

Nr zadania:

9

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2022 roku

A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania: Precyzyjna fenomika, telemetria modulowanej fluorescencji i temperatury roślin dla modelowania, optymalizacji i przyspieszenia procesu hodowli żyta (<i>Secale cereale</i> L.)
Numer zadania: 9 <i>(w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 2015 r., poz. 1170 z późn. zm.))</i>
Planowany okres realizacji zadania: 2022 r.
Planowane nakłady w zł: 199 200

B. DANE WNIOSKODAWCY

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax) Prorektor ds. Nauki Prof. dr hab. inż. Tomasz Okruszko Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Nowoursynowska 166 02-787 Warszawa tel.: 22 59 310 13, fax.: 22 59 310 53 e-mail: prorektor_nauka@sggw.pl

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Stanisław Karpiński	prof. dr hab.	SGGW, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Anna Rusaczonok	dr	SGGW, Katedra Botaniki, Instytut Biologii
Weronika Czarnocka	dr	SGGW, Katedra Botaniki, Instytut Biologii
Paweł Burdiak	dr	SGGW, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii
Joanna Dąbrowska-Bronk	dr	SGGW, Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii
Jarosław Bojarczuk	dr	Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR
Piotr Gawroński	dr	SGGW, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii
Damian Witoń	dr	SGGW, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii
Aleksandra Stec	mgr	SGGW, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii

2. Kierownik zadania (imię, nazwisko, tytuł lub stopień naukowy, adres do korespondencji, telefon bezpośredni i do sekretariatu jednostki organizacyjnej zatrudniającej kierownika zadania, e-mail kierownika; telefon do oraz dane osoby, z którą można się kontaktować w razie nieobecności kierownika zadania)

Prof. Stanisław Karpiński

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Biologii

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

tel. 22 59 321 51 (sekretariat), 22 59 321 72 (bezpośredni)

fax 22 59 32152

e-mail: stanisław_karpiński@sggw.edu.pl

Dane osoby do kontaktu w razie nieobecności kierownika zadania:

Aleksandra Stec

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Biologii

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

tel. 22 59 321 81

e-mail: aleksandra_stec@sggw.edu.pl

D. OPIS ZADANIA

1. Obecny stan wiedzy w tematyce objętej zadaniem (max. 1 strona A4)

W ramach realizowanego zadania badawczego projektu NCBiR CROPTECH został zaprojektowany zrobotyzowany, samojezdny system do pomiaru modulowanej fluorescencji i temperatury liści roślin rosnących w warunkach polowych. System wraz z autorskimi programami do analizy danych został zaprojektowany w celu oceny potencjału plonotwórczego, odporności roślin uprawnych na stresy środowiskowe (tj. susza, mróz, odporność na choroby etc.) we wczesnej fazie wzrostu w celu wykorzystania metod teledetekcyjnych i autorskich algorytmów dla przyspieszenia i zoptymalizowania procesu hodowli nowych odmian zbóż. Główne zalety głowicy skanującej fluorescencję i temperaturę do precyzyjnej fenomiki i jej przewaga nad systemami dostępnymi na rynku zostały opisane powyżej. Pierwsze polowe pomiary kukurydzy wykonano w czerwcu 2019 r. na polkach doświadczalnych na Wolicy, SGGW w Warszawie. Pomiary te wykazały, że 50% wyższy plon nasion w odmianach Rosomak i Kosynier w porównaniu do Wielkopolanki i Wigor istotnie koreluje z podwyższoną różnicą temperatury liści w 10-tygodniowych młodych liściach, zmierzoną jako różnica temperatury w niskim i bardzo wysokim natężeniu światła (6 °C wyższa ΔT) w porównaniu do niskoplonujących starych odmian Wigor i Wielkopolanka. Te rezultaty w kombinacji z pomiarami parametrów fluorescencyjnych liści ($RFD = F_m / F_s$) pozwoliły nam na wstępne opracowanie algorytmów przewidywania plonowania kukurydzy, tak jak to zrobiliśmy dla rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) i pomiarów kwasu salicylowego czy nadtlenu wodoru w korelacji do plonu nasion (Bernacki i wsp., 2019).

Hodowcy roślin muszą przez lata eksperymentować z tysiącami roślin, aby rozwinąć odmianę o ulepszonych cechach. Ich metody hodowli są skuteczne, ale bazują na wypracowanych latach zdolnościach hodowcy i dlatego trudno im nadążyć za rosnącą złożonością potrzeb klientów i wyzwań związanych z bezprecedensowymi zmianami środowiska naturalnego. Podstawą, na której opiera się sukces procesu hodowli roślin, jest czas, w jakim wprowadza się na rynek nową komercyjnie ulepszoną odmianę. Sukces i rynkowa konkurencyjność spółek hodowlanych zależy od jakości badań podstawowych, która to w ostatnich latach stała się bardzo wymagająca i skomplikowana, oraz zależy od przekucia zdobytej nowej wiedzy z badań podstawowych w komercyjny sukces wyhodowania nowej odmiany. Wykorzystanie w tym zakresie współczesnego rozumienia genetyki, fizjologii, wzrostu i plonowania roślin oraz uporządkowania i znormalizowania eksperymentów, które to wymaga nowego niestandardowego oprzyrządowania znacznie może poprawić szybkość i jakość hodowli roślin. Związana z tym implementacja nowych protokołów hodowli roślin generuje potrzebę poprawy kwantyfikacji i znormalizowania oceny cech użytkowych poprzez wykorzystanie matematycznego modelowania pomiarów tych cech.

Projekt zakłada wykorzystanie nowych urządzeń pomiarowych i programów sterujących cyfrową analizą obrazów fluorescencyjnych i termicznych roślin, oraz na matematycznym skorelowaniu tych parametrów, mierzonych na wczesnym etapie rozwoju rośliny z cechami fizjologicznymi, molekularnymi i biochemicznymi roślin jak: poziom hormonów (kwas salicylowy), poziom reaktywnych form tlenu (np. H_2O_2), z potencjałem plonotwórczym roślin. Ta metoda będzie miała zastosowanie dla każdej rośliny, bo polega na badaniu zależności wyżej wymienionych cech z telemetrycznymi pomiarami sprawności cieplnej fotosystemów i ich efektywności transportu elektronów, a w części matematycznego modelowania polega na wyprowadzeniu równania dyskretnych zależności znormalizowanych parametrów cech z potencjałem plonotwórczym danej rośliny, linii czy odmiany, niezależnie od tego ile i jakie geny są w tą cechę zaangażowane. Takie matematyczne równania i funkcje najlepiej opisujące te zależności umożliwią przyspieszenie procesu hodowli nowych odmian żyta o określonych nowych komercyjnych cechach użytkowych (np. lepszym plonowaniu, lepszej wydajności zużycia wody, bardziej tolerancyjnych na stresy suszy czy odpornych na nowe choroby) poprzez ulepszone i

telemetrycznie znormalizowany wybór komponentów do krzyżowań a przez to na wyeliminowaniu wielu niepotrzebnych krzyżowań.

Literatura:

Abreu ME, Munné-Bosch S. J Exp Bot. 2009, 60: 1261–1271; Bernacki MJ et al., Physiol Plant. 2019 Nov 20. doi: 10.1111/ppl.12863; Bernacki et al., 2018 J. Plant Physiol. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.04.014>; Czarnocka et al., 2017 Plant, Cell & Env. 40, 2644–2662 doi: 10.1111/pce.12994; Dixon et al., Plant Cell 2018, doi:10.1105/tpc.17.00961; Gitelson AA et al., (2003) J. Plant Physiol. 160: 271–282; Górecka M et al., 2019 Plant Cell & Env. 42, (<https://doi.org/10.1111/pce.13686>). Karpiński S et al., Plant Cell & Env. 2013 Apr;36(4):736-44. doi: 10.1111/pce.12018. Peak D et al., 2004 PNAS of USA January 27, 2004 101: 918-922; Szechyńska-Hebda M et al., Plant Cell Rep. 2016 Mar;35(3):527-39. doi: 10.1007/s00299-015-1901-y; Szechyńska-Hebda M et al., Plant Cell. 2010 Jul;22(7):2201-18. doi: 10.1105/tpc.109.069302; Wituszynska W et al., Plant Physiol. 2013 Apr;161(4):1795-805. doi: 10.1104/pp.112.208116

1a. Streszczenie dotychczas uzyskanych wyników – wyłącznie, jeśli zadanie stanowi kontynuację badań – (max. ½ strony A4).

W ramach zadania 9 przeprowadzono analizy i pomiary w 2021 r. zgodnie z planem. Wstępne rezultaty wskazują, że wprowadzenie do hodowli żyta nowych biochemicznych i fizjologicznych markerów (NPQ, SA, H₂O₂, chl a/b, luteiny, \square T), w tym markerów (cech) mierzonych telemetrycznie (NPQ i \square T), umożliwi przyspieszenie procesu i zoptymalizowanie kosztów hodowli nowych odmian żyta. Z pierwszego roku badań uzyskano następujące wnioski:

1. Zauważono silną negatywną korelację pomiędzy ilością kłosów a stosunkiem chl a/b w mieszańcu.
2. Z rezerwą należy patrzeć na pozytywną korelację w mieszańcach F1 pomiędzy poziomem H₂O₂ a masą ziarniaków (plonem) oraz ilością ziarniaków.
3. Należy zwrócić baczną uwagę na przeciwstawne korelacje pomiędzy mieszańcami a ostatnimi komponentami tego mieszańca (singel i restorer).
4. Wyselekcjonowano startery dla 6 genów markerowych w życie.

2. Cele zadania

Celem częściowym badań w 2022 roku w ramach projektu jest:

Określenie różnic/podobieństw w komponentach żyta użytych do krzyżowań (objektach) względem stabilnej linii referencyjnej TUR w parametrach fluorescencyjnych chlorofilu i delty temperatury liści eksponowanych na niskie i wysokie natężenie światła na wczesnym etapie rozwoju rośliny.

Po znalezieniu istotnych różnic w tych parametrach pomiędzy obiektami wybrano najbardziej różnicujące obiekty do szczegółowych badań biochemiczno-fizjologicznych oraz molekularnych. Zostaną zbadane poziomy kwasu salicylowego, nadtlenu wodoru i pigmentów (chlorofile i karotenoidy). Zostaną określone sekwencje genomowe i cDNA dla wybranych markerów molekularnych (6). Zostanie zmierzona wymiana gazowa, w liściach żyta wybranych obiektów na wczesnym etapie rozwoju. Na końcu zmierzony zostanie plon nasion w tych zróżnicowanych obiektach.

Celem tych badań będzie wstępne określenie poziomu korelacji parametrów molekularnych i fizjologicznych z parametrami telemetrycznymi (modulowana fluorescencja i temperatura liści).

Harmonogram realizacji zadania

Harmonogram realizacji zadania należy sporządzić w tabeli, dla każdego z planowanych tematów badawczych z uwzględnieniem ilości planowanych testów/prób/linii na których prowadzone będą badania. Proszę podać koszty realizacji poszczególnych tematów badawczych.

Proszę wyróżnić etapy (tematy badawcze), określić czas ich trwania w miesiącach od rozpoczęcia projektu i przewidywane koszty. Terminy realizacji tematów badawczych mogą się zazębiać. Suma kosztów tematów badawczych musi być równa całkowitemu kosztowi zadania.

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu Badawczego
1	Opracowania kompleksowe z analiz i pomiarów WUE, pigmentów, aparatów szparkowych, transpiracji, asymilacji, fluorescencji chl. i temperatury liści, kinetyki śmierci komórki liści, SA, H ₂ O ₂ , cyklu VAZ, aktywności markerowych enzymów, wysokości plonu, odporności na stres świetlny, etc. w certyfikowanych odmianach i komponentach do krzyżowań żyta	Kwiecień - grudzień	99 200
2	Analizy i opracowania pomiarów w z ekspresji wybranych markerowych genów oraz aktywności markerowych enzymów w certyfikowanych odmianach i komponentach do krzyżowań żyta.	Kwiecień - grudzień	70 000
3	Normalizacja danych, i matematyczne modelowanie dyskretnych sprzężeń, opracowanie wyników do raportu.	Październik - grudzień	10 000
Razem			199 200

UWAGA: Nie są tematami badawczymi czynności techniczne służące wykonaniu zadania np. zakup materiałów, utrzymanie roślin w szklarni, opracowanie statystyczne wyników, opracowanie raportów i sprawozdań.

4. Opis tematów badawczych

4. 1. Temat badawczy 1

Opracowania kompleksowe z analiz i pomiarów WUE, pigmentów, aparatów szparkowych, transpiracji, asymilacji, fluorescencji chl. i temperatury liści, kinetyki śmierci komórki liści, SA, H₂O₂, cyklu VAZ, aktywności markerowych enzymów, wysokości plonu, odporności na stres świetlny, etc. w certyfikowanych odmianach i komponentach do krzyżowań żyta.

Cel tematu badawczego 1

Celem tego eksperymentu jest określenie różnic w wybranych parametrach fluorescencji chlorofilu i temperatury liści na wczesnym etapie rozwoju rośliny mierzonej w niskim i wysokim natężeniu światła, w 29 wyselekcjonowanych mieszańcach i komponentach, użytych do hodowli tych mieszańców, o różnicujących wartościach z dobrze udokumentowanymi krzyżowaniami. Wykonanie pomiarów poziomu chlorofilu w liściach. Na podstawie różnic w tych parametrach zostaną opracowane korelacje i segregacja tych korelacji.

Materiały i metody

Komponenty i obiekty użyte do pomiarów: PB21, PB22, PB23, PB24, PB25, PB26, PB27, PB28, PB29, PB31, PB32, PB33, PB34, PB35, PB47, PB48, PB50, PB52, PB54, PB55, PB56, PB58, PB60, PB62, PB63, PB65, PB67, PB68, PB70.

Standardowa metodyka laboratorium prof. Karpińskiego opisana w wielu publikacjach jego zespołu będzie stosowana do pomiarów koncentracji pigmentów, parametrów fluorescencji chlorofilu oraz temperatury liści w niskim i wysokim oświetleniu w młodych liściach żyta w wybranych liniach mieszańców i komponentów użytych do krzyżowań na wczesnym etapie rozwoju rośliny. Parametry wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII) zostaną obliczone zgodnie ze standardowym protokołem pomiarowym. Pomiary temperatury liści dokonywane będą za pomocą kamery termowizyjnej Therma CAM SC640 (FLIR Systems, USA) z niestandardowym systemem skanowania temperatury liści w niskim i wysokim natężeniu światła fotosyntetycznie aktywnego. Pigmenty będą mierzone na Shimadzu HPLC spektrofotometrycznie. Wszystkie pomiary będą wykonane przynajmniej w 14 powtórzeniach (14x29=406 pomiarów). Pomiary liczby aparatów szparkowych, wydajności zużycia wody, śmierci komórki będą wykonane w 4 i 5 roku realizacji zadania 9 na końcowej mniejszej liczbie obiektów.

Ocena szans na osiągnięcie założonego celu, ocena istniejącego ryzyka

Z uwagi na duże doświadczenie w realizacji podobnego typu eksperymentów, ryzyko niepowodzenia jest minimalne. Jakkolwiek jest to materiał biologiczny a niektóre komponenty słabo plonują i rosną. Dlatego istnieje ryzyko, że wykonamy mniejszą ilość pomiarów niż zaplanowano. W przypadku nie stwierdzenia różnic lub zbyt małych różnic w parametrach fluorescencji chlorofilu i temperatury liści pomiędzy młodymi liśćmi komponentów wprowadzimy pomiary liści bardziej dojrzałych i/lub zielonych źdźbeł.

Mierniki dla tematu badawczego 1

Lp.	Miernik ¹	Wartość miernika
1.	Parametr RFD (F_m/F_s) dla 29 komponentów żyta	406 pomiarów
2	Parametr F_v/F_m dla 29 komponentów żyta	406 pomiarów
3	Parametr F_m'/F_s dla 29 komponentów żyta	406 pomiarów
4	Parametr NPQ dla 29 komponentów żyta	406 pomiarów
5	Parametr ΔT dla 29 komponentów żyta	406 pomiarów
6	Plon nasion z danego komponentu żyta	406 pomiarów
7	Pigmenty	406 pomiarów

4.2. Temat badawczy 2

Kompleksowe opracowania analiz i pomiarów ekspresji genów w certyfikowanych odmianach i komponentach do krzyżowań żyta.

Cel tematu badawczego 2

Celem tego tematu badawczego jest określenie różnic/podobieństw w zawartości kwasu salicylowego, nadtlenu wodoru względem barwników fotosyntetycznych (z tematu badawczego. 1) w liściach

¹ Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

wyselekcjonowanych 29 mieszańców i komponentów, oraz skorelowania tych wartości z plonowaniem (z TB 1.). Celem jest również ustalenie sekwencji genomowej DNA i cDNA dla 8 wyselekcjonowanych molekularnych markerów dla późniejszych pomiarów poziomu ekspresji genów (markerów).

Materiały i metody

Standardowa metodyka laboratorium prof. Karpińskiego opisana w wielu publikacjach jego zespołu będzie stosowana do pomiarów pigmentów, stężenia SA, H₂O₂ w liściach mieszańców i komponentów żyta (29) na wczesnym etapie rozwoju rośliny. Eksperymenty zostaną założone w HR Smolice i w szklarni doświadczalnej na polach Wolicy SGGW w Warszawie. W skrócie, SA będzie mierzona na Shimadzu HPLC, H₂O₂ spektrofotometrycznie. Parametry fluorescencyjne i termiczne będą mierzone w liściach tych samych mieszańców i komponentów. Wszystkie pomiary będą wykonane przynajmniej w 7 powtórzeniach z 29 komponentach (7x29=203). Zostaną ustalone sekwencje z 29 odmian i komponentów (6 różnych markerów molekularnych i dwa markery kontrolne z tzw. house keeping genes aktywna i ubiquityna) i zostaną opracowane startery do amplifikacji cDNA dla przynajmniej 8 różnych markerów molekularnych (8x29=232). Zweryfikowanie sekwencji DNA i cDNA

Ocena szans na osiągnięcie założonego celu, ocena istniejącego ryzyka

Z uwagi na doświadczenie ryzyko niepowodzenia jest minimalne. Jakkolwiek w przypadku nie stwierdzenia różnic lub zbyt małych różnic w pomiędzy młodymi liśćmi różnych komponentów i linii referencyjnej wprowadzimy pomiary liści bardziej dojrzałych i/lub zielonych źdźbeł.

Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	Miernik ² nowy dla F1	wartość miernika
1	Pomiar SA w liściach	203 pomiary
2	Pomiar H ₂ O ₂ w liściach	203 pomiary
3	Wyselekcjonowanie sekwencji genomowych DNA dla 8 markerów molekularnych żyta	232 sekwencje
4	Wyselekcjonowanie sekwencji cDNA 8 markerów molekularnych żyta	232 sekwencje
5	Opracowanie 16 zweryfikowanych starterów dla wyselekcjonowanych markerów molekularnych	16 sekwencji

4.3. Temat badawczy 3

Normalizacja danych, matematyczne modelowanie dyskretnych sprzężeń, przygotowanie opracowań wyników do publikacji.

Cel tematu badawczego 3

Wyprowadzenie wstępnych równań dyskretniej współzależności poziomów SA, H₂O₂ i pigmentów w liściach od parametrów fluorescencyjnych i dynamiki temperaturowej liści i od potencjału plonowania, podobnie jak

² Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

opisano w publikacji zespołu prof. Karpińskiego (Bernacki i wsp., 2018). Analizy zostaną przeprowadzone na SGGW w Warszawie. Wykonamy wstępne matematyczne modelowanie dyskretnych zależności tych cech.

Materiały i metody

Wzór analityczny omawianej funkcji regresji składa się przez nas w dwóch etapach. W pierwszej analizujemy zbiory odpowiednich funkcji elementarnych, zaczynając od najmniej skomplikowanej do bardziej skomplikowanej, aż zadowoli nas podobieństwo do zbioru punktów. W ten sposób każdemu eksperymentowi podporządkujemy funkcję zmiennej x zależnej od kilku parametrów, takich jak funkcja liniowa, kwadratowa i sześcienna. Ostatecznie funkcja wymierna jest brana pod uwagę, gdy punkty mają tendencję do zera dla dużego x. W drugim kroku obliczamy wartości parametrów, dla których współczynnik korelacji jest, co najmniej poniżej jednego, stosując standardowe procedury statystyczne. Funkcje regresji mogą okazać się niezbędnymi nam funkcjami algorytmicznymi. Dokładny opis metodologii jest zawarty w Bernacki et al., 2018.

Ocena szans na osiągnięcie założonego celu, ocena istniejącego ryzyka

Brak ryzyka

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	Miernik ³	wartość miernika
1	Funkcja zależności SA od H ₂ O ₂ i vice versa	1
2	Funkcja zależności SA lub H ₂ O ₂ od ΔT lub od chl a/b	1
3	Funkcja zależności SA lub H ₂ O ₂ lub od ΔT lub od chl a/b od plonowania	1

5. Literatura:

Bernacki MJ et al., 2019, *Physiol Plant*. Nov 20. doi: 10.1111/ppl.12863;

Czarnocka et al., 2017 *Plant, Cell & Env*. 40, 2644–2662 doi: 10.1111/pce.12994;

Gilroy et al., 2016, *Plant Physiology* 171, 1606 – 1615, <https://doi.org/10.1104/pp.16.00434>

Szechyńska-Hebda et al., 2010 *Plant Cell* 22; 2201 – 2218 <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069302>

Wituszyńska W et al., *Plant Physiol*. 2013 Apr;161(4):1795-805. doi: 10.1104/pp.112.208116

³ Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

6. Raport z wyników badań za 2022 rok

Na podstawie badań przeprowadzonych w roku ubiegłym do dalszych analiz wyselekcjonowano 29 linii żyta (objekty), wśród których były linie reprezentujące następujące grupy:

M - mieszaniec końcowy; R – restorer; S – singiel; D – dopełniacz; MS – linia męsko sterylna

Przeprowadzono szereg analiz fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych, jak również analizy plonu roślin i wielkości ziarniaków roślin żyta jak zaplanowano.

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 (7 po dwie spulowane), 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

W sumie wczytano dane dla 406 roślin z 29 obiektów. W przypadku niektórych parametrów zaobserwowano różnicowanie między powtórzeniami biologicznymi należącymi do tych samych obiektów.

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

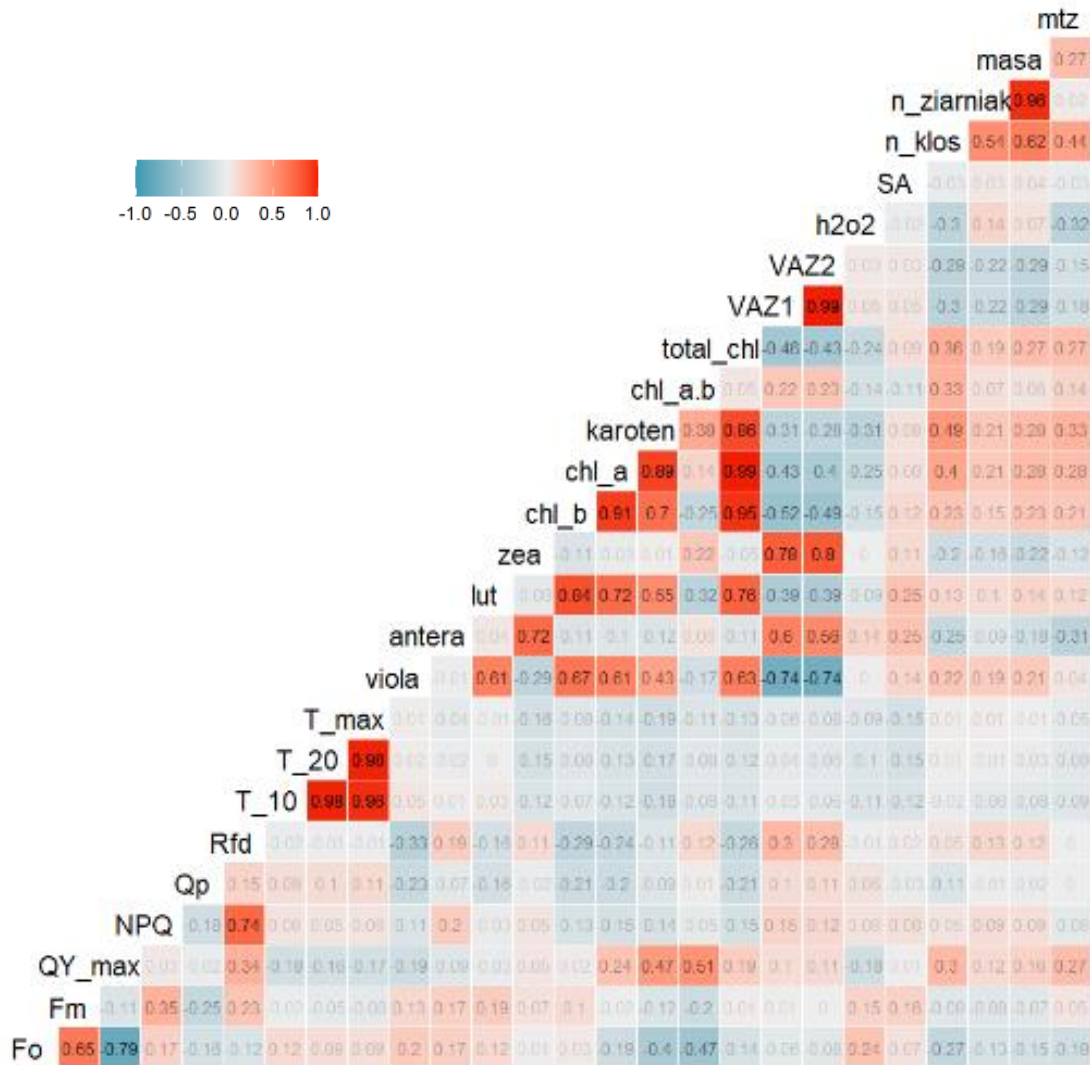


Figura 2. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem wszystkich analizowanych obiektów

Zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy:

- wiolaksantyną a luteiną (0,61)
- wiolaksantyną a chlorofilem a (0,61) i chlorofilem b (0,67)
- współczynnikiem deepoksydacji a zeaksantyną (0,79) i anteraksantyną (0,6)
- ilością ziarniaków a masą ziarniaków (0,96)
- RFD a NPQ (0,75)
- QYmax (F_v / F_m) a zawartością karotenu (0,47)
- QYmax (F_v / F_m) a stosunkiem chlorofilu a/b (0,51)

Spośród innych pozytywnych korelacji na szczególną uwagę pod kątem hodowlanym zasługuje korelacja między:

- zawartością karotenu a ilością kłosów (0,49)

- zawartością chlorofilu *a* a ilością kłosów (0,4)
- zawartością karotenu a masą tysiąca ziarniaków (0,33)
- QYmax (F_v/F_m) a ilością kłosów (0,3) i masą tysiąca ziarniaków (0,27)

Z drugiej strony zaobserwowano negatywną korelację pomiędzy:

- F_0 a QYmax (F_v/F_m) (-0,79)
- współczynnikiem deepoksydacji a wiolaksantyną (-0,74)
- współczynnikiem deepoksydacji a zawartością chlorofilu *a* (-0,43) i *b* (-0,52)
- zawartością nadtlenu wodoru a ilością kłosów (-0,3) i masą tysiąca ziarniaków (-0,32) (potwierdzone z ubiegłego 2021 r.)
- współczynnikiem deepoksydacji a ilością kłosów (-0,29) i masą ziarniaków (-0,29)
- zawartością anteraksantyny a masą tysiąca ziarniaków (-0,31)
- F_0 a ilością kłosów (-0,27)

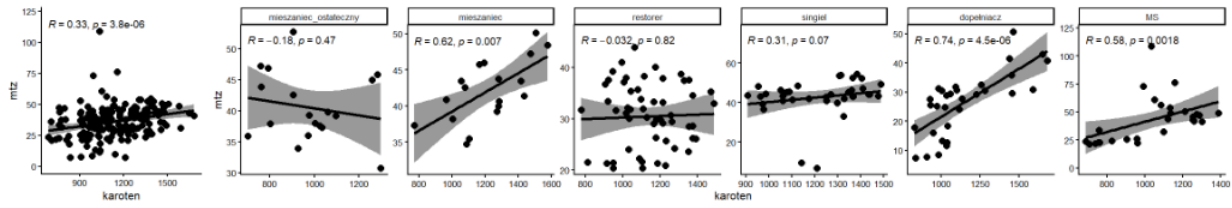
Spośród powyżej wymienionych najbardziej interesujące są niezbyt wysokie korelacje między różnymi parametrami plonu oraz barwnikami fotosyntetycznymi oraz QY_max (F_v/F_m).

Poniżej zostało przedstawione jak wygląda korelacja dla wszystkich roślin w obrębie każdego obiektu oraz w obrębie grup funkcjonalnych dla różnych parametrów.

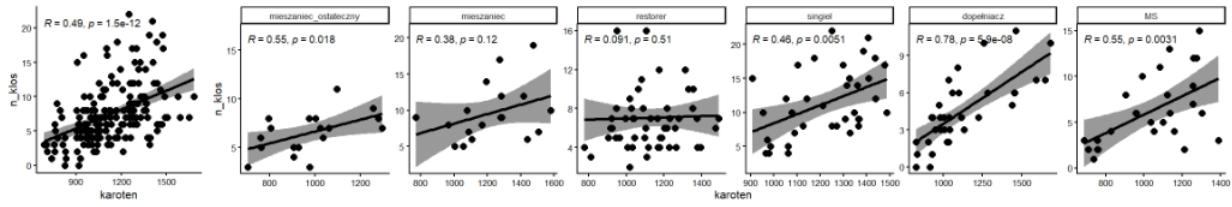
Interesujące jest to, że w obrębie większości analizowanych poniżej parametrów najwyższe korelacje można zaobserwować w liniach dopełniaczy oraz w liniach męsko sterylnych (MS). Dotyczy to korelacji:

- karoten vs mtz (0,74 dopełniacz, 0,58 MS),
- karoten vs liczba kłosów (0,78 dopełniacz, 0,55 MS),
- anteraksantyna vs mtz (-0,53 MS)
- QYmax (F_v/F_m) vs mtz (0,49 dopełniacz, 0,85 MS),
- chlorofil *a*/chlorofil *b* vs mtz (0,79 MS),
- QYmax (F_v/F_m) vs liczba kłosów (0,46 dopełniacz, 0,63 MS),
- QYmax (F_v/F_m) vs chlorofil *a*/chlorofil *b* (0,66 dopełniacz, 0,84 MS),
- chlorofil *a* vs liczba kłosów (0,56 dopełniacz, 0,53 MS),
- kwas salicylowy vs H_2O_2 (0,34 dopełniacz)

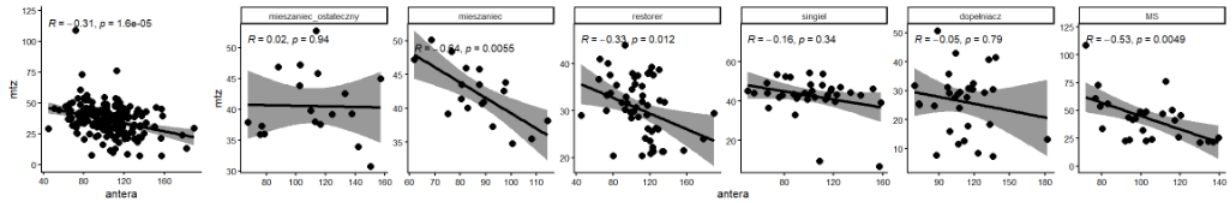
karoten vs. mtz



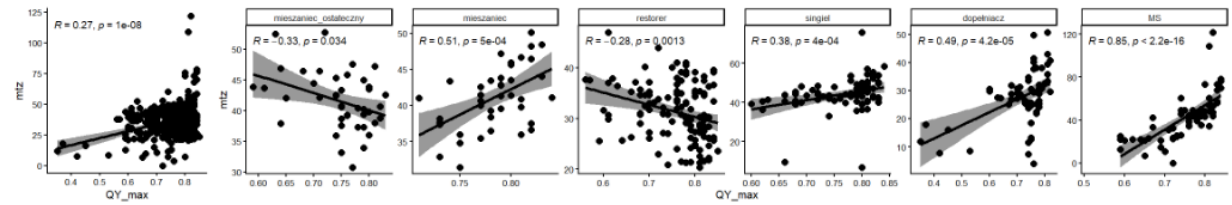
karoten vs. liczba kłosów



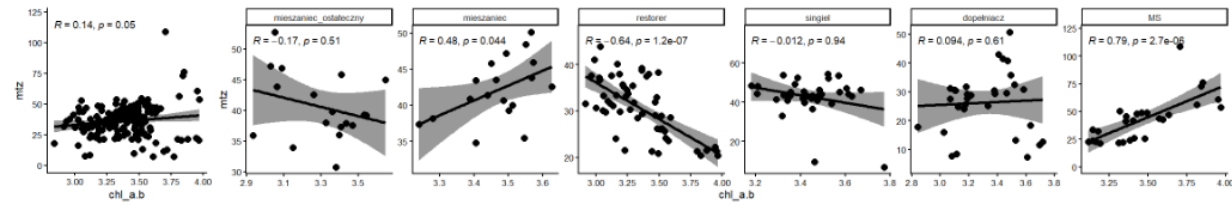
anteraksantyna vs. mtz



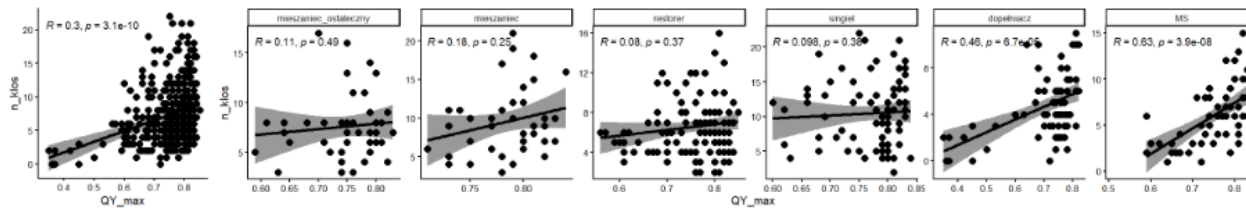
Fv/Fm vs. mtz



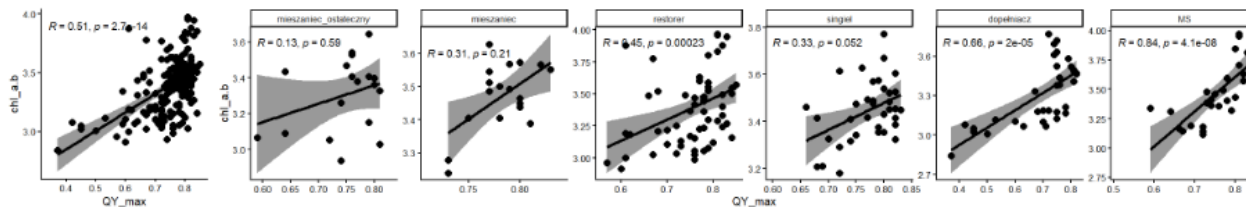
Chl a/b vs. mtz



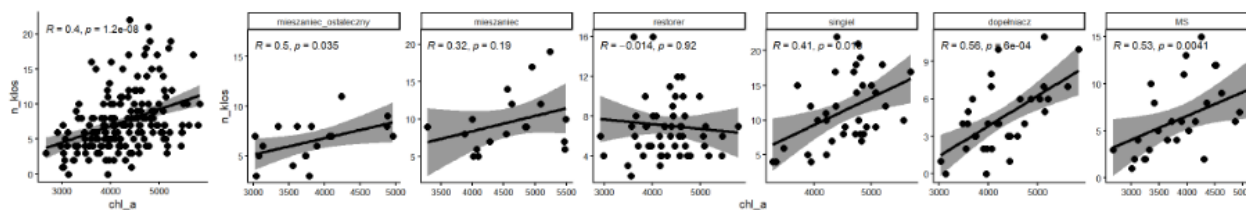
Fv/Fm vs. liczba kłosów



Fv/Fm vs. Chl a/b



Chl a vs. liczba kłosów



SA vs. H2O2

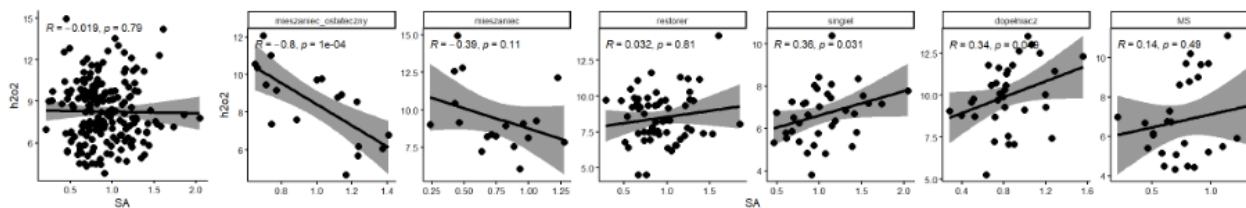


Figura 3. Wykresy obrazujące współczynnik korelacji Spearmana z podziałem na poszczególne grupy pomiędzy wybranymi parametrami, które dały najbardziej interesujące korelacje.

Poniżej zaprezentowano macierze korelacji Spearmana po analizie dla poszczególnych analizowanych grup (M – mieszaniec końcowy; R – restorer; S – singiel; D – dopelniacz; MS – linia męsko sterylina)

Mieszaniec

All data, Spearman

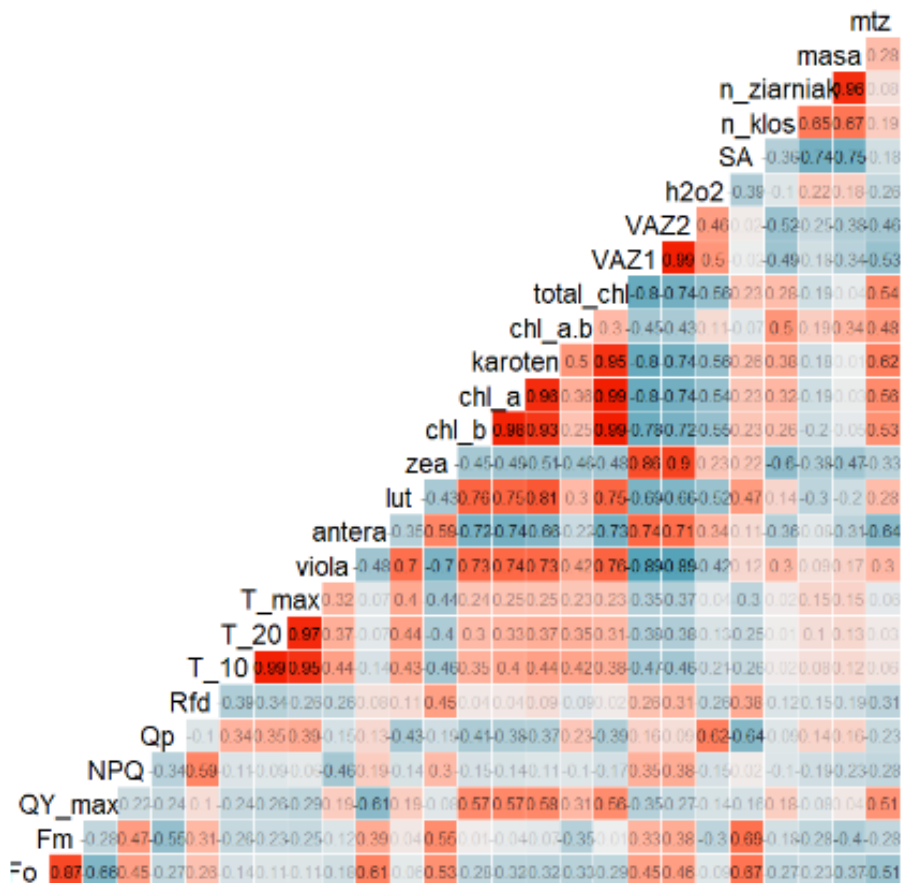


Figura 4. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych mieszańców.

W grupie mieszańców na uwagę zasługuje wyraźna pozytywna korelacja pomiędzy masą tysiąca ziarniaków (mtz) a zawartością barwników – chlorofilu a (0,56), chlorofilu b (0,53), karotenu (0,62) oraz QYmax (0,51).

Spośród wszystkich analizowanych grup w tej grupie zaobserwowano ponadto najbardziej wyraźną pozytywną korelację pomiędzy deltą temperatury liści a zawartością barwników fotosyntetycznych.

Widać też wyraźną pozytywną korelację pomiędzy Fo, Fm a zawartością kwasu salicylowego.

Mieszaniec ostateczny

All data, Spearman

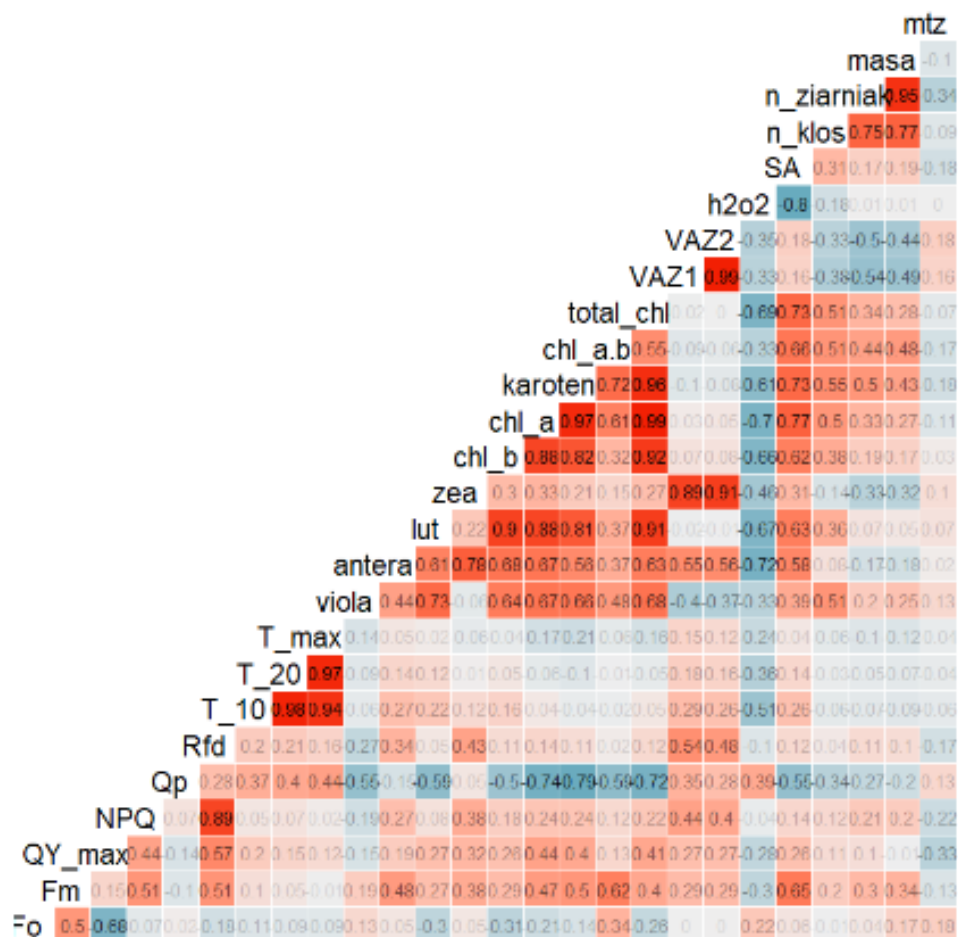


Figura 5. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych mieszańców ostatecznych.

W grupie mieszańców ostatecznych rzuca się w oczy wyraźna pozytywna korelacja pomiędzy barwnikami fotosyntetycznymi a kwasem salicylowym oraz parametrami plonu, zwłaszcza ilością kłosów oraz ilością i masą ziarniaków.

Z drugiej strony w tej grupie zaobserwowano negatywną korelację pomiędzy parametrami fotosyntetycznymi a Qp (= fotochemiczne wygaszanie energii wzbudzenia).

Restorer

All data, Spearman

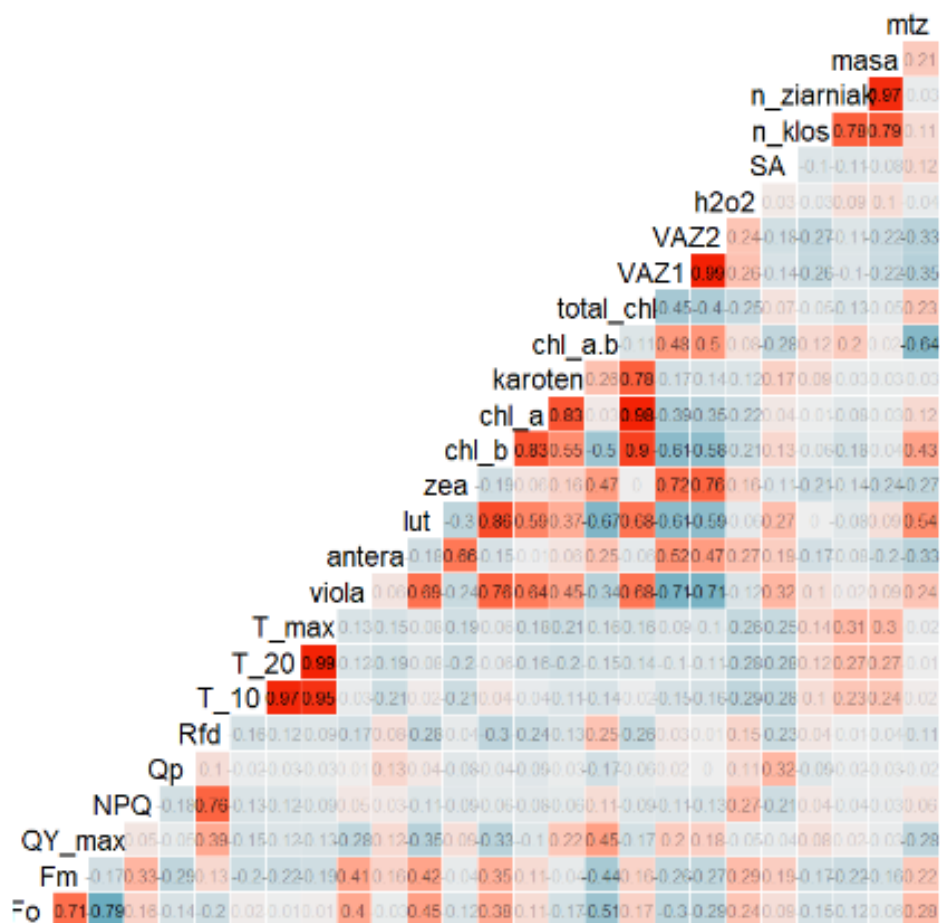


Figura 6. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych restorerów.

W grupie restorerów zaobserwowano najmniej istotne korelacje spośród wszystkich analizowanych grup. Na uwagę zasługuje tu pozytywna korelacja między masą tysiąca ziarniaków a luteiną (0,54) i chlorofilem b (0,43) oraz wyraźna negatywna korelacja między masą tysiąca ziarniaków z stosunkiem chlorofilu a do chlorofilu b (-0,64)

Singiel

All data, Spearman

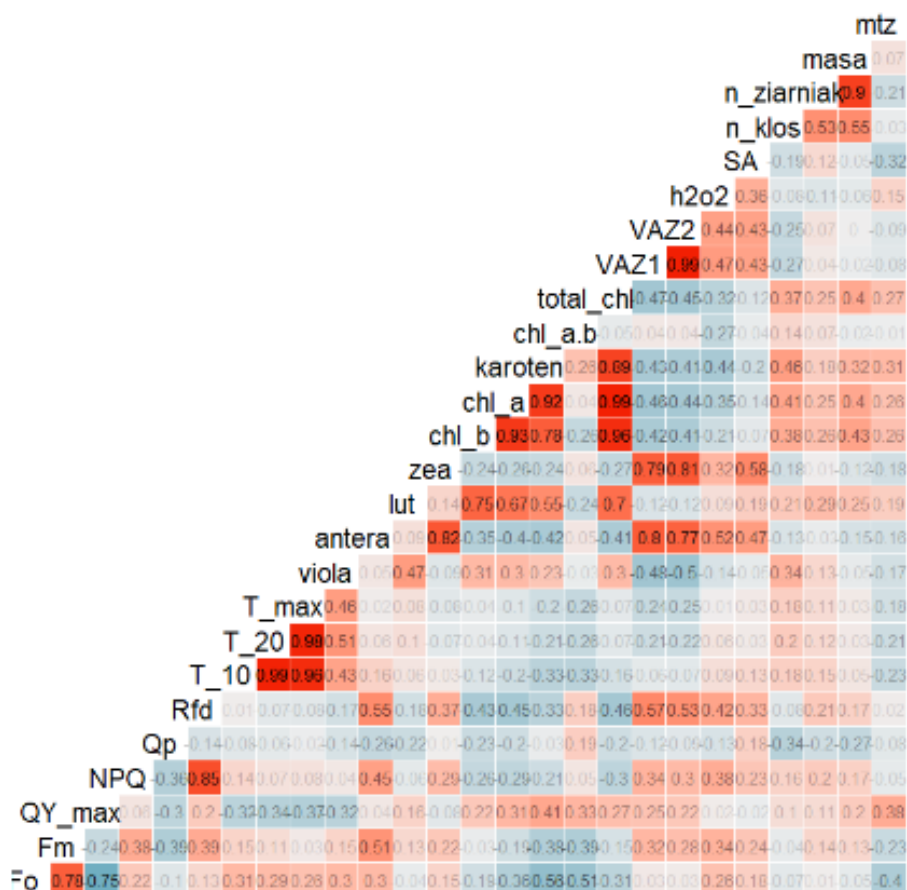


Figura 7. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych singli.

W grupie singli, podobnie jak w grupie mieszańców ostatecznych uwagę zwraca pozytywna korelacja między QYmax (Fv/Fm), barwnikami fotosyntetycznymi, a wszystkimi analizowanymi parametrami plonu. W tej grupie zaobserwowano również pozytywną korelację między deltą temperatury liści a zawartością wiola ksantyny oraz pomiędzy współczynnikiem witalności (Rfd) a cyklem WAZ, zawartością H₂O₂ i kwasu salicylowego.

Dopełniacz

All data, Spearman

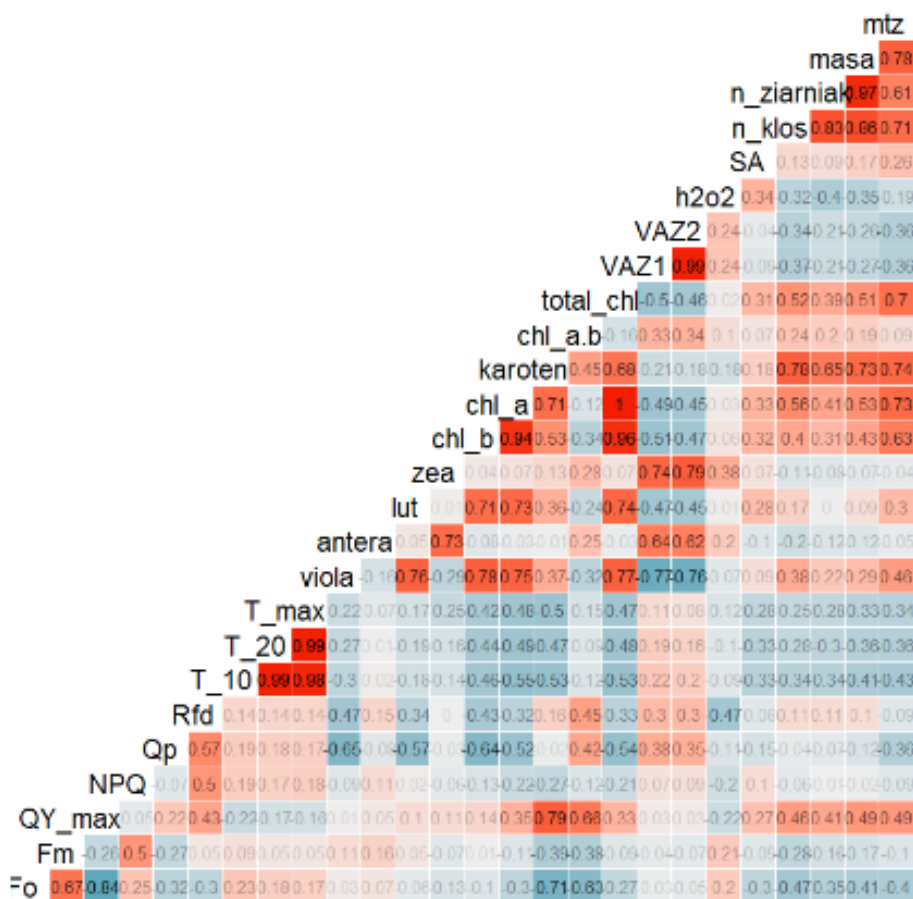


Figura 8. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych dopełniaczy.

W grupie dopełniaczy również zaobserwowano wyraźną korelację między barwnikami fotosyntetycznymi (chlorofil a, b, karoten), a wszystkimi analizowanymi parametrami plonu. W tej grupie wystąpiła również korelacja między zawartością anteraksantyny i zeaksantyny a zawartością kwasu salicylowego i H₂O₂.

MS

All data, Spearman

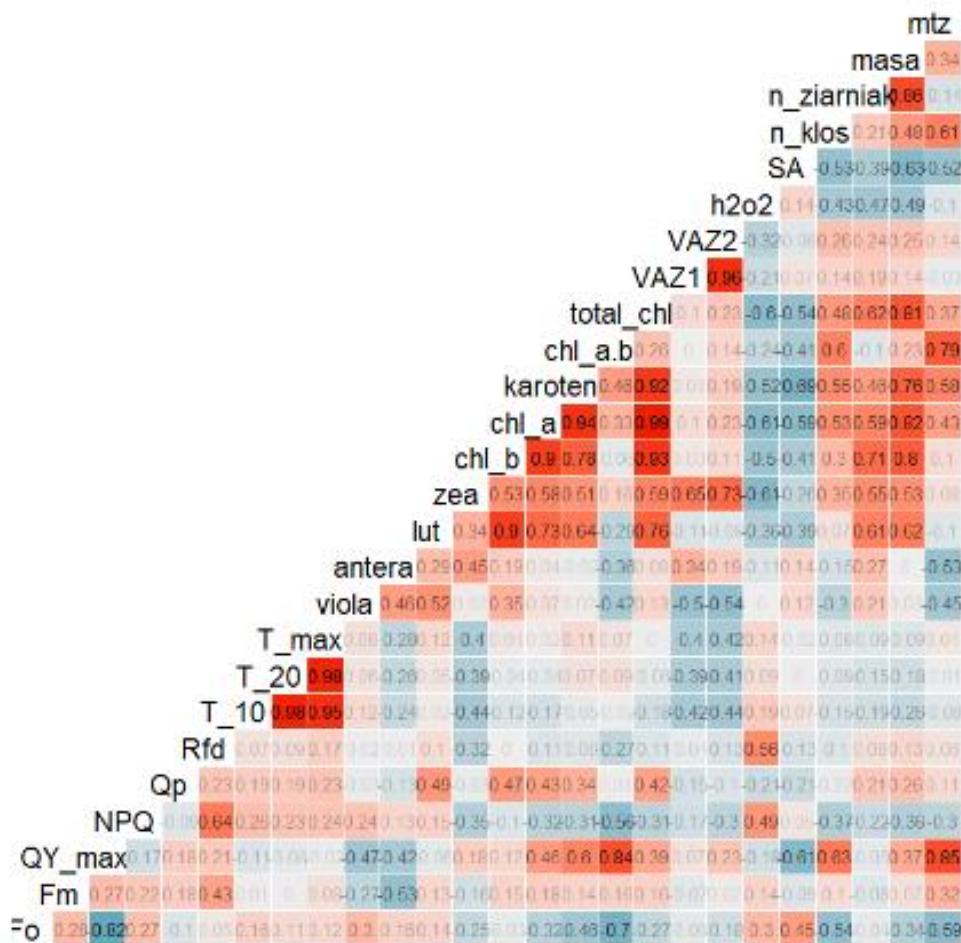


Figura 9. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych MS.

W grupie linii męsko-sterylnych zaobserwowano najwyraźniejszą spośród wszystkich grup pozytywną korelację pomiędzy QYmax (Fv/Fm) a masą tysiąca ziarniaków (0,85). W tej grupie QYmax koreluje również z szeregiem barwników fotosyntetycznych. Zawartość barwników chlorofilu a i b, karotenu, zeaksantyny i luteiny wyraźnie koreluje tu z parametrami plonu, zwłaszcza z masą ziarniaków. 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. Algorytm korelacji jest w trakcie opracowywania.

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.

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

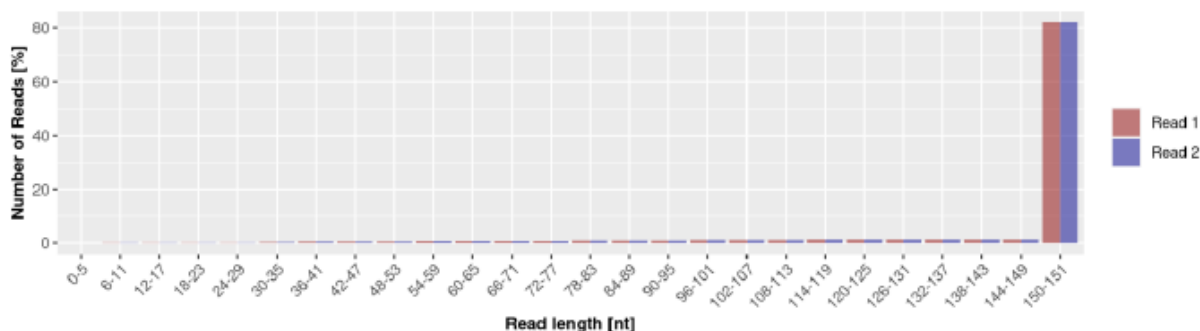


Fig. 2-1: Sequence lengths of trimmed FASTQ reads (average of all samples) (DNA)

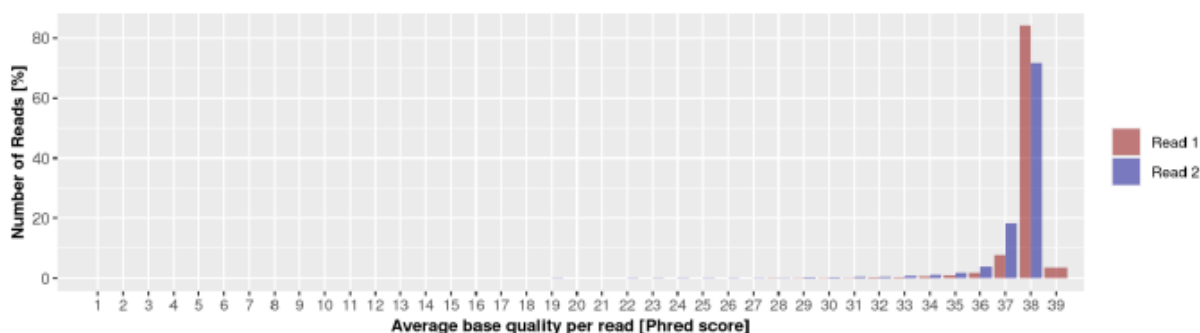


Fig. 2-2: Sequence quality of trimmed FASTQ reads (average of all samples) (DNA)

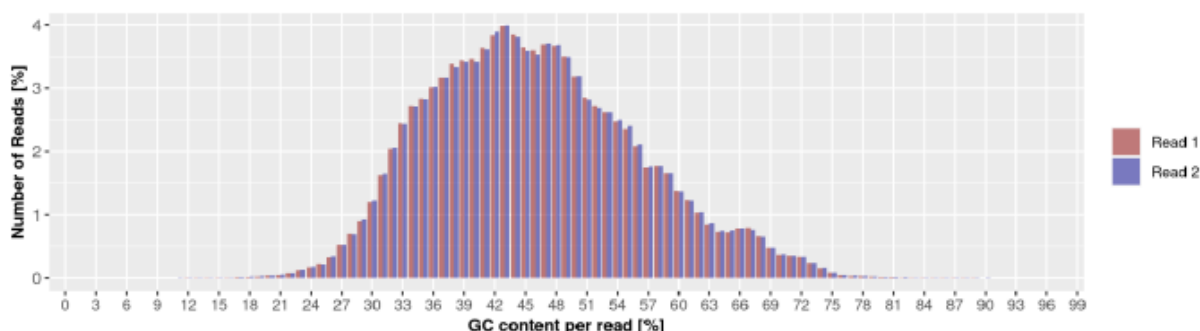


Fig. 2-3: GC content of trimmed FASTQ reads (average of all samples) (DNA)

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 i pigmentów 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 udało się ustalić funkcje (korelacji) dla miernika 1, 2 i 3 które wynoszą: $SA = 1.261 \times H_2O_2^3 - 4.357 \times H_2O_2^2 + 4.244 \times H_2O_2 - 0.614$ Ustalono natomiast korelację dla plonowania od SA na poziomie istotności $R^2 = 0.69$, która może być opisana $SA = -10^{-10} \times Yield^3 + 2 \times 10^{-6} \times Yield^2 - 0.008 \times Yield + 11.2$.

Podsumowując, znaleziono pozytywne korelacje pomiędzy mtz a Q_{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_{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_{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_{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.