



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. Renata Muca

mgr inż. Marcin Jaromir

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 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	Optimalizacja 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)	W trakcie realizacji

Materiały i metodyka

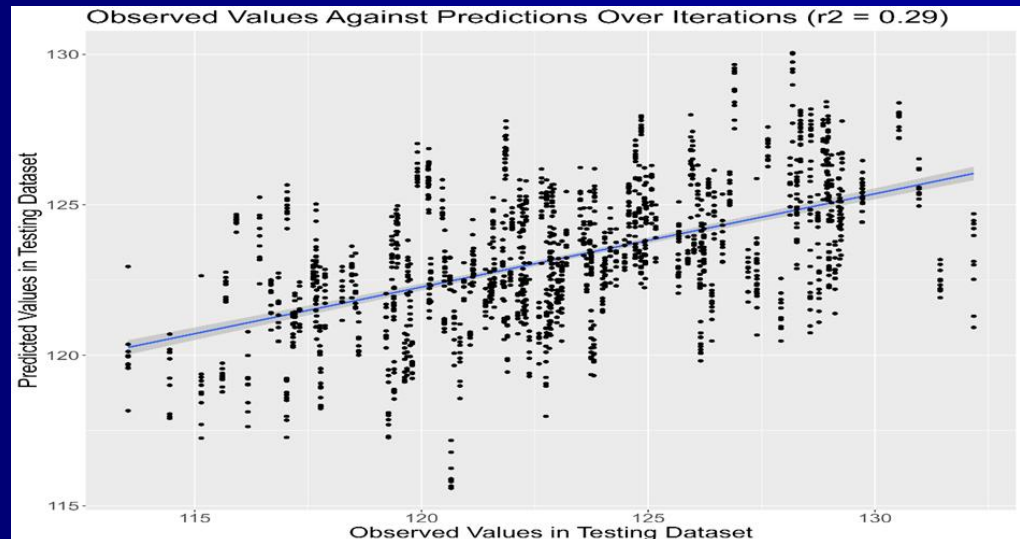
1. Przewidywanie wartości genetycznej
 - izolacja DNA i genotypowanie 500 rodów pszenicy markerami DArTseq,
 - adnotacja markerów, analizy asocjacyjne i charakterystyka markerów do selekcji genomowej
2. Plon 171 linii porównano w układzie bloków losowych z wzorcami w lokalizacjach: Kończewice, Modzurów, 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
 - sekwencjonowanie odmiany Euforia w technologii Illumina usługowo
 - 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)

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

Zależność średniego plonu przewidywanego od obserwowanego w populacji 171 genotypów liczona metodą rrBLUP dla całego zestawu markerów.



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

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)

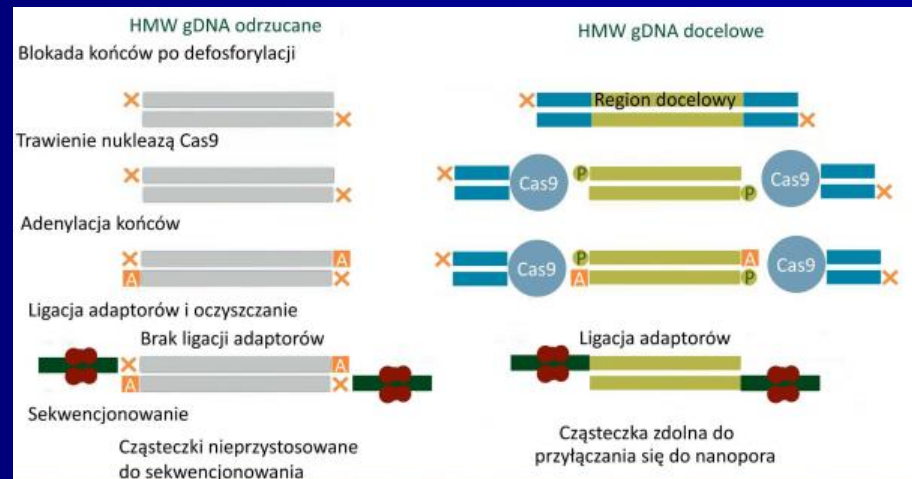
Optymalizacja konstrukcji bibliotek

- ✓ Na podstawie analiz asocjacyjnych i metylacji odmiany Euforia zweryfikowano wybór genów ważnych dla rozwoju i plonowania pszenicy
- ✓ Porównano zmienność rejonów +/- 5000 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

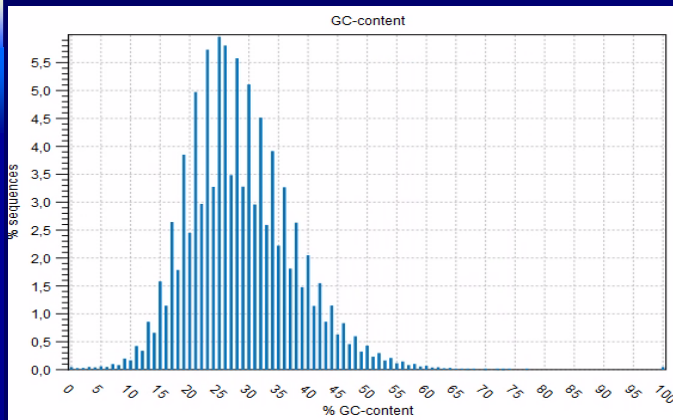


Zasada selekcji cząsteczek z nukleazą Cas9

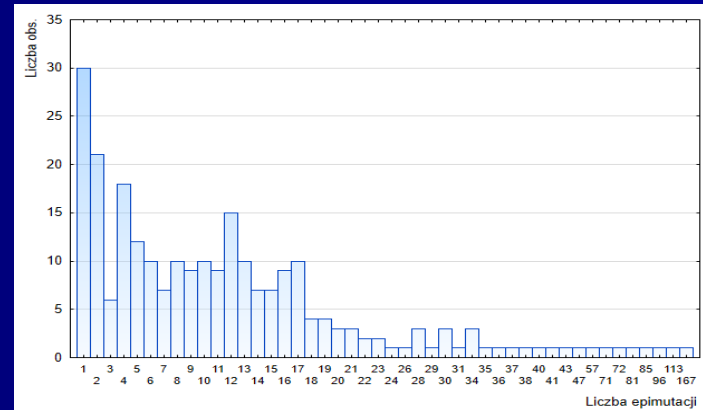
Wyniki (zadanie 3)

Optymalizacja konstrukcji bibliotek

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



Zawartość GC w zsekwenconowanych odczytach



Liczba rejonów genomu z różną ilością zmian metylacyjnych

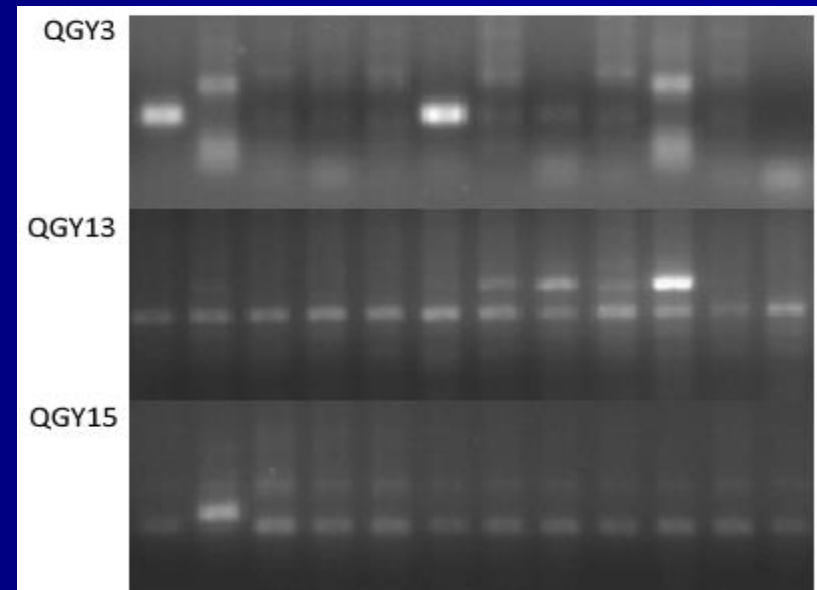
- ✓ Dotychczas w optymalizacji systemów selekcyjnych pszenicy jako referencja wykorzystywana była sekwencja prymitywnej jarej odmiany Chinese Spring, co sprawia, że wiele markerów ważnych dla hodowców odpada w trakcie selekcji markerów.
- ✓ Sekwencja referencyjna nowoczesnego genotypu pszenicy ozimej jest potrzebna do planowanych analiz epigenetycznych.
- ✓ Ponad połowa cytozyn w genomie pszenicy nie jest metylowana

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



stabilność, $p=0.015$
%plon, $p=0.048$
stabilność, $p=0.06$

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>