



MOLEKULARNO OPLEMENJIVANJE BILJA

Zlatko Šatović, Hrvoje Šarčević, Klaudija Carović-Stanko, Ivan Pejić
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

**Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost
i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv)**

E-mail: zsatovic@agr.hr



Europska unija
Zajedno do fondova EU



Zagreb, 2019



Republika Hrvatska

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet



1919. Osnutak fakulteta

1921. Predmet 'Genetika' u studijskom programu

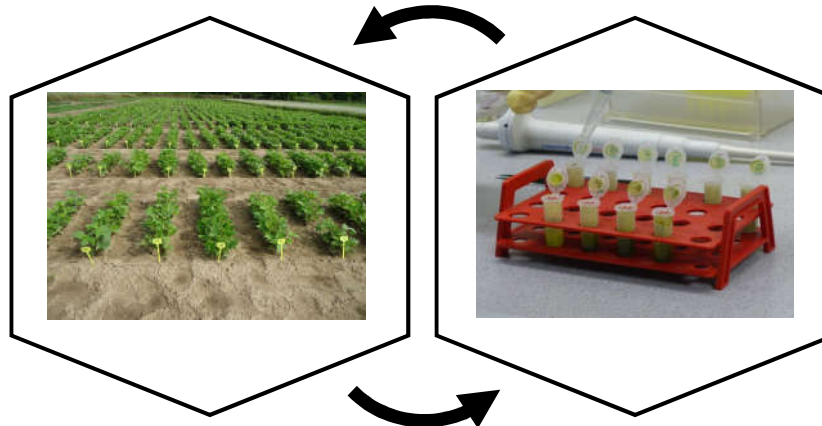
1922. Akademik Alois Tavčar (1895-1979)

- prvi profesor genetike

OPLEMENJIVANJE BILJA

- za učinkovit oplemenjivački program potrebna je:
 1. raznolikost ishodišnog biljnog materijala
 2. precizna analitička metoda
 3. jasan oplemenjivački cilj

Klasično
oplemenjivanje
bilja



Molekularno
oplemenjivanje
bilja

- odabira poželjnih
genotipova na temelju
fenotipa

- odabir poželjnih genotipova na
neizravan način, pomoću
molekularnih biljega koji su usko
vezani s genima koja nadziru
poželjno svojstvo

Fenotipizacija + Genotipizacija

MOLEKULARNO OPLEMENJIVANJE BILJA

- odabir pomoću biljega (**marker assisted selection**)
 - prvi korak: identifikacija biljega povezanih s određenim poželjnim svojstvom
1. Izrada genetskih karata i analiza lokusa za kvantitativna svojstva (**QTL analysis**)
 - materijal: razdvajajuća generacija nakon ciljanog križanja (rekombinantne inbred linije; RIL)
 - cilj: povezanost između genotipa određenog biljega i raznolikosti svojstva
 2. Pridruživajuće kartiranje (**association mapping; GWAS**)
 - materijal: skupina genotipova (panel)
 - cilj: povezanost između genotipa određenog biljega i raznolikosti svojstva
 3. Genomska selekcija (**genomic selection**)
 - materijal: skupina genotipova (panel)
 - cilj: procjena genotipske vrijednosti jedinke na temelju učinaka svih analiziranih biljega

PRIDRUŽIVAJUĆE KARTIRANJE: GRAH

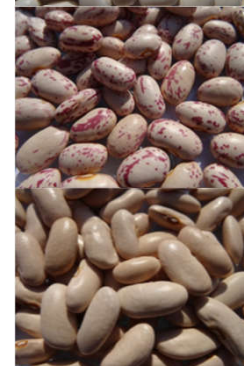
- proizvodnja graha u RH se temelji na tradicijskim kultivarima ('stare sorte')
- mali poljoprivredni proizvođači
- ne postoji oplemenjivački program u RH
- zapostavljena kultura
- biljni materijal
 - tradicijski kultivari
 - velika morfološka raznolikost
 - 174 primki >> 10 morfotipova



'Kukuruzar'



'Tetovac'



'Biser'



'Trešnjevac'



'Puter'



'Dan i noć'



'Zelenčec'

METODE

(A) Genotipizacija

(1) Analiza tipa fazeolina

- DNA biljezi za utvrđivanje tipa fazeolina

(2) Analiza mikrosatelitnim biljezima (SSRs)

- 26 biljega

(3) Analiza biljezima SNP (DArTseq)

- 6,599 polimorfni biljega SNP

(B) Fenotipizacija

- analiza količine hranjivih tvari u sjemenu graha:
N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn

Cilj istraživanja:

- analiza podrijetla i raznolikosti tradicijskih kultivara graha
- identifikacija biljega SNP povezanih s količinom bioaktivnih hranjivih tvari u sjemenu graha

CENTAR PODRIJETLA BILJNE VRSTE



○ Centar podrijetla: srednja Amerika

→ Širenje divlje biljne vrste: do Anda
(~100,000 BP)
davno prije udomaćenja

UDOMAĆENJE



Multicentrično udomaćenje
neovisno udomaćen u dvije regije
(~8,000 BP)

Centri udomaćenja:

- Srednja Amerika
indeterminirani tipovi
združeni usjev
kukuruz/grah/bundeva ('milpa')
- Središnje Ande
determinirani tipovi
nema prikladnih kultura:
gomoljaste kulture, kinoa

DIVERZIFIKACIJA



Udomaćenje:

- Srednja Amerika: indeterminirani tipovi
- Središnje Ande: determinirani tipovi

Diverzifikacija:

- Središnje Ande: indeterminirani tipovi
nakon introdukcije kukuruza
(~7,000-6,000 BP)
- Srednja Amerika: determinirani tipovi
svojstvo determiniranosti je
podrijetlom iz oba centra udomaćenja

INTRODUKCIJA U EUROPU

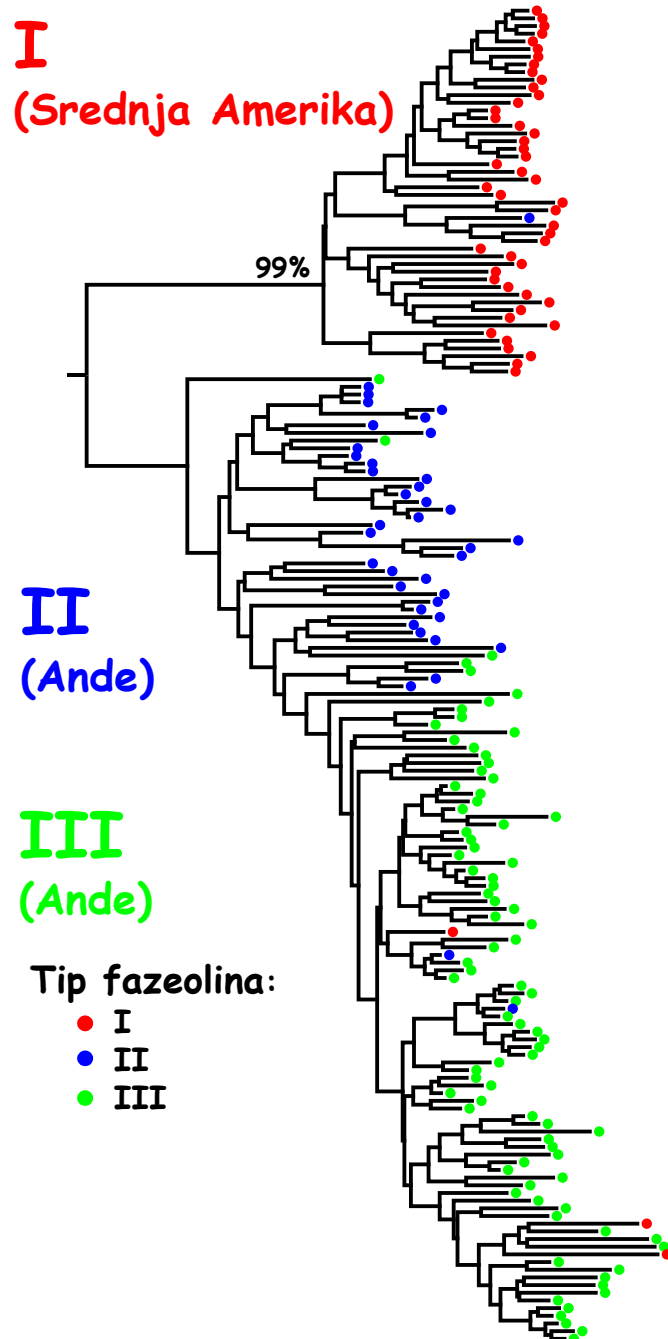


⇒ Introdokcija u Europu
u XVI st.
Portugal i Španjolska
brojne introdokcije

Podrijetlo

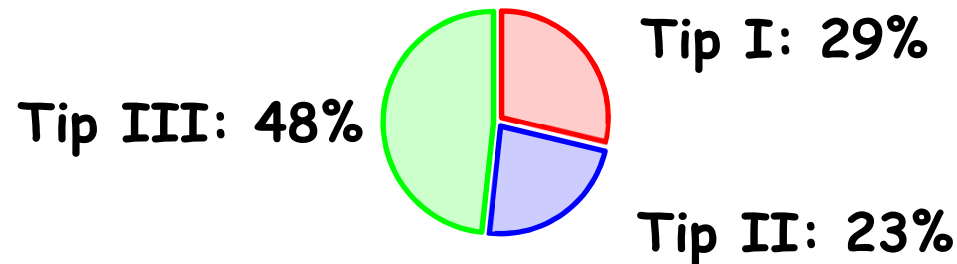
- tip fazeolina
- Srednja Amerika 33%
- Središnje Ande 67%
- hibridi između skupina: do 33%

TIP FAZEOLINA



(1) Tipovi fazeolina

1. Tip I - Srednja Amerika ("S")
2. Tip II - Ande ("H" or "C")
3. Tip III - Ande ("T")



(2) Mikrosatelitni biljezi (SSRs): Stablo

- dvije skupine

Srednja Amerika vs Ande

- podskupina

Ande Tip III

I/A

(Srednja Amerika)

II/B₁
(Ande)

III/B₂
(Ande)

Tip fazeolina:

- I
- II
- III

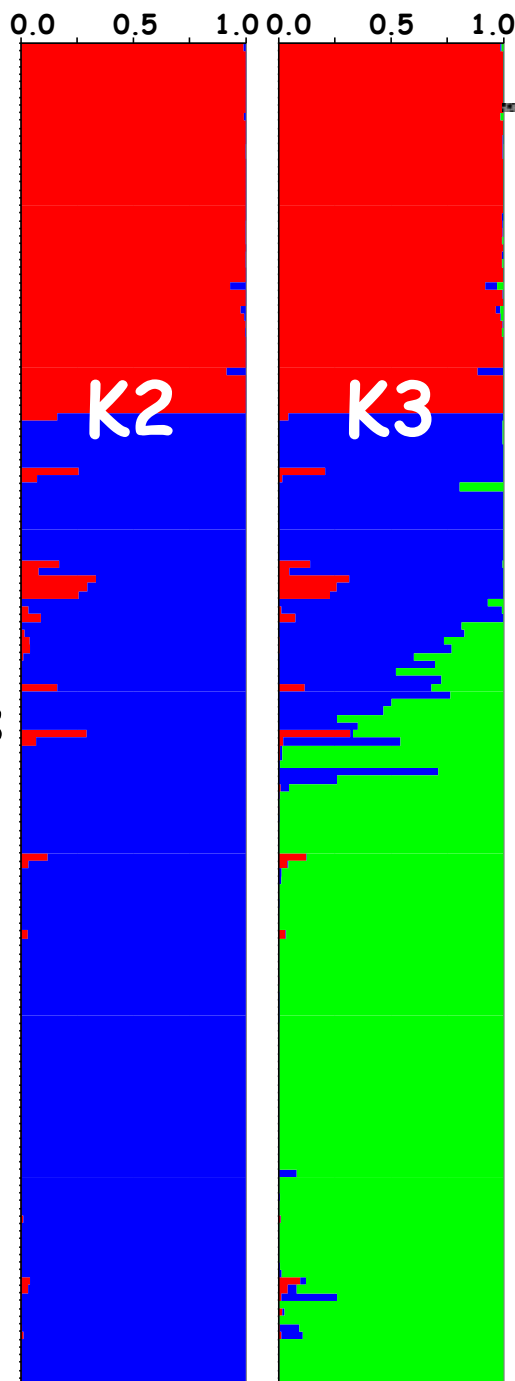
Genetska skupina:

- A
- B₁
- B₂

0.05

99%

SSRs



MIKROSATELITI

(3) Analiza strukture

- Bayesovska analiza skupina
- udio pripadnosti (Q) svake primke u genetsku skupinu pretpostavljajući postojanje dvije (K2) ili tri (K3) skupine

- Skupine / fazeolin:

A - Tip I

Srednja Amerika

B₁ - Tip II

Ande

B₂ - Tip III

Ande

BILJEZI SNP

- DArTseq (**Diversity Arrays Technology**)
 - metoda sekvenciranja sljedeće generacije (**NGS**)
- ukupan broj biljega: 17,514
- broj biljega visoke kvalitete: 6,599

Schmutz et al. (2014) >> referentni genom za grah

Valdisser et al. (2017) >> analiza raznolikosti pomoću DArTseq SNPs

	Valdisser et al. (2017)	Ovo istraživanje
Broj primki (uzoraka/genotipova)	188*	174
Broj polimorfnih biljega	5,961	6,599
SNP/Mpb	11.58	12.85
Zapažena heterozigotnosti (H_o)	0.037	0.019
Očekivana heterozigotnosti (H_E)	0.443	0.376

*91 tradicijski kultivar + 97 modernih kultivara iz cijelog svijeta

I/A

(Srednja Amerika)

II/B₁

(Ande)

III/B₂

(Ande)

Tip fazeolina:

- I
- II
- III

Genetska skupina:

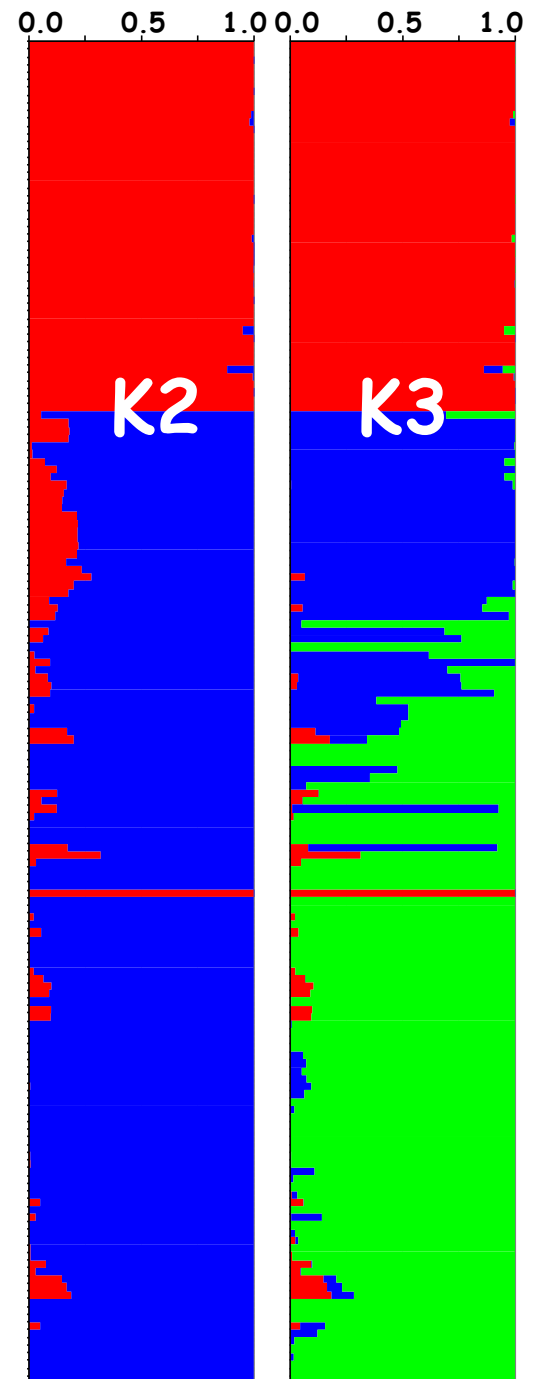
- A
- B₁
- B₂

0.05

SNPs

(4) Analiza strukture

- 923 biljega u ravnoteži vezanosti gena (linkage equilibrium; LE)
- Bayesovska analiza skupina
- podudarni rezultati



I/A

(Srednja Amerika)

II/B₁
(Ande)

III/B₂
(Ande)

Tip fazeolina:

- I
- II
- III

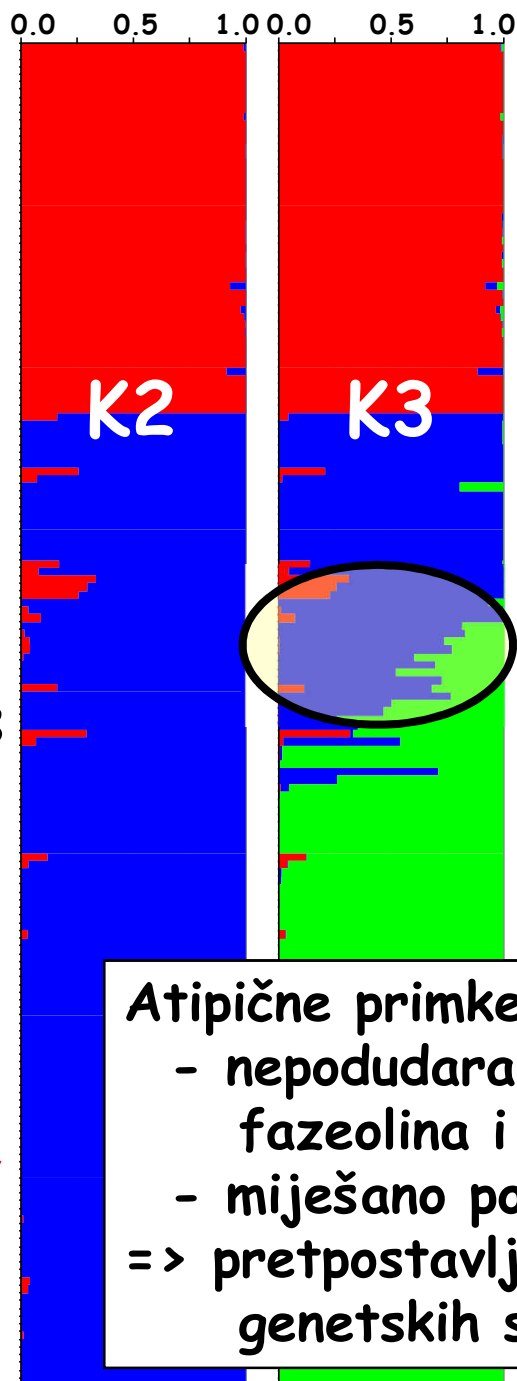
Genetska skupina:

- A
- B₁
- B₂

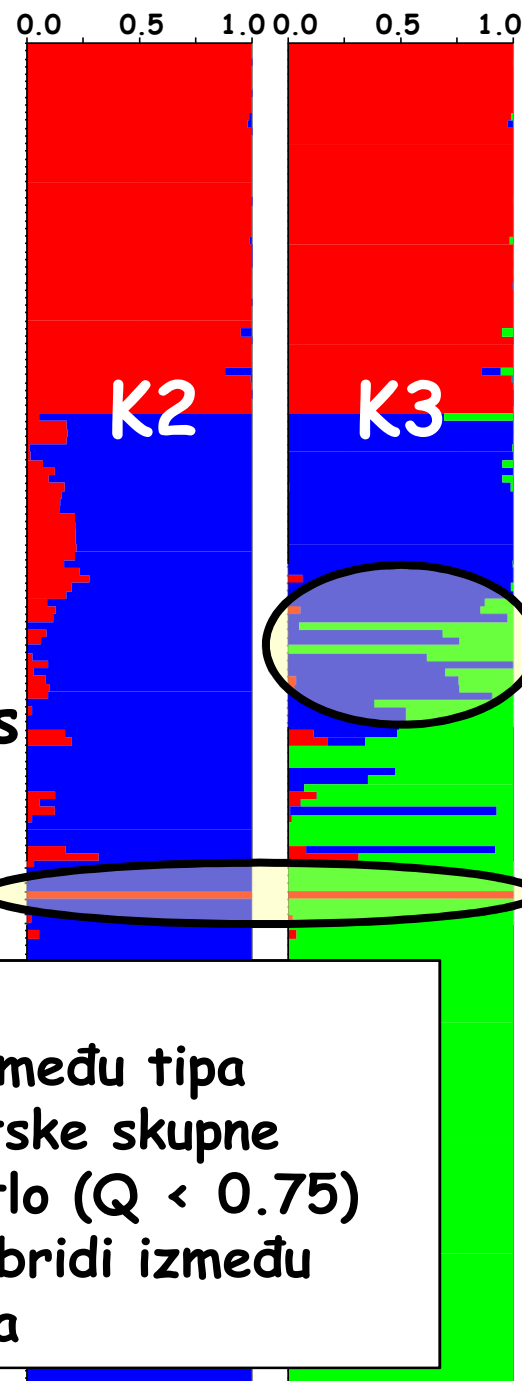
0.05

99%

SSRs



SNPs



Atipične primke:

- nepodudaranje između tipa fazeolina i genetske skupne
 - miješano podrijetlo ($Q < 0.75$)
- => pretpostavljeni hibridi između genetskih skupina

I/A
(Srednja Amerika)

II/B₁
(Ande)

III/B₂
(Ande)

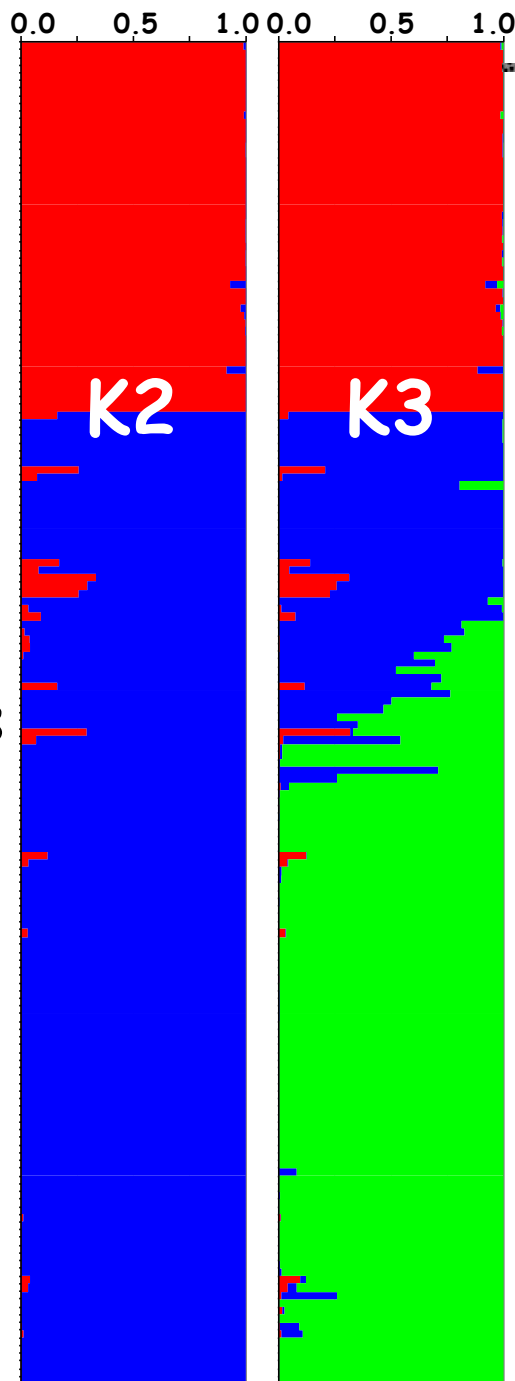
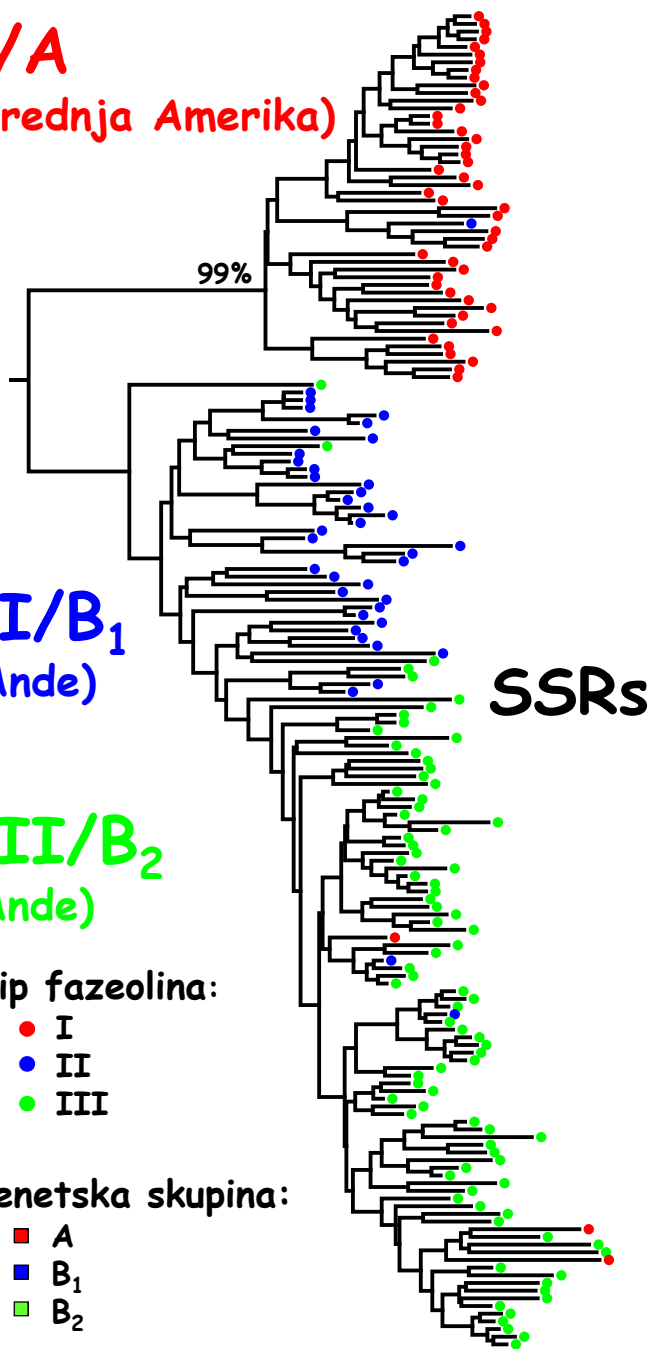
Tip fazeolina:

- I
- II
- III

Genetska skupina:

- A
- B₁
- B₂

0.05



MORFOTIPOVI



'Kukuruzar' (visoki)

'Tetovac' (visoki)

'Biser' (niski)



'Visoki Trešnjevac'

'Visoki Puter'

'Visoki Dan i noć'



'Niski Trešnjevac'

'Niski Puter'

'Niski Dan i noć'

'Zelenčec' (niski)

MORFOTIPOVI

I/A

(Srednja Amerika)

0.0 0.5 1.0 0.0 0.5 1.0



'Kukuruzar' (visoki)

'Tetovac' (visoki)

'Niski Puter' (niski)

'Niski Trešnjevac'

'Niski Puter'

'Niski Dan i noć'

'Niski Trešnjevac'

'Niski Puter'

'Niski Dan i noć'

'Zelenčec' (niski)

99%

II/B₁
(Ande)

III/B₂
(Ande)

Tip fazeolina:

- I
- II
- III

Genetska skupina:

- A
- B₁
- B₂

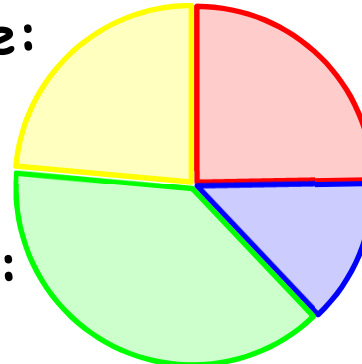
0.05

Atipične:
23%

III/B₂:
38%

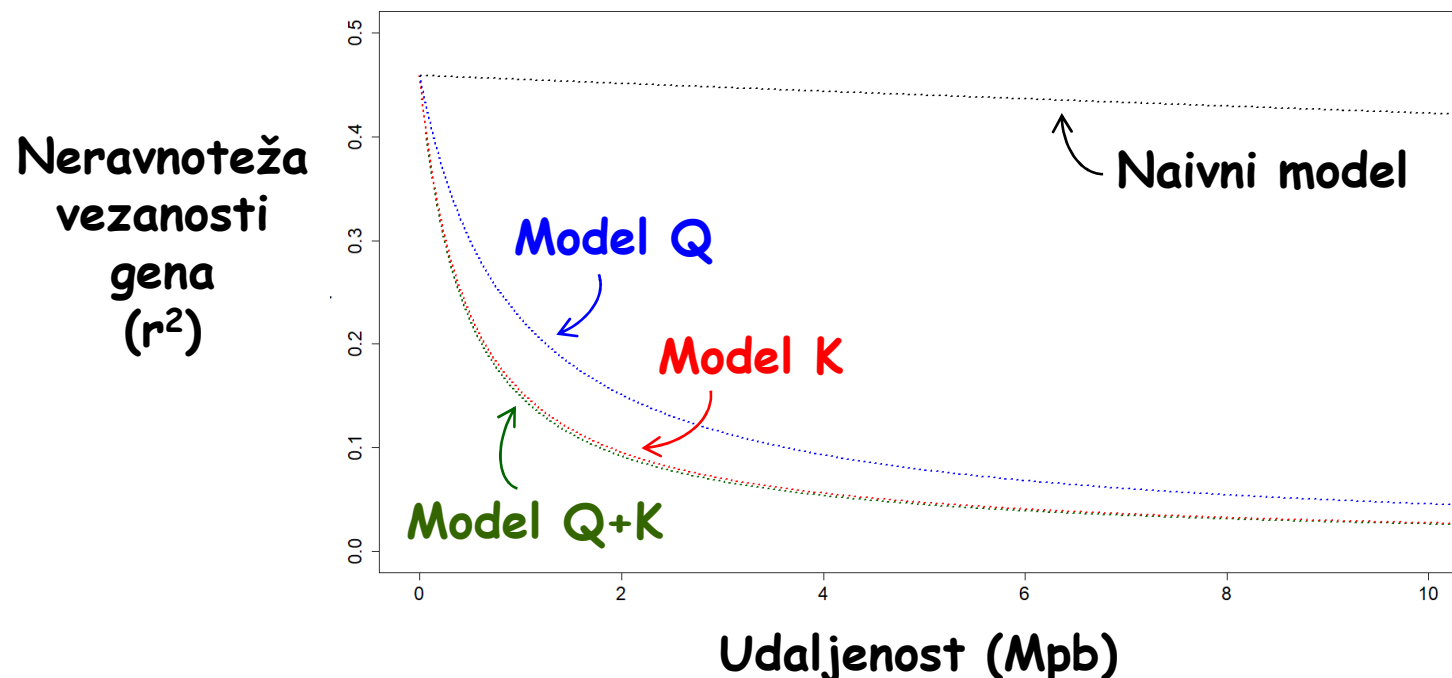
I/A:
25%

II/B₁:
13%



PRIDRUŽIVAJUĆE KARTIRANJE

- utvrđivanje povezanosti između genotipa određenog biljega i raznolikosti svojstva na temelju neravnoteže vezanosti gena (**linkage disequilibrium; LD**)
- uzroci lažnih povezanosti
 - genetska struktura panela (Q)
 - različit stupanj srodnosti (**kinship**) genotipova (K)



MODEL

Fenotip

- količina hranjiva u sjemenu graha

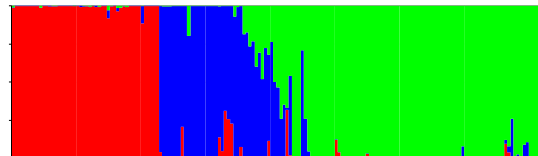
$$Y_i = \mu + M_{ki} + Q_i + G_iK + e_{ij}$$

Biljeg

Struktura
populacije (Q)

Učinak genetskog
zaleđa (G)
Matrica srodnosti (K)

6,559
biljeg SNP



Biljezi SSR (K3)

$$K = \begin{bmatrix} \theta_{11} & & & & \\ \theta_{12} & \theta_{22} & & & \\ \theta_{13} & \theta_{23} & \theta_{33} & & \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \\ \theta_{1I} & \theta_{2I} & \theta_{3I} & \cdots & \theta_{II} \end{bmatrix}$$

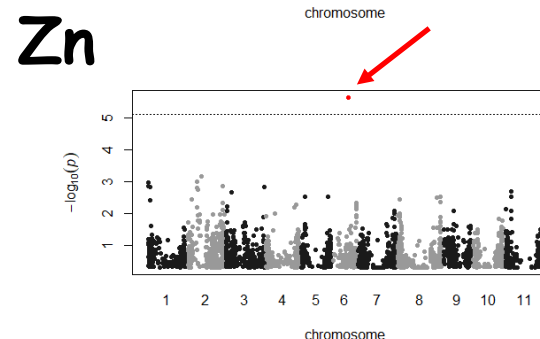
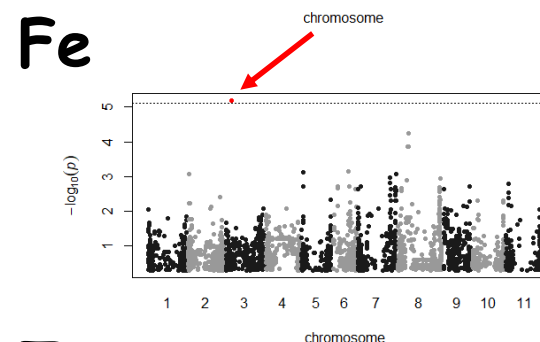
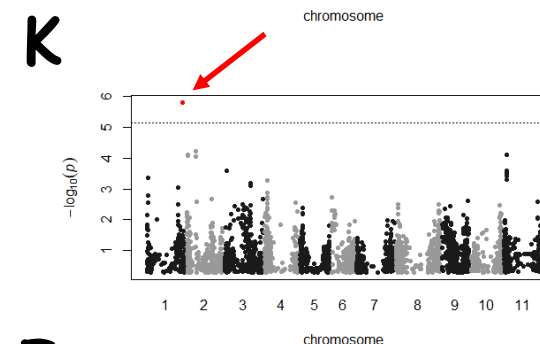
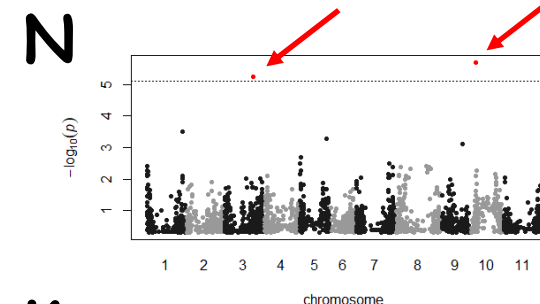
Biljezi SNP

REZULTATI

- pozicija biljega koji pokazuju
signifikantnu povezanost s količinom
hranjiva u sjemenu graha

Svojstvo	Kromosom	Pozicija SNP-a (pb)	Metoda
N	Pv03	38,974,600	MLMM
N	Pv10	7,465,267	TASSEL/MLMM
K	Pv01	49,116,667	TASSEL/MLMM
Mg	Pv08	50,916,423	TASSEL
Fe	Pv03	7,139,144	MLMM
Zn	Pv06	21,113,843	TASSEL/MLMM

- mješoviti model uz kontrolu Q i K
 - analiza pojedinačnih lokusa
(single-locus model; TASSEL)
 - multilokusna analiza
(multi-locus model; MLMM)



FUNKCIJSKA ANOTACIJA

Svojstvo	Kromosom	Pozicija (kodirajuća regija)	Funkcijska anotacija
N	Pv03	Phvul.003G177500	<i>Transcription initiation factor IIE, alpha subunit (KOG2593)</i>
N	Pv10	Phvul.010G048000	<i>Ca²⁺-independent phospholipase A2 (KOG0513)</i>
K	Pv01	Intergenska regija nizvodno od Phvul.001G229900	<i>Transcription factor, Myb superfamily (KOG0048)</i>
Mg	Pv08	Phvul.008G199900	<i>Magnesium transporter (KOG2922)</i>
Fe	Pv03	Phvul.003G055900	nepoznata funkcija
Zn	Pv06	Phvul.006G092600	nepoznata funkcija

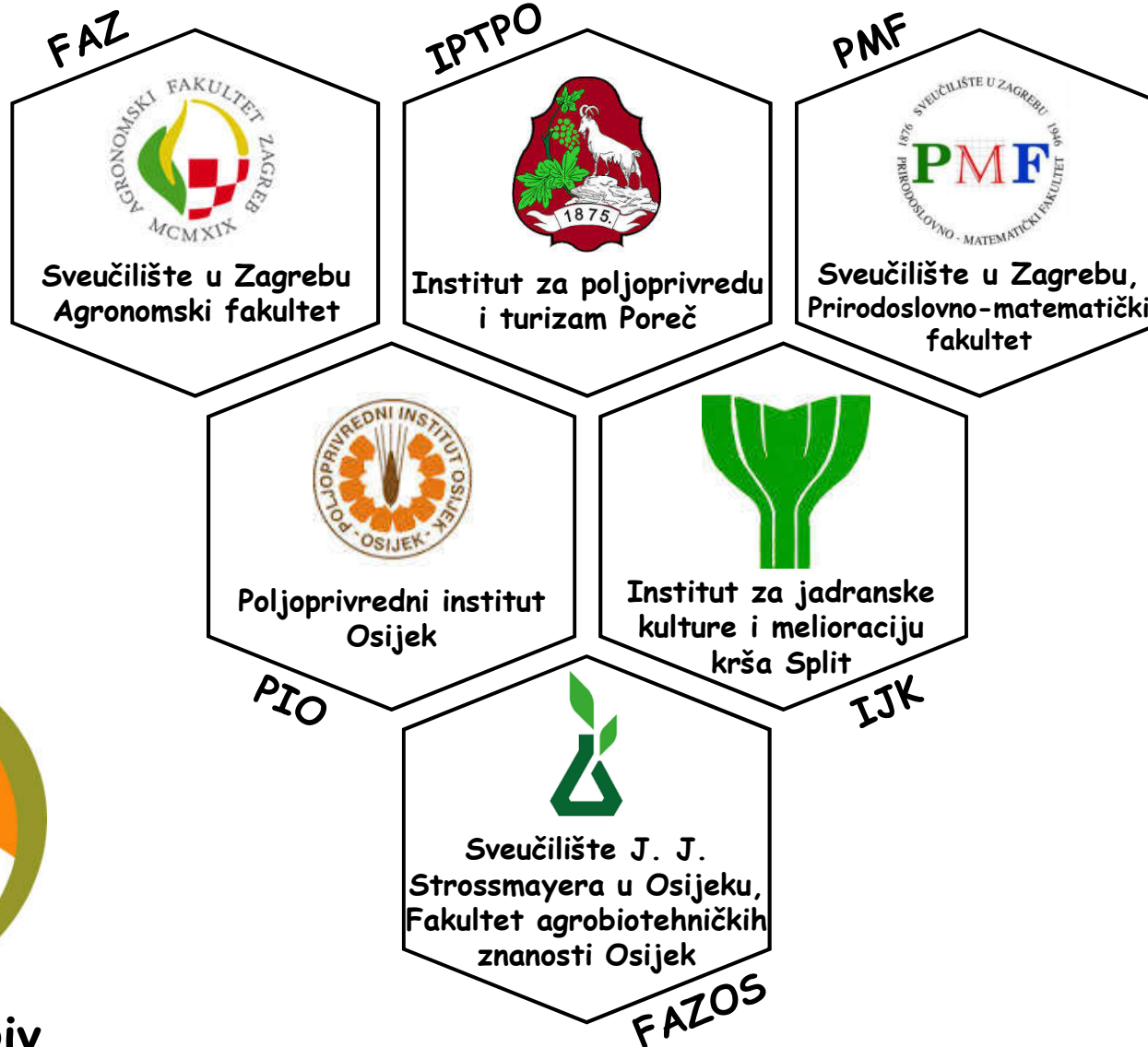
ZCI CroP-BioDiv

+ 5 partnerskih institucija

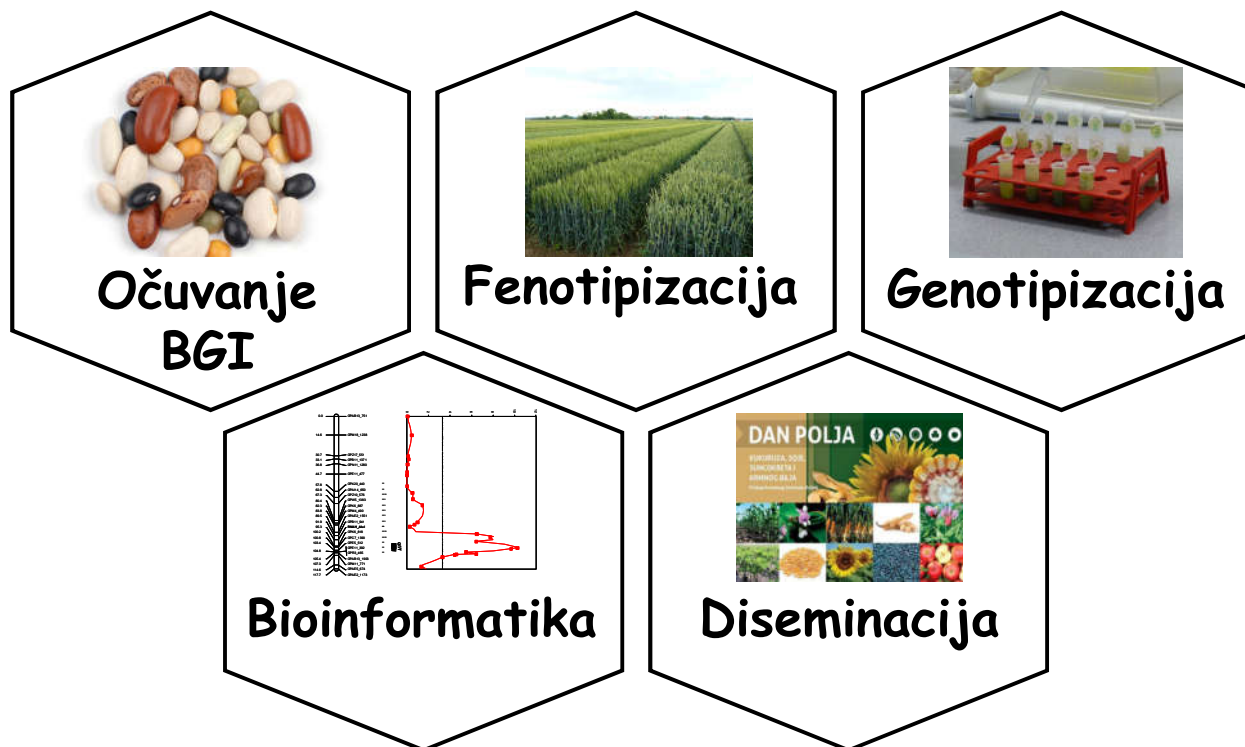
Institucija
nositeljica



ZCI CroP-BioDiv



ZCI CroP-BioDiv: Ciljevi



Očuvanje biljnih genetskih izvora >> prikupljanje, očuvanje, upotreba
Fenotipizacija >> platforme za visoko-propusnu fenotipizaciju (HTP)
Genotipizacija >> sekvenciranje sljedeće generacije (NGS)
Bioinformatika >> pridruživajuće kartiranje (GWAS)
Diseminacija >> radionice, ljetne škole, konferencije

ZCI CroP-BioDiv: Elementi projekta

Glavne kulture



Kukuruz



Pšenica



Soja

Tradicijske kulture



Vinova loza



Maslina

Zapostavljene kulture



**Kupusnjače
Lukovi**



Grah



**Dalmatinski buhač
Kadulje**

ZAHVALE



CoE CroP-BioDiv

Boris Lazarević
Zlatko Liber
Jerko Gunjača
Ana Nimac
Monika Vidak



<http://biodiv.iptpo.hr>