

# STRESZCZENIE ZE SPRAWOZDANIA MERYTORYCZNEGO Z REALIZACJI ZADANIA NA RZECZ POSTĘPU BIOLOGICZNEGO W PRODUKCJI ROŚLINNEJ W 2021 ROKU

**Tytuł zadania nr 16 : Analiza genetycznych uwarunkowań związanych z efektem heterozji oraz odpornością na fuzarium u kukurydzy (*Zea mays* L.).**

## **Temat badawczy 1**

### 1. Cel tematu badawczego

**Celem** tematu badawczego 1 jest identyfikacja nowych markerów molekularnych związanych z plonem ziarna oraz cechami struktury plonu kukurydzy dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji oraz mapowania asocjacyjnego i fizycznego.

### 2. Materiał roślinny

W skład materiału roślinnego w temacie badawczym 1 weszło 250 linii matecznych oraz 2 linie ojcowskie pochodzące z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. Linie te (252) zostały wysiane w dwóch miejscowościach i zostały poddane obserwacjom w warunkach polowych. W roku 2021 z linii tych do sekwencjonowania i analiz molekularnych zostały wybrane losowo 192 linie, a pozostałe 60 analizowane będzie w roku 2022 wraz z mieszańcami.

### 3. Metodyka badań

**Doświadczenie** w warunkach polowych z 250 liniami matecznymi i 2 liniami ojcowskimi zostało założone w jednym powtórzeniu, w dwóch miejscowościach. W warunkach polowych wykonano również krzyżowanie linii rodzicielskich. Łącznie wykonanych zostało 500 krzyżowań (250 linii matecznych x pierwsza linia ojcowska i 250 linii matecznych x druga linia ojcowska). Krzyżowanie prowadzone było w celu uzyskania nasion mieszańcowych do doświadczeń na 2022 i 2023 rok.

**Izolacja DNA** ze 192 genotypów rodzicielskich, które zostały przekazane do sekwencjonowania nowej generacji prowadzona była przy użyciu kitu z firmy Promega.

**Sekwencjonowanie** wykonane zostało z wykorzystaniem technologii DArTseq, opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji. Analizy zostały wykonane w Diversity Arrays Technology, University of Canberra w Australii.

**Mapowanie asocjacyjne** dla plonu oraz cech struktury plonu 192 genotypów kukurydzy zostało wykonane za pomocą analizy GWAS. Mapowanie to zostało wykonane na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania oraz fenotypowania. Dane genotypowe otrzymane zostały z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowiły wyniki polowe dotyczące wielkości plonu oraz cech struktury plonu. Analizowane były następujące cechy struktury plonu: dł. kolby, średnica kolby, dł rdzenia, średnica rdzenia, ilość rzędów, ilość ziarniaków w rzędzie, MTN. Na podstawie wykonanej analizy GWAS do dalszych badań wybrano markery silicoDArT i SNP o największym poziomie istotności, czyli te, które były najsilniej asocjowane z cechami struktury plonu i plonem.

**Mapowanie fizyczne** polegało na tym, że sekwencje markerów silicoDArT i SNP, które zostały wybrane na podstawie analizy GWAS, poddawano analizie BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool), polegającej na przeszukaniu baz danych w celu znalezienia sekwencji o wysokiej homologii względem wybranych sekwencji markerów silicoDArT i SNP. Analizy te wykonane zostały w serwisie URGI (Unité de Recherche Génomique Info) z kompletnie sekwencjonowanym genomem kukurydzy.

**Analiza funkcjonalna sekwencji genów i projektowanie starterów** zostały wykonane przy wykorzystaniu programu Blast2GO oraz Primer 3 Plus. Analizie poddane zostały sekwencje wszystkich genów zlokalizowanych w obszarze chromosomów wyznaczonych na podstawie wykonanej analizy BLAST w serwisie URGI. Celem było uzyskanie informacji o biologicznej funkcji sekwencji genów znajdujących się w wyznaczonym rejonie chromosomów. Następnie zaprojektowano startery do identyfikacji wyselekcjonowanych markerów.

#### 4. Wyniki i wnioski

W wyniku analizy pomiarów biometrycznych stwierdzono zróżnicowanie w średniej wysokości analizowanych cech dla linii w Smolicach i Kobierzycach. Powyższe wyniki wskazują na występowanie interakcji genotypowo-środowiskowych.

Przeprowadzona analiza wariancji dla obserwowanych cech pomiędzy genotypami wykazała istotne statystycznie zróżnicowanie pomiędzy genotypami oraz istotne statystycznie zróżnicowanie dla wszystkich obserwowanych cech pomiędzy miejscowościami, w których było założone doświadczenie polowe (Kobierzyce i Smolice).

Analiza zmiennych kanonicznych wykazała, że wszystkie obserwowane cechy charakteryzowały się rozkładem normalnym. Nie zaobserwowano grupowania się linii ze względu na analizowane cechy.

Analiza korelacji badanych cech wykazała zarówno w Smolicach jak i Kobierzycach, że najwyżej dodatnio skorelowana była masa ziarna z kolby i plon z poletka (100%) oraz długość kolby i długość rdzenia.

W wyniku sekwencjonowania nowej generacji otrzymano markery molekularne SilicoDArT (53 031) i SNP (28 571), na podstawie których oszacowano dystans genetyczny pomiędzy analizowanymi liniami. W oparciu o podobieństwo genetyczne analizowane linie utworzyły 4 główne grupy. Analizując dendrogram można zauważyć, że linie ze Smolic wykazują większe podobieństwo pomiędzy sobą, niż z liniami pochodzącymi z Kobierzyc i odwrotnie linie z Kobierzyc są bardziej podobne do siebie niż do linii ze Smolic.

Spośród 81 602 zidentyfikowanych markerów SilicoDArT i SNP w wyniku mapowania asocjacyjnego wybrano 15 409 (1 559 SilicoDArT i 13 850 SNP) istotnie związanych z analizowanymi cechami struktury plonu oraz samym plonem. Najwięcej markerów molekularnych związanych było z długością kolby (1 203), średnicą kolby (1 759), długością rdzenia (1 201) i średnicą rdzenia (2 326).

Spośród 15 409 markerów istotnie związanych z analizowanymi cechami struktury plonu i plonem wybrano 18 markerów DArT, które były istotne, dla 4 tych samych cech w obu miejscowościach Kobierzyce i Smolice. Markery te wykorzystano do mapowania fizycznego.

W wyniku analiz stwierdzono, że 6 z 18 wytypowanych markerów jest zlokalizowane wewnątrz genów. Markery te są zlokalizowane odpowiednio na chromosomach 8, 9, 7, 3, 5 i 1. W przypadku pozostałych markerów podano ich lokalizację i odległość od najbliższych położonych genów, które w części są scharakteryzowane. Szczegółowa rola poszczególnych białek zostanie określona w kolejnym roku badań po dokładnej analizie doniesień literaturowych.

Po określeniu położenia 18 wytypowanych markerów DArT, do 16 z nich zaprojektowano startery, które posłużą do ich identyfikacji. W kolejnych latach markery te będą mogły zostać wykorzystane w programach hodowlanych do selekcji odmian dobrze plonujących.

## **Temat badawczy 2**

### 1. Cel tematu badawczego

**Celem** tematu badawczego 2 jest identyfikacja nowych markerów związanych z odpornością roślin na fuzarium oraz optymalizacja procedur diagnostycznych, służących do identyfikacji markerów molekularnych zaczerpniętych z literatury związanych z genami odporności na fuzarium

### 2. Materiał roślinny

W skład materiału roślinnego weszły między innymi te same 252 genotypy rodzicielskie (250 linii matecznych i 2 linie ojcowskie), które zostały opisane w temacie badawczym 1. Na tych samych materiałach prowadzone były, w różnych terminach obserwacje stopnia porażenia roślin przez fuzarium. Do mapowania asocjacyjnego i fizycznego wykorzystane zostały wyniki sekwencjonowania tych samych 192 linii co w temacie badawczym 1. Oprócz powyższego w skład materiału roślinnego w temacie badawczym 2, weszło 30 genotypów referencyjnych odpornych i wrażliwych na fuzarium przekazanych Katedrze Genetyki i Hodowli Roslin przez Hodowlę Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR. Na 30 genotypach referencyjnych prowadzone było testowanie 12 markerów zaczerpniętych z doniesień literaturowych.

### 3. Metodyka badań

**Doświadczenie polowe** z 252 liniami zostało opisane w temacie badawczym 1 ponieważ zarówno obserwacje cech struktury plonu jak i porażenia przez fuzarium prowadzone były na tym samym materiale roślinnym tylko w innych terminach. Doświadczenie z 30 genotypami kukurydzy odpornymi i wrażliwymi na fuzarium zostało założone w ogrodzie należącym do Katedry Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu.

**Izolacja DNA** (ze 192 linii), przeznaczonego do sekwencjonowania nowej generacji została opisana w temacie badawczym 1. ponieważ te same wyniki sekwencjonowania zostały wykorzystane do mapowania asocjacyjnego w obu tematach (w temacie 1, wyniki sekwencjonowania były korelowane z cechami struktury plonu, natomiast w temacie 2, korelowane były ze stopniem porażenia roślin przez fuzarium). Izolacja DNA z 30 genotypów podatnych i wrażliwych na fuzarium prowadzona była przy użyciu kitu z firmy A&A Biotechnology.

**Sekwencjonowanie** dotyczyło również tych samych 192 linii rodzicielskich co w zadaniu 1, i tam zostało szczegółowo opisane.

**Mapowanie asocjacyjne** dla odporności na fuzarium 192 genotypów kukurydzy zostało wykonane za pomocą analizy GWAS. Mapowanie to zostało wykonane na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania oraz fenotypowania. Dane genotypowe otrzymane zostały z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowiły wyniki polowe dotyczące stopnia porażenia roślin przez fuzarium. Na podstawie wykonanej analizy GWAS do dalszych badań wybrano markery silicoDArT i SNP o największym poziomie istotności, czyli te, które były najsilniej asocjowane z odpornością na fuzarium.

**Mapowanie fizyczne** polegało na tym, że sekwencje markerów silicoDArT i SNP, które zostały wybrane na podstawie analizy GWAS, poddawano analizie BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool), polegającej na przeszukaniu baz danych w celu znalezienia sekwencji o wysokiej homologii względem wybranych sekwencji markerów silicoDArT i SNP. Analizy te wykonane zostały w serwisie URGI (Unité de Recherche Génomique Info) z kompletnie sekwencjonowanym genomem kukurydzy.

**Analiza funkcjonalna sekwencji genów i projektowanie starterów** zostały wykonane przy wykorzystaniu programu Blast2GO oraz Primer 3 Plus. Analizie poddane zostały sekwencje wszystkich genów zlokalizowanych w obszarze chromosomów wyznaczonych na podstawie wykonanej analizy BLAST w serwisie URGI. Celem było uzyskanie informacji o biologicznej funkcji sekwencji genów znajdujących się w wyznaczonym rejonie chromosomów. Następnie zaprojektowano startery do identyfikacji wyselekcjonowanych markerów.

**Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)** została wykorzystana do identyfikacji markerów sprzężonych z genami odporności na fuzarium dla 30 odpornych i wrażliwych genotypów kukurydzy. Wykorzystane markery zostały opracowane i przetestowane przez Abdel-Rahman et al. (2016) oraz Salah et al. (2016).

**Elektroforezę** prowadzono w 2% żelu agarozowym pod napięciem 120 V przez 1h\*.

#### 4. Wyniki i wnioski

Analizowane linie zarówno w Smolicach jak i Kobierzycach charakteryzowały się wysoką i bardzo wysoką odpornością na fuzarium ocenianą w skali 1-9 (1 – podatne, 9 – odporne). Najmniej odporne okazały się linie o numerach 124 (Smolice-6, Kobierzyce-5,7), 194 (Smolice-5, Kobierzyce-4,7), 206 (Smolice-6, Kobierzyce-6,3), 213 (Smolice-6, Kobierzyce-6) i 246 (Smolice-6, Kobierzyce-6,3).

Analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic w stopniu porażenia roślin przez fuzarium pomiędzy liniami w obrębie danej miejscowości (Kobierzyce, Smolice) jak również pomiędzy miejscowościami.

Wyniki obserwacji polowych pozwoliły wykazanie istotnych dodatnich korelacji pomiędzy stopniem porażenia roślin przez fuzarium w Smolicach i Kobierzycach.

W wyniku sekwencjonowania nowej generacji otrzymano markery molekularne SilicoDArT (53 031) i SNP (28 571), na podstawie których oszacowano dystans genetyczny pomiędzy analizowanymi liniami. W oparciu o podobieństwo genetyczne analizowane linie utworzyły 4 główne grupy. Analizując dendrogram można zauważyć, że linie ze Smolic wykazują większe podobieństwo pomiędzy sobą, niż z liniami pochodzącymi z Kobierzyc i odwrotnie linie z Kobierzyc są bardziej podobne do siebie niż do linii ze Smolic.

W wyniku sekwencjonowania nowej generacji otrzymano łącznie 81 602 markery molekularne, z których w wyniku mapowania asocjacyjnego wybrano 2 962 (321 SilicoDArT i 2 641 SNP) istotnie związanych z odpornością roślin na fuzarium.

Spośród 2 962 markerów istotnie związanych z odpornością roślin kukurydzy na fuzarium wybrano 7 markerów (SilicoDArT, SNP), które były istotne na poziomie 0.001. Markery te wykorzystano do mapowania fizycznego.

W wyniku analiz stwierdzono, że 2 z 7 wytypowanych markerów są zlokalizowane wewnątrz genów. Markery te są zlokalizowane odpowiednio na chromosomach 2 i 3. W przypadku pozostałych markerów podano ich lokalizację i odległość od najbliższej położonych genów, które w części są scharakteryzowane.

Po określeniu położenia 7 wytypowanych markerów (SilicoDArT, SNP) do każdego z nich zaprojektowano startery, które posłużą do ich identyfikacji. W kolejnych latach markery te będą mogły zostać wykorzystane w programach hodowlanych do selekcji odmian odpornych na fuzarium.

W wyniku testowania starterów zaczerpniętych z doniesień literaturowych na 30 genotypach odpornych i podatnych na fuzarium stwierdzono, że w przypadku jednej linii (25) zidentyfikowano 10 z 12 testowanych markerów. W przypadku linii z numerami 255, 9 i 35 zidentyfikowano 9 z 12 markerów. Wszystkie wymienione linie z wyjątkiem linii 35 posiadały odporność na poziomie 9 w obydwu miejscowościach (Kobierzyce, Smolice). Linie te mogą być traktowane jako referencyjne i wykorzystywane do krzyżowań.

W toku analiz opracowano warunki reakcji multiplexPCR dla sześciu par starterów. Zastosowanie analiz multiplexPCR pozwala skrócić czas niezbędny do identyfikacji markerów sprzężonych z genami odporności na fuzarium.