

Katarzyna Mikołajczyk

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Poznaniu

Autor korespondencyjny – e-mail: kamik@nico.ihar.poznan.pl

Analizy genotypu i fenotypu nowej generacji w nowoczesnej hodowli roślin — wybrane zagadnienia z 20. Kongresu EUCARPIA, 29.08–1.09.2016, ETH Zurych, Szwajcaria

Next-generation genome and phenome analyses in modern plant breeding — Selected topics of the 20th EUCARPIA General Congress, 29.08–1.09.2016, ETH Zurich, Switzerland

Słowa kluczowe: hodowla roślin uprawnych, genotypowanie, fenotypowanie, rzepak *Brassica napus* L.

Streszczenie

Przedstawiono wybrane zagadnienia dotyczące zastosowania nowoczesnych wysokowydajnych technologii analizy genomu i fenomu roślin uprawnych, prezentowane podczas 20. Kongresu EUCARPIA w Zurychu. Szczególną uwagę zwrócono na aspekty związane z możliwością praktycznego wykorzystania wyników otrzymanych za pomocą nowych metod i technik analitycznych. Istotne jest aby zbieraniu i przetwarzaniu danych w bazach nowego typu towarzyszyła systematyczna weryfikacja. W wielu ośrodkach prowadzone są intensywne badania w celu zsekwencjonowania genomów referencyjnych ważnych gospodarczo roślin uprawnych. Tworzone są mikromacierze służące identyfikacji polimorfizmów SNP zdefiniowanych dla określonych cech fenotypowych. Dotychczas macierze tego typu opracowano dla pszenicy, rzepaku i kukurydzy. Intensywne badania prowadzone są również z zastosowaniem technologii fenotypowania nowej generacji. Szczególnie ważne jest opracowanie genomowych modeli prognostycznych dla cech wielogenowych. Modele te umożliwiłyby wspomaganie selekcji genotypów o wysokim potencjale plonotwórczym oraz wykazujących odporność lub tolerancję na stres abiotyczny i biotyczny. Ponadto, istotna jest ciągła weryfikacja nadrzędnych celów badawczych i selekcyjnych w światowej produkcji ważnych roślin uprawnych.

Key words: crop plant breeding, genotyping, phenotyping, rapeseed *Brassica napus* L.

Abstract

Selected topics of the 20th EUCARPIA General Congress including application of modern high-throughput technologies of crop plant genome and phenome analyses are presented in this conference report. Especially, possibilities of practical use of results obtained using new analytical methods and techniques were considered. It is important that data collected and curated in new type of 'big' data bases were carefully and systematically verified. In many institutes worldwide, extensive research is done to sequence reference genomes of economically important crop plants. SNP-chip arrays are

developed to screen for polymorphisms associated with particular phenotypic traits; till now, arrays for wheat, rapeseed and corn genome analyses were created. Sophisticated studies are also performed using new generation phenotyping technologies. In particular, creating of multitrait genomic prediction models is of special importance. Such models could support selection of genotypes with high yield potential and resistance to abiotic and biotic stress as well. Moreover, permanent verifying update of main research and selection goals in the world production of important crop plants is of great importance.

W międzynarodowym kongresie 20th EUCARPIA General Congress uczestniczyli przedstawiciele wiodących ośrodków w świecie zajmujących się badaniami dotyczącymi ważnych gospodarczo roślin uprawnych. Prezentowano główne kierunki badań obejmujące zboża, rośliny białkowe, oleiste i włókniste, pastewne, warzywne, drzewa i krzewy owocowe, a także rośliny ozdobne. Sesje plenarne obejmowały następujące zagadnienia: (1) genomika i bioinformatyka, (2) tolerancja na stres abiotyczny, (3) tolerancja na stres biotyczny, (4) metabolity wtórne oraz (5) fenomika. Ponadto, odbywały się równoległe sesje tematyczne, dotyczące poszczególnych roślin uprawnych, a także sesja plakatowa obejmująca wszystkie zagadnienia i trwająca przez cały czas konferencji. Sesje tematyczne obejmowały, z jednej strony, prezentacje ustne, z drugiej – krótkie doniesienia ustne typu „flash-presentations”.

Podczas sesji plenarnych prezentowano systemy oraz podejścia badawcze, które mogą stanowić nowe kierunki i perspektywy rozwoju badań podstawowych mających ścisłe przełożenie na praktykę hodowlaną ważnych roślin uprawnych. Punkt wyjścia stanowią zmieniające się warunki klimatyczne, a także konieczność wyżywienia wzrastającej liczby ludności na świecie. Poszerzenie zróżnicowania genetycznego staje się ważnym zadaniem, równoległe do utrzymywania i podnoszenia cech jakościowych, oraz nie mniej istotnych – związanych z plonem. W oparciu o kompleksowe badania w doświadczeniach polowych hodowli wstępnej (ang. pre-breeding), a także w testach hodowlanych oraz w odniesieniu do analiz statystycznych i bioinformatycznych powstają nowe technologie hodowli roślin, NPBTs (ang. New Plant Breeding Technologies), kluczowe dla uzyskiwania efektów gospodarczych. Ważnym, odrębnym zagadnieniem staje się zachowanie i długoterminowe przechowywanie zasobów genowych form, które zostały wyparte przez nowe genotypy, w miejscu ich występowania oraz w bankach genów (ang. *in situ*, *ex-situ* conservation) (Bradshaw 2017, str. 3). Stąd, jak podkreślano, nowoczesna hodowla, wykorzystująca rozwijające się intensywnie metody i technologie badań podstawowych, jest pewnego rodzaju sztuką, wymagającą doświadczenia i praktyki hodowlanej oraz umiejętnego wykorzystania selekcji genomowej nowej generacji, analizy bioinformatycznej, a także wysoko-przepustowej analizy fenotypu.

Genomy referencyjne i genomika w hodowli

Wraz z rozwojem technik wysokowydajnego sekwencjonowania tzw. nowej generacji (ang. New Generation Sequencing — NGS) w toku kompleksowych badań w wielu ośrodkach uzyskano kompletne sekwencje nukleotydowe genomów poszczególnych gatunków roślin uprawnych, tzw. sekwencje referencyjne (Stein 2017, str. 7). Badania nad genomami poliploidalnymi, często zawierającymi znaczny procent sekwencji powtarzających się, a tylko kilka procent kodujących białka, stanowiły wyzwanie, a także wymagały tworzenia i posługiwania się bazami danych nowego typu, przeznaczonych do gromadzenia i przetwarzania tzw. BIG DATA. Wnosi to nową jakość do wszystkich obszarów związanych z nowoczesną hodowlą i selekcją oraz wyznacza kierunki dalszych poszukiwań, dla kolejnego pokolenia młodych hodowców i badaczy. Ponadto, umożliwia wyznaczenie dalszych kierunków i nowych strategii ulepszania roślin uprawnych w oparciu o analizy genomów, z wykorzystaniem różnego typu technik nowej generacji, jak genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (ang. Genotyping by Sequencing — GBS) (Fu 2016, str. 33; Milner i wsp. 2016, str. 35), czy badania asocjacyjne całych genomów (ang. Genome-Wide Association Studies — GWAS) (Stein 2017, str. 7).

W wyniku redukcji kosztów NGS wysokowydajne analizy genomów roślin użytkowych stały się coraz powszechniejsze. Zidentyfikowano szereg polimorfizmów jednonukleotydowych (ang. Single Nucleotide Polymorphism — SNP) różnicujących poszczególne genotypy, charakteryzujące się określonymi cechami fenotypowymi. W wyniku analiz QTL oraz asocjacyjnych, jak również z wykorzystaniem systematycznych obserwacji i pomiarów cech fenotypowych zdefiniowano szereg markerów DNA zasocjowanych z ważnymi cechami użytkowymi roślin uprawnych (Elkind 2016, str. 8). Osiągnięto wyraźny postęp, dzięki zainwestowaniu znacznych funduszy, i co nie mniej ważne skoncentrowanego wysiłku oraz poświęconego czasu całych zespołów badawczych w wielu ośrodkach na świecie. Miejsce selekcji przy użyciu markerów, ang. Marker Assisted Selection — MAS, zajmuje tzw. selekcja poprzez analizę genomową, ang. Genomic Assisted Selection — GAS (Elkind 2016, str. 8) lub tzw. selekcję genomową, ang. Genomic Selection — GS.

Genotypowanie przy użyciu wielu markerów molekularnych staje się ważnym narzędziem analizy zróżnicowania genetycznego, a także mapowania genetycznego, znajdującym zastosowanie w hodowli. Opracowano szereg testów w oparciu o technologię mikromacierzy, służących genotypowaniu cech dla ważnych roślin uprawnych. Tego typu macierze pierwszej generacji obejmują zwykle dużą liczbę markerów trudnych do zidentyfikowania i praktycznego wykorzystania, a poza tym stosunkowo kosztownych. Dlatego opracowano mikromacierze genotypujące SNP drugiej generacji (Ganal 2016, str. 58), w oparciu o ponowne genotypowanie materiałów hodowlanych i zasobów genowych – dla pszenicy, rzepaku i kukurydzy. Markery te są mniej kosztowne, specyficzne dla haplotypu, jak również równomiernie rozmieszczone w analizowanym genomie.

Technologie wysokowydajnego fenotypowania

Przewidywanie wypadkowej wartości cech ilościowych, złożonych, może być skuteczniejsze wskutek dodania informacji o dynamice danej cechy i jej składowych (komponent). Dane tego typu mogą być uzyskane w wyniku wysokowydajnego fenotypowania i zestawiane w modele parametryczne lub nieparametryczne. Otrzymywane krzywe parametryczne mogą być wykorzystywane jako cechy skorelowane w genomowych modelach prognostycznych dla cech wielogenowych (ang. multitrait genomic prediction models). Modele te mogą być wykorzystywane do: (1) przewidywania cech plonu na podstawie pomiarów składowych struktury plonu we wczesnych stadiach rozwojowych rośliny (selekcja podczas sezonu wegetacyjnego) oraz (2) zwiększenia dokładności przewidywania plonu poprzez integrację plonu i składowych plonu (selekcja podczas zbiorów) (Bustos-Korts i wsp. 2016, str. 16). Tego typu analizy zaczynają być stosowane dzięki nowym metodom wysokowydajnego fenotypowania, umożliwiającym kompleksowe zbieranie różnego typu danych uzyskanych w wyniku pomiarów i obserwacji z eksperymentów szklarniowych i doświadczeń polowych, z zastosowaniem rozmaitych sensorów i kamer zamontowanych na odpowiednich stelażach, suwnicach, a także dronach. Coraz większe zainteresowanie budzą pomiary i analizy spektralne struktury ładu na poletkach dokonywane z powietrza (Reynolds i wsp. 2016, str. 371), oraz umożliwiające zebranie w krótkim czasie dużej liczby danych wysoko-przepustowych nowej generacji z platformy do fenotypowania polowego (ang. Field Phenotyping Platform — FIP) (Kirchgeßner i wsp. 2016, str. 372). Bioinformatyczna analiza i opracowanie danych w odniesieniu do danych genotypowych pełnią kluczową rolę w definiowaniu regionów genomu zasocjowanych lub sprzężonych z daną cechą. Ponadto, docelowo będą stanowiły podstawę do prowadzenia selekcji genomowej. Należy jednak brać pod uwagę fakt, że ogromna liczba zidentyfikowanych markerów przyczynia się do powstania szumu informacyjnego; konieczna jest więc rzetelna weryfikacja wyników.

Lokalizacja metabolitów z zastosowaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas

Zaawansowane metody spektrometrii mas (ang. mass spectrometry — MS) umożliwiają przestrzenną detekcję oraz identyfikację białek, tłuszczów i innych metabolitów w tkance roślinnej. Tego typu analizy w znaczący sposób przyspieszają postęp zarówno w badaniach podstawowych, jak i w możliwości praktycznego zastosowania zidentyfikowanych biomarkerów funkcjonalnych do selekcji. U rzepaku zidentyfikowano i zlokalizowano tkankowo-specyficzne metabolity związane z przemianami estrów kwasu synapowego podczas kiełkowania nasion (Bhandari i wsp. 2016, str. 32). Jest to kolejny etap w rozwoju analizy metabolomów roślinnych. Ma on szczególne znaczenie w badaniach procesów

rozwoju i wzrostu rośliny, również w zależności od warunków środowiskowych oraz stresu abiotycznego i biotycznego. Systematyczna analiza bioinformatyczna zidentyfikowanych związków umożliwia adnotację genów regulatorowych i przypisanie do poszczególnych szlaków metabolicznych. Tego typu badania stanowią fascynujące wyzwanie, a zarazem dają niespotykane dotąd możliwości wnikliwej analizy z dziedziny cytofizjologii, metabolomiki, proteomiki oraz genomiki.

Badania roślin uprawnych z rodzaju *Brassica*

– prezentowane były jako doniesienia ustne ”flash”, w bloku ‘Rośliny białkowe i oleiste’ oraz w formie plakatów. Przedstawiono dwa doniesienia ”flash”; jedno z nich dotyczyło badań wpływu oddziaływań odmiana × środowisko oraz nawożenie azotem × środowisko na plon nasion i plon tłuszczu badanych czterech odmian rzepaku (Marjanović-Jeromela i wsp. 2016, str. 271). Drugie z doniesień obejmowało badania prowadzone w IHAR–PIB, Oddział w Poznaniu. Dotyczyły one otrzymania genotypów rekombinantów rzepaku o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w oleju nasion – podwyższonej zawartości kwasu oleinowego (HO) i obniżonej – linolenowego (LL) (Mikołajczyk i wsp. 2016, str. 272). Spośród dziewięciu plakatów, sześć dotyczyło badań nad rzepakiem: molekularnej cytogenetycznej analizy trzech pokoleń resyntetyzowanego rzepaku (Amonosova i wsp. 2016, str. 278), zróżnicowanej zawartości związków bioaktywnych w czarnych i żółtych nasionach rzepaku (Cegielska-Taras i wsp. 2016, str. 282), badania zróżnicowania genetycznego pomiędzy odmianami rzepaku określanego przy pomocy markerów mikrosatelitarnych (Mikołajczyk i wsp. 2016, str. 293), nowych linii mutantów chemicznych *B. napus* o zróżnicowanym składzie kwasów tłuszczowych (Shirokova i wsp. 2016, str. 296), zmienności fenotypowej linii resyntetycznych *B. napus* (Sosnowska i wsp. 2016, str. 298), a także wpływu traktowania kolchicyną, *in vitro* oraz *in vivo* na wydajność otrzymywania podwojonych haploidów roślin rzepaku (Szala i wsp. 2016, str. 301). Pozostałe plakaty na temat roślin uprawnych z rodzaju *Brassica* dotyczyły badań nad zawartością steroli w oleju gorczycy białej, *Sinapis alba* (Bartkowiak-Broda i wsp. 2016, str. 280), wpływu siarki na akumulację glukozyolanów, GLS, u nisko- i wysoko-glukozyolanowych linii *B. juncea* (Gohain i wsp. 2016, str. 281) oraz charakterystyki genów funkcjonalnych wyizolowanych z czterokomorowych zalążni *B. rapa*, metodą RNAseq (Kim i wsp. 2016, str. 285).

Podsumowanie

W tzw. erze genomowej (ang. Genomic Era), wraz z lawinowym rozwojem technik badawczych, instrumentalnych i bioinformatycznych konieczna jest stała weryfikacja nadrzędnych celów badawczych i selekcyjnych w światowej produkcji

ważnych roślin uprawnych. Rzepak należy do najważniejszych roślin oleisto-białkowych. Zsekwencjonowanie genomu referencyjnego dla *Brassica napus* (Chalhoub i wsp. 2014) oraz prowadzenie w coraz większym zakresie analiz fenotypowania nowej generacji implikuje rozwój badań w celu opracowania interpretacji wyników. Wiąże się to również z badaniami z dziedziny odporności rzepaku na stres abiotyczny i biotyczny. Do tego niezbędne jest stworzenie odpowiednich baz danych i opracowanie systemów zarządzania nimi. W niedalekiej przyszłości można spodziewać się coraz bardziej precyzyjnych narzędzi selekcyjnych w oparciu o analizy genotypu i fenotypu nowej generacji, ze szczególnym uwzględnieniem analizy profili metabolicznych w zależności od zdefiniowanych cech biochemicznych danej formy.

Literatura

- 20th EUCARPIA General Congress. Abstracts. 29 Aug – 1 Sep 2016. Red. R. Kölliker i B. Böller. Agroscope, Institute for Sustainability Sciences.
- Amonosova A.V., Zemstova L.V., Zhidkova E.N., Muravlev A.A., Yurkevich O.Y., Samatadze T.E., Książczyk T., Volovik V., Shirokova A.V., Zoshchuk S.A., Muravenko O. 2016. Molecular cytogenetic analysis of three generations of resynthesized rapeseed (*Brassica napus* L.). W: Abstracts: 278.
- Bartkowiak-Broda I., Rudzinska M., Radziejewska-Kubzdela E., Pietka T., Michalski K. 2016. Variability of sterols content in oil of white mustard (*Sinapis alba* L.). W: Abstracts: 280.
- Bhandari D.R., Li B., Gottwald S., Römpf A., Spengler B. 2016. Localization of metabolites in plant tissues using high-resolution mass spectrometry imaging. W: Abstracts: 32.
- Bradshaw J.E. 2016. Plant breeding: Past, present and future. W: Abstracts: 3.
- Bustos-Korts D.V., Malosetti M., Chapman S.C., Zheng B., van Eeuwijk F.A. 2016. Integrating high-throughput phenotyping technologies in a multi-trait genomic prediction model. W: Abstracts: 16.
- Chalhoub B., Denoeud F., Liu S., Parkin I.A.P. i in. 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 22 (345): 950-953.
- Cegielska-Taras T., Nogala-Kałucka M., Szala L., Siger A. 2016. The variation of bioactive compounds in black and yellow seeds of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). W: Abstracts: 282.
- Elkind Y. 2016. Genomic assisted selection and classical plant breeding – synergy or competition? W: Abstracts: 8.
- Fu Y.-B. 2016. A new lab guide on genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis. W: Abstracts: 33.
- Ganal M. 2016. Optimized and cost-efficient genotyping arrays for plant breeding. W: Abstracts: 58.
- Gohain P.B., Rose T.J., King G.J. 2016. Response of glucosinolate (GLS) accumulation to sulphur in low and high GLS lines of *Brassica juncea*. W: Abstracts: 281.
- Kim J.S., Seo M.-S., Won S.Y., Kang S.-H., Sohn S.-H. 2016. Characterizing genes isolated from tetralocular ovary of *Brassica rapa* by RNA-seq. W: Abstracts: 285.
- Kircheggssner N., Liebisch F., Yu K., Kronenberg L., Hund A., Walter A. 2016. Field Phenotyping Platform (FIP) – an automated multi sensor system for plant phenotyping in the field – first results. W: Abstracts: 372.

- Marjanović-Jaromela A., Terzić S., Jankulovska M., Zorić M., Kondić-Špika A., Jocković M., Hristov N. 2016. Dissection of year related climatic variables and their effect on winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) development and yield. W: Abstracts: 271.
- Mikolajczyk K., Dabert M., Spasibionek S., Bocianowski J., Nowakowska J., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2016. Marker assisted breeding of winter oilseed rape lines (*Brassica napus* L.) with changed seed oil fatty acid composition. W: Abstracts: 272.
- Mikolajczyk K., Nowakowska J., Bocianowski J., Liersch A., Poplawska W., Spasibionek S., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. 2016. Assessment of genetic diversity among oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars using single locus microsatellite markers. W: Abstracts: 293.
- Milner S.G., Himmelbach A., Oppermann M., Weise S., Graner A., Knüpfner H., Scholz, Börner, Mascher M., Stein N. 2016. BRIDGE: Biodiversity informatics for harnessing barley genetic diversity hosted at the genebank of OPK Gatersleben. W: Abstracts: 35.
- Reynolds M., Molero G., Pinto F., Sukumaran S. 2016. Phenotyping for plant breeding: combining precision with throughput. W: Abstracts: 371.
- Shirokova A.V., Volovik V.T., Korovina L.M., Zhukov A.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D., Kostyanovskiy R.G., Krutius O.N., Kadorkina G.K., Amosova A.V., Muravenko O.V., Dokudovskaya N.A. 2016. New canola (*Brassica napus* L.) mutant lines with similar phenotypes and different fatty acid composition. W: Abstracts: 296.
- Sosnowska K., Szala L., Cegielska-Taras T. 2016. Phenotypic variability of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.). W: Abstracts: 298.
- Stein N. 2016. Big genomes, big data, big progress? What will be the impact of reference genome sequences in barley, wheat and rye? W: Abstracts: 7.
- Szala L., Wójtowicz M., Sosnowska K., Cegielska-Taras T. 2016. Effect of *in vitro* and *in vivo* colchicine treatment on efficient production of double haploid plants of oilseed rape. W: Abstracts: 301.