zostało następnie zweryfikowane poprzez sekwencjonowanie (5 SNP). Oceniano również populację pod kątem SNP opisywanego jako towarzyszący Rz1 z zastosowaniem RFLP (Ryc.5). Uzyskane wyniki wskazują na obecność znaczącego zróżnicowania genotypowego i fenotypowego badanych materiałów, a ustalenie konsekwencji poszczególnych polimorfizmów dla odporności i interakcji rośliny z wirusem wymaga prowadzenia dalszych prac, w szczególności analizy pokolenia F2.
- Wybrane produkty PCR towarzyszące odporności wycinano z żelu agarozowego (Fig.6), a następnie sekwencjonowano i poszukiwano sekwencji o znaczącym dopasowaniu w dostępnych bazach z zastosowaniem BLAST (NCBI). Potwierdzono charakter wybranych produktów jako analogów genów odporności RGA (ang. *resistance gene analogues*).

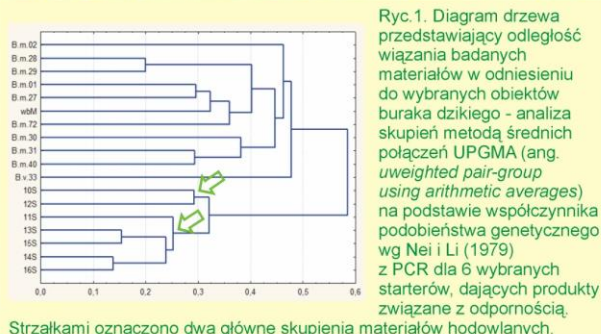
### Literatura:

Fénart S, Arnaud JF, De Cauwer I, Cuguen J. Nuclear and cytoplasmic genetic diversity in weed beet and sugar beet accessions compared to wild relatives: new insights into the genetic relationships within the *Beta vulgaris* complex species. Theor Appl Genet 2008; 116: 1063-1077.

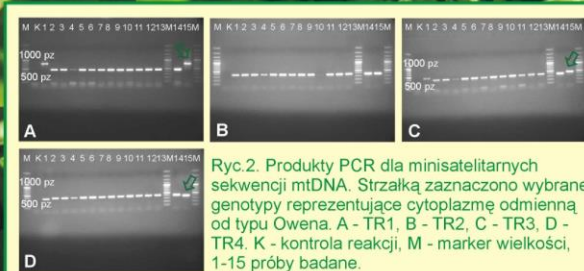
Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 5269-5273.



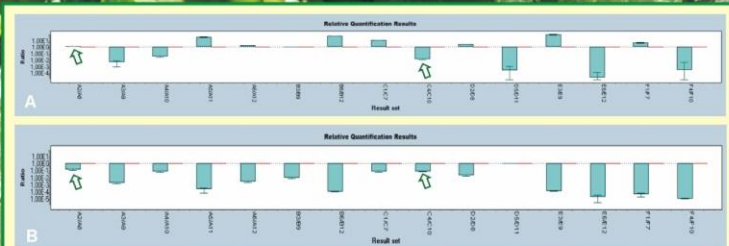
Ryc.5. Ocena genotypowa badanych materiałów na podstawie cięcia restrykcyjnego produktów PCR zaprojektowanego z zastosowaniem programu RestrictionMapper, wersja 3. Analiza SNP towarzyszącego Rz1, heterozygoty zaznaczono strzałkami.



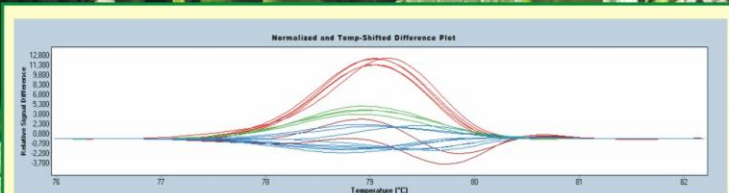
Ryc.1. Diagram drzewa przedstawiający odległość wiązania badanych materiałów w odniesieniu do wybranych obiektów buraka dzikiego - analiza skupień metodą średnich połączeń UPGMA (ang. *unweighted pair-group using arithmetic averages*) na podstawie współczynnika podobieństwa genetycznego wg Nei i Li (1979) z PCR dla 6 wybranych starterów, dających produkty związane z odpornością.



Ryc.2. Produkty PCR dla minisatelitarnych sekwencji mtDNA. Strzałką zaznaczono wybrane genotypy reprezentujące cytoplazmę odmienną od typu Owena. A - TR1, B - TR2, C - TR3, D - TR4. K - kontrola reakcji, M - marker wielkości, 1-15 próby badane.



Ryc.3. Ocena fenotypowa badanych materiałów hodowlanych w systemie real-time PCR LightCycler 480 w module Advanced Relative Quantification z zastosowaniem LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science). A - ocena BNYVV względem genu aktywny, B - ocena *Polymyxa betae*, wektora BNYVV względem genu aktywny. Zaznaczono genotypy o niskiej koncentracji wirusa przy stosunkowo wysokiej koncentracji *P. betae*, niektóre wykazały znaczącą zgodność na poziomie analizowanych SNP z odmianą referencyjną 'Annella' KWS Rz2.



Ryc.4. Ocena genotypowa badanych materiałów hodowlanych w systemie real-time PCR LightCycler 480 w module Gene Scanning z zastosowaniem LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science). Analiza HRM w regionie, w którym identyfikowano SNP towarzyszące Rz2.



Ryc.6. Produkty PCR uzyskane dla wybranych sekwencji (A i B), po wycięciu z żelu poddano ponownej amplifikacji (C) i sekwencjonowaniu. Potwierdzono wysoką zgodność na poziomie 99% do fragmentu genomu *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* o 100% dopasowania do mRNA białek typu NBS-LRR związanych z odpornością. K - kontrola reakcji, M - marker wielkości, 1-13 próby badane.

Badania realizowane w ramach Programu Wieloletniego na lata 2015-2020 "Tworzenie naukowych podstaw postępu biologicznego i ochrona roślinnych zasobów genowych źródłem innowacji wsparcia zrównowagowanego rolnictwa oraz bezpieczeństwa żywnościowego kraju" na podstawie umowy nr HORzg 8424/2/2017 pomiędzy Ministrem Rolnictwa i Rozwoju Wsi a Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB w Radzikowie z dnia 05.05.2017, Zad.2.4 "Poszerzanie puli genetycznej buraka cukrowego przez doskonalenie procesu gnotogenyzy oraz podnoszenie odporności na wirus nekrotycznego zółknięcia nerwów i tolerancji na suszę".