



Temat nr 1:

Selekcja genomowa pszenicy ozimej

Okres realizacji zadania: 01.01.2022-31.12.2022

Zespół wykonawców:

Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza

prof. dr hab. Mirosław Tyrka

(mtyrka@prz.edu.pl) – kierownik projektu

dr inż. Magdalena Szeliga

mgr inż. Kinga Rączka

mgr inż. Justyna Buczkowicz

mgr inż. Dorota Tyrka

Instytut Genetyki Roślin PAN

prof. dr hab. Paweł Krajewski

**We współpracy ze spółkami
hodowli roślin:**

- Małopolska Hodowla Roślin
- Hodowla Roślin Strzelce
- Poznańska Hodowla Roślin
- DANKO Hodowla Roślin
- Hodowla Roślin Smolice

Cele projektu w 2022 roku

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	Przewidywanie wartości genetycznej. Izolacja DNA i charakterystyka 500 linii markerami DArT	TAK
2	Ocena fenotypowa 171 rodów pszenicy zwyczajnej w 1-rocznym doświadczeniu polowym	TAK
3	Optymalizacja konstrukcji bibliotek do NGS i charakterystyka epigenetyczna wybranego genotypu metodą sekwencjonowania wrażliwego na metylację	TAK
4	Konwersja wybranych 20 markerów na system bazujący na PCR (HRM, KASP lub STS)	TAK

Materiały i metodyka

1. Przewidywanie wartości genetycznej
 - izolacja DNA i genotypowanie 500 rodów pszenicy markerami DArTseq,
 - adnotacja markerów, analizy asocjacyjne i wybór zestawu do selekcji genomowej
2. Plon 171 linii porównano w układzie bloków losowych z wzorcami w lokalizacjach: Strzelce, Modzurów, Nagradowice, Smolice i Kobierzyce, w trzech powtórzeniach w warunkach agrotechnicznych A2. Określono również 8 dodatkowych cech głównie fenologicznych i związanych z tolerancją na choroby grzybowe
3. Optymalizacja konstrukcji bibliotek
 - sekwencjonowanie odmiany Euforia w technologii METHYL-SEQ usługowo
 - projektowanie gRNA, synteza i oczyszczanie gRNA, przygotowanie biblioteki ukierunkowanej z wykorzystaniem nukleazy Cas9 i longPCR, sekwencjonowanie w technologii Oxford Nanopore
4. Konwersja 20 markerów najsilniej zasocjowanych z plonem na system wykrywania mutacji punktowych metodą STS (sequence tagged sites)

Wyniki (zadanie 1)

Przewidywanie wartości genetycznej

- ✓ 500 genotypów pszenicy scharakteryzowano przy pomocy markerów DArTseq
- ✓ Markery (również dla populacji treningowej) zadnotowano do najnowszej sekwencji referencyjnej pszenicy Chinese Spring (V2.1)
- ✓ Dla populacji kalibracyjnej i materiałów badanych w 2022 roku, do analiz asocjacyjnych wprowadzono 19483 markery DArTseq
- ✓ Wykonano optymalizację populacji treningowej do selekcji genomowej

- ✓ Na podstawie analiz asocjacyjnych zidentyfikowano 15 rejonów determinujących zmienność pod względem plonu ziarniaków i stabilności

Wyniki (zadanie 1)

Przewidywanie wartości genetycznej

Rejony genomu o największym znaczeniu dla poprawy plonowania pszenicy zwyczajnej zidentyfikowane na podstawie analiz asocjacyjnych

MTA	Markery flankujące		Chromo- som	pozycja (Mbp)		R ²		
				IWGSC_v1.0		GY_BLUP	GY_%STD	STA
QGY1	1235724	4410248	1B	632.7	632.7	10.9(3)	11.1(1)	-
QGY2	2275308	3938883	2B	634.4	636.1	8(6)	8.2(1)	-
QGY3	3020780	3030699	2B	670.9	687.5	8.7(28)	-	-
QGY4	1100592	1097050	2B	694.3	725.1	10.6(51)	9.7(5)	-
QGY5	3532864	1090370	2B	790.9	801.9	10.9(13)	11(4)	-
QGY6	1118056	1002393	2D	561.0	572.3	9.2(6)	8.1(1)	-
QGY7	1129191	1105580	2D	633.5	635.9	9(5)	8.8(2)	-
QGY8	1207429	1076743	3A	639.7	641.9	20.3(48)	19.2(13)	-
QGY9	1087696	1266639	3D	5.7	9.9	10.3(12)	10.4(8)	-
QGY10	999327	34092080	5A	685.0	687.4	-	-	13.4(4)
QGY11	1089247	1091392	5B	7.7	16.2	10.7(6)	9.8(1)	-
QGY12	3951541	3533315	6A	605.2	609.7	7.9(6)	9.3(5)	-
QGY13	7913548	2280230	6B	4.9	9.1	9.1(6)	9.7(3)	-
QGY14	1272443	3020355	7B	641.9	644.4	11.1(7)	11.6(4)	-
QGY15	1254272	3022330	7B	740.6	743.2	12.4(8)	13.1(1)	-

- ✓ Przeciętne efekty związane z wybranymi markerami dla % plonu względem standardu wyniosły od 8 do 20% a dla stabilności plonowania 13.4%

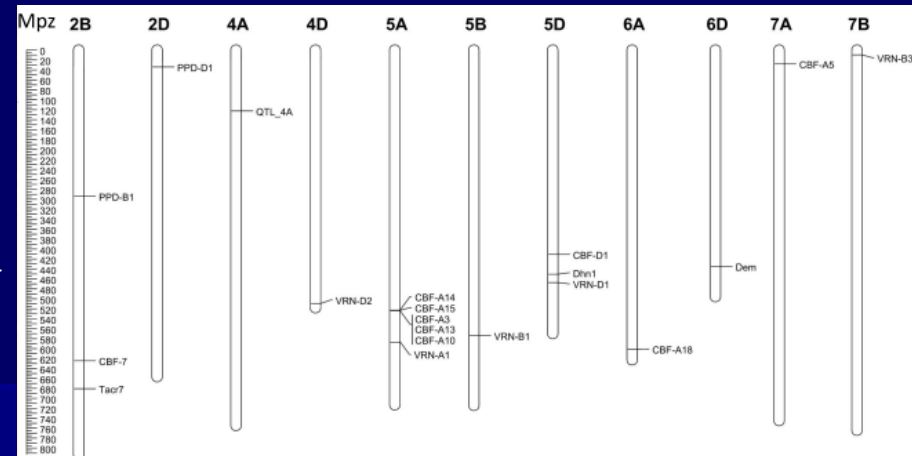
Wyniki (zadanie 2)

Ocena fenotypowa 171 rodów pszenicy zwyczajnej w doświadczeniu polowym

- ✓ W wyniku analiz wariancji dla plonu, we wszystkich seriach stwierdzono istotne efekty związane z genotypem badanych linii, środowiskiem i interakcją genotypowo-środowiskową
- ✓ Określono stabilność plonowania i wysokość plonowania względem wzorców
- ✓ Uzyskano dane o wysokości, wczesności, MTZ oraz wyleganiu. Oceniono nasilenie objawów mączniaka, rdzy brunatnej i żdźbłowej oraz septoriozy liści. Stwierdzono statystycznie istotne zróżnicowanie prawie wszystkich dodatkowych cech w seriach.
- ✓ Zgromadzone dane fenotypowe są wykorzystywane do oceny przydatności wybranego zestawu markerów do selekcji genomowej i identyfikacji dodatkowych markerów zasocjowanych z plonem.

Wyniki (zadanie 3)

Optymalizacja konstrukcji bibliotek



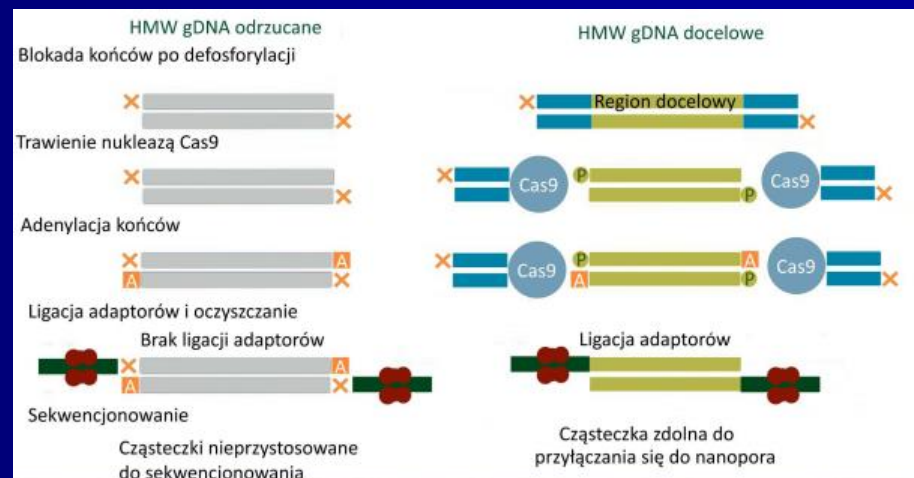
Geny wybrane do tworzenia biblioteki ukierunkowanej

- ✓ Na podstawie analiz asocjacyjnych zweryfikowano wybór genów ważnych dla rozwoju i plonowania pszenicy
- ✓ Porównano zmienność rejonów +/- 5000 pz z otoczenia tych genów
- ✓ Do rejonów konserwatywnych zaprojektowano sondy gRNA kierujące Cas9 i z zoptymalizowano ich syntezę

- ✓ Do zakończenia zadania pozostało dokończenie przygotowania biblioteki i sekwencjonowanie w technologii Oxford Nanopore



Aparat do sekwencjonowania w nanoporach

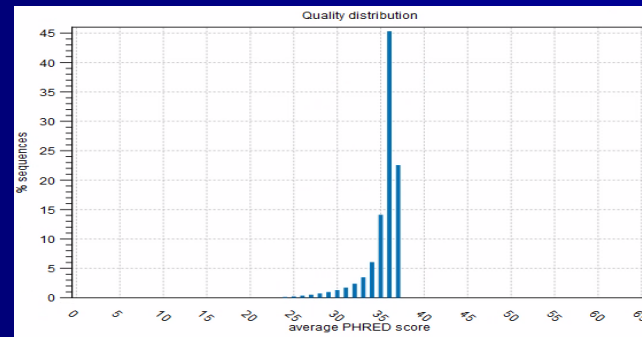
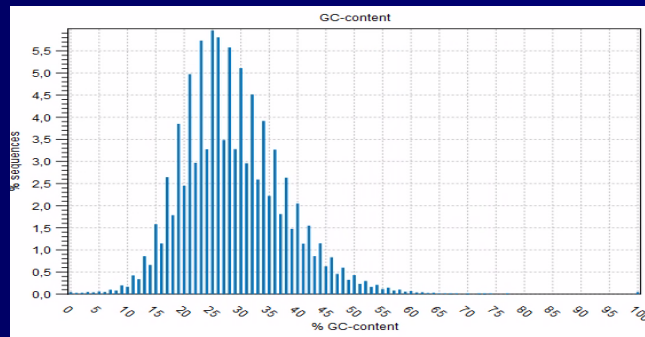


Zasada selekcji cząstek z nukleazą Cas9

Wyniki (zadanie 3)

Optymalizacja konstrukcji bibliotek

- ✓ Przeprowadzono sekwencjonowanie odmiany Euforia w technologii METHYL-SEQ uzyskując 40X pokrycie genomu pszenicy zwyczajnej

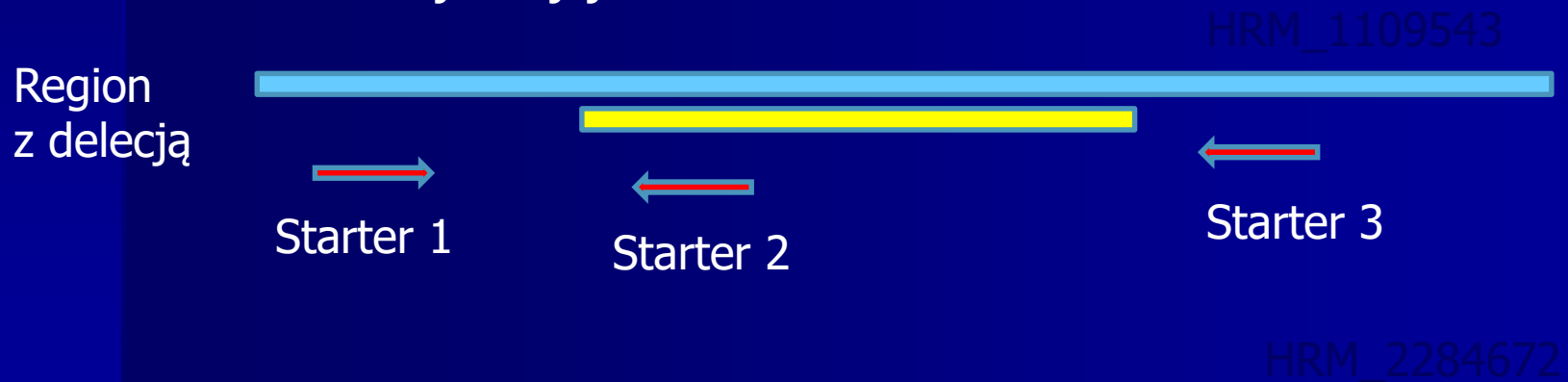


- ✓ Dotychczas w optymalizacji systemów selekcyjnych pszenicy jako referencja wykorzystywana była sekwencja prymitywnej jarej odmiany Chinese Spring, co sprawia, że wiele markerów ważnych dla hodowców odpada w trakcie selekcji markerów.
- ✓ Obecnie pojawiło się kilkanaście sekwencji nowych odmian pszenicy.
- ✓ Sekwencja referencyjna nowoczesnego genotypu pszenicy ozimej jest potrzebna do planowanych analiz epigenetycznych.

Wyniki (zadanie 4)

Konwersja markerów

- ✓ Na podstawie składowych głównych wybrano 96 linii reprezentujących zmienność badanej populacji
- ✓ Dla 15 rejonów wybranych na podstawie analizy asocjacyjnej zaprojektowano 20 markerów STS-PCR
- ✓ Markery zaprojektowano do delecji sąsiadujących z wybranymi markerami DArTseq tak, żeby uzyskiwać produkty wskazujące równocześnie na obecność delecji lub jej brak



Podsumowanie

- ✓ Uzyskane dane będą opublikowane w 2022 roku.
- ✓ Przygotowany artykuł pt. Genome-wide association mapping in elite winter wheat breeding for yield improvement. Journal of Applied Genetics (wysłane)
- ✓ Aktualne, sprawozdanie i wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:
<https://mtyrka.v.prz.edu.pl/materialy-do-pobrania/materialy-ogolnodostepne>