

Precyzyjna fenomika, telemetria modulowanej fluorescencji i temperatury roślin dla modelowania, optymalizacji i przyspieszenia procesu hodowli żyta (*Secale cereale* L.)

Kierownik zadania:

Prof. dr hab. inż. Stanisław M. Karpiński

SGGW w Warszawie,

Instytut Biologii,

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Stanislaw_Karpinski@sggw.edu.pl

Cele zadania:

- Określenie różnic/podobieństw w 29 komponentach żyta użytych do krzyżowań (obiektach) względem stabilnej linii referencyjnej TUR w mierzonych telemetrycznie parametrach fluorescencyjnych chlorofilu i różnic temperatury liści eksponowanych na niskie i wysokie natężenie światła na wczesnym etapie rozwoju rośliny.
- Zbadanie poziomów kwasu salicylowego, nadtlenu wodoru i pigmentów (chlorofile i karotenoidy) na wczesnym etapie rozwoju oraz plonowania 29 komponentów i mieszańców.
- Ustalenie sekwencji genomowej DNA i cDNA dla 8 wyselekcjonowanych molekularnych markerów dla późniejszych pomiarów poziomu ekspresji genów (markerów).
- wstępne określenie poziomu korelacji parametrów molekularnych i fizjologicznych z parametrami telemetrycznymi (modulowana fluorescencja i temperatura liści).

Materiały i metody:

- Pomiar modułowanej fluorescencji chlorofilu i temperatury liści.
- Biochemiczne pomiary poziomów kwasu salicylowego, nadtlenu wodoru, chlorofili i pigmentów w liściach żyta.
- Pomiar morfologiczny i plonowania nasion.
- Zidentyfikowanie homologicznych sekwencji genów (markerów) w życie z wykorzystaniem poznanej sekwencji genomu żyta.
- Statystyczne i matematyczne analizy korelacji cech.

Poniżej zaprezentowane są przykładowe macierze dla 29 analizowanych obiektów, które wizualizują różnicę wartości wszystkich mierzonych parametrów w porównaniu do średniej w obrębie obiektów. Jak widać, do analizy brano po 14 roślin w obrębie danego obiektu. Niektóre parametry biochemiczne były mierzone na mniejszej liczbie powtórzeń, dlatego te pola w obrębie macierzy zaznaczono kolorem szarym.

Legenda dotycząca poszczególnych analiz:

F_0 – fluorescencja minimalna liści zaadaptowanych do ciemności

F_m - fluorescencja maksymalna liści zaadaptowanych do ciemności

QYmax – maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu II

NPQ – niefotochemiczne wygaszanie energii

q_p - fotochemiczne wygaszanie

Rfd - wskaźnik zaniku fluorescencji chlorofilu *a* (wskaźnik witalności). RFD wskazuje poziom spadku intensywności fluorescencji z fluorescencji maksymalnej (F_m) do fluorescencji w stanie steady state i mówi to o witalności roślin i zdolności adaptacji do warunków środowiskowych.

T_10 – przyrost temperatury liści po 10s od włączenia wysokiego natężenia światła (4000uE)

T_20 – przyrost temperatury liści po 20s od włączenia wysokiego natężenia światła (4000uE)

T_max – maksymalny przyrost temperatury liści w trakcie ekspozycji na wysokie natężenie światła (4000uE)

viola - wiolaksantyna

antera - anteraksantyna

lut - luteina

zea - zeaksantyna

chl_b – chlorofil *b*

chl_a – chlorofil *a*

karoten - karoten

chl_a,b – stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b*

total_chl – całkowita zawartość chlorofilu

VAZ – cykl WAZ, współczynnik deepoksydacji, który informuje o stanie równowagi pomiędzy zeaksantyną, anteraksantyną a wiolaksantyną w cyklu WAZ.

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

SA - kwas salicylowy

n_klos – ilość kłosów

n_ziarniak – ilość ziarniaków

masa – masa kłosa

mtz – masa tysiąca ziarniaków

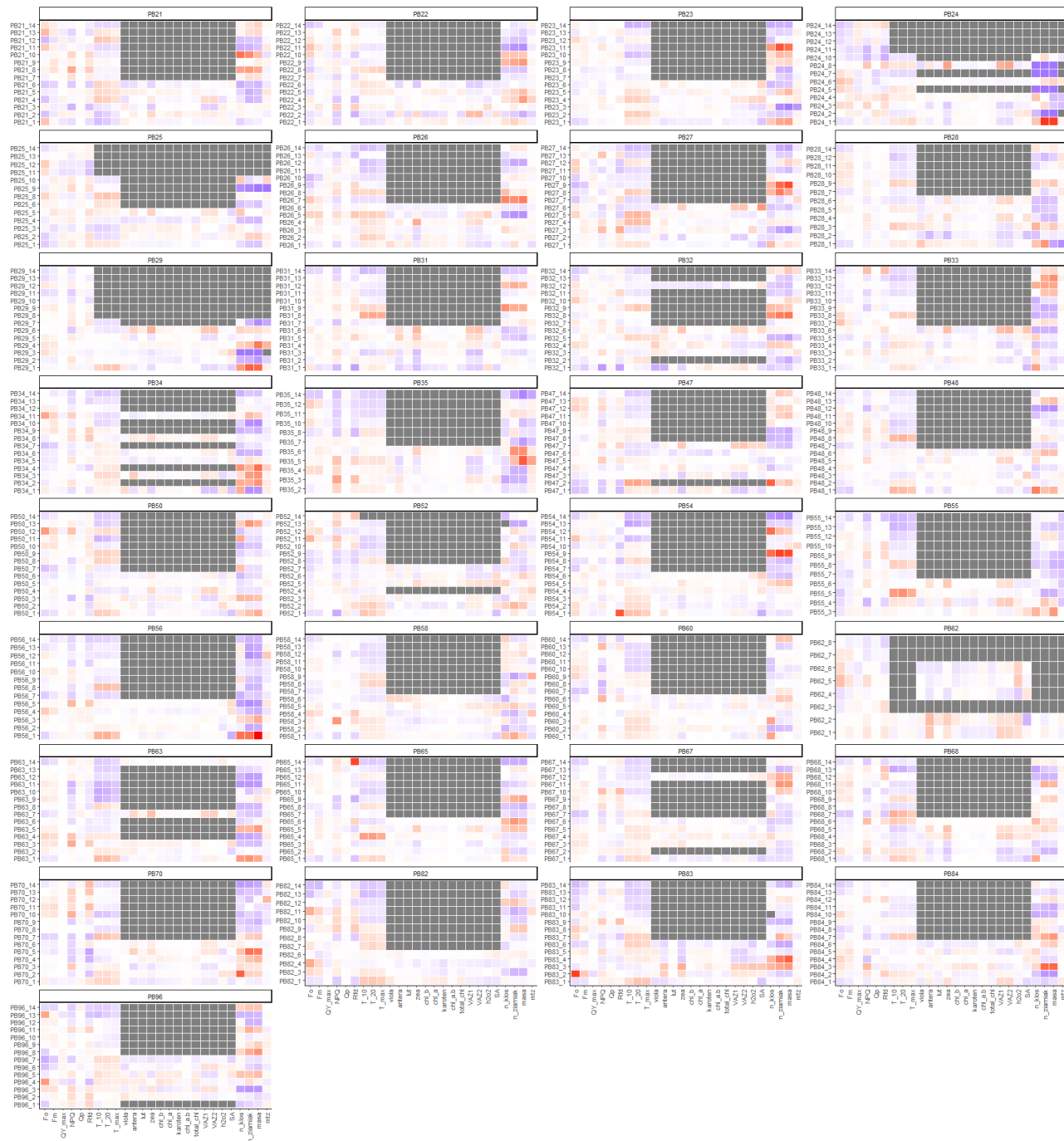
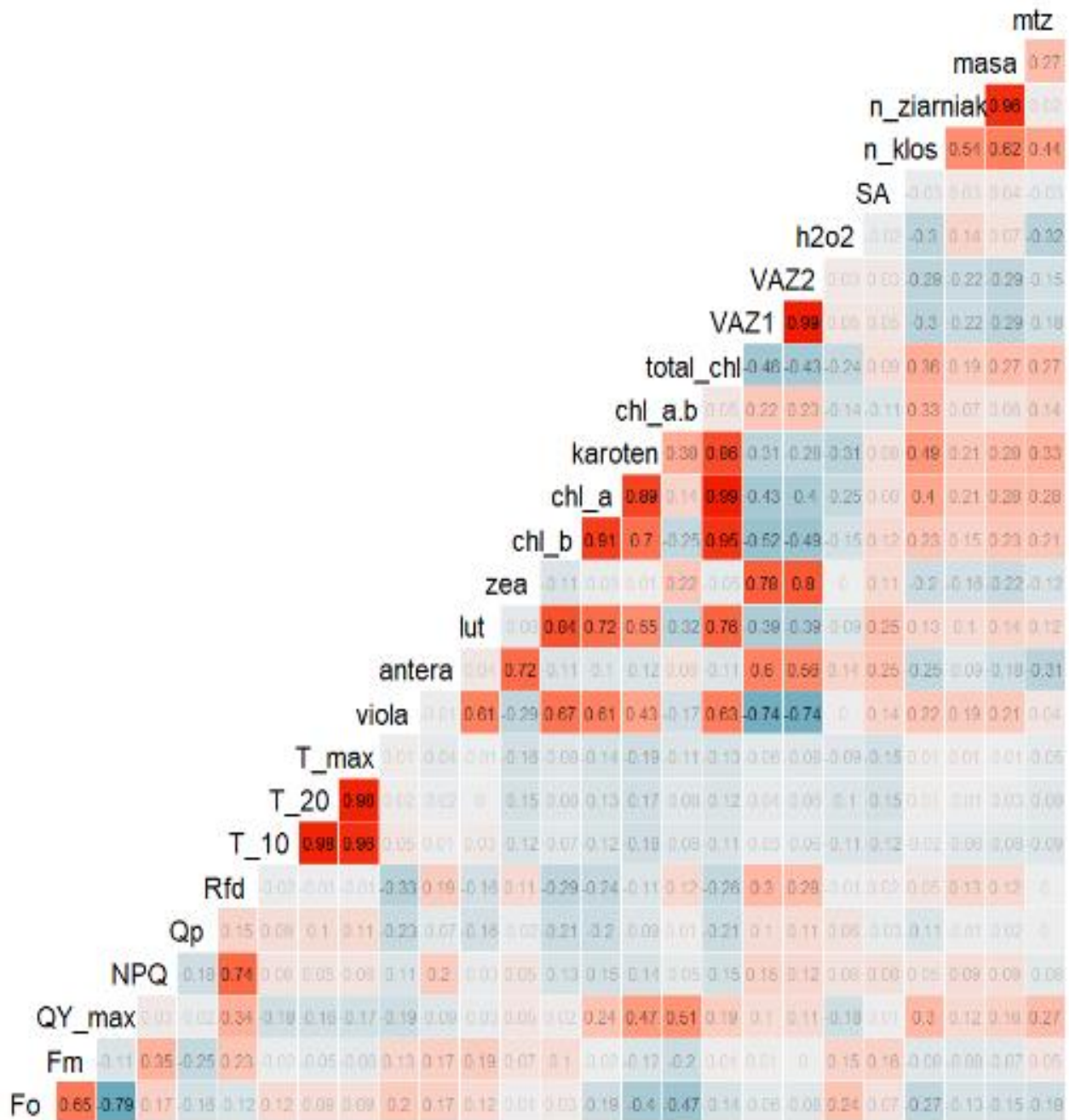


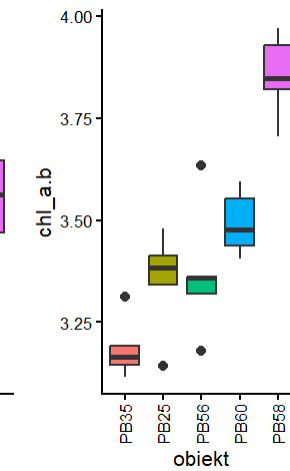
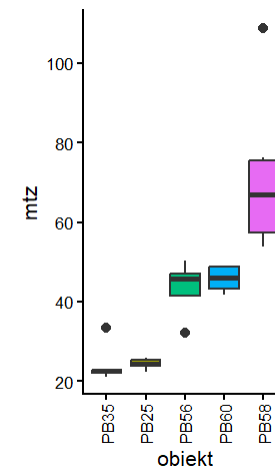
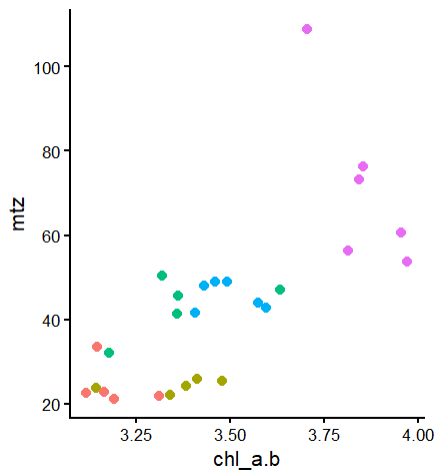
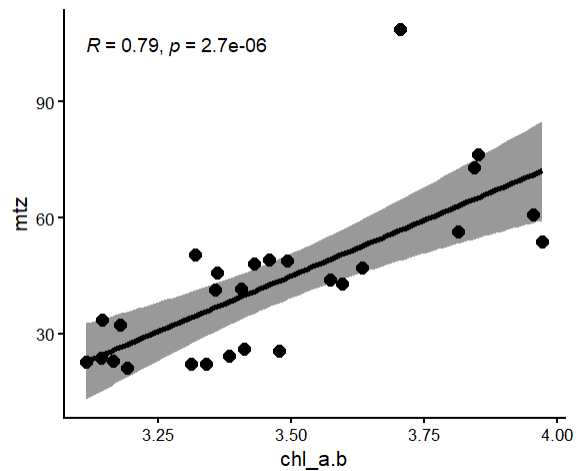
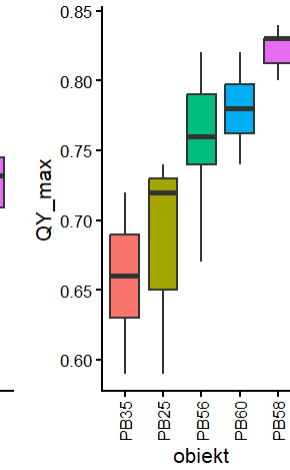
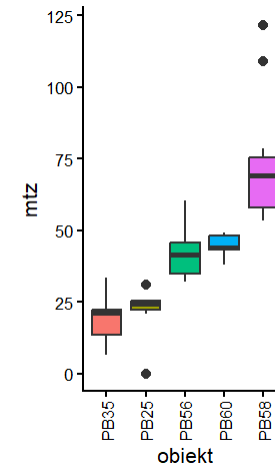
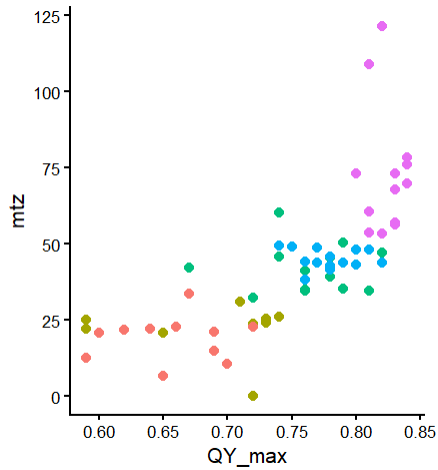
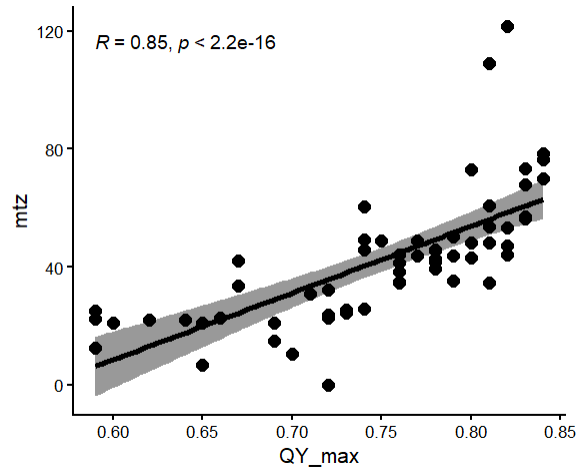
Figura 1. Macierze obrazujące różnicę wartości mierzonych parametrów w porównaniu do średniej w obrębie obiektów. Wartość 0 oznacza średnią dla obiektu, a wartość 0.2 oznacza że w danej roślinie wartość parametru jest większa o 20% w porównaniu do średniej w danym obiekcie. Niektóre parametry biochemiczne były mierzone na mniejszej liczbie pulowanych powtórzeń, dlatego te pola w obrębie macierzy zaznaczono kolorem szarym. Na figurze zamieszczono przykładowe macierze 29 analizowanych obiektów.



Następnie wykonano analizę i macierz korelacji prezentującą zależności pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami. Dla poszczególnych parametrów wartości zostały wyliczone na podstawie współczynnika korelacji Spearmana.

Figura 2. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem wszystkich analizowanych obiektów.

Szczegółowe analizy: Bardzo ciekawa jest korelacja w obrębie roślin MS między mtz a Fv/Fm i Chl a/b. Chciałbym sprawdzić czy jest to spowodowane różnicami między obiektami. Jak widać na poniższym wykresie korelacje te wynikają z różnic między obiektami MS. Obserwujemy w nich że im wyższa jest wartość Qymax tym wyższa jest masa tysiąca ziarniaków. Podobnie jest dla chl. a/b



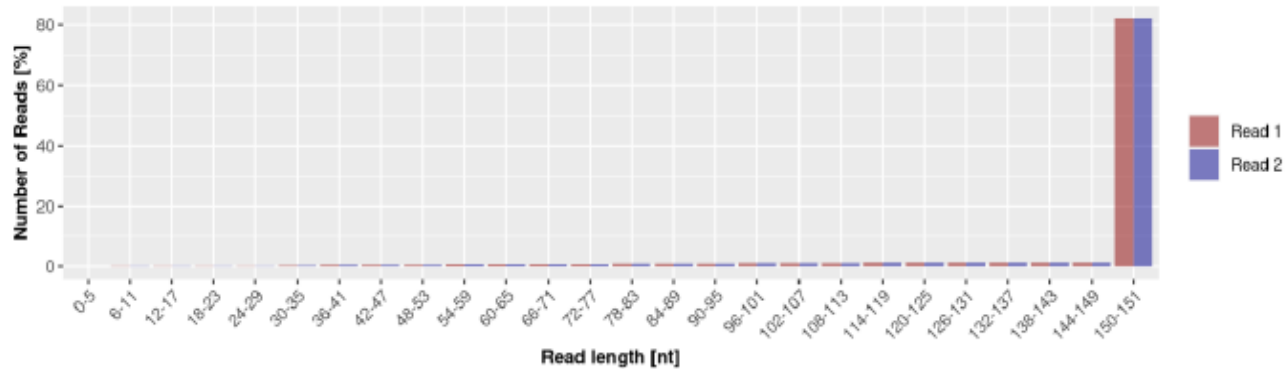


Fig. 2-1: Sequence lengths of trimmed FASTQ reads (average of all samples) (DNA)

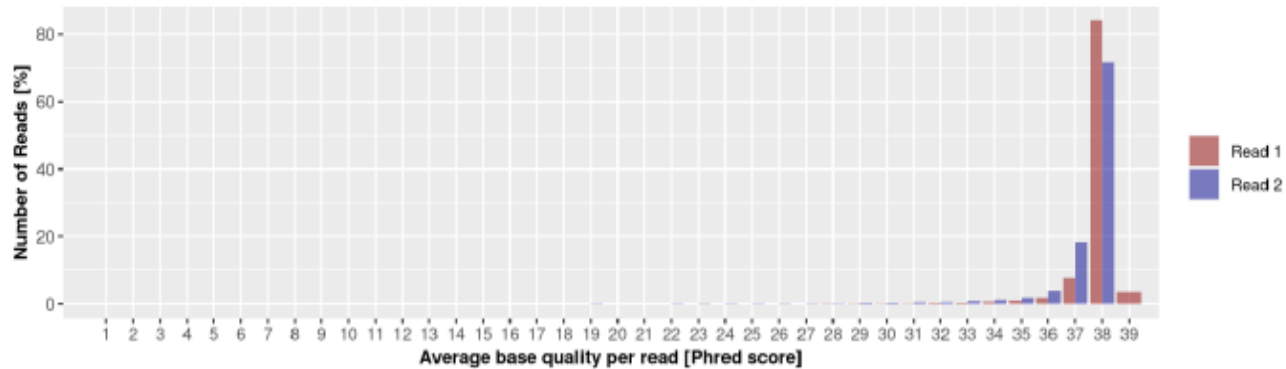


Fig. 2-2: Sequence quality of trimmed FASTQ reads (average of all samples) (DNA)

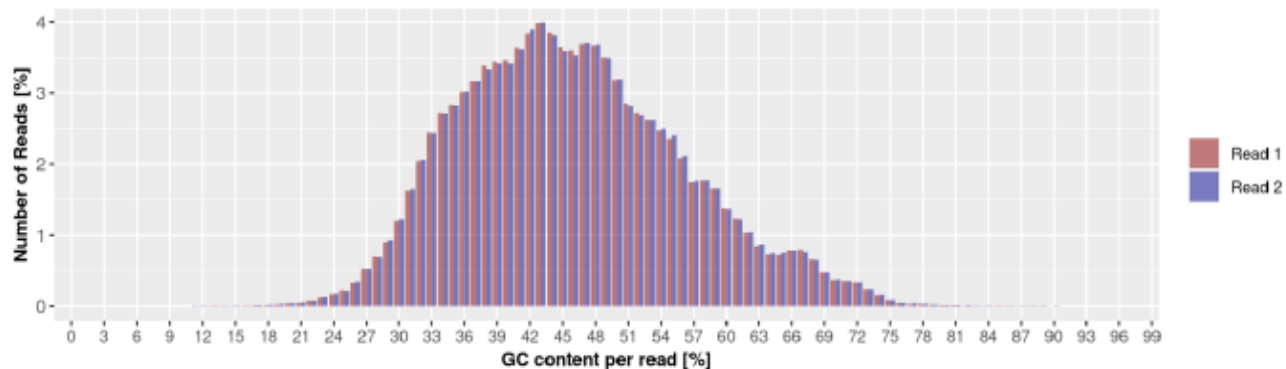


Fig. 2-3: GC content of trimmed FASTQ reads (average of all samples) (DNA)

Innym obszarem badań było ustalenie sekwencji genomowej DNA i cDNA dla 8 wyselekcjonowanych molekularnych markerów w liściach wyselekcjonowanych 29 mieszańców i komponentów. Do analiz wybrano następujące geny: - MPK4, - LSD1, - EDS1, - CRK5, - APX2, - HSP70, - aktyna, - ADP-RFa

Dla powyższych 8 genów uzyskano 232 amplikony. Poddano je sekwencjonowaniu w trybie 2x150 odczytów. Dla każdego genotypu uzyskano od 14 do 99 tys. odczytów, o zrównoważonym poziomie par GC. W tej chwili jesteśmy w trakcie analizy sekwencjonowania dla wszystkich badanych genotypów.

Tutaj zaprezentowano kilka figur roboczych z raportu z sekwencjonowania dotyczących długości odczytów oraz jakości próbek.

DYSKUSJA:

Dla tematu badawczego 1 wykonano po 406 pomiarów dla parametrów przedstawionych w miernikach od 1 do 7. W ramach tematu badawczego 2 wykonano po 203 pomiary H_2O_2 i SA oraz ustalono sekwencje DNA dla 8 markerów (232 sekwencje). Sekwencje wpłynęły do nas na początku grudnia i są analizowane. Sekwencja 16 starterów zostanie podane w uzupełnieniu raportu do końca 2022 r. W ramach tematu badawczego 3 nie udało się ustalić funkcji (korelacji) dla miernika 1 i 2 z powodu braku tej korelacji, ustalono natomiast korelację dla plonowania i chl a/b oraz OY_{max} (F_v / F_m) i plonowania. Stwierdzono, że korelacja tego parametru fluorescencyjnego zależy głównie od parametru F_0 a w mniejszym stopniu od F_m czy F_v . Korelacja ta ma potencjalne znaczenie dla przyspieszenia i zoptymalizowania procesu hodowli żyta.

Podsumowując, znaleziono pozytywne korelacje pomiędzy mtz a $Q_{y_{max}}$ w liniach MS, dopełniaczach, mieszańcach i singlach natomiast ta sama korelacja jest negatywna w przypadku mieszańca ostatecznego i restorera. Biorąc pod uwagę, że mieszańiec ostateczny F1 powstaje jako rezultat skrzyżowania restorera z singlem, należy zwrócić baczną uwagę na następujące przeciwstawne korelacje: Dla masy tysiąca ziaren (MTZ) i parametru $Q_{y_{max}}$ mamy odwrotną zależność między singlem a restorerem i powstałym mieszańcem ostatecznym. Podobnie singiel powstaje z krzyżówki MS i dopełniacza gdzie u wszystkich korelacja $Q_{y_{max}}$ z mtz jest mocno lub średnio-pozytywna. Pozostałe mierzone parametry nie wykazują istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami. Te rezultaty wskazują, że wprowadzenie do hodowli żyta nowych fizjologicznych markerów w tym markerów mierzonych telemetrycznie jak $Q_{y_{max}}$ mierzonych na wczesnym etapie rozwoju rośliny koreluje z masą 1000 ziarniaków mierzoną wiele miesięcy później po zbiorze. To może umożliwić przyspieszenie procesu hodowli nowych odmian żyta i zredukować koszt hodowli nowych odmian.

Wnioski:

- Zauważono silną pozytywną korelację pomiędzy ilością kłosów a stosunkiem chl a/b, karotenem i negatywną dla cyklu VAZ i Qp w mieszańcu ostatecznym.
- Należy zwrócić baczną uwagę na przeciwstawne korelacje pomiędzy mieszańcami a ostatecznymi komponentami tego mieszańca (singel i restorer).
- Znaleziono pozytywne korelacje pomiędzy mtz a Q_{Ymax} w liniach MS, dopełniaczach, mieszańcach i singlach natomiast ta sama korelacja jest negatywna w przypadku mieszańca ostatecznego i restorera.
- MPK4, - LSD1, - EDS1, - CRK5, - APX2, - HSP70, - aktyna, - ADP-Rfa. Dla tych 8 genów uzyskano 232 amplikony. Poddano je sekwencjonowaniu w trybie 2x150 odczytów.
- Wstępne rezultaty wskazują, że wprowadzenie do hodowli żyta nowych biochemicznych i fizjologicznych markerów (SA, H₂O₂, chl a/b, luteiny, ΔT), w tym markerów (cech) mierzonych telemetrycznie (np. Q_{Ymax}) umożliwi przyspieszenie procesu hodowli żyta i pozwoli na obniżenie kosztów hodowli nowych odmian żyta.