

# SEKWENCJONOWANIE NANOPOROWE BIBLIOTEK DNA SELEKJONOWANYCH NUKLEAZĄ CAS9 U PSZENICY ZWYCZAJNEJ



Mirosław Tyrka, Anna Spryszak

Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki, Politechnika Rzeszowska im. I Łukasiewicza

## Wstęp

- W wyniku stosowania technologii genotypowania przez sekwencjonowanie (GBS) uzyskuje się wiele danych, lecz liczba użytecznych, przydatnych do selekcji markerów stanowi jedynie niewielki procent.
- Sekwencje wybranych genów lub rejonów regulatorowych można wyselekcjonować uzyskując zbiór fragmentów DNA do sekwencjonowania (bibliotekę ukierunkowaną).
- Dzięki odpowiednio zaprojektowanym cząsteczkom kierującym CRISPR RNA (crRNA), do selekcji wybranych fragmentów genomu do sekwencjonowania może być wykorzystana nukleaza Cas9.
- Sekwencjonowanie w technologii Oxford Nanopore (ON) daje możliwość poznania sekwencji wybranych fragmentów o szerokim zakresie wielkości.

## Sekwencjonowanie w nanoporach

- Długość odczytów od krótkich do ultra długich (>4Mb)
- Sekwencjonowana jest natywna forma DNA z zachowaniem statusu metylacyjnego
- Wydajność sekwencjonowania do 50 Gb/komórkę
- Urządzenie przenośne



## Cel pracy

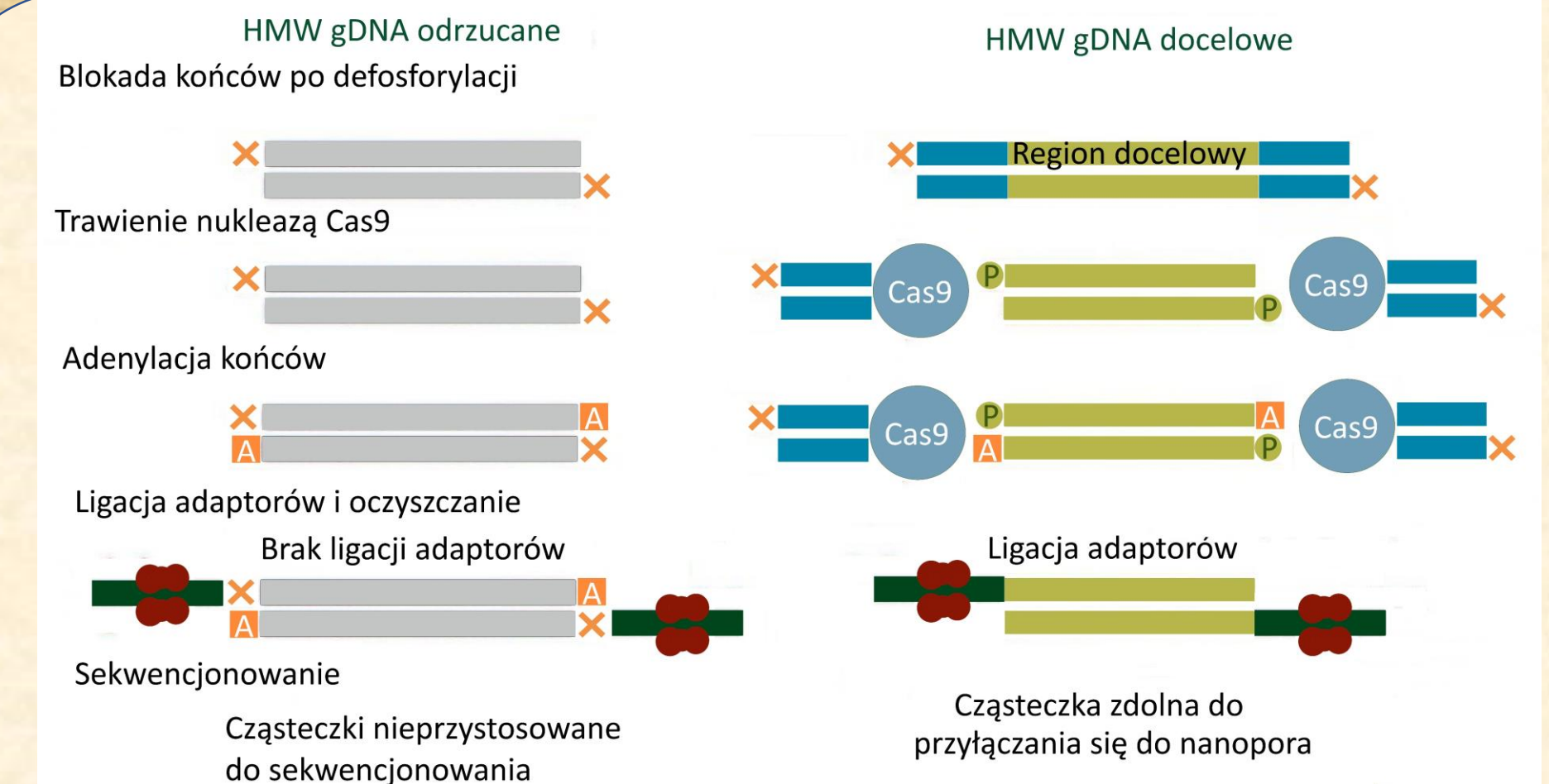
- Analiza zmienności rejonów flankujących wybranych genów związanych z mrozoodpornością pszenicy zwyczajnej na podstawie resekwencjonowanych genomów 15 odmian pszenicy
- Wybór fragmentów DNA do zaprojektowania sekwencji kierujących crRNA do konstrukcji biblioteki ukierunkowanej do sekwencjonowania ON.

## Metodyka

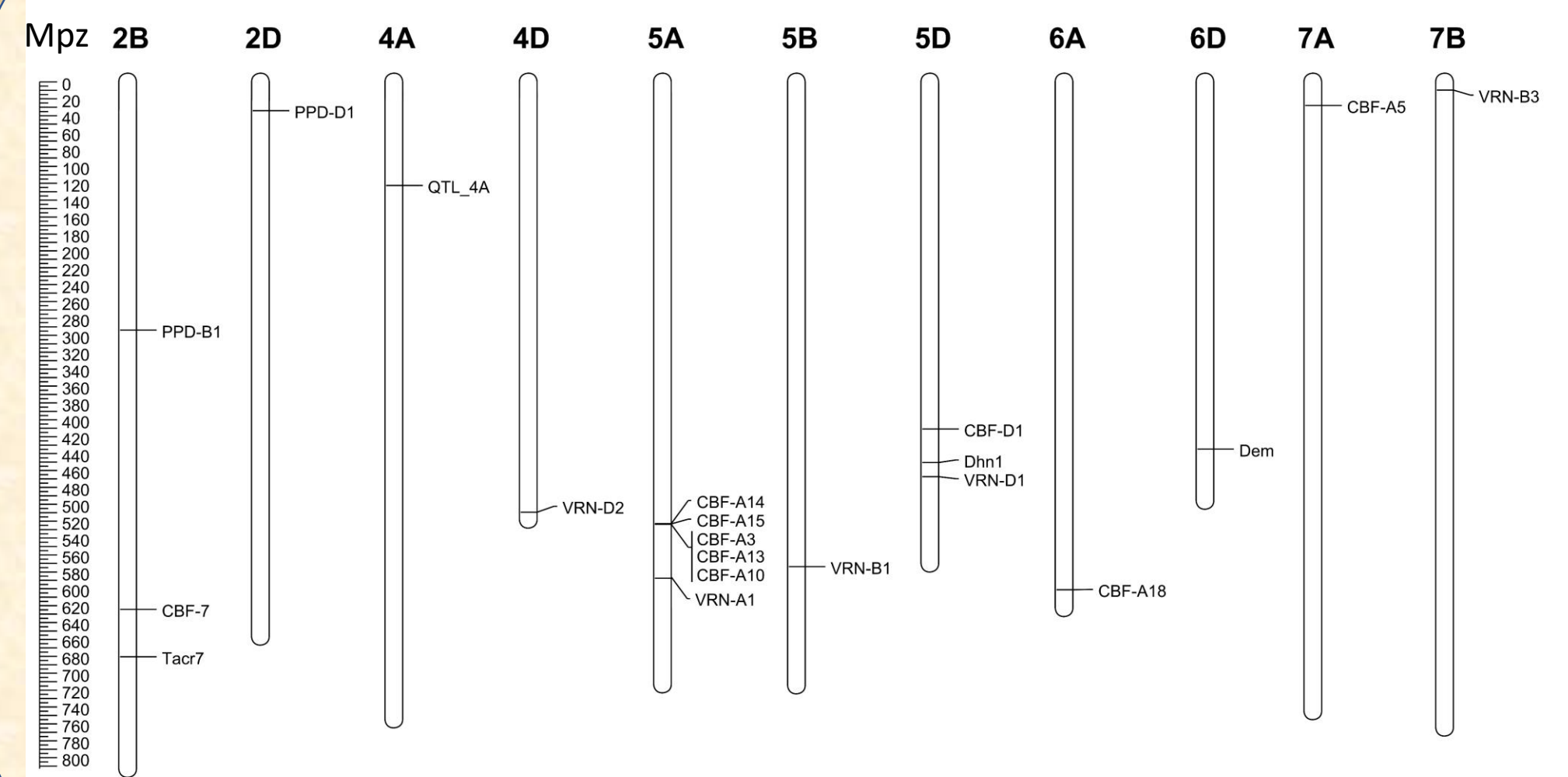
- Analiza zmienności genetycznej 20 genów odpowiedzialnych za zimotrwałość pszenicy zwyczajnej i rejonów +/- 2 kbp flankujących te geny
- Zmienność genetyczną badano na podstawie dostępnych sekwencji zdeponowanych w bazie Ensembl Plants dla sekwencji referencyjnej Chinese Spring (CS, IWGSC V2.1) i 14 odmian pszenicy (Landmark, Stanley, Julius, Norin61, Robigus, Mace, CadENZA, Paragon, Weebill, Jagger, Arinalfor, Claire, Mattis i Lancer).

## Wnioski

- Geny o niskiej zmienności: *Ppd-B1*, *Cbf7*, *Vrn-D2*, *Cbf-A14*, *Cbf-A13*, *Cbf-D1*, *Dhn1*, *Cbf-A18*, *Dem* i *Vrn-B3* oraz geny o wysokiej zmienności: *TraesCS4A01G107100*, *CBF-A15*, *Cbf-A3*, *Cbf-A10* i *Cbf-A5* mają konserwatywne rejony flankujące do projektowania crRNA
- Stwierdzono zmienność rejonów flankujących geny *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* i *Vrn-D1*, co należy uwzględnić przy projektowaniu crRNA



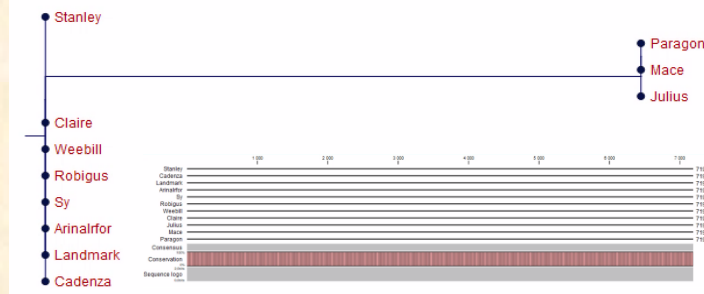
Zasada działania selekcji fragmentów do sekwencjonowania w nanoporach z wykorzystaniem Cas9



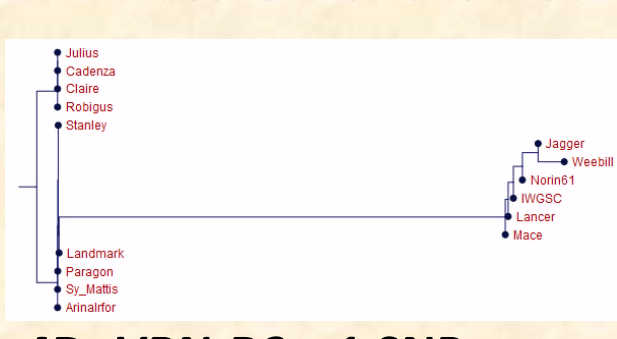
Rozmieszczenie 20 badanych genów na mapie fizycznej pszenicy (IWGSC RefSeq v2.1)

## Wyniki

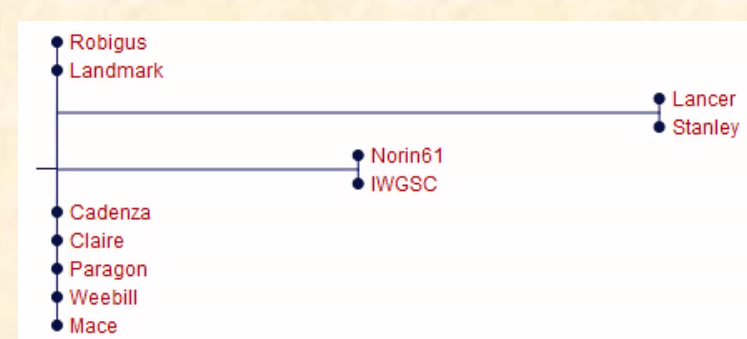
### 2B: PPD-B1 – 1 SNP



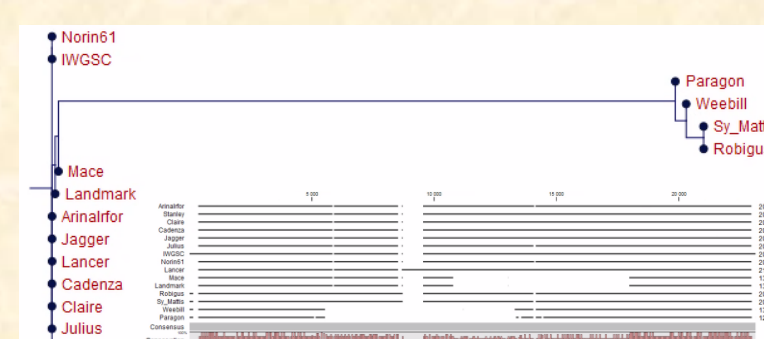
### 4A: TraesCS4A01G107100 – 22 SNP



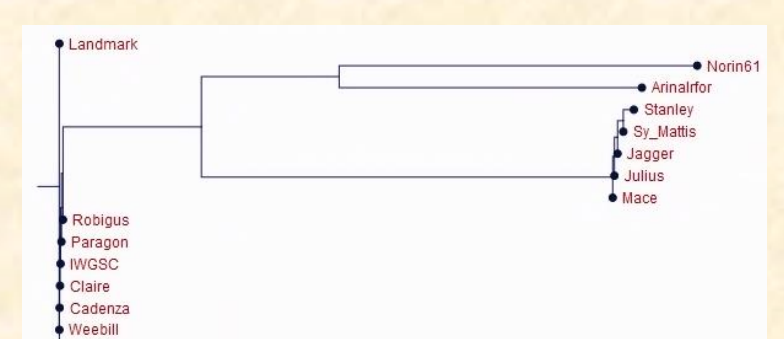
### 5A: CBF-A13 – 4 SNP



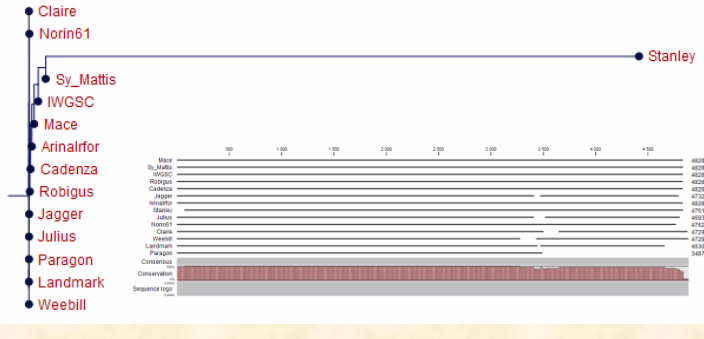
### 5B: VRN-B1 – 2 grupy 8/6 SNP, ins



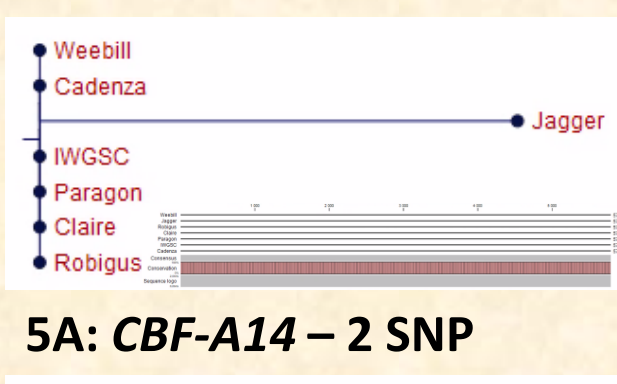
### 6A: CBF-A18 – 2 SNP



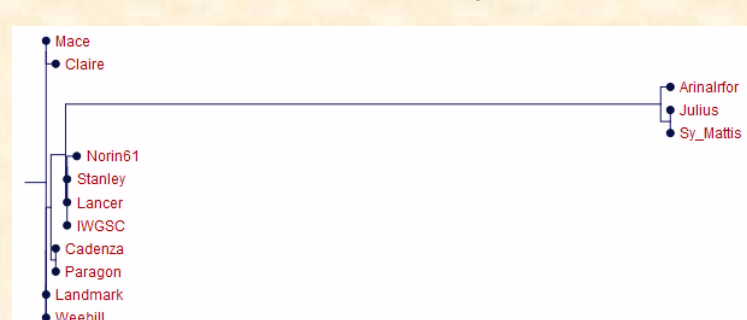
### 2B: CBF7 – 1 SSR



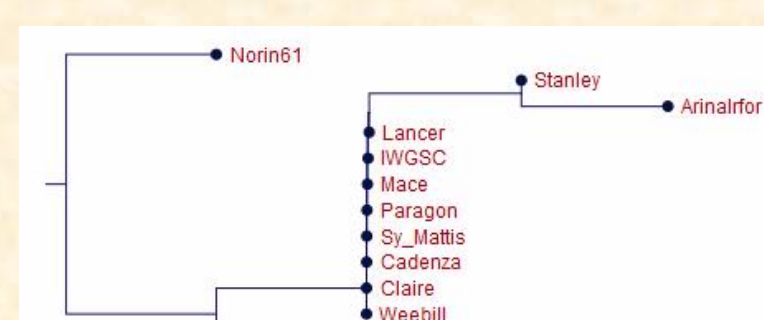
### 4D: VRN-D2 – 1 SNP



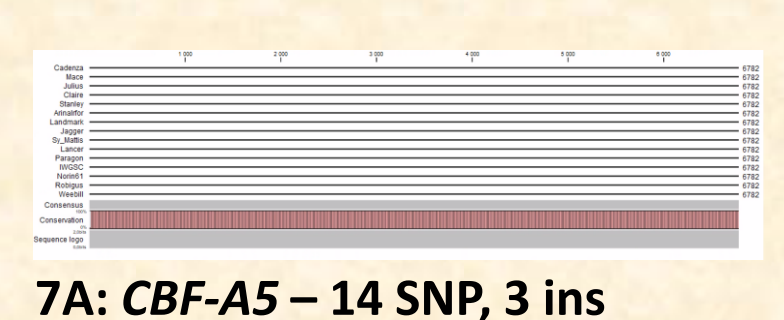
### 5A: CBF-A3 – 64 SNP, 3 SSR



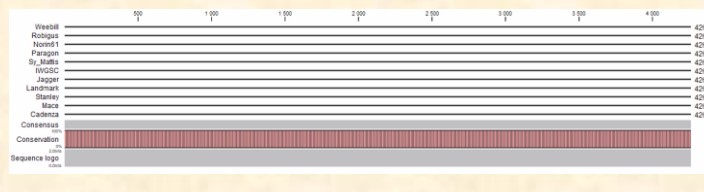
### 5D: CBF-D1 – 5 SNP



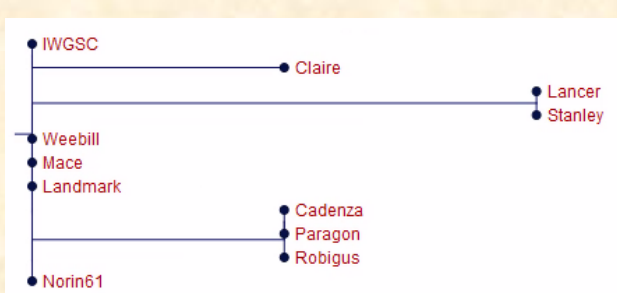
### 6D: Dem – 2 SNP



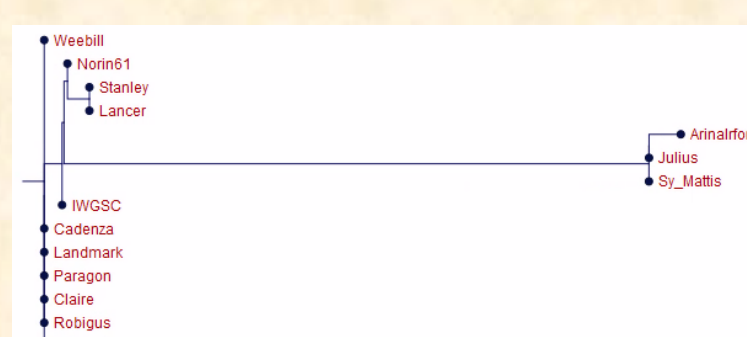
### 2B: Tac7 – brak zmienności



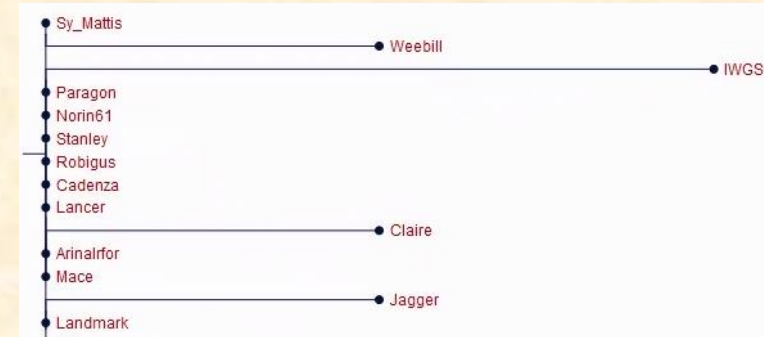
### 5A: CBF-A14 – 2 SNP



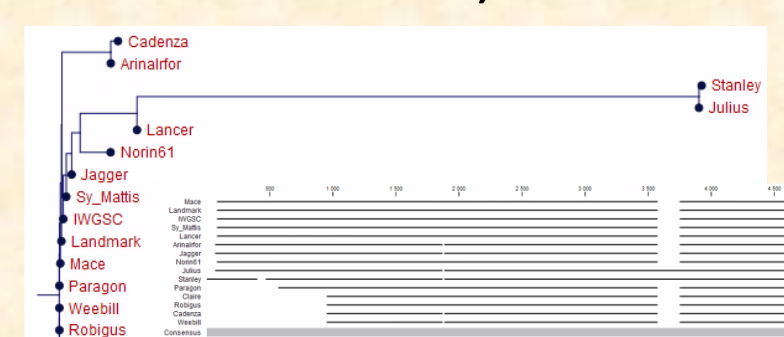
### 5A: CBF-A10 – 47 SNP



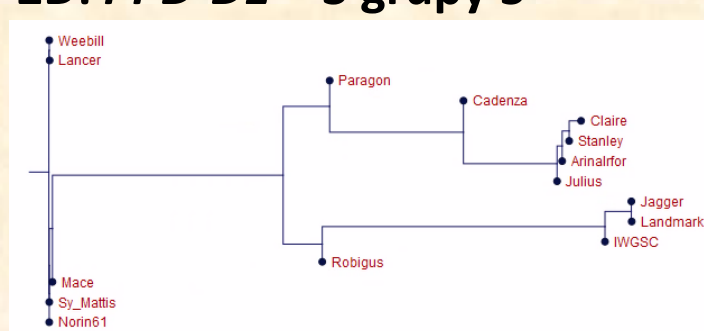
### 5D: Dhn1 – 5 SNP, del



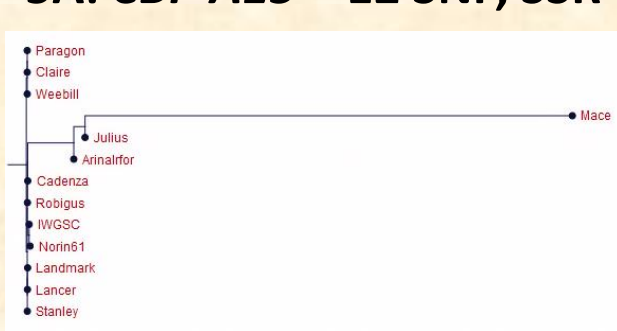
### 7A: CBF-A5 – 14 SNP, 3 ins



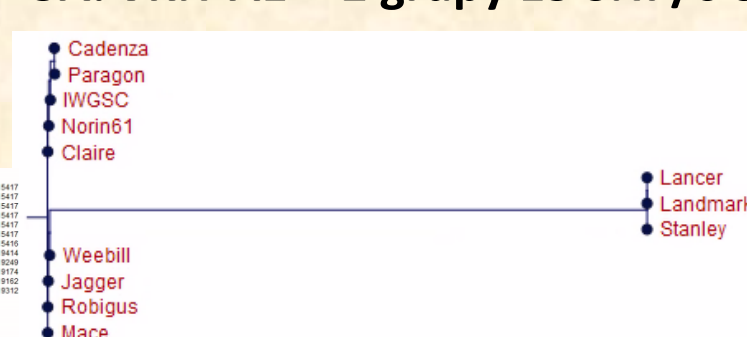
### 2D: PPD-D1 – 3 grupy 5'



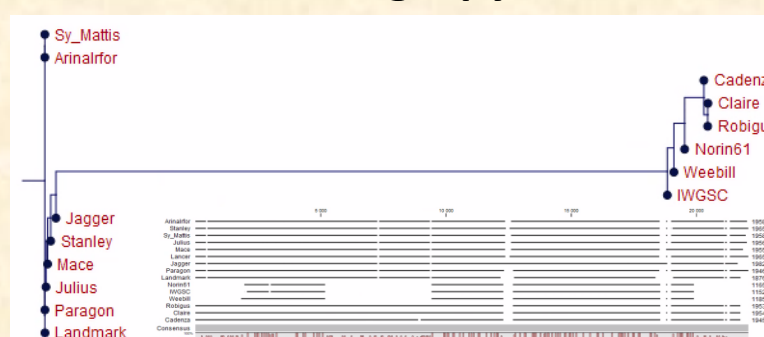
### 5A: CBF-A15 – 12 SNP, SSR



### 5A: VRN-A1 – 2 grupy 15 SNP/0 SNP



### 5D: VRN-D1 – 2 grupy 5/3 SNP, ins



### 7B: VRN-B3 – 4 SNP

