

Korekta z dnia 08.02.2024

## **SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**

**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2023 roku**

### **A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania: <b>Selekcja genomowa pszenicy</b>
Numer zadania: <b>1</b>
Planowany okres realizacji zadania: <b>2023 r.</b>
Planowane nakłady w zł: <b>312 000</b>

### **B. DANE WNIOSKODAWCY**

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)

**Lesław Gniewek, dr hab. inż. prof. PRz, Prorektor ds. Nauki, Politechnika Rzeszowska  
im. Ignacego Łukasiewicza, Al. Powstańców Warszawy 12, 35-959 Rzeszów, tel. (+48 17) 865 12  
47, tel./fax (+48 17) 854-23-40**

## C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

### 1. Zespół badawczy

Kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Mirosław Tyrka	Prof. dr hab. inż.	Politechnika Rzeszowska
Wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Paweł Krajewski	Prof. dr hab.	Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu
Renata Muca	Dr inż.	Politechnika Rzeszowska
Marcin Jaromin	Mgr inż.	Politechnika Rzeszowska
Justyna Buczkowicz	Mgr inż.	Politechnika Rzeszowska
Dorota Tyrka	Mgr inż.	Politechnika Rzeszowska

W roku 2023 prace zaplanowane dla dr. inż. Magdaleny Szeligi wykonała dr inż. Renata Muca, natomiast prace zaplanowane dla mgr inż. Małgorzaty Semik wykonał mgr inż. Marcin Jaromin.

### 2. Kierownik zadania

Mirosław Tyrka, prof. dr hab. inż., al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów; tel. bezp. (+48 17) 865 1927; sekretariat (+48 17) 865 1745, e-mail: [mtyrka@prz.edu.pl](mailto:mtyrka@prz.edu.pl), pod nieobecność (+48 17) 865 1897, Dorota Tyrka

## D. OPIS ZADANIA

### 1. Cele zadania

Proponowane badania mają na celu poszerzenie wiedzy na temat uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych oraz mechanizmów kształtujących zmiany w wysokości plonowania. Plon jest niezwykle złożoną cechą, a hipoteza badawcza zakłada, że część tej zmienności jest kształtowana przez zmiany epigenetyczne. Realizacja przewidzianych badań pozwoli na określenie udziału i roli tych zmian w kształtowaniu plonu.

Podjętym kierunkom odpowiadają 3 cele badawcze tj. a) walidacja systemu selekcji genomowej pszenicy, b) prace nad konstrukcją bibliotek ukierunkowanych do genotypowania z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania trzeciej generacji i c) optymalizacja systemu selekcji genomowej (w zakresie zmiany systemu selekcji, panelu markerów lub efektów selekcyjnych).

Informacje o przewidywanych efektach selekcyjnych związanych z występowaniem markerów DArTseq zostaną wykorzystane do szybkiej selekcji komponentów do krzyżowań spośród genotypów testowanych w doświadczeniu porównawczym w celu zainicjowania cyklu hodowlanego z możliwością wspomaganie selekcją genomową.

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie <sup>1</sup> /częściowo <sup>1</sup> )
1	Przewidywanie wartości genetycznej. Izolacja DNA i charakterystyka 500 linii markerami DArTseq	TAK
2	Ocena fenotypowa 171 rodów pszenicy zwyczajnej (zestaw do mapowania asocjacyjnego) w doświadczeniu polowym (1 rok)	TAK
3	Optymalizacja konstrukcji bibliotek do NGS i charakterystyka epigenetyczna wybranego genotypu metodą sekwencjonowania	TAK
4	Konwersja wybranych 20 markerów na system bazujący na PCR (HRM, KASP lub STS)	TAK

## 2. Harmonogram realizacji zadania

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Przewidywanie wartości genetycznej. Izolacja DNA i charakterystyka 500 linii markerami DArTseq	01 ----- 12	90 000
2	Ocena fenotypowa 171 rodów pszenicy zwyczajnej (zestaw do mapowania asocjacyjnego) w doświadczeniu polowym (1 rok)	01 ----- 09	116 000
3	Optymalizacja konstrukcji bibliotek do NGS i charakterystyka epigenetyczna wybranego genotypu metodą sekwencjonowania	01 ----- 12	76 000
4	Konwersja wybranych 20 markerów na system bazujący na PCR (HRM, KASP lub STS)	01 ----- 12	30 000
Razem			312 000

W pozycji „wynagrodzenia wraz z pochodnymi od wynagrodzeń” przekroczono koszty o 0.02 zł ze względu na zaokrąglenia składek ZUS.

<sup>1</sup> Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

### 3. Opis tematów badawczych

#### 3. 1. Temat badawczy 1: Przewidywanie wartości genetycznej

##### *Cel tematu badawczego 1*

Przez długi czas selekcja genomowa była zdominowana przez bazujący na hybrydyzacji DNA system DArT. Wraz z upowszechnianiem się technik sekwencjonowania następnej generacji (NGS), system ten został dostosowany (DArTseq) i pozwala na uzyskiwanie około 30000 markerów. Technologia DArTseq opiera się na sekwencjonowaniu następnej generacji fragmentów uzyskanych w procedurze podwójnej redukcji złożoności. W tym podejściu fragmenty DNA uzyskane po zastosowaniu kombinacji enzymów restrykcyjnych PstI-HpaII i PstI-HhaI z adapterami są trawione za pomocą TaqI. Jest to podejście analogiczne do proponowanego w ramach rozwijania własnych systemów markerowych w projekcie realizowanym w latach 2018-2019. Obecnie stosowane technologie GBS stanowią wydajne narzędzie identyfikacji mutacji punktowych (SNP) i zmian wynikających z obecności lub braku fragmentu DNA.

Celem tematu badawczego nr 1 było wykorzystanie sekwencjonowania NGS do charakterystyki genetycznej 500 genotypów pszenicy metodą DArTseq. Uzyskane dane posłużyły do weryfikacji efektów selekcyjnych ustalonych dla populacji treningowej oraz do selekcji genotypów do krzyżowań.

##### *Materialy i metody*

Materiał badawczy stanowiły 2-tygodniowe siewki pszenicy zwyczajnej uzyskane z otrzymanych nasion (Tabela S1.1). Izolację DNA z 500 linii wykonano zgodnie z metodyką zalecaną przez Diversity Arrays Technology. Stężenie próbek określano na fluorymetrze Qubit oraz spektrofotometrycznie a jakość oceniano po rozdziale na 1.5% żelu agarozowym.

Markery DArTseq dla populacji 500 linii badanych w 2023 roku zostały zmapowane do aktualnego genomu referencyjnego (Wheat Chinese Spring IWGSC RefSeq v2.1 genome assembly (2021)). Usunięto również markery, dla których brakowało segregacji dla > 30% genotypów oraz markery z częstością rzadszego allele poniżej 0.05%.

Analizy asocjacyjne dla populacji treningowej wykonano z wykorzystaniem programu Tassel 5.0 oraz iPAT<sup>2</sup>. Asocjacje przeliczono dla markerów silicoDArT, SNP oraz modeli GLM, MLM. Obliczenia dla modeli CMLM i FarmCPU wykonano w programie iPAT. W selekcji markerów istotnych dla serii wybrano takie, które miały istotne efekty dla największej liczby środowisk, stabilności plonowania, średniego plonu i plonu względem standardów. W kolejnym etapie selekcji markery istotne dla serii porównywano i wybrano markery o istotnych efektach ze stabilnością i % standardu dla więcej niż 1 środowisk. W celu dostosowania do programu Tassel 5.0 segregacje dominujących markerów silicoDArT przepisano domyślnie na SNP zastępując 1 i 0 przez A i C odpowiednio. W macierzy SNP oznaczenia „0” zastępowano przez allel dziki, „1” na allel zmutowany natomiast „2” na heterozygotę.

W ramach optymalizacji selekcji genomowej przeprowadzono autowalidację predykcji genomowej dla różnych modeli statystycznych służących do przewidywania wartości hodowlanej ocenianej genetycznie (genetic estimated breeding values, GEBV). Testowano modele gBLUP (genomic Best Linear Unbiased Prediction), rrBLUP (ridge regression BLUP)<sup>3</sup> oraz BRR (Gaussian regression), Bayes A, Bayes B, Bayes C i BL (Bayesian Lasso)<sup>4</sup>.

---

<sup>2</sup> Chen CJ, Zhang Z. iPat: intelligent prediction and association tool for genomic research. *Bioinformatics*. 2018 Jun 1;34(11):1925-1927. doi: 10.1093/bioinformatics/bty015.

<sup>3</sup> Endelman, J. (2011) Ridge regression and other kernels for genomic selection in the R package rrBLUP. *Plant Genome*, 4, 250–255.

<sup>4</sup> Pérez, Paulino. et al. (2014) Genome-wide regression and prediction with the BGLR statistical package. *Genetics*, 198, 483-495.

## Wyniki

W ramach realizacji zadania nr 1, 500 genotypów pszenicy scharakteryzowano przy pomocy markerów DArTseq (tabele S1.2, S1.4). Uzyskano 42519 markerów SNP, spośród których usunięto 6592 markery o liczbie danych brakujących przekraczających 30% oraz 21423 markery o częstości występowania poniżej 5% i 136 o zdublowanych pozycjach. Spośród 25938 markerów silicoDArT odrzucono 42 markery o powyżej 30% danych brakujących i 11230 markery o niskim polimorfizmie oraz markery o zdublowanych pozycjach i uzyskano 14660 markerów silicoDArT. Dla panelu materiałów badanych w 2023 roku, do analiz asocjacyjnych i predykcji genomowej pozostawiono wszystkie markery silicoDArT i 10531 markerów SNP (tabele S1.3, S1.5).

Dane genotypowe uzyskane metodą DArTseq dla materiałów badanych w 2023 wykorzystano do identyfikacji markerów związanych z plonem i cechami jakościowymi (tabela S1.6).

Zidentyfikowano 9 głównych rejonów związanych z plonowaniem i 3 związane z zawartością skrobi (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Główne loci związane ze zmiennością plonu ziarniaków i zawartością skrobi.

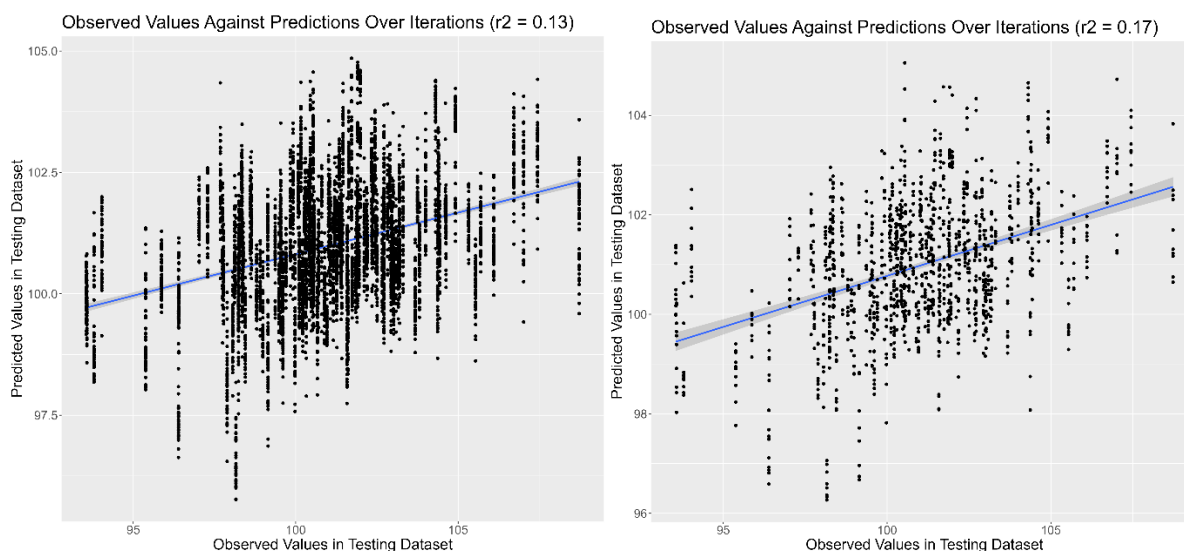
MTA	SNP flankujące		Chro	IWGSC_v2.1 (Mpz)		R2		
	M1	M2		M1	M2	GY_BLUP	GY_STD	Inne
QGY1	1674	1683	2A	36216026	39201857	-	14.04	GLM: NAD/SMH 11.8-13.7
QGY2	5225	5230	3D	18936183	19197634	-	-	G/MLM: KOH 15.8-19.7
QGY3	6675	-	5A	464270897			15.5	16.6 GLM: NAD13.3-15.5
QGY4	6704	6719	5A	473807772	476894853		16.9	18.5 GLM: NAD12.7-15.3
QGY5	6840		5A	543698374			13.4	19.7 G/MLM: KBP17.1-18.3
QGY6	7388	7398	5B	433164266	436384186	-	-	GLM: SMH12.5-16.8
QGY7	8480	8490	6A	587432118	587965598	-	-	G/MLM: KBP 16.2-16.6
QGY8	8507		6A	598415823			11.2	17.3 G/MLM: STH14.4
QGY9	11478	11494	7D	4215386	5670027			G/MLM: RAH/KRZ15.3-18.03
QS1	2784	2789	2B	643625410	644612105			GLM: SMO: 12.8-14.1
QS2	5022	5026	3B	802550956	803229423			GLM: STH: 13.7-18.9
QS3	7105	7106	5A	691649147	691655672			GLM: KOB: 14.2-15.9

GY\_BLUP – plon ziarna dla BLUP, GY\_STD – plon ziarna w procentach standardu, G/MLM wyniki istotne w modelach GLM i MLM odpowiednio.

Dane o średniej wysokości plonu w 5 miejscowościach z doświadczeń na poziomach A1 i A2 oraz o plonowaniu względem standardów wykorzystano o walidacji różnych modeli predykcji genomowej (Tabela 1.2.). Modele testowano oddzielnie dla 14367 markerów SNP i 14660 markerów silicoDArT. Stwierdzono, że dla obu typów markerów i wszystkich badanych modeli predykcji genomowej doświadczenia prowadzone na poziomie A2 pozwalają uzyskać dane o wyższej przydatności do przewidywania wartości hodowlanej u pszenicy zwyczajnej. Dla danych z 2022/2023 lepsza jest też przewidywalność plonowania w odniesieniu do wzorca.

Tabela 2.1. Wartości współczynników determinacji dla plonowania w 5 miejscowościach na poziomach A1 i A2 oraz w odniesieniu do standardów.

Model	R2 dla cech			
	Plon_A1	Plon_A2	Plon%STD_A1	Plon%STD_A2
<b>SNP</b>				
gBLUP	0.06	0.09	0.05	0.13
<b>rrBLUP</b>	<b>0.06</b>	<b>0.10</b>	<b>0.05</b>	<b>0.13</b>
BL	0.08	0.10	0.07	0.12
BRR	0.06	0.09	0.05	0.10
<b>BayesA</b>	<b>0.08</b>	<b>0.10</b>	<b>0.07</b>	<b>0.13</b>
BayesB	0.08	0.10	0.06	0.13
BayesC	0.06	0.11	0.05	0.12
<b>silicoDArT</b>				
gBLUP	0.06	0.09	0.04	0.13
<b>rrBLUP</b>	<b>0.04</b>	<b>0.11</b>	<b>0.03</b>	<b>0.17</b>
BL	0.06	0.11	0.06	0.11
BRR	0.03	0.10	0.04	0.12
<b>BayesA</b>	<b>0.06</b>	<b>0.12</b>	<b>0.08</b>	<b>0.14</b>
BayesB	0.06	0.15	0.05	0.13
BayesC	0.05	0.13	0.05	0.14



Rys. 1.1. Rozkład wartości przewidywanych do obserwowanych w modelu rrBLUP dla plonowania względem standardów na poziomie A2 dla markerów SNP i silicoDArT.

### Dyskusja

Selekcja genomowa (SG) pozwala na przyspieszenie hodowli poprzez selekcję genotypów o skumulowanych korzystnych allelach. Skuteczność przewidywań plonu w selekcji genomowej zależy w dużej mierze od puli genetycznej wykorzystywanej do skalowania wartości markerów oraz od puli genetycznej populacji, w której przewidywana jest wartość cechy. W jednym z wariantów zastosowania selekcji genomowej, dla wybranego krzyżowania, wartości selekcyjne przypisywane markerom są oceniane dla połowy populacji a następnie markery te są wykorzystywane do przewidywania wartości dla pozostałej części populacji która nie ma fenotypu. Poprzez odpowiednie zintegrowanie SG z procesem hodowlanym, możliwa jest selekcja komponentów do krzyżowań wyłącznie w oparciu o genomowe szacunkowe wartości hodowlane, zanim materiały hodowlane zostaną wprowadzone do szkółek i prób polowych. Ze względu na skrócenie czasu cyklu selekcji, przewiduje się, że roczny zysk genetyczny w

przypadku SG jest dwa do trzech razy większy niż w przypadku konwencjonalnego programu selekcji fenotypowej<sup>5</sup>.

W przypadku plonu, Belamkar i wsp (2018) stwierdzili, że u pszenicy ozimej średnia zdolność predykcyjna na podstawie danych genomowych w zbiorze treningowym wahała się od 0,23 do 0,55. Zdolność predykcyjna oszacowana dla nowego roku przy użyciu pozostałych lat wahała się od 0,17 do 0,28<sup>6</sup>. W badaniach własnych uzyskano podobne wartości korelacji w roku 2022 natomiast w 2023 dla autowalidacji modelu uzyskano wartości poniżej 0.17. Lozada i wsp. (2019)<sup>7</sup> stwierdził, że selekcja genomowa była korzystniejsza niż selekcja oparta na markerach pod względem selekcji na wzrost plonu. Uzupełnienie selekcji fenotypowej o selekcję genomową dało około 10% wzrost skuteczności selekcji w porównaniu do zastosowania samej tylko selekcji fenotypowej.

W przypadku innych cech pszenicy, o mniej złożonym podłożu genetycznym, zastosowanie selekcji genomowej może być bardziej skuteczne. W programie hodowlanym pod kątem zwiększenia zawartości fruktanów uzyskano zwiększenie ich zawartości o 25% bez wspomagania selekcją genomową a wykorzystanie danych genomowych pozwoliło zwiększyć postęp genetyczny do 34%<sup>8</sup>. Maksymalna wartość predykcji w hodowli pszenicy zwyczajnej pod kątem trzech rdzy wynosiła wewnątrz populacji od 0.45 do 0.80, natomiast dla fuzariozy od 0.42 do 0.90<sup>2</sup>.

Populacja kalibracyjna została scharakteryzowana w doświadczeniu 3 letnim w określonych warunkach środowiska i będzie wykorzystana do stworzenia populacji treningowej. Analizy asocjacyjne przeprowadzone na liniach służących do walidacji (z danymi fenotypowymi z lat 2020 i 2021) zostaną wykorzystane do wyboru dodatkowych markerów, które będą stanowiły uzupełnienie i rozwinięcie panelu markerowego. Reasumując, bezpośrednio populacja kalibracyjna stanowi odrębny panel doświadczalny, natomiast na poziomie wyników analiz asocjacyjnych zestaw markerów do selekcji genomowej będzie optymalizowany i uzupełniany. Perspektywnym celem jest opracowanie systemu selekcji bazującego na zmienności w genach regulujących procesy prowadzące do wydajnej akumulacji energii i zasobów w postaci plonu ziarniaków i skrobi.

W celu maksymalnego wykorzystania selekcji genomowej, powinna być ona zintegrowana z prowadzonymi pracami hodowlanymi, przewidywane wartości selekcyjne mogą tracić lub zyskiwać na znaczeniu w zależności od wybranych komponentów rodzicielskich. Proces ten wymaga ciągłych modyfikacji tj. uzupełniania zestawu markerów i korekty wartości predyktywnej poszczególnych markerów. Ewolucja populacji treningowej jest zatem niezbędna nie tylko w skali optymalizacji ogólnego zestawu markerów lecz wydaje się, że powinna być dostosowana również do programów hodowlanych.

Dane fenotypowe dla populacji treningowej i kolejnych populacji obejmowały również obserwacje przetrwania, wczesności, wysokości, wylegania, MTZ oraz chorób (rdzy brunatnej, rdzy żółtej, mączniaka, fuzariozy i septoriozy). W ramach kontynuacji badań analizy dla tych cech zostały przeprowadzone w kierunku identyfikacji dodatkowych markerów. Ponadto, zebrane dane umożliwią ocenę związku wytypowanych markerów cech fenologicznych i odpornościowych z plonowaniem.

---

<sup>5</sup> Haile J.K., N'Diaye A., Sari E. et al. 2020 Potential of Genomic Selection and Integrating “Omics” Data for Disease Evaluation in Wheat. *Crop Breed Genet Genom.* 2(4):e200016.

<sup>6</sup> Belamkar V, Guttieri MJ, Hussain W, et al. Genomic Selection in Preliminary Yield Trials in a Winter Wheat Breeding Program. *G3 (Bethesda)*. 2018;8(8):2735-2747. Published 2018 Jul 31. doi:10.1534/g3.118.200415

<sup>7</sup> Lozada, D.N., Mason, R.E., Sarinelli, J.M. et al. Accuracy of genomic selection for grain yield and agronomic traits in soft red winter wheat. *BMC Genet* 20, 82 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0785-1>

<sup>8</sup> Veenstra L.D., Poland J, Jannink J-L, Sorrells M.E. 2020. Recurrent genomic selection for wheat grain fructans. *Crop Sci.* 60 1499-1512.

Wykonano sumaryczne analizy właściwości markerów silicoDArT i SNP do przewidywania wartości hodowlanych (GEBV) dla danych z lat 2020-2023 (Tabela S5.1-2). Obliczono również wartości GEBV dla linii i odmian z zestawów walidacyjnych badanych w tych latach (Tabela S5.3). Dla 4 lat uwzględnionych w zestawieniu wykorzystano 17979 markerów SNP w tym 7520 (42%) markerów było unikalnych dla wybranego pojedynczego roku. Pozostałe markery były wykorzystane do predykcji plonu w 2 (21.1%), 3 (13.1%) lub 4 (24%) latach. W sumie, spośród 4302 markerów segregujących w badanych populacjach w 4 latach około połowa dawała w miarę stabilne kierunki efektów dla średniego plonu (BLUP) i plonu względem standardów (tj. 8, 7 i 6 efektów dodatnich lub ujemnych w 4-leciu, Tabela S5.2).

Do przewidywania plonu wykorzystano również 23283 markery silicoDArT w latach 2020-2023. W tej grupie 9909 (42.6%) markerów występowało w jednym roku badań, 7214 (31.0%) w 2 latach, natomiast 3163 i 2997 markerów występowało w 3 i 4 latach, odpowiednio. Podobnie jak w przypadku markerów SNP, około połowa (1622) markerów silicoDArT występujących w 4 latach miała stabilne (od 8 do 6) kierunki efektów związanych z plonem pszenicy w doświadczeniach prowadzonych na poziomie A2 (Tabela S5.1).

Powyższe analizy należy traktować jako wstępne. Dodatkowe elementy jakie można uwzględnić w celu poprawy modelu to przewidywanie plonu na podstawie haplotypów. Podejście to powinno z jednej strony pozwolić na wyeliminowanie z modelu markerów niewłaściwie zmapowanych w wyniku homeologii genomów pszenicy, a z drugiej strony powinno umożliwić prawidłowe uzupełnienie brakujących segregacji. Drugim elementem jest optymalizacja populacji wykorzystanych do budowy modeli cząstkowych w poszczególnych latach – eliminacja wybranych genotypów daje szansę, na uzyskanie lepiej oszacowanych efektów mniej zależnych od struktury populacji.

Efekty markerów zlokalizowanych w wybranych rejonach genomu istotnie związanych z wysokością plonu (Tabela 1.1.) przeanalizowano w latach 2020-2023 (Tabela S5.4). Dla większości badanych rejonów wybrano markery SNP występujące w 3 lub 4 latach badań. W przypadku marker QGY1 i QGY7 efekty stwierdzone w 2023 roku nie potwierdziły się w pozostałych latach. Natomiast markery z rejonu QGY2 były dość stabilnie pozytywne, podobnie jak marker 1218808 z rejonu QGY6 i marker 2248056 z rejonu QGY9. Jeśli chodzi o QGY3, QGY4, QGY5 i QGY8 to wybrane markery wykazywały stabilne efekty negatywne (Tabela S5.4).

### ***Wnioski***

Uzyskane dane wykorzystano do analiz asocjacyjnych w celu wytypowania rejonów związanych z plonowaniem. Wybrany zestaw markerów może być przydatny do wspomaganie hodowli lub optymalizacji selekcji genomowej.

W celu poprawy skuteczności selekcji genomowej wymagana jest optymalizacja populacji treningowej.

Mierniki dla tematu badawczego 1:

Lp.	miernik <sup>9</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba genotypów (Ng) z których wyizolowano DNA	500	500
2	Liczba próbek analizowanych metodą DArTseq	500	500

<sup>9</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.



### 3.2 Temat badawczy 2 Ocena fenotypowa

#### *Cel tematu badawczego 2*

Celem tematu było uzyskanie jak najbardziej kompleksowych danych fenotypowych ze szczególnym uwzględnieniem plonu.

#### *Materiały i metody*

W celu uzyskania danych fenotypowych w 5 lokalizacjach (Kończewice, Modzurów, Krzemlin, Radzików i Kobierzyce) założono doświadczenie obejmujące porównanie 171 linii w układzie bloków losowych z wzorcami (Artist, Kilimanjaro i Symertia) w trzech powtórzeniach w warunkach agrotechnicznych A2.

Główną ocenianą zmienną był plon, natomiast ocena fenotypowa w wybranych lokalizacjach obejmowała oprócz masy ziarna z poletka również obserwacje takie jak: liczbę dni do kłoszenia, wysokość, wyleganie i masę tysiąca ziaren. W roku 2023 analizy rozszerzono o cechy jakościowe bazujące na NIR tj. zawartość białka i skrobi, glutenu mokrego, wodochłonności i twardości. Wdrożono również procedury analizy zawartości L-asparaginy oraz folianów. W warunkach naturalnej infekcji przeprowadzono ocenę wybranych chorób grzybowych. Uzyskane dane stanowią komponent fenotypowy analiz asocjacyjnych i posłużą do identyfikacji dodatkowych regionów odpowiedzialnych za cechy plonowania pszenicy.

#### *Wyniki*

W ramach przeprowadzonych badań założono doświadczenia w 5 lokalizacjach. Określono wysokość plonu ziarna o wilgotności 15% dla 171 genotypów badanych w 3 seriach w odniesieniu do 3 wzorców w układzie bloków niekompletnych (Tabela S.2.1). We wszystkich seriach stwierdzono istotne efekty związane z genotypem badanych linii, środowiskiem i interakcją genotypowo-środowiskową (Tabela 2.1). Niezależnie, dodatkowo, wprowadzono charakterystykę jakościową zawartości i składu skrobi.

Tabela 2.1. Analiza wariancji zmienności plonu porównywanych linii pszenicy zwyczajnej na poziomie A2.

Źródło zmienności	Efekt	Stopnie swobody efektu	Średnie kwadraty efektu	Stopnie swobody błędu	Średnie kwadraty błędu	F	p
Seria 1							
Genotyp (G)	Losowe	59	223.5	236	113.1	2.0	0.00019
Lokalizacja (E)	Stałe	4	66279.4	236	113.1	586.0	0.00000
G*E	Losowe	236	113.1	600	57.2	2.0	0.00000
Seria 2							
Genotyp (G)	Losowe	59	278.8	236	107.3	2.6	0.00000
Lokalizacja (E)	Stałe	4	31012.0	236	107.3	289.2	0.00000
G*E	Losowe	236	107.3	600	44.0	2.4	0.00000
Seria 2							
Genotyp (G)	Losowe	59	341.2	236	135.6	2.5	0.00000
Lokalizacja (E)	Stałe	4	39866.8	236	135.6	293.9	0.00000
G*E	Losowe	236	135.6	600	109.1	1.2	0.02030

Tabela 2.2. Stabilność plonowania i plonowanie 60 genotypów testowanych w serii S1 na poziomie A2.

Odmiana/ród	Ranking stabilności	Stabilność	Średni plon (dt/ha)	Plon (% wzorca)
AND 19057	22	1.59	135.76	102.83
AND 19068	15	2.09	134.65	101.99
AND 19249	57	0.37	129.74	98.27
AND 19569	26	1.51	134.47	101.85
AND 19791	51	0.71	136.39	103.31
AND 19797	27	1.46	129.06	97.75
ARTIST w1	31	1.42	131.47	99.58
<b>C 19 104</b>	<b>1</b>	<b>5.00</b>	<b>123.54</b>	<b>93.57</b>
C 19 573	16	2.07	131.92	99.92
<b>C2738/14-14</b>	<b>50</b>	<b>0.71</b>	<b>139.34</b>	<b>105.54</b>
<b>DD 197/19</b>	<b>48</b>	<b>0.85</b>	<b>137.72</b>	<b>104.31</b>
DD 531/19	34	1.27	134.53	101.90
DD 559/19	35	1.27	132.55	100.40
DD 868/19	8	2.58	134.18	101.63
DI 2/38	24	1.55	129.47	98.06
DL 1027/19	20	1.61	134.11	101.58
DL 1028/19	54	0.54	129.86	98.36
<b>DL 1091/19</b>	<b>53</b>	<b>0.55</b>	<b>139.06</b>	<b>105.33</b>
DL 1095/19	32	1.36	129.02	97.72
<b>KBP 21.16</b>	<b>28</b>	<b>1.46</b>	<b>137.83</b>	<b>104.40</b>
KBP 21.25	13	2.16	133.43	101.07
KBP 21.28	36	1.25	132.00	99.98
KBP 21.41	46	0.88	133.39	101.04
KBP 21.47	21	1.60	132.91	100.67
KILIMANJARO w2	59	0.35	131.09	99.29
MIB 0245	10	2.29	132.96	100.71
MIB 0534	12	2.20	135.99	103.00
NAD_Z190674	29	1.44	135.91	102.94
<b>NAD_Z190702</b>	<b>3</b>	<b>4.83</b>	<b>132.74</b>	<b>100.54</b>
NAD_Z_19008	52	0.56	130.23	98.64
NAD_Z_19040	37	1.20	133.29	100.96
NAD_Z_19581	14	2.16	135.85	102.90
NAD_Z_19647	42	1.01	133.08	100.80
POB 0122	41	1.03	130.69	98.99
<b>POB 0222</b>	<b>2</b>	<b>4.85</b>	<b>123.51</b>	<b>93.55</b>
POB 0322	44	0.92	134.12	101.59
SMH 497	7	2.69	128.39	97.24
SMH 524	6	2.99	133.27	100.94
SMH 553	40	1.11	132.57	100.41
SMH 576	45	0.91	131.80	99.83
SMH 578	58	0.36	135.60	102.71
SMH 643	47	0.86	134.93	102.20
SMH 710	56	0.43	130.04	98.50
SMH 761	23	1.56	134.32	101.74
SMH 796	17	1.95	132.58	100.42
SMH 804	60	0.25	133.00	100.74
SMH 825	30	1.44	131.45	99.56
STH 0244L1	39	1.15	136.97	103.75
STH 0244L2	49	0.74	133.79	101.34
STH 0307	38	1.18	131.63	99.70
STHD 0411	5	3.15	135.13	102.35
STHD 0424	9	2.36	132.65	100.48
STHD 0430	55	0.52	129.70	98.24
STHD 0441	43	0.93	132.77	100.56
STHD 0549	33	1.35	135.34	102.51
STHD 1121	18	1.69	133.56	101.16
STHD 1126	25	1.53	131.82	99.84
STHD 1438	19	1.63	137.31	104.00
STHD 1447	4	3.68	130.91	99.15
SYMETRIA w3	11	2.27	133.51	101.13

Tabela 2.3. Stabilność plonowania i plonowanie 59 genotypów testowanych w serii S2 na poziomie A2.

Odmiana/ród	Ranking stabilności	Stabilność	Średni plon (dt/ha)	Plon (% wzorca)
AND 19073	39	1.43	134.79	101.91
AND 191003	32	1.96	132.67	100.30
AND 191004	5	3.25	138.16	104.45
AND 191009	55	0.68	135.42	102.38
AND 19799	33	1.94	130.82	98.91
AND 19829	43	1.32	132.66	100.30
AND 19862	7	3.04	135.90	102.75
ARTIST w1	28	2.14	131.85	99.69
C 16 397	4	3.27	138.39	104.63
C 17 263	9	2.92	136.19	102.96
C 19 186	24	2.43	133.93	101.26
C 3279/16os	56	0.62	130.09	98.35
DD 198/19	18	2.59	138.77	104.92
DD 530/19	29	2.14	132.63	100.27
DD 561/19	31	2.06	134.85	101.95
DD 909/19	45	1.24	134.11	101.40
DL 1102/19	48	1.20	133.94	101.27
DL 1121/19	57	0.61	131.75	99.61
DL 1156/19	12	2.80	131.00	99.05
DL 1175/19	36	1.77	129.20	97.68
DL 1220/19	21	2.56	137.30	103.81
KBP 21.17	46	1.21	136.56	103.25
KBP 21.32	49	1.16	130.21	98.45
KBP 21.42	14	2.75	131.13	99.14
KBP 21.43	51	1.03	127.50	96.40
KBP 21.50	8	2.92	130.07	98.34
KBP 21.9	20	2.58	132.37	100.08
KILIMANJARO w2	52	0.84	130.12	98.38
MIB 01007	41	1.38	135.15	102.18
NAD_Z_191004	15	2.75	136.24	103.00
<b>NAD_Z_191036</b>	<b>6</b>	<b>3.20</b>	<b>142.12</b>	<b>107.45</b>
<b>NAD_Z_191090</b>	<b>37</b>	<b>1.66</b>	<b>141.55</b>	<b>107.02</b>
NAD_Z_19377	35	1.90	135.80	102.67
NAD_Z_19796	10	2.91	133.44	100.89
POB 0422	11	2.81	127.50	96.39
POB 0522	44	1.29	124.05	93.79
POB 0622	27	2.40	129.79	98.12
SMH 520	25	2.42	134.65	101.80
SMH 530	58	0.44	132.55	100.21
SMH 574	60	0.39	133.01	100.56
SMH 592	16	2.71	132.70	100.33
SMH 644	47	1.21	133.96	101.28
SMH 733	17	2.68	136.26	103.02
SMH 786	50	1.15	133.25	100.74
SMH 797	53	0.83	133.96	101.28
SMH 816	22	2.52	135.37	102.34
SMH 829	13	2.76	132.95	100.52
SMH 840	54	0.77	135.87	102.72
<b>STHD 1461</b>	<b>3</b>	<b>3.50</b>	<b>132.87</b>	<b>100.45</b>
STHD 1464	26	2.41	135.09	102.13
STHD 1468	30	2.09	138.12	104.43
STHD 1471	59	0.44	138.26	104.53
STHD 1472	38	1.56	136.42	103.14
<b>STHD 1474</b>	<b>23</b>	<b>2.50</b>	<b>139.67</b>	<b>105.59</b>
<b>STHD 1475</b>	<b>42</b>	<b>1.34</b>	<b>143.12</b>	<b>108.20</b>
STHD 1476	40	1.38	135.37	102.34
STHD 1477	34	1.93	136.48	103.19
STHD 1479	19	2.59	129.33	97.78
<b>STHD 2001</b>	<b>1</b>	<b>4.26</b>	<b>131.65</b>	<b>99.54</b>
<b>SYMETRIA w3</b>	<b>2</b>	<b>3.82</b>	<b>134.83</b>	<b>101.94</b>

Tabela 2.4. Stabilność plonowania i plonowanie 59 genotypów testowanych w serii S3 na poziomie A2.

Odmiana/ród	Ranking stab.	Stabilność	Średni plon (dt/ha)	Plon (% wzorca)
<b>AND 19019</b>	<b>4</b>	<b>2.91</b>	<b>142.46</b>	<b>106.72</b>
AND 19026	29	1.38	135.98	101.87
AND 19337	43	0.95	137.68	103.14
AND 19803	17	2.03	133.78	100.22
AND 267/16	9	2.47	133.70	100.16
<b>AND 27/16</b>	<b>12</b>	<b>2.23</b>	<b>141.10</b>	<b>105.70</b>
AND 33/16	60	0.37	139.35	104.39
ARTIST w1	42	0.96	132.40	99.18
C 18 238	16	2.06	135.18	101.27
C 1854/17-4	40	1.10	125.52	94.03
C 19 318	52	0.78	133.25	99.82
<b>C2815/15-21</b>	<b>1</b>	<b>3.57</b>	<b>131.15</b>	<b>98.25</b>
DD 470/19	35	1.23	136.03	101.90
DD 522/19	37	1.16	132.44	99.22
DD 800/19	36	1.20	139.32	104.37
DD 910/19	45	0.94	135.29	101.35
DL 1278/19	47	0.94	135.09	101.20
DL 1348/19	30	1.34	135.44	101.46
DL 1359/19	56	0.64	137.62	103.09
DL 1410/19	38	1.15	132.65	99.37
DL 1552/19	20	1.85	137.51	103.01
KBP 21.10	33	1.32	129.87	97.29
KBP 21.19	27	1.40	132.95	99.60
KBP 21.20	51	0.79	131.33	98.38
KBP 21.33	13	2.18	130.67	97.89
KBP 21.56	15	2.08	136.30	102.11
KILIMANJARO w2	26	1.40	131.77	98.71
KOH 03221	44	0.94	131.14	98.24
KOH 12020	48	0.94	134.08	100.44
KOH 18619	58	0.57	138.40	103.68
MIB 01152	57	0.63	136.78	102.47
<b>NAD_Z190876</b>	<b>7</b>	<b>2.53</b>	<b>145.15</b>	<b>108.73</b>
NAD_Z_19110	19	1.92	139.65	104.61
NAD_Z_19565	8	2.51	135.86	101.78
NAD_Z_19628	55	0.64	135.39	101.42
NAD_Z_19649	50	0.81	137.76	103.20
<b>POB 0722</b>	<b>2</b>	<b>3.34</b>	<b>135.64</b>	<b>101.61</b>
POB 0822	46	0.94	127.98	95.87
POB 0922	32	1.32	127.32	95.38
POB 1022	25	1.48	131.04	98.16
SMH 521	24	1.57	134.22	100.55
SMH 533	41	1.04	133.84	100.26
SMH 575	28	1.39	136.01	101.89
SMH 577	59	0.51	133.97	100.36
SMH 633	10	2.40	133.64	100.12
SMH 652	5	2.74	128.84	96.52
SMH 754	23	1.71	133.63	100.11
SMH 798	22	1.72	129.53	97.03
SMH 820	18	1.98	132.86	99.53
SMH 839	31	1.33	133.46	99.98
STH 2008	21	1.82	137.74	103.18
STH 2009	34	1.28	134.84	101.01
STH 2010	39	1.12	137.71	103.16
STHD 2002	11	2.37	132.87	99.54
STHD 2003	54	0.73	137.11	102.72
<b>STHD 2004</b>	<b>53</b>	<b>0.77</b>	<b>141.63</b>	<b>106.10</b>
STHD 2005	49	0.89	136.74	102.44
<b>STHD 2006</b>	<b>3</b>	<b>3.17</b>	<b>131.63</b>	<b>98.61</b>
STHD 2007	14	2.13	135.36	101.40
SYMETRIA w3	6	2.61	136.30	102.10

Tabela 2.5. Zestawienie wybranych dodatkowych cech badanych na genotypach w trzech seriach (S1-S3). WYS – wysokość roślin, LDK – liczba dni do kwitnięcia, WYL2 - wyleganie, HL – masa hektolitra, MTZ – masa tysiąca ziaren, BLK – zawartość białka.

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std	Wsp.zmn.	Skośność	Kurtoza
Seria 1								
WYS	420	96.40	74	133	9.923	10.294	0.479	0.550
LDK	300	150.96	144	157	2.496	1.654	-0.273	0.019
WYL2	300	8.26	2.33	9	1.252	15.166	-2.256	5.470
HL	360	76.76	8.2	85.2	4.925	6.417	-7.629	103.868
MTZ	360	47.13	32.4	65.5	4.594	9.748	0.017	0.461
BLK	120	12.60	10.5	14.1	0.744	5.902	-0.333	0.031
Seria 2								
WYS	420	94.81	72	124	9.362	9.875	0.347	0.087
LDK	300	150.90	144	157	2.193	1.453	-0.558	1.031
WYL2	300	8.52	3.67	9	0.928	10.897	-2.353	5.727
HL	360	76.83	62.7	82.9	2.576	3.352	-0.666	1.639
MTZ	360	46.30	33.8	64	4.502	9.724	0.064	0.416
BLK	120	12.34	10.4	14.3	0.937	7.596	0.176	-0.618
Seria 3								
WYS	420	97.11	72	128	10.432	10.742	0.280	-0.110
LDK	300	151.29	144.33	161	2.398	1.585	0.072	0.949
WYL2	300	8.26	3	9	1.194	14.444	-1.846	3.002
HL	360	77.08	70.5	83	2.271	2.946	-0.238	-0.315
MTZ	360	46.56	35.2	62.5	4.954	10.638	0.367	0.100
BLK	120	11.89	9.3	13.5	0.796	6.696	-0.997	1.875

W pierwszej serii spośród rodów plonujących powyżej wzorca wysoką stabilnością cechowały się C2738/14-14, DL 1091/19, KBP 21.16 i DD 197/19 (Tabela 2.2). W drugiej serii wysoki plon i stabilność miały rody STHD 1475, NAD\_Z\_191036 i NAD\_Z\_191090 (Tabela 2.3). W trzeciej serii rodów wysokim i stabilnym plonem cechowały się NAD\_Z190876, AND 19019 i STHD 2004 (Tabela 2.4). Rody oceniono również pod względem wysokości, wczesności, MTZ oraz zawartości białka (Tabela 2.5). Ponadto w 2023 roku ocenę fenotypową uzupełniono o oznaczenia cech jakościowych (Tabela 2.6).

## Dyskusja

Dane fenotypowe są istotnym elementem opracowania i testowania systemu markerów w optymalizacji metody selekcji genomowej. Zebranie kompleksowych danych fenotypowych obejmujących informacje o stopniu porażenia przez choroby, wybranych cechach fenologicznych oraz wysokości plonu pozwoli na ustalenie związków pomiędzy tymi cechami. Wykorzystanie podzbiorów istotnych markerów z mapowania asocjacyjnego może utrzymywać wysoką dokładność (64-70%) dla plonu ziarna, ale może przyczynić się do spadku dokładności przewidywania cech o wysokiej odziedziczalności, takich jak wysokość roślin<sup>10</sup>.

Częstym argumentem przemawiającym przeciwko stosowaniu selekcji genomowej jest stosunkowo niska odziedziczalność plonu. Z punktu widzenia przydatności do systemu selekcji genomowej istotny jest udział wariacji genetycznej w całkowitej zmienności fenotypowej. W przypadku programu hodowlanego pszenicy ozimej Uniwersytetu Stanowego Kansas, odziedziczalność plonu sensu lato ziarna wynosi poniżej 0,3<sup>11</sup>. Natomiast w badaniach własnych, odziedziczalność liczona na podstawie średnich kwadratów odchyłeń i w kolejnych seriach 1-3 populacji kalibracyjnej wyniosła ona odpowiednio 62%, 62%, i 70%.

<sup>10</sup> Lozada, D.N., Mason, R.E., Sarinelli, J.M. et al. Accuracy of genomic selection for grain yield and agronomic traits in soft red winter wheat. BMC Genet 20, 82 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0785-1>

<sup>11</sup> Calvert M, Evers B, Wang X, Poland J. 2020. Breeding Program Optimization for Genomic Selection in Winter Wheat. <https://doi.org/10.1101/2020.10.07.330415>

Tabela 2.6. Zestawienie wybranych dodatkowych cech jakościowych zbadanych w próbach z 3 lokalizacji (Strzelce, Kobierzyce i Smolice)

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std	Wsp.zmn.	Skośność	Kurtoza
<b>KOB</b>								
białko	540	10.92	8.40	13.70	0.965	8.841	0.044	-0.360
popiół	540	1.41	1.30	1.60	0.067	4.785	0.296	0.190
tłuszcz	540	1.58	1.10	2.30	0.178	11.284	0.440	0.201
włókno sur.	540	2.66	2.20	3.20	0.176	6.619	0.073	-0.007
skrobia	540	61.09	57.90	63.30	0.818	1.339	-0.284	0.512
gluten mokry	540	24.20	17.00	32.20	2.629	10.864	0.110	-0.320
wodochłonność	540	52.67	46.40	60.25	2.512	4.769	0.196	-0.199
twardość	540	52.06	29.90	69.00	7.413	14.241	-0.172	-0.194
<b>SMO</b>								
białko	540	11.71	8.70	14.80	1.155	9.859	0.050	-0.383
popiół	540	1.50	1.20	1.80	0.094	6.235	0.109	0.085
tłuszcz	540	1.51	1.10	2.00	0.154	10.168	0.251	0.012
włókno sur.	540	2.41	1.90	3.10	0.238	9.849	0.381	-0.641
skrobia	540	60.49	56.20	64.20	1.239	2.049	0.002	0.126
gluten mokry	540	27.90	17.00	40.30	3.885	13.925	0.059	-0.319
wodochłonność	540	54.52	46.35	59.64	2.171	3.982	-0.344	0.130
twardość	540	62.90	28.30	81.30	9.048	14.386	-0.406	-0.357
<b>STH</b>								
białko	538	9.61	8.10	11.70	0.648	6.746	0.362	-0.105
popiół	538	1.41	1.20	1.60	0.068	4.799	-0.101	-0.467
tłuszcz	538	1.69	1.30	2.20	0.173	10.264	0.260	-0.375
włókno sur.	538	2.48	2.00	3.00	0.168	6.785	0.008	-0.085
skrobia	538	62.27	60.00	65.60	0.722	1.159	0.462	0.727
gluten mokry	538	20.76	14.60	27.30	1.989	9.580	0.394	0.369
wodochłonność	538	50.78	45.81	56.78	2.128	4.190	0.125	-0.459
twardość	538	49.39	25.90	72.50	7.881	15.958	0.059	-0.134

## Wnioski

Uzyskano dane o plonowaniu oraz cechach plonotwórczych dla 171 linii pszenicy ozimej, które posłużą do walidacji modelu selekcji genomowej.

Lp.	miernik <sup>12</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
2.1.	Liczba genotypów pszenicy z oceną plonu w przynajmniej 5 lokalizacjach	171	171
2.2.	Liczba ocenianych cech pszenicy	4	4

<sup>12</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

### 3.3 Temat badawczy 3 Optymalizacja konstrukcji bibliotek

#### *Cel tematu badawczego 3*

Klasyczne systemy markerowe nie są na tyle czułe żeby wychwycić zmiany metylacyjne. W obecnych metodach, zastosowanie enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację pozwala na wykrycie jedynie części zmian metylacyjnych. Technologie sekwencjonowania trzeciej generacji stanowią narzędzie do poznania zmienności epigenetycznej w skali całego genomu. W ramach zaplanowanych badań technologie trzeciej generacji zastosowano do sekwencjonowania całego genomu pszenicy i do badania zmienności w wybranych fragmentach genomu.

Celem tematu było: 1) sekwencjonowanie wybranego genotypu za pomocą metody sekwencjonowania całogenomowego w celu uzyskania danych niezbędnych do opracowania sekwencji referencyjnej pszenicy - analiza ta powinna dostarczyć danych pozwalających na identyfikację rejonów podlegających metylacji; 2) optymalizacja metodyki tworzenia bibliotek z selekcją docelowych rejonów przy pomocy CRISPR/Cas8 do sekwencjonowania nanoporowego.

#### *Seqwencjonowanie wybranego genotypu w technologii Illumina*

Analizy obejmowały sekwencjonowanie całogenomowe w technologii Illuminy. Prace są kontynuowane na polskiej odmianie Euforia. Wybór odmiany do sekwencjonowania był losowy, jedyne kryteria selekcji to data wpisu do rejestru w ciągu ostatnich 5 lat i pochodzenie z polskiej hodowli. Sekwencjonowanie całogenomowe wykonano usługowo, po dostarczeniu DNA wyizolowanego zgodnie z wymogami serwisu. Serwis obejmował przygotowanie biblioteki zgodnie z IDT xGen DNA EZ kit.

Dalsza obróbka surowych danych polegała na usunięciu pozostałości adaptorów i ocenie jakości odczytów. W dalszym etapie analizy uzyskane sekwencje zostaną wykorzystane do korekty odczytów PacBio i złożenia sekwencji genomowej odmiany Euforia na bazie zdeponowanych genomów referencyjnych. Z uwagi na wymagania obliczeniowe analizy będą kontynuowane w IGR PAN z wykorzystaniem programów zainstalowanych na komputerach dużej mocy w Poznańskim Centrum Superkomputerowo-Sieciowym i na platformie Cyverse.

#### *Optymalizacja metodyki tworzenia bibliotek z selekcją docelowych rejonów przy pomocy CRISPR/Cas8 do sekwencjonowania nanoporowego*

Do optymalizacji metodyki wybrano sześć odmian ozimych pszenicy o znanej sekwencji (Cadenza (PANG0002-PG-10), Claire (PANG0005-PG-8), Kronos (PANG0008-PG-6), Lancer (PANG0009-PG-7), Paragon (PANG0013-PG-7), Weebill (PANG0016-PG-8)). Do przygotowania biblioteki wybrano 20 genów (Tabela 3.1). W celu lepszego wyboru odcinków kierujących, sekwencje genów poszerzono o 5 tys nukleotydów z końców 3' i 5' na podstawie danych z bazy Plants Ensembl dla wybranych 6 zsekwencjonowanych odmian pszenicy. Zaprojektowane crRNA, zostały następnie wykorzystane do syntezy cząsteczek gRNA. Z uwagi na wysokie koszty zakupu syntetycznych cząsteczek RNA (20x wyższe od DNA) sekwencje DNA dla crRNA wykorzystano do transkrypcji *in vitro* gRNA zestawem EnGen sgRNA Synthesis Kit, *S.pyrogenes* Protocol (NEB, #E3322). Uzyskane sondy pod defosforylacji i oczyszczeniu zostały zastosowane do redukcji złożoności biblioteki przeprowadzonej zgodnie z metodyką Cas9 Sequencing Kit (SQK-CS9109). Stężenie DNA w próbkach pszenicy i zsyntetyzowanego gRNA określono na fluorymetrze Qubit i spektrofotometrycznie a integralność oceniono na żelu agarozowym.

Tabela 3.1. Geny wybrane do przygotowania biblioteki ukierunkowanej.

Oznaczenie gen	Chromosom	Zakres	Gen adnotacja	Cas9/PCR
<i>CBF-7</i>	2B	624355817..624354731	TraesCS2B01G434300	PCR -
<i>CBF-A10</i>	5A	523610162..523608286	TraesCS5A01G311900	PCR
<i>CBF-A13</i>	5A	523565873..523567727	TraesCS5A02G311795	PCR
<i>CBF-A14</i>	5A	523017139..523014908	TraesCS5A01G311300	PCR
<i>CBF-A15</i>	5A	523136185..523137961	TraesCS5A01G311500	PCR
<i>CBF-A18</i>	6A	601134858..601132820	TraesCS6A01G381200	PCR
<i>CBF-A3</i>	5A	523588694..523586767	TraesCS5A01G311800	PCR
<i>CBF-A5</i>	7A	27906197..27904137	TraesCS7A01G057800	PCR
<i>CBF-D1</i>	5D	410843807..410842099	TraesCS5D01G317700	PCR
<i>Dem</i>	6D/6B	434787533..434790099	TraesCS6D01G332400	PCR
<i>Dhn1</i>	5D	450378814..450380741	TraesCS5D01G379300	PCR
<i>PPD-B1</i>	2B	293694474..293688451	TraesCSU01G196100	Cas9, PCR
<i>PPD-D1</i>	2D	33956129..33951962	TraesCS2D01G079600	Cas9, PCR
<i>QTL_4A</i>	4A	122735562..122736397	TraesCS4A01G107100	PCR
<i>Tacr7</i>	2B	680447236..680445475	TraesCS2B01G483000	PCR
<i>VRN-A1</i>	5A	587424204..587411179	TraesCS5A01G391700	Cas9,PCR
<i>VRN-B1</i>	5B	573817387..573802529	TraesCS5B01G396600	Cas9,PCR
<i>VRN-B3</i>	7B	9701869..9704470	TraesCS7B01G013100	Cas9,PCR
<i>VRN-D1</i>	5D	467185262..467176178	TraesCS5D01G401500	Cas9,PCR
<i>VRN-D2</i>	4D	509284733..509281917	TraesCS4D01G364400	Cas9, PCR

## Wyniki

### *Sekwencjonowanie wybranej odmiany*

W wyniku sekwencjonowania losowych sekwencji reprezentujących genom odmiany Euforia uzyskano ponad 5 miliardów sekwencji (2 x 2.585.707.686) o łącznej długości 2 x 390.4 Gbp (odczyty w dwóch kierunkach). Jakość większości sekwencji była wysoka i wartość Phred wyniosła średnio 39 (Rys 3.1). Oznacza to, że w uzyskanych danych możliwy jest błąd sekwencjonowania w około jednym nukleotydzie na 1000 odczytanych. Błędy odczytu kumulowały się głównie w sekwencjach o długości 151 par zasad i zostały zredukowane po usunięciu adaptorów (Rys. 3.2). Sekwencje były zanieczyszczone głównie sekwencjami transpozazy Nextera oraz w mniejszym stopniu sekwencjami adaptorowymi Illumina (Rys 3.3). Średnia zawartość GC wyniosła 46% i cechowała się dużą zgodnością z przewidywanym rozkładem (Rys. 3.4). W uzyskanych odczytach o długości 151 nt nie występowały dane brakujące.

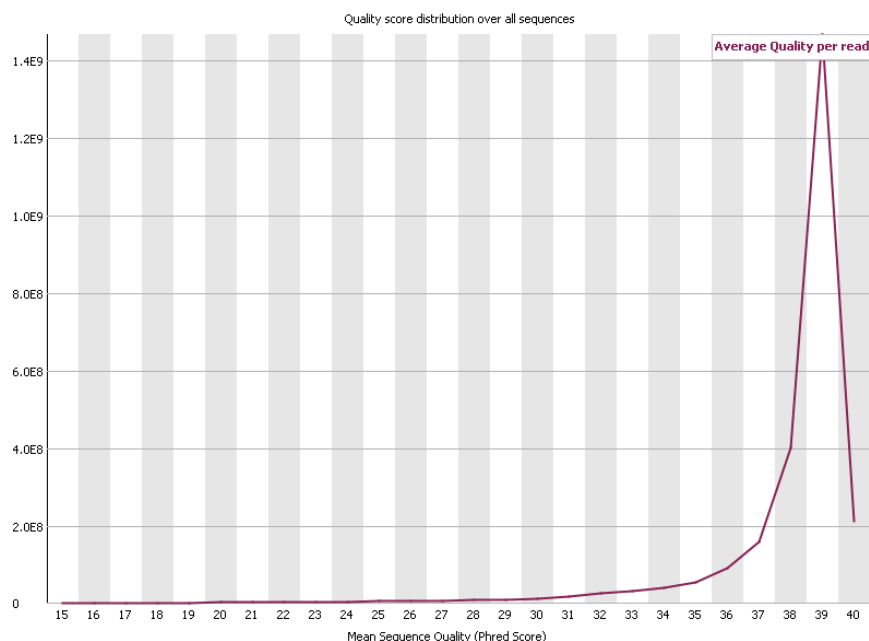
Oczyszczanie sekwencji przeprowadzono w programie TrimGalore. W procesie tym odrzucono sekwencje, które po sparowaniu i usunięciu adapterów były krótsze niż 20 bp (około 1% sekwencji wejściowych). Kontrolna analiza jakości po tym procesie potwierdziła skuteczność eliminacji adapterów. Oczyszczone sekwencje dopasowano do genomu referencyjnego RefSeq v2.1 pozyskanego z strony The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) przy użyciu programu bowtie<sup>13,14</sup>. W wyniku mapowania około 10% oczyszczonych sekwencji stwierdzono, że 93.16% było właściwie sparowanych i wszystkie znalazły rejony homologiczne na genomie Chinese Spring. Na przykładowym obrazie mapowania sekwencji do chromosomu 4B widać, że niektóre rejony są nadreprezentowane (Rys. 3.5.). Przykładowo do pozycji 16 957 444 i 604 435 760 na chromosomie 4B zmapowało się odpowiednio 8434 i 5220 fragmentów, co oznacza nierównomierny rozkład sekwencji przy zakładanym średnim ponad 50-krotnym pokryciu genomu. Na podstawie danych z mapowania do genomów referencyjnych zostaną wybrane markery SNP. Lokalizacje tych markerów zostaną porównane z informacjami dostępnymi w bazach i efektami związanymi z plonowaniem w celu

<sup>13</sup> Langmead B, Wilks C, Antonescu V, Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics*. 2018 Jul 18. doi: 10.1093/bioinformatics/bty648.

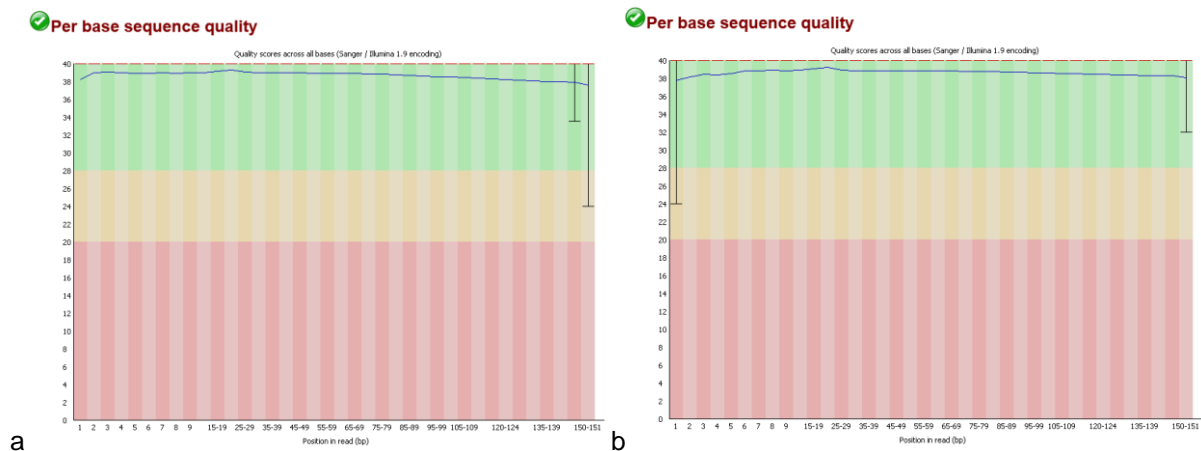
<sup>14</sup> Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 2012 Mar 4;9(4):357-9. doi: 10.1038/nmeth.1923.



wzbogacenia możliwości ich wykorzystania selekcji. Szczegółowa analiza porównawcza sekwencji (Rys 3.6.) może stanowić punkt wyjścia do zdefiniowania liczby mutacji punktowych wymaganych do wyznaczenia SNP. Miejsca występowania pojedynczych mutacji można uznać za przypadkowe efekty błędu w sekwencjonowaniu, natomiast obecność 3 mutacji punktowych może nie mieć charakteru losowego. Analizy te wymagają kontynuacji i opracowania naukowego.

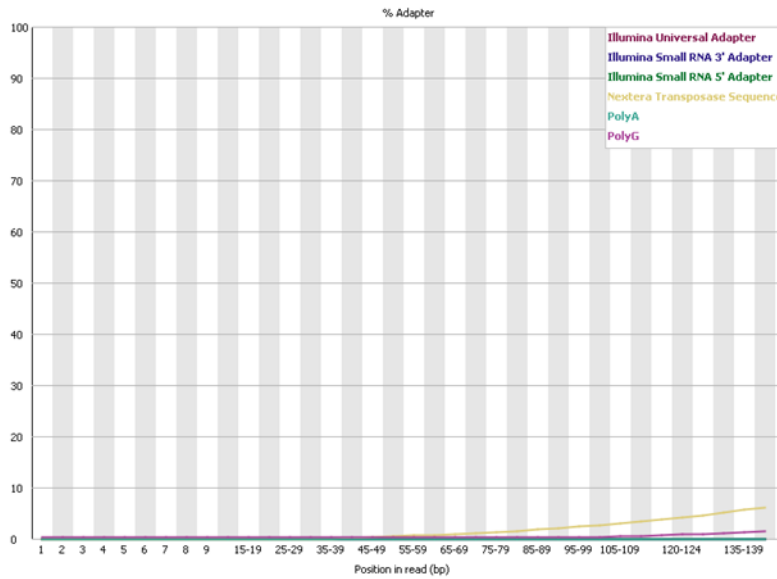


Rys. 3.1. Wartości jakości sekwencjonowania Phred dla uzyskanych sekwencji.

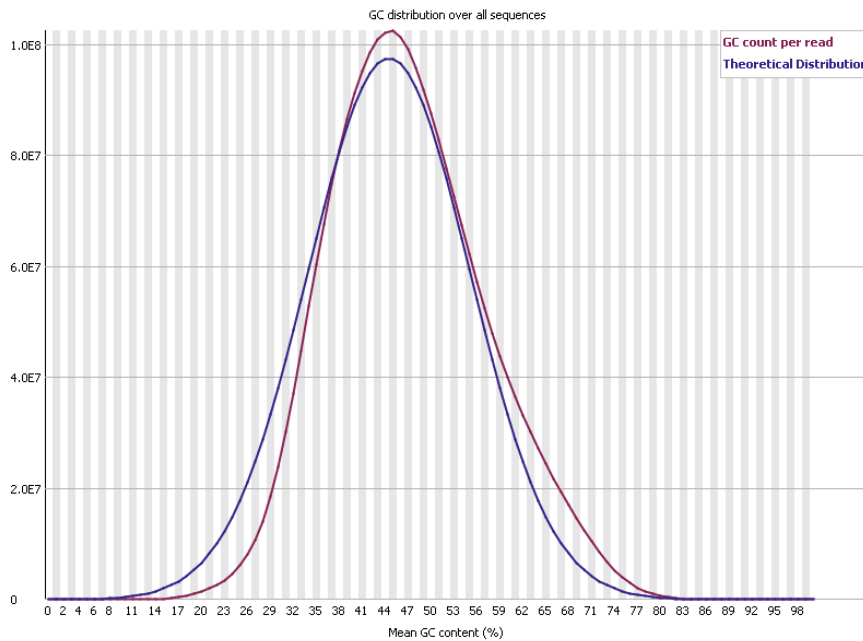


Rys. 3.2. Wartości Phred jakości sekwencjonowania w zależności od długości sekwencji przed (a) i po usunięciu adaptorów (b).

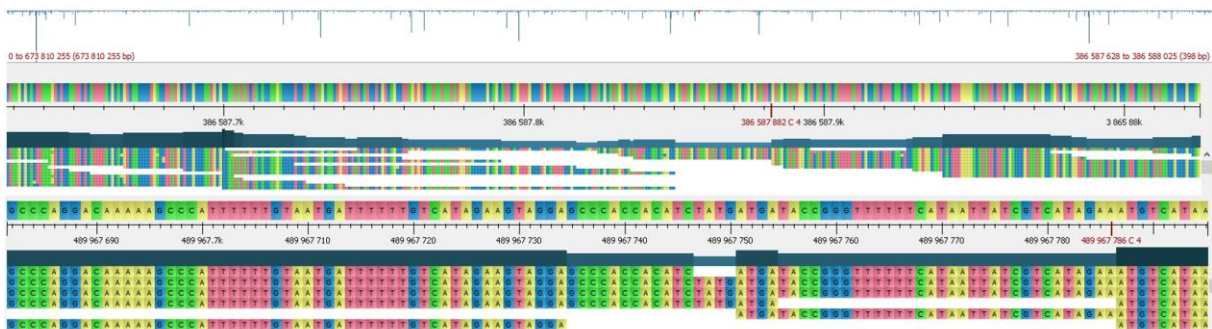
### Adapter Content



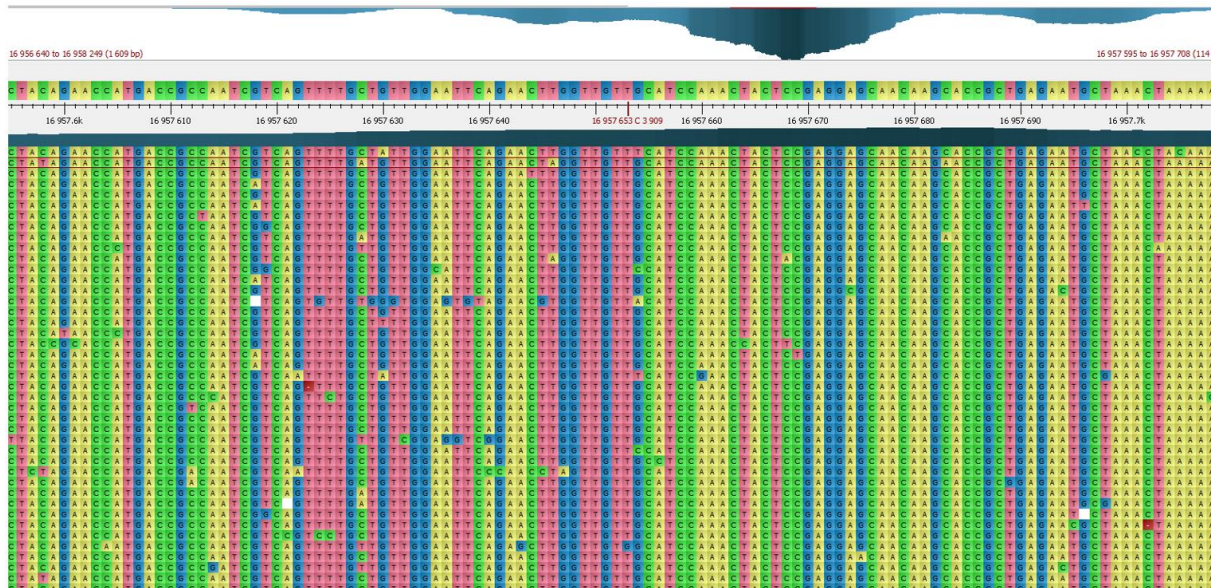
Rys. 3.3. Zawartość adaptorów w danych surowych.



Rys. 3.4. Zawartość GC dla uzyskanych sekwencji.



Rys. 3.5. Obraz mapowania uzyskanych sekwencji do chromosomu 4B pszenicy. Wybrane rejony są pokryte przez około 6 sekwencji (dla 10% przeanalizowanych danych).



Rys. 3.6. Przykład mapowania odczytów w rejonie o wysokim pokryciu na chromosomie 4B obrazujący występowanie pojedynczych różnic w odniesieniu do sekwencji referencyjnej oraz różnic wielokrotnych, które mogą świadczyć o obecności mutacji punktowych w odmianie Euforia.

### Optymalizacja konstrukcji biblioteki

W ramach przygotowania do realizacji zadania sprowadzono z kolekcji odmiany referencyjne o znanej sekwencji genomu i wykonano z nich izolację DNA. Wykorzystano sekwencje do syntezy gRNA zaprojektowane w 2022 roku dla sekwencjonowania genów *Ppd-B1*, *Ppd-D1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D2*, *Vrn-A1*, *Vrn-D1* i *Vrn-B3*. Przeprowadzono syntezę i oczyszczanie kierującego RNA. Biblioteki przygotowano zgodnie z metodyką opracowaną w 2021 roku.

Tabela 3.3. Sekwencje starterów wykorzystanych do syntezy gRNA.

Starter	Sekwencja
1_PPD-B1_F20	TTCTAATACGACTCACTATAGGTTTGACCGAACTCTCGTTGTTTTAGAGCTAGA
1_PPD-B1_R16	TTCTAATACGACTCACTATAGAAACTTCTGAGTGGCAATTGTTTTAGAGCTAGA
2_PPD-D1_F2	TTCTAATACGACTCACTATAGGAATCTACACAGTGGATGGGTTTTAGAGCTAGA
2_PPD-D1_R30	TTCTAATACGACTCACTATAGACATTTGGCTACGTCCTTGTGTTTTAGAGCTAGA
3_Vrn-B1_F111	TTCTAATACGACTCACTATAGCGTCCATCCGTCCTCTCACGTTTTAGAGCTAGA
3_Vrn-B1_R1	TTCTAATACGACTCACTATAGACTCAATACCTGAATCGGTGTTTTAGAGCTAGA
4_Vrn-D2_F16	TTCTAATACGACTCACTATAGCATTATTGGCGTTGCGTGGGTTTTAGAGCTAGA
4_Vrn-D2_R74	TTCTAATACGACTCACTATAGACATCGTTGGATTGAAATGGTTTTAGAGCTAGA
5_vrn-A1_F41	TTCTAATACGACTCACTATAGCTCAAACGTCATAGTTCATGTTTTAGAGCTAGA
5_vrn-A1_R44	TTCTAATACGACTCACTATAGCTTGACAACAGTGTATTGAGTTTTAGAGCTAGA
6_vrn-D1_F8	TTCTAATACGACTCACTATAGAGTTGTCATTACACGAGTGGTTTTAGAGCTAGA
6_vrn-D1_R38	TTCTAATACGACTCACTATAGCTTGAGAACAGTGTATTGAGTTTTAGAGCTAGA
7_vrn-B3_F20	TTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTCAACGCAGAATGGAGTTTTAGAGCTAGA
7_vrn-B3_R487	TTCTAATACGACTCACTATAGTTGATCGAGCATACATATGTTTTAGAGCTAGA

### Dyskusja

Obecnie obok genomu referencyjnego pszenicy jarej Chinese Spring dostępnych jest 49 genomów różnych odmian pszenicy (w porównaniu do 20 w 2023 roku). Uzyskanie jak najbardziej kompletnego genomu referencyjnego nowoczesnej odmiany pszenicy ozimej jest ważnym elementem identyfikacji zmienności epigenetycznej oraz optymalizacji systemu adnotacji i selekcji markerów. Uzyskane dane o

zmienności metylacyjnej u odmiany Euforia pozwolą na identyfikację rejonów regulowanych metylacyjnie w nowoczesnych odmianach w odniesieniu do innych odmian jarych i ozimych. W wyniku analiz przeprowadzonych w 2023 roku uzyskano 2x390.4 Gb danych sekwencyjnych, czyli przyjmując wielkość genomu pszenicy 14.23 Gb uzyskano prawie 55-krotne pokrycie sekwencji genomu odmiany Euforia, co powinno umożliwić po połączeniu z danymi z PacBio z 2021 roku na złożenie genomu pszenicy do poziomu kontigów lub skafoldów.

Wydajność wzbogacania pozostawia jeszcze wiele do życzenia wymaga analizy parametrów sekwencji kierujących nukleazę na wybrane rejony. W celu zwiększenia możliwości sekwencjonowania wybranych genów ze wzbogacaniem sekwencji docelowych w technologii Cas9, poszerzono zakres sekwencji skierowanych w dół i górę od genu do 5 tys nukleotydów. Wyniki uzyskane w 2021 roku pokazują możliwości wykorzystania bibliotek wzbogaczanych i sekwencjonowania najnowszej generacji do analizy wybranych genów wraz z rejonami regulatorowymi z uwzględnieniem zmienności epigenetycznej. Prezentowane doniesienie dotyczące sekwencjonowania bibliotek wzbogaczanych nukleazą Cas9 u pszenicy jest pionierskie. W wyniku przeprowadzonych badań nie udało się poprawić jakości uzyskiwanych sekwencji.

## Wnioski

Uzyskanie dokładnych informacji o genomie referencyjnym jest podstawą opracowania wydajnego systemu selekcji genomowej.

Dane z sekwencjonowania bibliotek wzbogaczanych o sekwencje docelowe przy wykorzystaniu nukleazy Cas9 w nanoporach nie pozwoliły na ustalenie zmian metylacyjnych.

Mierniki dla tematu badawczego 3 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik <sup>15</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
3.1	Liczba genotypów sekwencjonowanych pod kątem identyfikacji zmienności metylacyjnej	1	1
3.2	Liczba genotypów dla których przygotowano biblioteki wzbogacone o wybrane rejony genomu i zsekwencjonowano w technologii ONT	6	6

<sup>15</sup> Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

### 3.4 Temat badawczy 4 Konwersja wybranych markerów

#### *Cel tematu badawczego 4*

Celem tematu badawczego nr 4 było wydobycie informacji z danych genotypowych (z sekwencjonowania NGS) oraz fenotypowych w postaci identyfikacji markerów o istotnych efektach związanych z wysokością plonowania w celu ich zastosowania do charakterystyki genetycznej 94 genotypów pszenicy.

#### *Materiały i metody*

W ramach realizacji tego zadania wykorzystano DNA z wybranych 94 genotypów pszenicy zwyczajnej przygotowane w ramach zadania nr 1 (Tabela S4.1). Do konwersji wybrano 20 markerów pochodzących z 12 rejonów zidentyfikowanych na podstawie analiz asocjacyjnych. Sekwencje wybranych markerów (Tabela 4.1) wykorzystano do zaprojektowania starterów do metod STS-PCR i HRM (Tabela 4.2). Markery STS zaprojektowano dla delecji znajdujących się w pobliżu markerów DArTseq o najwyższych efektach ze zmiennością plonu oraz znajdujących się w pobliżu genów kandydujących. Dodatkowo zaprojektowano również markery do badania zmienności pojedynczych nukleotydów techniką HRM.

W skład reakcji o objętości 20 $\mu$ L wchodziły 10X stężony bufor do PCR, 2 lub 3 startery 200 nM, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP 200 $\mu$ M, spermidyna 0.4  $\mu$ M, Taq 0.75 U i 40 ng gDNA. Amplifikacje prowadzono przy temperaturze przyłączania startera 60°C. Optymalizacja polegała na testowaniu innej polimerazy (Phire) z towarzyszącym buforem. Oznaczenia HRM z wykorzystaniem HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta dla oznaczeń nr 16 i 20.

Tabela 4.1. Sekwencje do wykrywania zmienności typu insercja-delecja w 20 loci.

Chrom	Region CS.V1	PAV	Start PAV	Wielkość PAV bp	Polimorfizm
chr2A	QGY1: 31701481..34644288	TraesCS2A02G074900	chr2A:33175034	1,954	17+4
chr2B	QS1: 635781189..636771112	TraesCS2B02G443200	chr2B:636459540	288	16+5
chr3A	QGY5:113701552..113701484	TraesCS3A02G136000	chr3A:113709059	222	20+1
chr3B	QS2: 786107976..786793186	TraesCS3B02G551700	chr3B:786600877	897	20+1
chr3D	QGY2: 18933765..19162675	TraesCS3D02G048600	chr3D:18731221	607	20+1
chr5A	QGY3:463766590..463766658	TraesCS5A02G250000	chr5A:464634640	288	20+1
chr5A	QGY4:473308564..476407996	TraesCS5A02G259000	chr5A:473426209	769	17+4
		TraesCS5A02G261100	chr5A:474949193	2,122	20+1
chr5A	QS3:689505744..689512342	TraesCS5A02G531000	chr5A:689484038	216	20+1
chr5B	QGY6:430290797..433526933	TraesCS5B02G248800	chr5B:431060311	156	19+2
		TraesCS5B02G250700	chr5B:432877724	424	19+2
chr6A	QGY7:584522666..585062630	TraesCS6A02G352100	chr6A:584758054	1,399	17+4
chr6A	QGY8:595578925..595578859	TraesCS6A02G370900	chr6A:595510452	222	17+4
chr7D	QGY9:3842517..5310945	TraesCS7D02G010400	chr7D:4984740	2,648	18+3

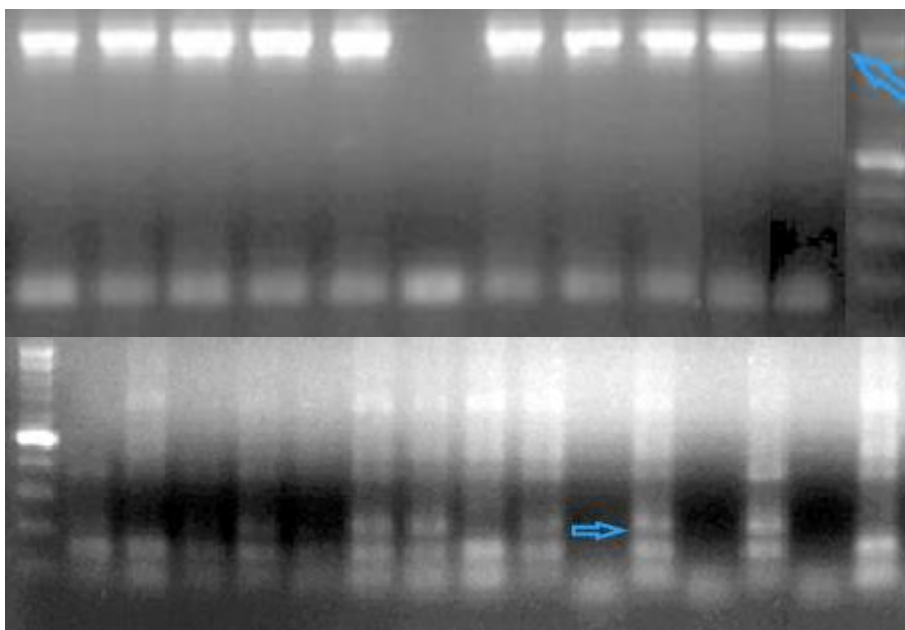
Tabela 4.2. Sekwencje starterów dla 20 markerów i oczekiwane wielkości produktów.

PCR	Rejon	MTA	Starter_L	Starter_R	Produkt	
					deleccj a	insercj a
1	2A	QGY1	AAAAAGGACCGGAGGGAGTA	ATCGGCAGGATGAATTTGTT	113	2067
			AAAAAGGACCGGAGGGAGTA	GCTGCCTACCATCTTTGAGC	-	223
15	2A	QGY1	GTGTTCTGCACCAGCATCAT	GGAACCTCCCCTCCTATTCCA	396	1627
				CAAGAGGCGGAGGATCATT	-	221
2	2B	QS1	CAACGCATAAACCATAAAGCA	AAGGTCATCCTTGCATCGAA	92	380
3	3A	QGY5	GTCGGCCAGAGATGCTTTTA	TGCTGGCATCCTGAGAACTA	138	360
4	3B	QS2	CTCGGCTAGGAGCTCTTTCA	TTTTCTTCGGAACCACCTG	313	1210
			CTCGGCTAGGAGCTCTTTCA	CTTCGGCTTGTTCCTCGAC	-	274
5	3D	QGY2	GGCCTTGCTAAACTGTGTCG	TGAGCCTGTTCAACATCTGAAT	87	694
6	5A	QGY3	AGGACGACGTGCTGATGAC	AGAGGCCGTAGACCTCAGTG	96	384
16	5A	QGY3	TGGAGGGAAGATAACCCAATC	CTTCATTTTGAGCCGAAATTTTA	T	87
				CTTCATTTTGAGCCGAAATTTTC	G	
7	5A	QGY4	GCTGCAGCTTATGCATTTGA	TGTCGACAGCAGATGGAATC	191	959
			GCTGCAGCTTATGCATTTGA	CCCCTGTTTGGCATTACTGT	-	164
8	5A	QGY4	CGATGCCGGACCTTAGTTTA	GCATCTCAAACCTTGCACCT	331	2453
			CGATGCCGGACCTTAGTTTA	AAGGGCTTCGTCATCAGAGA	-	244
17	5A	QGY4	TCTCTCTCCCTACAACACG	CTGGGTCAGCAGAGGAGAAC	148	370
18	5A	QGY4	CCCAGGAAAGATCTACCGAAC	CACGTGCGTAGTTCAGCTTC	96	471
9	5A	QS3	ATCACGGGTGCATCCTATTC	CAGACACTTTGTCGGTGTGG	148	364
10	5B	QGY6	TCTCCGTTGCCGTGATATAG	GAGGGTTTCGTGGACTTTGT	124	280
11	5B	QGY6	TTTTTCCTTCCTTGAATCCTTT	CCGAGCCATAGTAATTGCAC	174	598
19	5B	QGY6	CCATGAGAGAAGCACAGAGG	TGGTAGCCCTCCCATTAATC	55	232
12	6A	QGY7	GCTATCACCCCTCCGTCTGTC	GGGCCCATCATTACCTTAT	223	1622
			GCTATCACCCCTCCGTCTGTC	AGACGGGAGACCTGTCTTGA	-	153
13	6A	QGY8	ATGAAACTCCACGCCTAAGC	GCGAACGAAGCTGAAGTCAA	154	375
20	6A	QGY8	ATGGCGTCCGTGAAGCTC	ATGGCCTGCGTCTTGACAG	C	119
				ATGGCCTGCGTCTTGACAT	T	
14	7D	QGY9	GAAGCAAAGCATCTCCCCAA	GGAGGGAGTACATAACAAGCG	264	2912
			GAAGCAAAGCATCTCCCCAA	ATCAGACTGCCCTCTCCAAC	-	193

### Wyniki

W ramach badań zbadano segregacje 20 markerów z 12 rejonów zidentyfikowanych w wyniku przeprowadzonych analiz asocjacyjnych (Tabela 1.1). Badania przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie oznaczenia testowano na 12 liniach segregujących pod względem odpowiednich markerów DArTseq. W drugim etapie polimorficzne oznaczenia testowano na 94 genotypach. Przeprowadzono dwuetapową optymalizację warunków reakcji. W przypadku oznaczeń wymagających optymalizacji reakcję wykonywano z wysoce procesywną polimerazą Phire typu hot-start. Spośród 20 testowanych oznaczeń, 11 nie było polimorficznych a 6 wymagało dalszej optymalizacji warunków reakcji (Tabela S4.2). Spośród 9 markerów wykrywających zmienność do dalszych testów wybrano oznaczenia PCR1 i PCR7 dla QGY1 i QGY4 (Fot 4.1) ze względu na zgodność segregacji z odpowiednimi markerami DArTseq w pierwszym etapie testów.





Fot 4.1. Przykłady konwertowanych markerów QGY4\_5A1 (191/959+164 pz) i QGY1\_2A (113/223 pz)

Analizy PCR1 i PCR7 przeprowadzone na zestawie 94 linii pszenicy zwyczajnej potwierdziły wysoką zgodność segregacji markera PCR1 z 984529 (współczynniki korelacji -0.714). W przypadku drugiego oznaczenia nie udało się potwierdzić zgodności segregacji (współczynniki korelacji -0.09). Reasumując, spośród 20 badanych markerów tylko 1 może być przydatny do śledzenia zmienności w rejonach genomu o istotnym związku z plonowaniem pszenicy ozimej w sezonie 2022/2023.

### **Dyskusja**

Na podstawie przeglądu dostępnych macierzy SNP i technologii GBS uważa się, że przyszłe platformy do praktycznej hodowli powinny wykorzystywać zautomatyzowane technologie genotypowania ukierunkowane na wykrywanie funkcjonalnych polimorfizmów o znaczeniu dla cech ekonomicznych. Stosowane platformy powinny być uzasadnione kosztowo i pozwalać na skuteczne przewidywanie cech ilościowych.<sup>16</sup> Niedawno u pszenicy badano zmiany wzorów metylacji genomowego DNA, jednak związek tych zmian z różnicami fenotypowymi i równoległym odkryciem epialleli pozostaje celem długoterminowym<sup>17</sup>. Uwzględniając stosunkowo niską skuteczność bezpośredniej konwersji markerów DArTseq na markery KASP lub HRM, w 2022 roku zaproponowano głównie markery STS-PCR nie pochodzące bezpośrednio z sekwencji DArTseq ale blisko sprzężone z nimi. Markery te powinny być łatwe w wykorzystaniu jeśli zostanie potwierdzony ich związek ze zmiennością plonowania.

### **Wnioski**

W wyniku przeprowadzonej analizy opracowano 1 marker o segregacji zgodnej z konwertowanym markerem DArTseq nr 36216026 z rejonu QGY1.2A.

<sup>16</sup> Rasheed A, Hao Y, Xia X, et al (2017) Crop Breeding Chips and Genotyping Platforms: Progress, Challenges, and Perspectives. *Mol Plant* 10:1047–1064. doi: 10.1016/j.molp.2017.06.008

<sup>17</sup> Gardiner LJ, Quinton-Tulloch M, Olohan L, et al (2015) A genome-wide survey of DNA methylation in hexaploid wheat. *Genome Biol* 16:1–15. doi: 10.1186/s13059-015-0838-3

Mierniki dla tematu badawczego 4:

Lp.	miernik <sup>18</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
4.1	Liczba konwertowanych markerów	20	20
4.2	Liczba badanych genotypów (Ng)	94	94

4. Planowana prezentacja wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja <sup>19</sup>	Liczba prezentacji podana w opisie zadania	Liczba prezentacji zrealizowana
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	publikacja <sup>20</sup>	Liczba publikacji podana w opisie zadania	Liczba publikacji zrealizowana
	Publikacja wyników analizy asocjacyjnej lub selekcji genomowej	publikacja oryginalna	1	0

Prace nad publikacją są zaawansowane. Ze względu na konieczność uzupełnienia wyników genotypowania dla części odmian pszenicy (ze uwagi na dużą liczbę danych brakujących) ostateczne opracowanie wyników przeciągnęło się. Dane uzyskane w bieżącym roku nie są atrakcyjne publikacyjnie i uzupełniające genotypowanie może przyczynić się do poprawy jakości wyników.

Załączniki<sup>21</sup>:

1. Materiały uzupełniające:  
Tabele uzupełniające S1.1-6, S2.1, S4.1-2, S5.1-4

5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:

<https://mtyrka.v.prz.edu.pl/materialy-do-pobrania/materialy-ogolnodostepne>

<sup>18</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

<sup>19</sup> Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

<sup>20</sup> Podać, czy chodzi o publikację oryginalną, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.

<sup>21</sup> Podać listę oraz dołączyć do sprawozdania kopie posterów/wyciągi z materiałów konferencyjnych/publikacje etc.

W nawiasie podać, na której stronie sprawozdania znajdują się prezentowane wyniki.



## 6. Miernik zadania - stopień realizacji

Lp.	miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
<b>Przewidywanie wartości genetycznej</b>				
1.1	Liczba genotypów (Ng) z których wyizolowano DNA	500	500	100%
1.2	Liczba próbek analizowanych metodą DArTseq	500	500	100%
<b>Ocena fenotypowa 171 rodów pszenicy zwyczajnej w doświadczeniu polowym</b>				
2.1	Liczba genotypów pszenicy z oceną plonu w przynajmniej 5 lokalizacjach	171	171	100%
2.2	Liczba ocenianych cech pszenicy	4	4	100%
<b>Optymalizacja konstrukcji bibliotek</b>				
3.1	Liczba genotypów sekwencjonowanych pod kątem identyfikacji zmienności metylacyjnej	1	1	100%
3.2	Liczba genotypów dla których przygotowano biblioteki wzbogacone o wybrane rejony genomu i zsekwencjonowano w technologii ONT	6	6	100%
<b>Konwersja wybranych markerów</b>				
4.1	Liczba konwertowanych markerów	20	Liczba konwertowanych markerów	100%
4.2	Liczba badanych genotypów (Ng)	94	Liczba badanych genotypów (Ng)	100%
			<b>Średnia</b>	100%
			<b>% realizacji zadania</b>	100

Sporządzono:

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

Politechnika Rzeszowska  
im. Ignacego  
Łukasiewicza  
35-959 Rzeszów,  
Al. Powstańców  
Warszawy 12

data

podpis i pieczęć

podpis