

Sprawozdanie z realizacji zadania badawczego nr 11 za 2024 rok

Tytuł zadania **Identyfikacja mechanizmu molekularnego odporności żyta ozimego na rdzę brunatną.**

Kierownik zadania: **Prof. dr hab. Kamila Nowosad**

Celem prac realizowanych w 2024 roku było:

- 1) Genotypowanie populacji mapującej F₂ Techniką target GBS.
- 2) Konwersja opracowanych markerów do markerów MAS.

W roku 2024 wykonano następujące prace:

Ad 1)

Badania przeprowadzono na genomowym DNA roślin pokolenia F₂ uzyskanych w 2022 roku. DNA zostało wyizolowane przy użyciu komercyjnego kitu do ekstrakcji kwasów nukleinowych, co pozwoliło na uzyskanie wysokiej jakości i zbliżonego stężenia DNA we wszystkich próbkach. Początkowo planowano genotypowanie markerów SNP przy użyciu techniki targetGBS, jednak zmiany w dostępności technologii oraz wzrost kosztów odczynników doprowadziły do wyboru techniki sekwencjonowania całogenomowego (WGS) z niskim pokryciem (3x). Sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie BGI przy użyciu technologii DNBSEQ-T7, wykorzystującej metodę nanokulek DNA (DNB, DNA NanoBalls). Metoda ta zapewniła stabilne i wysokiej jakości odczyty o długości 100 pz (paired-end, PE).

Przygotowane biblioteki sekwencyjne zostały poddane analizie bioinformatycznej, wykorzystując narzędzia takie jak GATK [McKenna i in. 2010], bowtie2 [Langmead i Salzberg 2012], samtools [Li i in. 2009] oraz Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Predykcja markerów SNP została przeprowadzona zgodnie z najlepszymi praktykami zalecanymi przez GATK [<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035890811-GATK-Best-Practices-Workflows>]. Dane genotypowe zostały przekształcone na allele A, B i H w celu przygotowania do konstrukcji mapy genetycznej, którą stworzono przy użyciu pakietu ASMap w R. Proces konstrukcji mapy genetycznej obejmował rygorystyczną filtrację markerów, eliminację danych o niskiej jakości oraz markerów wykazujących zaburzenia w segregacji alleli.

Ostateczna liczba SNP została ograniczona przez zastosowanie szeregu kryteriów filtracyjnych, takich jak wykluczenie markerów o wysokim odsetku brakujących danych,

zaburzeniach segregacji oraz niskiej wartości jakościowej (Qual By Depth). Dzięki temu procesowi wyeliminowano potencjalne błędy i uzyskano wiarygodne dane, które były gotowe do dalszych analiz.

Genotypowanie populacji F_2 z zastosowaniem technologii WGS pozwoliło na uzyskanie odczytów o łącznej liczbie ponad 21 milionów oraz ponad 2,5 miliarda zasad. Odczyty charakteryzowały się bardzo wysoką jakością, gdzie ponad 90% osiągnęło wartość Q30, a ponad 95% osiągnęło wartość Q20. Taka jakość danych wskazuje na ich wiarygodność oraz przydatność w dalszych analizach genotypowych. Po zastosowaniu rygorystycznych kryteriów filtracji wyłoniono 3457 markerów SNP, rozmieszczonych w całym genomie, co stanowi solidną podstawę do dalszych analiz genetycznych populacji.

Konstrukcja mapy genetycznej wykazała równomierne rozmieszczenie markerów na wszystkich chromosomach żyta (1R-7R). Uzyskana mapa genetyczna miała długość 4469 cM, obejmując 962 unikalne loci. Proporcje alleli A, B i H odpowiadały teoretycznemu rozkładowi 1:2:1 dla populacji F_2 , co potwierdziło poprawność danych i jakość zastosowanych markerów. Wartości LOD oraz współczynniki rekombinacji (RF) potwierdziły bliskie powiązania markerów w obrębie grup sprzężeniowych oraz brak powiązań między markerami z różnych grup. Takie wyniki świadczą o poprawnym przypisaniu markerów oraz solidności konstrukcji mapy genetycznej.

Dalsza analiza rozmieszczenia markerów wykazała, że na niektórych chromosomach, takich jak 5R, wystąpiły regiony pozbawione markerów. Mogło to być wynikiem specyficznych cech genomu, takich jak obszary o niskiej zmienności genetycznej lub trudności w sekwencjonowaniu. Analiza jakości danych genotypowych wskazała jednak na równomierne pokrycie większości chromosomów, co sugeruje wysoką jakość danych.

Wyniki badań potwierdziły, że mimo ograniczeń wynikających z niskiego pokrycia sekwencjonowania, możliwe jest uzyskanie wiarygodnych danych genotypowych. Zastosowane rygorystyczne kryteria filtracji markerów, zgodne z literaturą [Zhou i in. 2016; Li i in. 2018], pozwoliły na eliminację artefaktów i uzyskanie mapy o równomiernym pokryciu chromosomów. Opracowana mapa genetyczna o długości 4469 cM obejmuje 962 loci, co odpowiada współczesnym standardom badań nad mapowaniem genomowym.

Wysoka jakość skonstruowanej mapy genetycznej oraz zidentyfikowane markery SNP mają kluczowe znaczenie dla przyszłych analiz genetycznych, w tym identyfikacji loci QTL. Uzyskana mapa genetyczna jest zgodna z wynikami innych badań nad mapami genetycznymi żyta [Milczarski i in. 2016] oraz innych roślin uprawnych. Pomimo pewnych ograniczeń, takich jak brak markerów w regionach centromerycznych i telomerycznych, mapa stanowi solidne narzędzie do badań nad zmiennością genetyczną i hodowlą roślin.

Dalsze analizy wykazały, że nawet w regionach o obniżonej liczbie markerów możliwe było zidentyfikowanie kluczowych loci odpowiadających za istotne cechy genetyczne. Analiza LOD oraz współczynniki rekombinacji (RF) wykazały poprawne przypisanie markerów do grup sprzężeniowych oraz brak powiązań między markerami z różnych grup, co dodatkowo potwierdza jakość skonstruowanej mapy. Wyniki są zgodne z literaturą, gdzie analizy LOD i RF uznaje się za kluczowe wskaźniki w ocenie jakości map genetycznych [Kuchel i in. 2007].

Podsumowując, skonstruowana mapa genetyczna charakteryzuje się wysoką jakością oraz równomiernym pokryciem chromosomów. Wyniki badań dostarczają solidnych podstaw do dalszych analiz, takich jak identyfikacja QTL oraz badania nad zmiennością genetyczną, przyczyniając się do zwiększenia precyzji i skuteczności w hodowli roślin. Dzięki zastosowanym metodom badawczym i precyzyjnej analizie możliwe było osiągnięcie rezultatów, które stanowią istotny krok naprzód w zrozumieniu genetycznej struktury badanej populacji F₂.

Ad 2)

Rozpoczęto od analizy dostępnych danych genetycznych dotyczących odporności na rdzę brunatną, w tym wyników genotypowania z wcześniejszych lat i danych z populacji F₂ (2024). Wybrano markery SNP korelujące z odpornością, preferując te o wysokiej frekwencji alleli w materiałach odpornych. Dla wybranych markerów zaprojektowano startery HRM i KASP. Startery HRM opracowano przy użyciu primer3Plus, sekwencji genomu referencyjnego żyta i wyników wcześniejszych sekwencjonowań, a ich syntezę zlecono firmie zewnętrznej. Startery KASP zaprojektowała firma LCG Genomic.

Walidację markerów przeprowadzono na liniach hodowlanych o różnym stopniu odporności na rdzę brunatną oraz na populacji F₂. W procesie walidacji wykorzystano reakcje HRM i

KASP, które przeprowadzono na urządzeniach Biorad Connect i Illumina Eco, zgodnie ze standardowymi protokołami [Ereli i Wittwer 2010; Thomson 2014]. Ostatecznie wybrano 25 markerów reprezentujących wszystkie chromosomy żyta, a wspólne startery zaprojektowano dla 13 z nich. Spośród nich pozytywne wyniki HRM uzyskano dla 10 markerów.

Metoda HRM wykazała przewagę nad KASP ze względu na niższy koszt, krótszy czas reakcji i wyższą czułość, a także łatwiejszą interpretację wyników. Korelacja wyników HRM z odpornością wyniosła 0,95, natomiast KASP 0,8. Ostatecznie HRM zidentyfikowano jako preferowaną metodę w selekcji markerowej, choć KASP pozostaje cennym narzędziem w specyficznych zastosowaniach wymagających wysokiej specyficzności i jednoczesnego genotypowania wielu markerów.

Podsumowując, metoda HRM stanowi efektywne narzędzie w genotypowaniu SNP w selekcji markerowej żyta, co potwierdzają uzyskane wyniki i wcześniejsze badania [Broccanello i in. 20218; He i in. 20214].

Literatura:

Choulet, Frédéric, Adriana Alberti, Sébastien Theil, Natasha Glover, Valérie Barbe, Josquin Daron, Lise Pingault et al. "Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B." *Science* 345, no. 6194 (2014): 1249721.

Kuchel, H., P. Langridge, L. Mosionek, K. Williams, and S. P. Jefferies. "The genetic control of milling yield, dough rheology and baking quality of wheat." *Theoretical and Applied Genetics* 112 (2006): 1487-1495.

Li, Faji, Weie Wen, Zhonghu He, Jindong Liu, Hui Jin, Shuanghe Cao, Hongwei Geng et al. "Genome-wide linkage mapping of yield-related traits in three Chinese bread wheat populations using high-density SNP markers." *Theoretical and Applied Genetics* 131 (2018): 1903-1924.

Milczarski, Paweł, Monika Hanek, Mirosław Tyrka, and Stefan Stojalowski. "The application of GBS markers for extending the dense genetic map of rye (*Secale cereale* L.) and the localization of the *Rfc1* gene restoring male fertility in plants with the C source of sterility-inducing cytoplasm." *Journal of Applied Genetics* 57 (2016): 439-451.

Thomson, Michael J. "High-throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement." *Plant Breeding and Biotechnology* 2, no. 3 (2014): 195-212.

Zhou, Zhiqiang, Chaoshu Zhang, Yu Zhou, Zhuanfang Hao, Zhenhua Wang, Xing Zeng, Hong Di et al. "Genetic dissection of maize plant architecture with an ultra-high density bin map based on recombinant inbred lines." *BMC genomics* 17 (2016): 1-15.

Broccanello, C., Chiodi, C., Funk, A., McGrath, J. M., Panella, L., & Stevanato, P. (2018). Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant methods*, 14, 1-8.

Chahal, G. S., & Gosal, S. S. (2002). Principles and procedures of plant breeding: biotechnological and conventional approaches. Alpha Science Int'l Ltd..

Erali, M., & Wittwer, C. T. (2010). High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*, 50(4), 250-261.

He, C., Holme, J., & Anthony, J. (2014). SNP genotyping: the KASP assay. *Crop breeding: methods and protocols*, 75-86.