



Temat nr 1:

Selekcja genomowa pszenicy

Okres realizacji zadania: 01.01.2021-31.12.2023

Zespół wykonawców:

Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza

prof. dr hab. Mirosław Tyrka

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

dr inż. Magdalena Szeliga

dr inż. Renata Muca

mgr inż. Marcin Jaromir

mgr inż. Justyna Buczkowicz

mgr inż. Dorota Tyrka

mgr inż. Kinga Rączka

mgr inż. Małgorzata Semik

We współpracy ze spółkami hodowli roślin:

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

Instytut Genetyki Roślin PAN

prof. dr hab. Paweł Krajewski

dr Monika Mokrzycka

mgr Maria Nuc

Cele projektu w 2023 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	W trakcie realizacji
4	Konwersja wybranych 20 markerów na system bazujący na PCR (HRM, KASP lub STS)	TAK

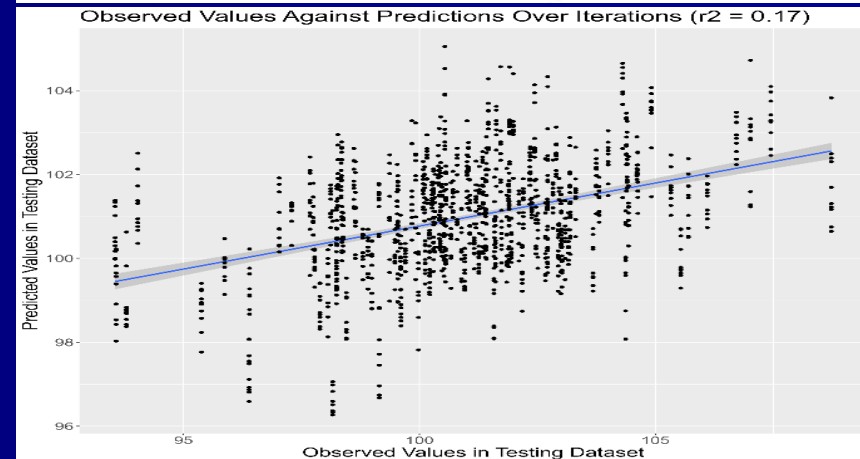
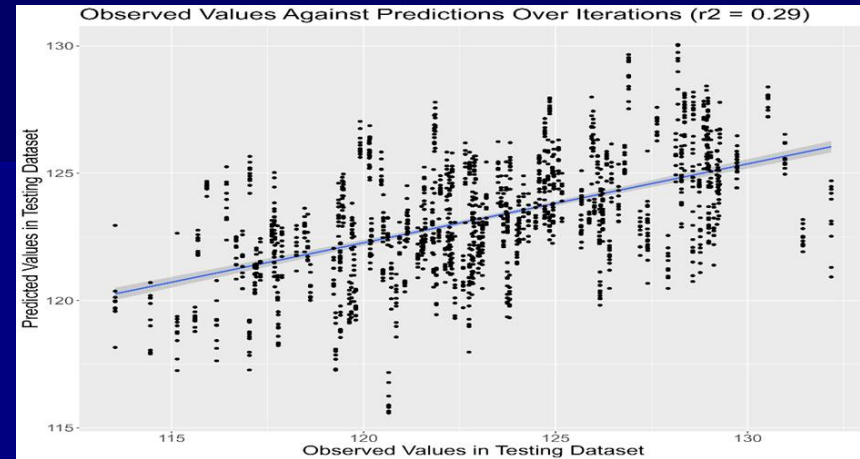
Materiały i metodyka

1. Przewidywanie wartości genetycznej
 - izolacja DNA i genotypowanie 500 rodów pszenicy markerami DArTseq,
 - adnotacja markerów, analizy asocjacyjne i charakterystyka markerów do selekcji genomowej
2. Plon 171 linii porównano w układzie bloków losowych z wzorcami w lokalizacjach: Kończewice, Modzurów, Krzemlin, Radzików i Kobierzyce, w trzech powtórzeniach w warunkach agrotechnicznych A2. Określono również 8 dodatkowych cech głównie fenologicznych i związanych z tolerancją na choroby grzybowe oraz wybrane cechy jakościowe
3. Optymalizacja konstrukcji bibliotek
 - 2022: sekwencjonowanie odmiany Euforia w technologii METHYL-SEQ
 - 2023: sekwencjonowanie odmiany Euforia w technologii Illumina
 - projektowanie gRNA, synteza i oczyszczanie gRNA, przygotowanie biblioteki ukierunkowanej z wykorzystaniem nukleazy Cas9 i sekwencjonowanie w technologii Oxford Nanopore
4. Konwersja 20 markerów najsilniej zasocjowanych z plonem na system wykrywania mutacji punktowych metodą STS (sequence tagged sites) ³

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 2023 roku, do analiz asocjacyjnych wprowadzono 14367 markerów DArTseq i 14660 silicoDArT 2022: 19483 markery DArTseq



Zależność średniego plonu przewidywanego od obserwowanego w populacji 171 genotypów liczona metodą rrBLUP dla całego zestawu markerów w 2022 i 2023 roku

Wyniki (zadanie 1)

Przewidywanie wartości genetycznej

✓ Na podstawie analiz asocjacyjnych zidentyfikowano 12 rejonów determinujących zmienność pod względem plonu ziarniaków i stabilności

MTA	SNP flankujące		Chro	IWGSC v2.1 (Mpz)		R2		Inne
	M1	M2		M1	M2	GY_BLUP	GY_STD	
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

✓ Przeciętne efekty związane z wybranymi markerami dla % plonu względem standardu wyniosły od 14.0 do 19.7% a dla średniego plonu od 11.2 do 16.9%

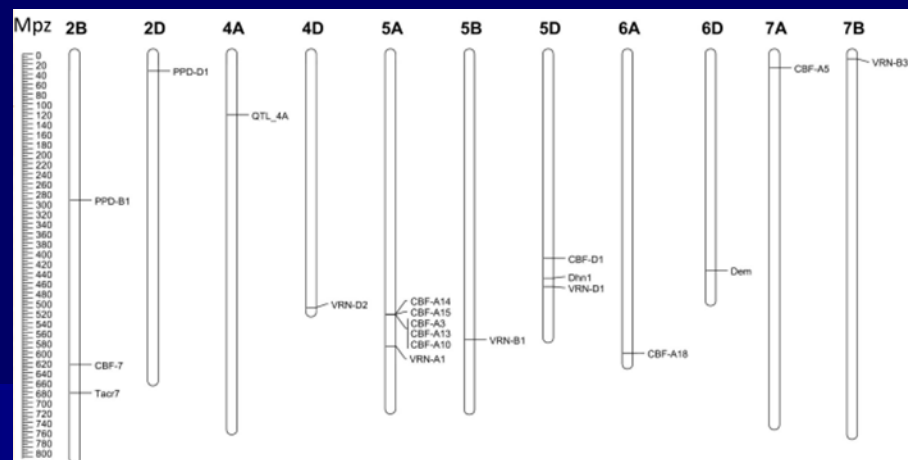
Wyniki (zadanie 2)

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 m.in. zawartość białka, popiołu, tłuszczu, skrobi. Stwierdzono statystycznie istotne różnicowanie 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

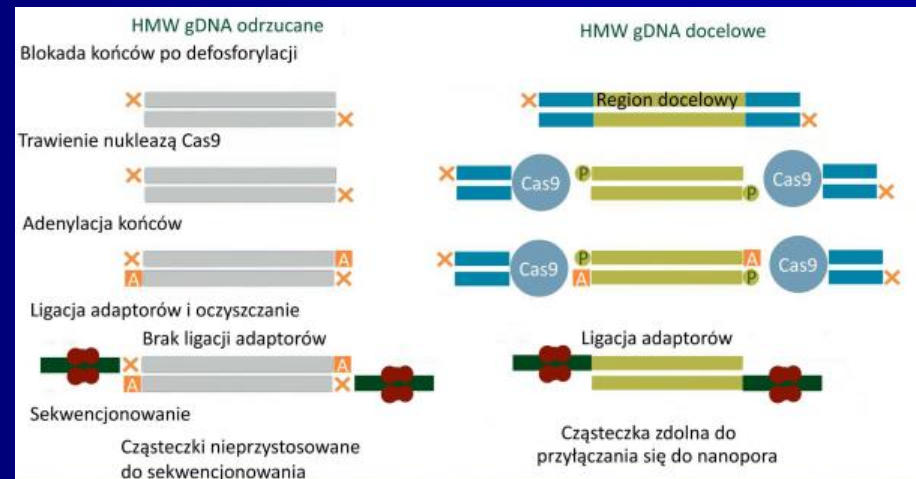


- ✓ Na podstawie analiz asocjacyjnych i metylacji odmiany Euforia zweryfikowano wybór genów ważnych dla rozwoju i plonowania pszenicy
- ✓ Porównano zmienność rejonów +/- 10000 pz z otoczenia tych genów
- ✓ Do rejonów konserwatywnych zaprojektowano sondy gRNA kierujące Cas9 i zoptymalizowano ich syntezę

- ✓ Przygotowane biblioteki sekwencjonowano w technologii Oxford Nanopore



Aparat do sekwencjonowania w nanoporach

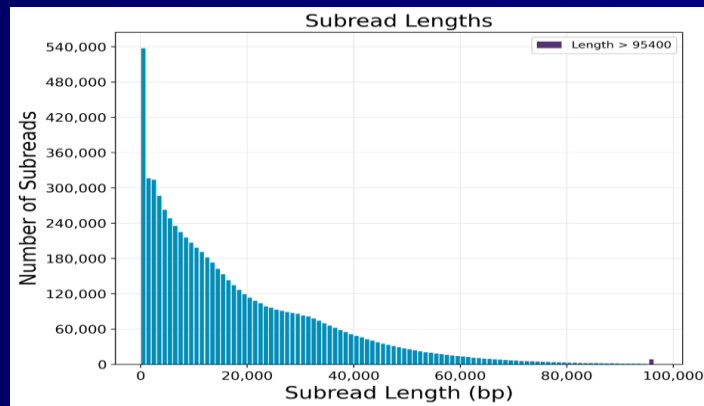


Zasada selekcji cząsteczek z nukleazą Cas9

Wyniki (zadanie 3)

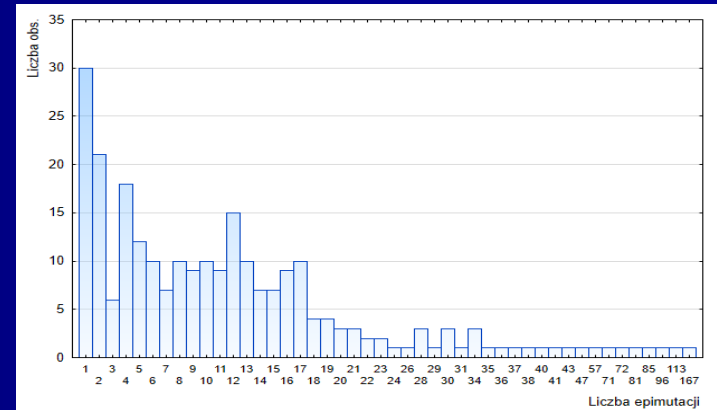
Optymalizacja konstrukcji bibliotek

- ✓ 2023: sekwencjonowanie odmiany Euforia w technologii Illumina uzyskując 40X pokrycie genomu pszenicy zwyczajnej w celu korekty długich odczytów PacBio uzyskanych w 2021 roku



2021: sekwencjonowanie PacBio SMRT uzyskując 375 Gb sekwencji co stanowi ponad 20X pokrycie genomu pszenicy zwyczajnej odczytami o średniej wielkości 17.5-19.4

- ✓ Ponad połowa cytozyn w genomie pszenicy nie jest metylowana
- ✓ Sekwencja referencyjna nowoczesnego genotypu pszenicy ozimej jest potrzebna do planowanych analiz epigenetycznych i lokalizacji markerów



Liczba rejonów genomu z różną ilością zmian metylacyjnych

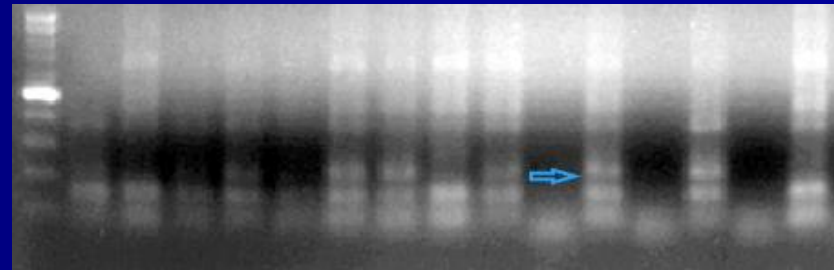
Wyniki (zadanie 4)

Konwersja markerów

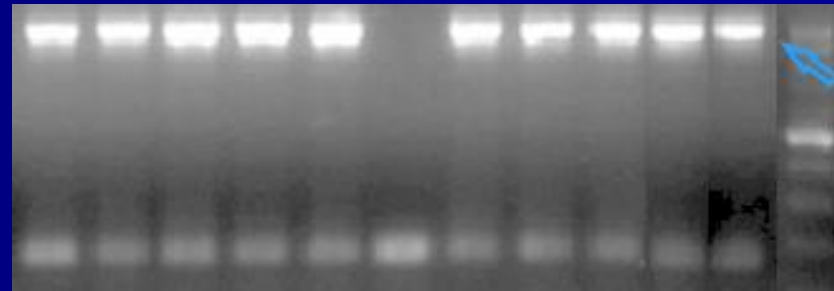
- ✓ Na podstawie składowych głównych wybrano 96 linii reprezentujących zmienność badanej populacji
- ✓ Dla 12 rejonów wybranych na podstawie analizy asocjacyjnej zaprojektowano 20 markerów STS-PCR
- ✓ Markery zaprojektowano do delecji sąsiadujących z wybranymi markerami DArTseq tak, żeby uzyskiwać produkty wskazujące równocześnie na obecność delecji lub jej brak



OGY1



OGY4



Podsumowanie

Tyrka M, Krajewski P, Bednarek PT, Rączka K, Drzazga T, Matysik P, Martofel R, Woźna-Pawlak U, Jasińska D, Niewińska M, Ługowska B, Ratajczak D, Sikora T, Witkowski E, Dorczyk A, Tyrka D. Genome-wide association mapping in elite winter wheat breeding for yield improvement. J Appl Genet. 2023 Sep;64(3):377-391. doi: 10.1007/s13353-023-00758-8. Epub 2023 Apr 29. Erratum in: J Appl Genet. 2023 May 13;: PMID: 37120451; PMCID: PMC10457411.

- ✓ Aktualne, sprawozdanie i wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:
<https://mtyrka.v.prz.edu.pl/materialy-do-pobrania/materialy-ogolnodostepne>