

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2023 roku

A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania:

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

Numer zadania: 9

*(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.))*Planowany okres realizacji zadania: **2023 r.**Planowane nakłady w zł: **172 800****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.edu.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 Rusaczonek	dr	SGGW, Katedra Botaniki, Instytut Biologii
Maria Duszyn	dr	SGGW, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, 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
Maciej J. Bernacki	dr	SGGW, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii

2. Kierownik 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:

Joanna Dąbrowska-Bronk
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Katedra Fizjologii Roślin
Instytut Biologii
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
tel. 22 59 325 36
e-mail: joanna_dabrowska@sggw.edu.pl

D. OPIS ZADANIA

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. H₂O₂), 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 ulepszony i telemetrycznie znormalizowany wybór komponentów do krzyżowań a przez to na wyeliminowaniu wielu niepotrzebnych krzyżowań.

1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo)
1.	Określenie różnic/podobieństw w komponentach żyta użytych do krzyżowań (objektach) względem stabilnej linii referencyjnej TUR w mierzonych telemetrycznie parametrach fluorescencyjnych chlorofilu liści eksponowanych na niskie i wysokie natężenie światła na wczesnym etapie rozwoju rośliny.	TAK
2.	Po znalezieniu istotnych różnic w tych parametrach pomiędzy obiektami wybrano najbardziej różnicujące objekty do szczegółowych badań biochemiczno-fizjologicznych oraz molekularnych. Zostaną zbadane poziomy kwas salicylowego, nadtlenu wodoru i pigmentów (chlorofile i karotenoidy). Zostaną określone różnice w ekspresji wybranych markerów molekularnych (APX1, LSD1, EDS1) w porównaniu do dwóch genów referencyjnych żyta. Zostanie zmierzona wymiana gazowa i liczba aparatów szparkowych. Zostanie również zmierzona aktywność CAT, w liściach żyta wybranych obiektów na wczesnym etapie rozwoju. Na końcu zmierzony zostanie plon nasion w tych zróżnicowanych obiektach.	TAK
3.	Celem tych badań będzie wstępne określenie poziomu korelacji parametrów molekularnych, fizjologicznych z parametrami telemetrycznymi (modulowana fluorescencja chlorofilu a).	TAK

2. Harmonogram realizacji zadania

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu Badawczego w 2023 r.
1	Opracowania kompleksowe z analiz i pomiarów WUE, pigmentów, aparatów szparkowych, transpiracji, asymilacji, fluorescencji chl. a 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	92 800
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			172 800

3. Opis tematów badawczych zaplanowanych na 2022 r.

3.1. Temat badawczy 1

Opracowania kompleksowe z analiz i pomiarów WUE, pigmentów, aparatów szparkowych, transpiracji, asymilacji, fluorescencji chl. a 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 wymiany gazowej na wczesnym etapie rozwoju rośliny mierzonych w niskim i wysokim natężeniu światła, w 29 wyselekcjonowanych mieszańcach i komponentach użytych do hodowli tych mieszańców. Wykonanie pomiarów poziomu chlorofilu i karotenoidów w liściach. Na podstawie różnic w tych parametrach zostaną opracowane korelacje i segregacja tych korelacji. Parametry fluorescencyjne będą mierzone dla 12 osobników natomiast zawartość pigmentów oraz parametry warunkujące wymianę gazową (długość, szerokość oraz liczba aparatów szparkowych) będzie mierzona dla 6 osobników każdej linii i komponentu.

Cel TB1 założony na 2023 został osiągnięty w całości.

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 w zmiennym 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 w 12 powtórzeniach (12x29=348). Z powodu awarii sprzętu do pomiaru wymiany gazowej CIRAS-3 (PP Systems, USA), parametry warunkujące wymianę gazową w roślinie (długość, szerokość oraz liczba aparatów szparkowych) zostaną policzone z wykorzystaniem mikroskopu konwokalnego w 6 powtórzeniach (6x29=174). Pigmenty i kwas salicylowy będą mierzone na Shimadzu HPLC spektrofotometrycznie.

Tabela 1. Zaplanowane i wykonane pomiary i analizy do tematu badawczego 1.

Lp.	Miernik ¹	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Parametr RFD (F_m/F_s) dla 29 komponentów żyta	348 pomiarów	1. 348
2	Parametr QY _{max} ($=F_v/F_m$) dla 29 komponentów żyta	348 pomiarów	2. 348
3	Parametr Qp F_m'/F_s dla 29 komponentów żyta	348 pomiarów	3. 348
4	Parametr NPQ dla 29 komponentów żyta	348 pomiarów	4. 348
5	Parametry g _s (wymiana gazowa) żyta	174 pomiarów	5. 174
6	Plon nasion z danego komponentu żyta	348 pomiarów	6. 348
7	pigmenty	174 pomiarów	7. 174

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

3.2. Temat badawczy 2

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

Cel TB2 założony na 2023 został osiągnięty w całości.

Cel tematu badawczego 2

Celem tego tematu badawczego jest określenie różnic/podobieństw w zawartości kwasu salicylowego (SA), nadtlenu wodoru (H_2O_2) względem barwników fotosyntetycznych (z tematu badawczego. 1) w liściach wyselekcjonowanych 29 mieszańców i komponentów, oraz skorelowania tych wartości z plonowaniem (z TB 1.). Celem jest również ustalenie poziomów ekspresji kilku ważnych molekularnych markerów (APX1, LSD1 i EDS1 oraz dwóch genów referencyjnych). Wszystkie pomiary SA i H_2O_2 będą wykonane przynajmniej w 6 powtórzeniach ($6 \times 29 = 174$ pomiary). Natomiast pomiary ekspresji 5 wybranych genów będą zrobione w 3 biologicznych i 3 technicznych powtórzeniach ($9 \times 29 \times 5 = 1305$ reakcji bez optymalizacji i testów, razem ok. 1500 reakcji qPCR).

Materiały i metody

Standardowa metodyka laboratorium prof. Karpińskiego opisana w wielu publikacjach jego zespołu będzie stosowana do pomiarów pigmentów, stężenia SA, H_2O_2 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. Kwas salicylowy będzie mierzony na Shimadzu HPLC, H_2O_2 spektrofotometrycznie. Liczba aparatów szparkowych będzie ustalona na jednostkę powierzchni liścia. Z powodu awarii sprzętu do pomiaru wymiany gazowej CIRAS-3 (PP Systems, USA), parametry warunkujące wymianę gazową w roślinie (długość, szerokość oraz liczba aparatów szparkowych) zostaną policzone z wykorzystaniem mikroskopu konwokalnego w 6 powtórzeniach ($6 \times 29 = 174$). Zostaną ustalone poziomy ekspresji 3 molekularnych markerów (APX1, LSD1 i EDS1) oraz 2 referencji (przynajmniej w 3 biologicznych i 3 technicznych powtórzeniach ($9 \times 5 \times 29 = 1305$ reakcji).

Tabela 2. Zaplanowane i wykonane mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	Miernik ²	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Pomiar SA w liściach	174 pomiary	1. 174
2.	Pomiar H_2O_2 w liściach	174 pomiary	2. 174
3.	Pośredni pomiar wymiany gazowej (długość oraz szerokość aparatów szparkowych) i liczby aparatów szparkowych na jednostkę powierzchni liścia.	174 pomiary	3. 174
4.	Pomiar poziomu ekspresji dla 5 genów (APX1, EDS1 i LSD1 oraz dwóch genów referencyjnych)	1305 reakcji	4. 1305

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

3.3. 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; parametrów warunkujących wymianę gazową i zawartości pigmentów w liściach od potencjału plonowania, podobnie jak opisano w publikacji zespołu prof. Karpińskiego (Bernacki i wsp., 2018). Analizy zostaną przeprowadzone na SGGW w Warszawie. Wykonamy wstępne regresyjne matematyczne modelowanie dyskretnych zależności tych cech.

Cel TB3 założony na 2023 został osiągnięty w całości.

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 podporządkowujemy 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 potrzebnymi nam funkcjami algorytmicznymi. Dokładny opis metodologii jest zawarty w Bernacki et al., 2018.

Tabela 3. Zaplanowane i wykonane mierniki dla tematu badawczego 3

<u>Lp.</u>	<u>Miernik³</u>	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
<u>1.</u>	Funkcja zależności SA lub H ₂ O ₂ lub gs lub liczby aparatów szparkowych lub QY _{max} lub chl a/b od plonowania.	<u>1</u>	<u>1</u>

Ze względu na dyskretnie sprzężenia pomiędzy parametrami i analizami z zadań badawczych wyniki i dyskusję wyników podajemy wspólnie dla tych zadań.

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

Wyniki i Dyskusja

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

M - mieszańce końcowe (z przywróconą płodnością); 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 8 obiektów (spośród 33 analizowanych), 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

QY_{max} – 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_kłos – ilość kłosów

n_ziarniak – ilość ziarniaków

masa – masa kłosa

mtz – masa tysiąca ziarniaków

stomata length – długość aparatów szparkowych

stomata width – rozwartość aparatów szparkowych

stomata density – zagęszczenie aparatów szparkowych

APX1 – poziom ekspresji żytniego genu askorbinianowej peroksydazy 1

LSD1 - poziom ekspresji żytniego genu LSD1

EDS1 - poziom ekspresji żytniego genu EDS1

W sumie wczytano dane dla 348 roślin z 28 obiektów. Jeden obiekt słabo wyrósł i nie było możliwości zebrania odpowiedniej ilości materiału do analiz. W przypadku niektórych parametrów jest bardzo duże zróżnicowanie między powtórzeniami biologicznymi należącymi do tych samych obiektów. Przykładem może być mtz (masa tysiąca ziarniaków) gdzie są przynajmniej 3 rośliny znacząco odstające od pozostałych. Dane są dużo bardziej zrównoważone ale można również zauważyć, że rośliny odstające w jednym parametrze nie są odstającymi w innych.

Następnie wykonano analizę i macierz korelacji prezentującą zależności pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami. Dla poszczególnych parametrów wartości zostały wyliczone na podstawie współczynnika korelacji Spearmana. Tak jak w 2022 r. zaobserwowano w 2023 r. pozytywną korelację pomiędzy:

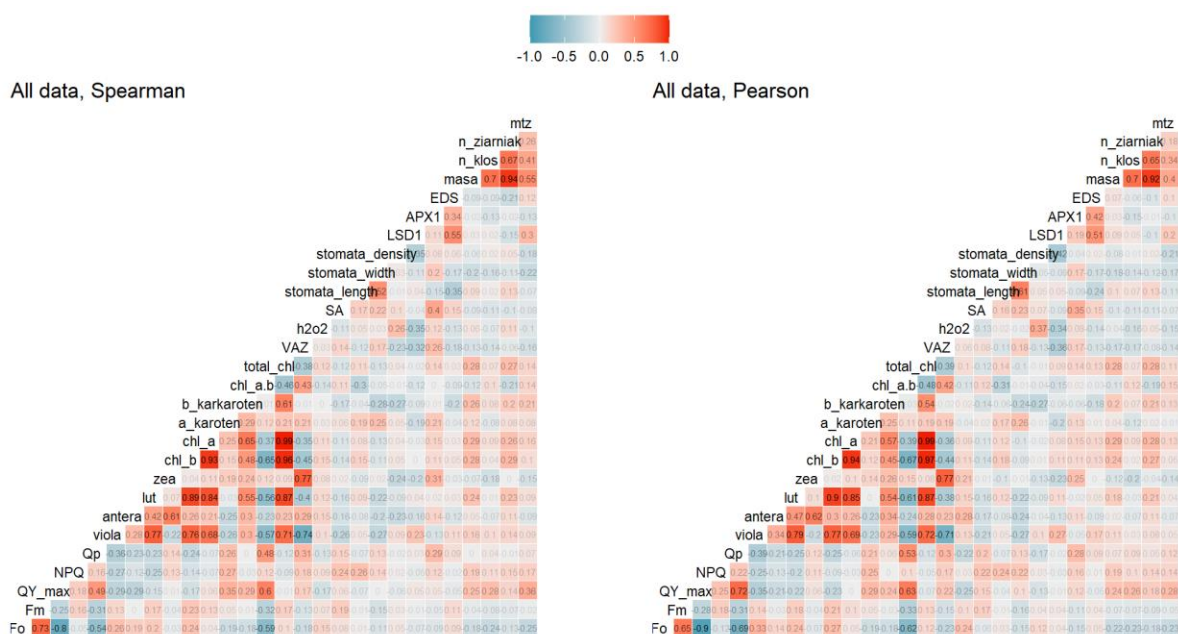
- wiolaksantyną a luteiną (0,61 2022 r., 0,79 2023 r.)
- wiolaksantyną a chlorofilem a (0,61 2022 r., 0,68 2023 r.) i chlorofilem b (0,67 2022 r., 0,76 2023 r.)
- ilością ziarniaków a masą ziarniaków (0,96 2022 r., 0,94 2023 r.)
- QYmax (F_v/F_m) a zawartością karotenu (0,47 2022 r., 0,35 2023 r.)
- QYmax (F_v/F_m) a stosunkiem chlorofilu a/b (0,51 2022 r., 0,6 2023 r.)

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

- zawartością karotenu a ilością kłosów (0,49 2022 r., 0,29 2023 r.)
- zawartością chlorofilu a a ilością kłosów (0,4 2022 r., 0,16 2023 r.)
- zawartością karotenu a masą tysiąca ziarniaków (0,33 2022 r., 0,21 2023 r.)
- QYmax (F_v/F_m) a ilością kłosów (0,3 2022 r., 0,23 2023 r.) i masą tysiąca ziarniaków (0,27 2022 r., 0,30 2023 r.)
- poziomem ekspresji genu LSD1 i EDS1 (0,55 2023 r.)

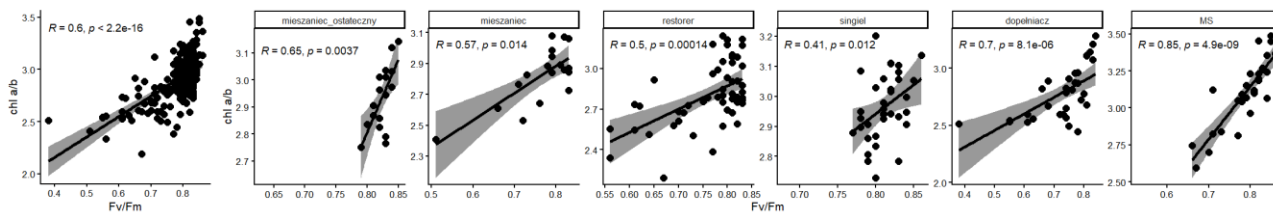
Z drugiej strony zaobserwowano negatywną korelację pomiędzy:

- F_0 a QYmax (F_v/F_m) (-0,79 2022 r., -0,9 2023 r.)
- zawartością nadtlenu wodoru a ilością kłosów (-0,3 2022 r., -0,16 2023 r.) i masą tysiąca ziarniaków (-0,32 2022 r., -0,16 2023 r.) (potwierdzone również z 2021 r.)
- zawartością nadtlenu wodoru a poziomem ekspresji genu LSD1 (-0,35 2023 r.)
- F_0 a ilością kłosów (-0,27 2022 r., -0,26 2023 r.)

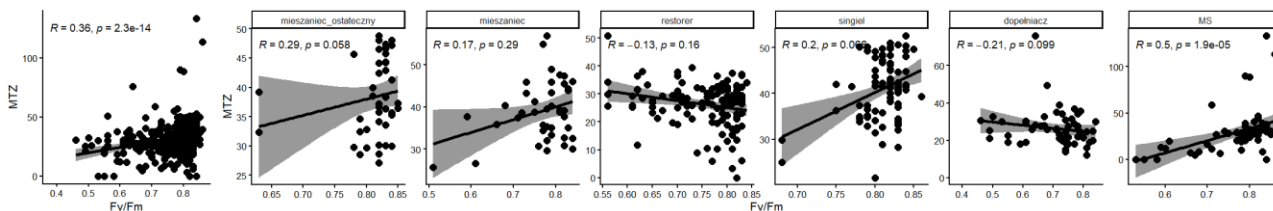


Rycina 2. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana i Pearsona pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem wszystkich analizowanych obiektów.

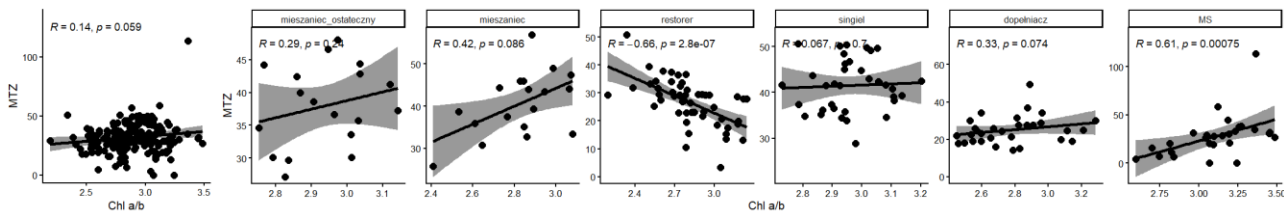
Porównywalnie do poprzednich lat największe korelacje występują w obrębie grup badanych parametrów (np. między różnymi barwnikami fotosyntetycznymi). Korelacje parametrów z różnych grup są znacznie mniejsze. Niemniej jednak zwraca uwagę, podobnie do danych z 2022 r., korelacja między Fv/Fm (QY_max) a stosunkiem chl a/b (chl_a.b) oraz obserwowana w tym roku pozytywna korelacja między ekspresją genu EDS i LSD oraz negatywna korelacja między ekspresją genu APX a liczbą kłosów. Wykresy przedstawiające te zależności znajdują się poniżej:



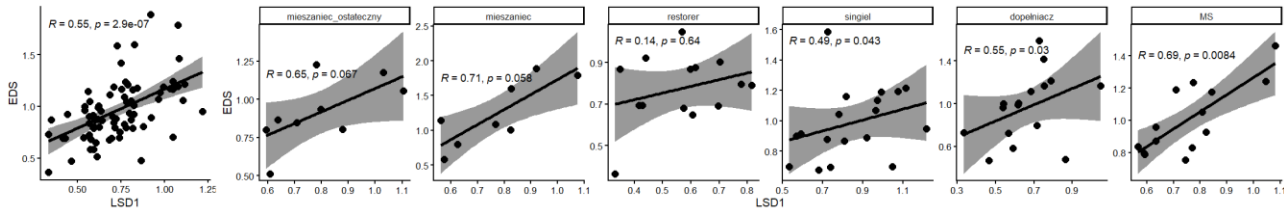
Rycina 3. Analiza korelacji między maksymalną wydajnością PSII (Fv/Fm) a stosunkiem chlorofiu a/b



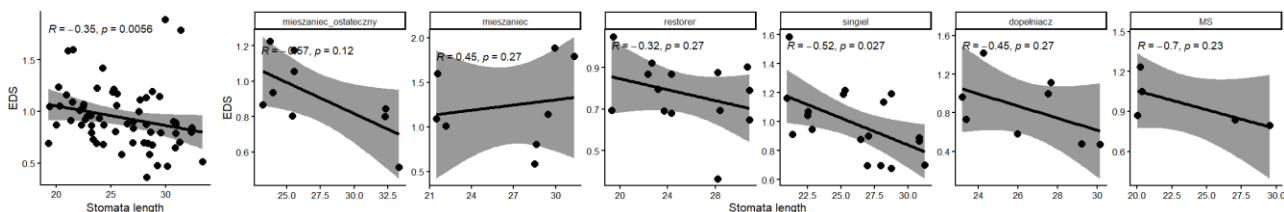
Rycina 4. Analiza korelacji między maksymalną wydajnością PSII (Fv/Fm) a masą tysiąca ziarniaków.



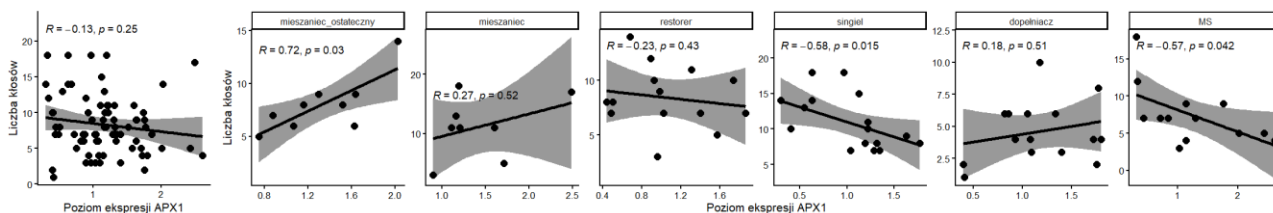
Rycina 5. Analiza korelacji między stosunkiem chl a/b a masą tysiąca ziarniaków.



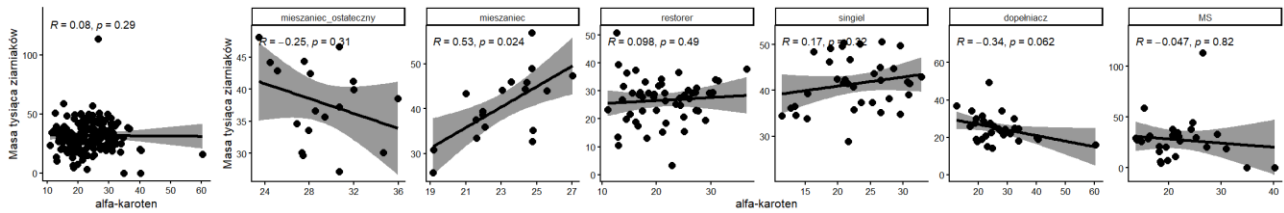
Rycina 6. Analiza korelacji między poziomem ekspresji LSD1 a EDS.



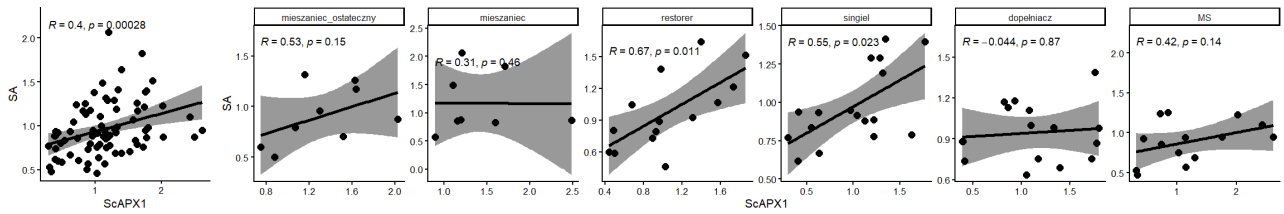
Rycina 7. Analiza korelacji między stosunkiem chl a/b a masą tysiąca ziarniaków.



Rycina 8. Analiza korelacji między poziomem ekspresji APX1 a liczbą kłosów.



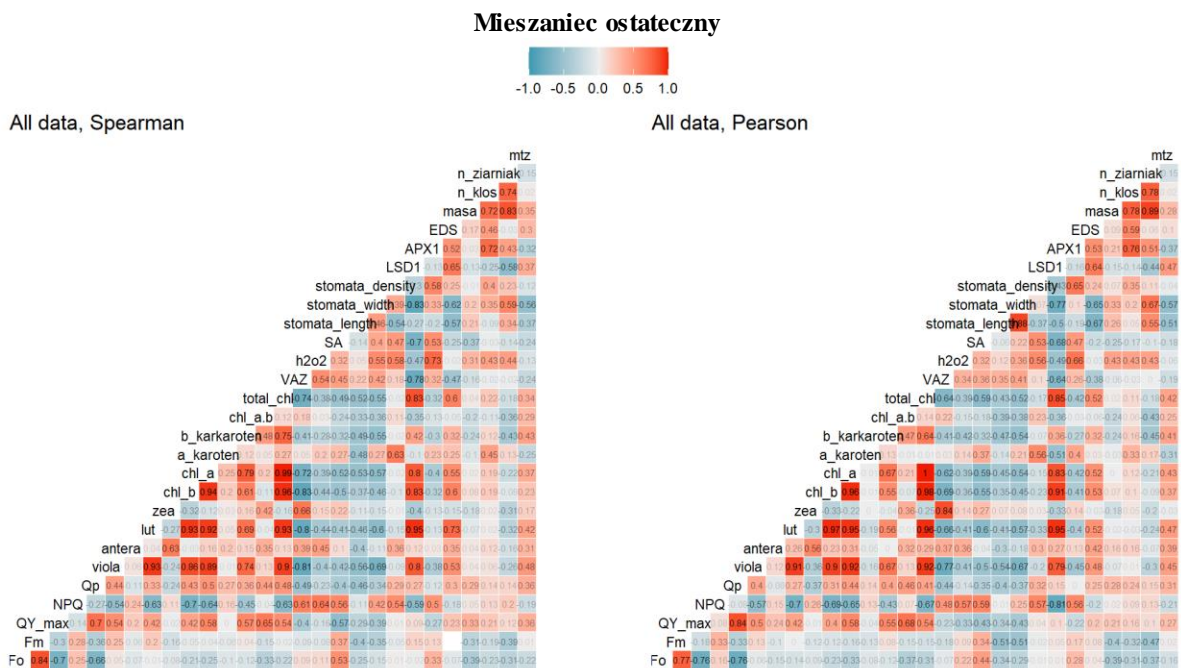
Rycina 9. Analiza korelacji między alfa-karotenu a masą tysiąca ziarniaków.



Rycina 10. Analiza korelacji między maksymalną poziomem ekspresji ScAPX1 a zawartością kwasu salicylowego

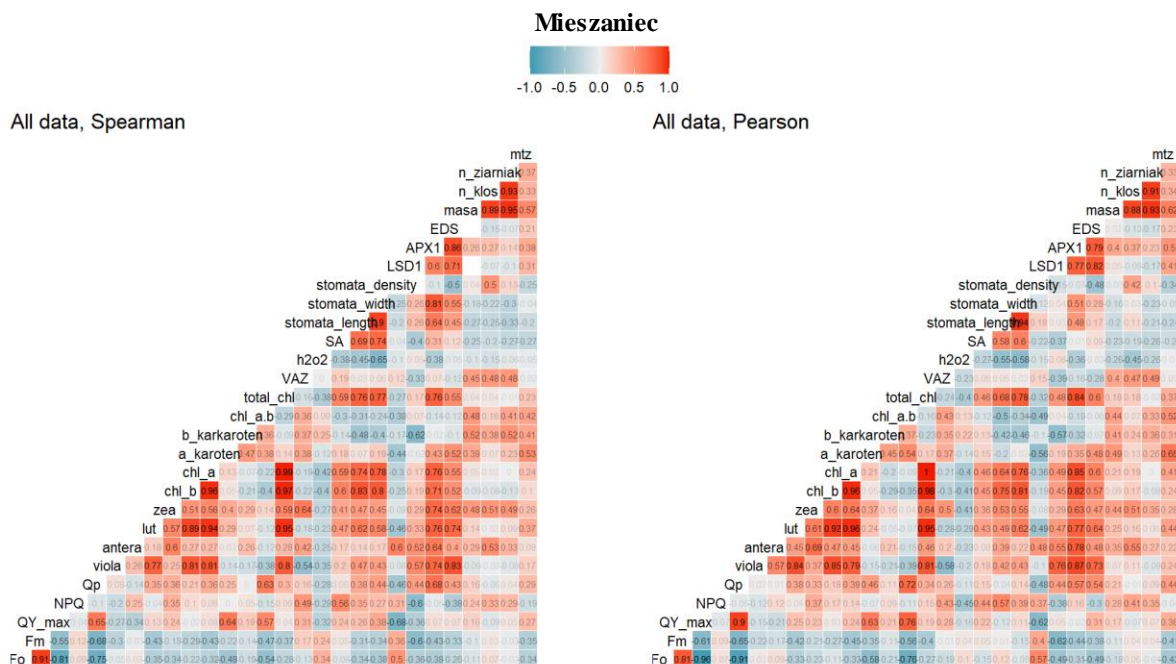
Poniżej zaprezentowano macierze korelacji Spearmana po analizie dla poszczególnych analizowanych grup (M – mieszaniec końcowy; R – restorer; S – singiel; D – dopełniacz; MS – linia męsko sterylna)

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 mieszańca, miesza ostatecznego, oraz w liniach męsko sterylnych (MS).



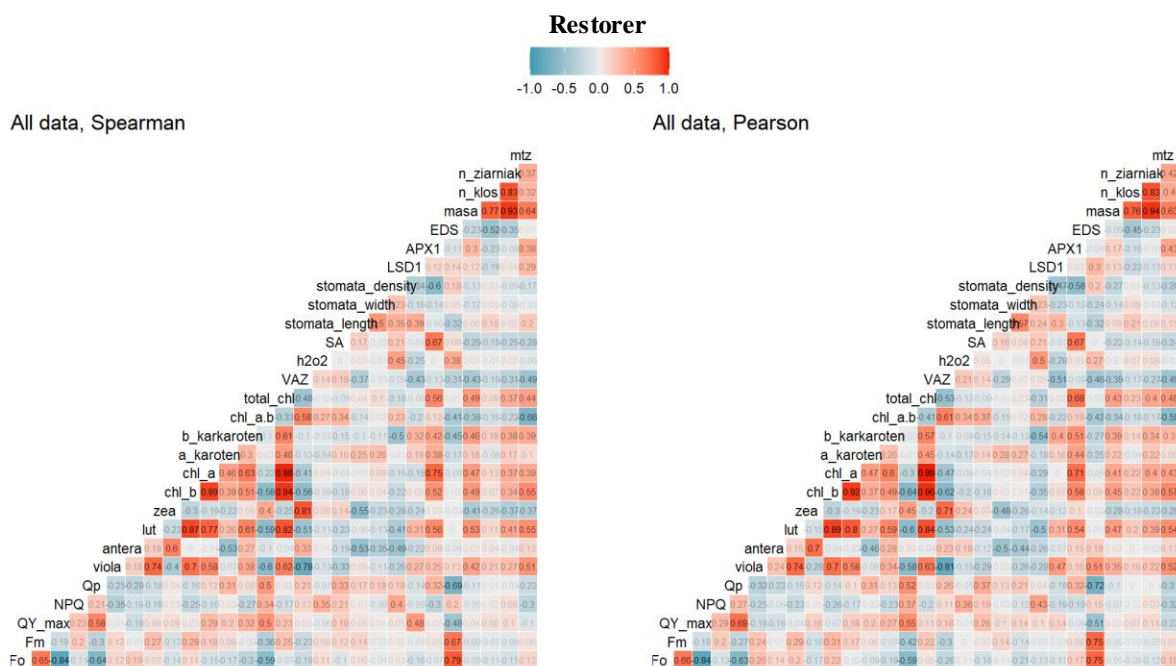
Rycina 11. Analiza korelacji dla wszystkich mierzonych parametrów na wszystkich danych w obrębie roślin mieszaniec ostateczny.

W grupie mieszańców ostatecznych należy zwrócić uwagę na wyraźną pozytywną korelację pomiędzy barwnikami fotosyntetycznymi a parametrami plonu (z wyjątkiem $a_{karotenu}$), zwłaszcza ilością kłosów oraz ilością i masą ziarniaków. Istotnie wysoką pozytywną korelację genów: EDS i LSD oraz pozytywny wpływ ekspresji tych genów na zawartość chlorofili, luteiny oraz violaksantyny. Z drugiej strony obserwujemy istotnie negatywną korelację pomiędzy zawartością chlorofili, pigmentów, wydajnością fotosyntetyczną (QY_{max} , Qp), ekspresją genów EDS i LSD a zawartością H_2O_2 , kwasu salicylowego oraz długością i szerokością aparatów szparkowych. Zauważalny jest również przeciwny wpływ ekspresji genu APX1 w porównaniu do ekspresji genów EDS i LSD na korelację dla wszystkich mierzonych parametrów.



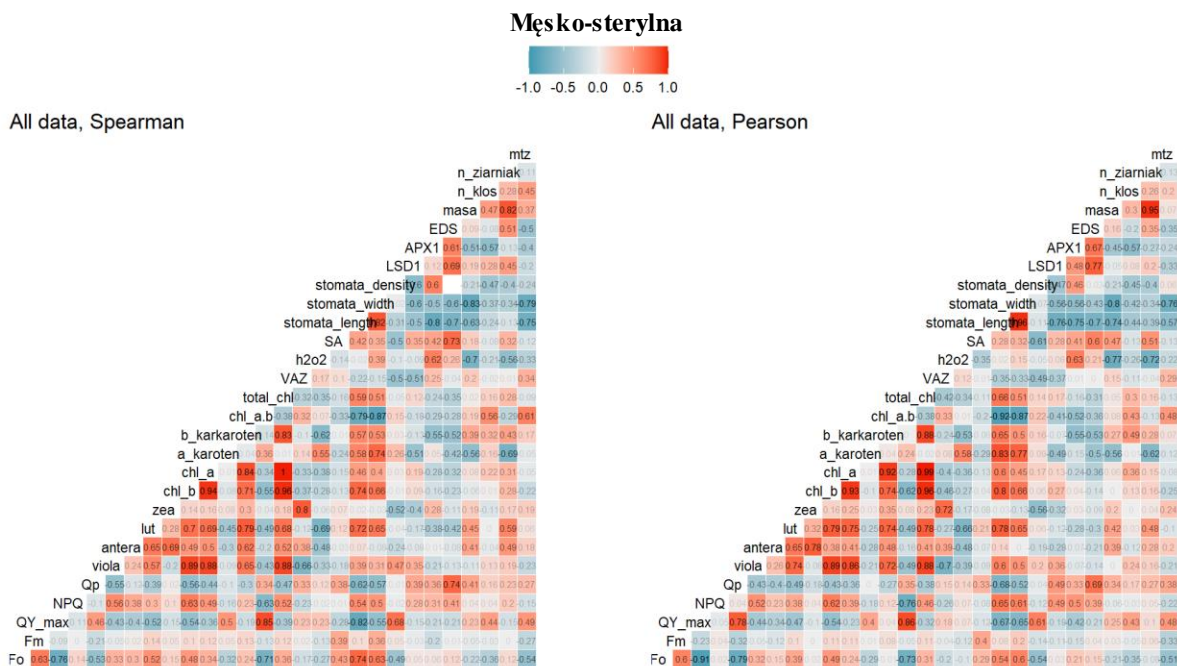
Rycina 12. Analiza korelacji dla wszystkich mierzonych parametrów na wszystkich danych w obrębie roślin mieszańców

W grupie mieszańców na uwagę zasługuje wyraźna pozytywna korelacja pomiędzy masą tysiąca ziarniaków (mtz) a zawartością barwników – chlorofilu a (0,56 w 2022 r. 0,41 w 2023 r.), chlorofilu b (0,53 w 2022 r. 0,24 w 2023 r.), karotenu (0,62 w 2022 r. 0,53 w 2023 r.) oraz QYmax (0,51 w 2022 r. 0,31 w 2023 r.). Obserwujemy istotną korelację pozytywną między ekspresją genów EDS, APX i LSD (0,86; 0,6) oraz pozytywną korelację ekspresji tych genów z zawartością chlorofilu, a karotenu, cyklem VAZ oraz wydajnością fotosyntetyczną (Qp).



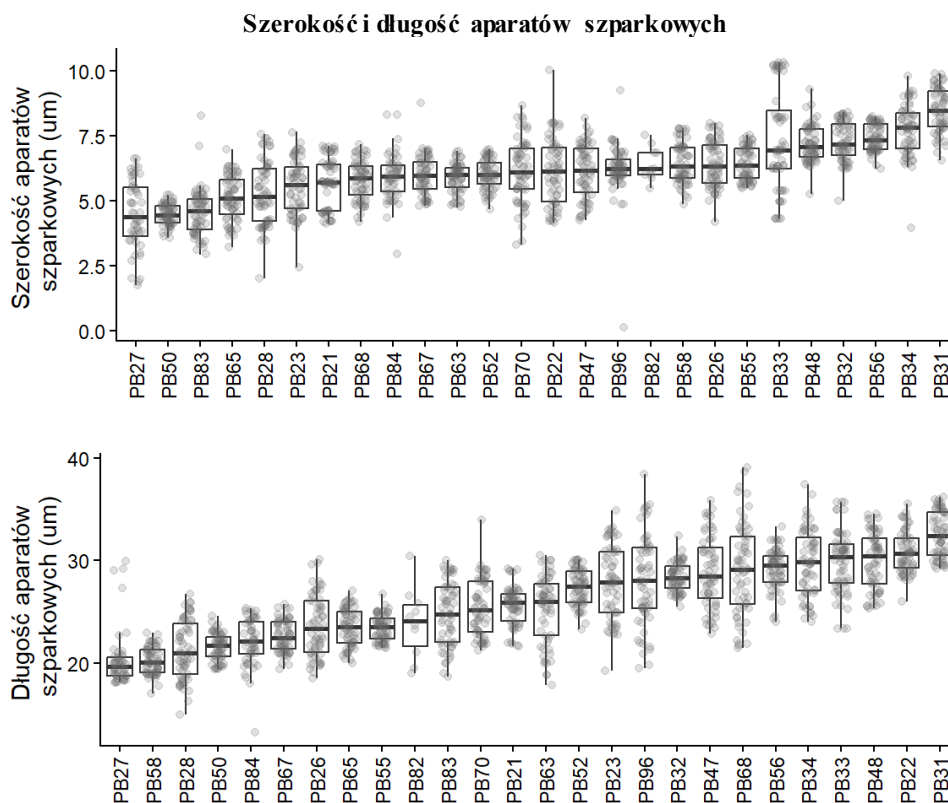
Rycina 13. Wykres obrazujący współczynnik korelacji pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych restorerów.

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 w 2022 r. 0,54 w 2023 r.) i chlorofilem b (0,43 w 2022 r. 0,57 w 2023 r.) oraz wyraźna negatywna korelacja między masą tysiąca ziarniaków a stosunkiem chlorofilu a do chlorofilu b (-0,64 w 2022 r. -0,66 w 2023 r.). Zaobserwowaliśmy również pozytywną korelację poziomu ekspresji APX1 z mtz (0,43) i zawartością kwasu salicylowego (0,67) oraz mocną negatywną korelację poziomu ekspresji EDS1 z liczbą kłosów (-0,52).



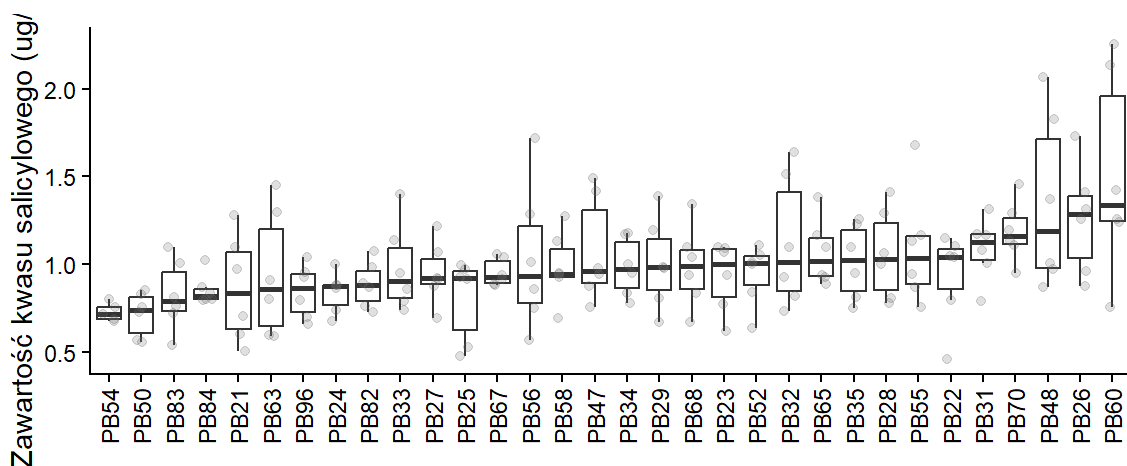
Rycina 16. Wykres obrazujący współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy wszystkimi mierzonymi parametrami z uwzględnieniem analizowanych MS.

W grupie linii męsko-sterylnych zaobserwowano wyraźną pozytywną korelację pomiędzy QYmax (F_v/F_m) a masą tysiąca ziarniaków (0,85 w 2022 r. a 0,5 w 2023 r.). W tej grupie QYmax jak i luteina, stosunek chl a/b pozytywnie korelują również z innymi parametrami plonu. Natomiast długość, szerokość oraz liczba aparatów szparkowych, Fo i H2O2 jak i poziom ekspresji APX1 negatywnie korelują z parametrami plonu. Ekspresja genów EDS, LSD i APX1 pozytywnie koreluje z zawartością kwasu salicylowego.



Rycina 17. Długość oraz szerokość aparatów szparkowych w analizowanych obiektach. Analizowano 6 roślin z każdego obiektu, w każdej roślinie mierzono 10 aparatów szparkowych. Zaobserwowano ponad 30% różnice w parametrach długości i szerokości aparatów szparkowych.

Zawartość kwasu salicylowego

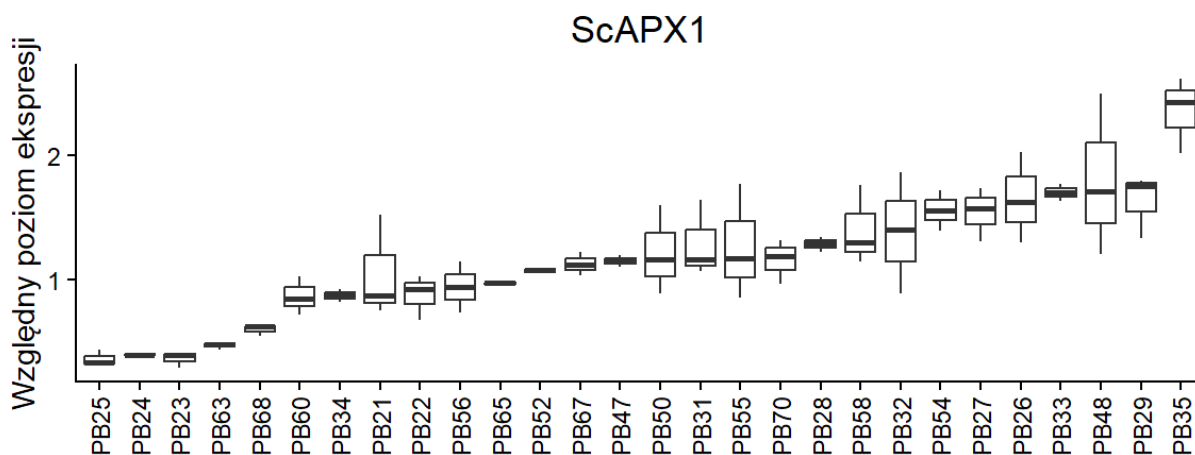


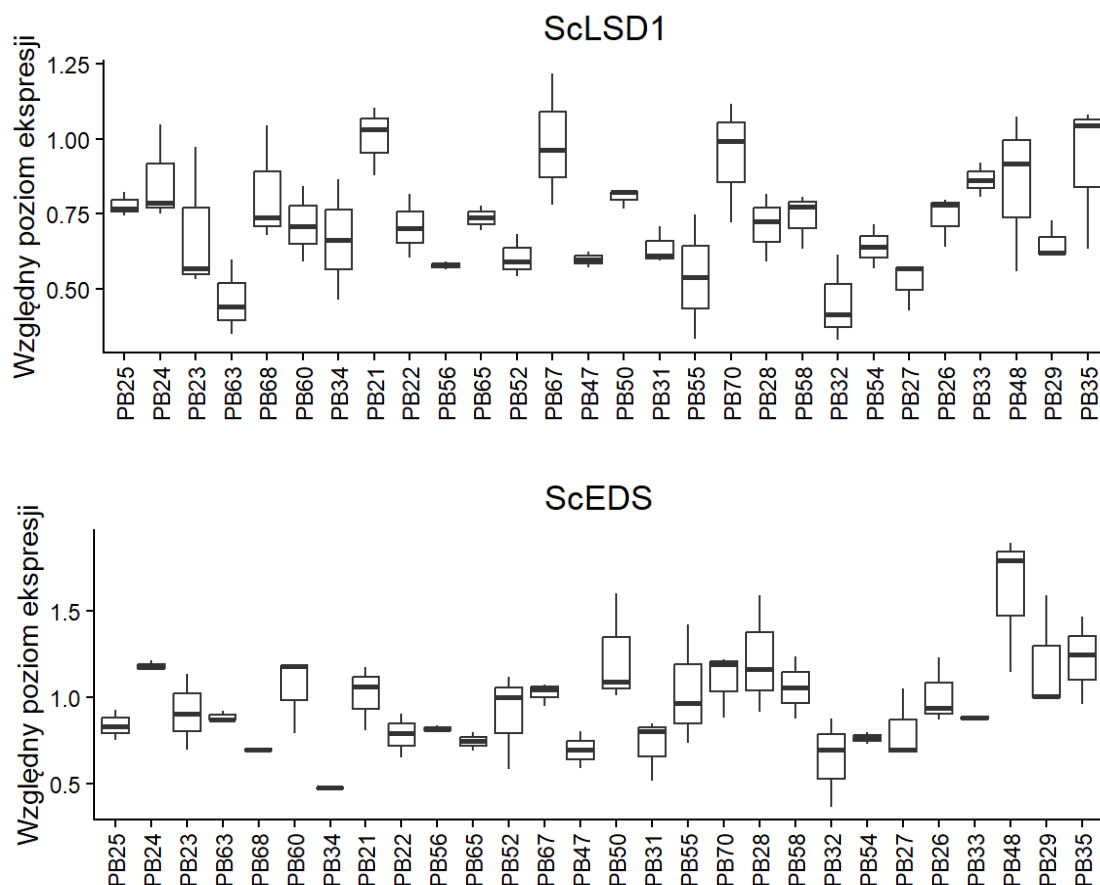
Rycina 18. Zawartość kwasu salicylowego w analizowanych obiektach. Analizowano 6 roślin z każdego obiektu.

Poziom ekspresji badanych genów

Przeanalizowano ekspresję 3 genów w odniesieniu do 2 genów referencyjnych we wszystkich obiektach. Dla każdego obiektu badano 3 powtórzenia biologiczne. Eksperyment wykonano w 3 powtórzeniach technicznych. Listę primerów przedstawiono w tabeli poniżej:

Nazwa genu	Rola	Primer F	Primer R
ScACT	Gen referencyjny	CCCCTTTGAACCCAAAAGCC	GAAAGCACGGCCTGAATAGC
ScADP-RFa	Gen referencyjny	TTCATGGTTGGTCTCGATG	GGATGGTGGTGACGATCTCT
ScLSD1	Gen badany	ATGCATGCACCAAACGGAAAT	ACGTTGCTCA CCA GTTTTCC
ScAPX1	Gen badany	CTGAGTGGGGAGAA GGAAGG	CCGCA GCATATTTGTCCACA
ScEDS	Gen badany	CATCATGCCACTGGACATCA	ACAAGCGAATTCCCAACAGG





Zaobserwowano ponad 7-krotną różnicę poziomu ekspresji ScAPX1 w badanych obiektach żyta. Podobnie zaobserwowano dla ScLSD1 i ScEDS1.

Wnioski

1. W mieszańcu ostatecznym znaleziono silne pozytywne korelacje między chl. a/b a parametrem fluorescencji chlorofilu QYmax (Fv/Fm) oraz między QYmax a masą tysiąca ziaren (mtz), co jest obiecujące dla osiągnięcia celów projektu.
2. Zaobserwowano powtarzającą się pozytywną korelację między ekspresją genu ScAPX1 i zawartością kwasu salicylowego zarówno w mieszańcu ostatecznym, jak i restorerze i singlu.
3. Znaleziono słabsze pozytywne korelacje pomiędzy mtez oraz innymi parametrami plonu a QYmax i niektórymi barwnikami fotosyntetycznymi w liniach MS, mieszańcach i singlach, natomiast te same korelacje są negatywne w przypadku restorera.
4. Biorąc pod uwagę, że mieszaniec ostateczny F1 powstaje jako rezultat skrzyżowania restorera z singlem, należy zwrócić uwagę na następujące przeciwstawne korelacje:
 - a. masy tysiąca ziaren (mtz) i parametru QYmax, gdzie mamy odwrotną zależność między singlem a restorerem i powstałym mieszańcem ostatecznym.
 - b. poziomem ekspresji genów ScAPX1, ScLSD1 i ScEDS1 a parametrami plonu, które również różnie korelują w singlu, restorerze i mieszańcu ostatecznym.
 - c. QYmax z mtez oraz innymi parametrami plonu, które występują na średnio-pozytywnym poziomie w singlu, podczas gdy te korelacje są różne (pozytywne lub negatywne) u MS i dopełniacza, komponentach z których po krzyżowaniu powstaje singiel.
 - d. podobnie parametry aparatów szparkowych korelują przeciwstawnie w singlu i dopełniaczu versus MS.
5. Największe korelacje występują w obrębie grup badanych cech (np. barwniki fotosyntetyczne, plonowanie), co wskazuje na prawidłowo wykonane pomiary i analizy w kolejnych latach. Pozostałe mierzone parametry nie wykazują istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami.
6. Analiza korelacji większości badanych cech jest powtarzalna między latami.
7. Powyższe rezultaty wskazują, że wprowadzenie do hodowli żyta nowych fizjologicznych markerów, w tym markerów mierzonych telemetrycznie, jak QYmax, mierzonych na wczesnym etapie rozwoju rośliny koreluje z masą 1000 ziaren i innych parametrów plonu mierzonych wiele miesięcy później po zbiorze. To może umożliwić przyspieszenie procesu hodowli nowych odmian żyta i zredukować koszt hodowli nowych odmian.

Literatura

- Bernacki MJ et al., 2018, *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>
Wituszynska W et al., *Plant Physiol.* 2013 Apr;161(4):1795-805. doi: 10.1104/pp.112.208116

4. Mierniki dla zadania - prezentacja wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	miernik ⁴	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	-	-	-	-
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	miernik ⁵	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	-	-	-	-

Załączniki⁶:

1. Kserokopia plakatu/ artykułu -

5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy

Wyniki badań dla wszystkich zadań są dostępne na stronie internetowej
<http://kghibr.sggw.pl/pl/badania/sprawozdania-z-projektow>

⁴ Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

⁵ Podać, czy chodzi o publikację oryginalną, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.

⁶ Podać listę oraz dołączyć do sprawozdania kopie posterów/wyciągi z materiałów konferencyjnych/publikacje etc. W nawiasie podać, na której stronie sprawozdania znajdują się prezentowane wyniki.

6. Mierniki zadania – stopień realizacji

Lp.	Miernik ⁷	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Parametr RFD (Fm/Fs) dla 29 komponentów żyta	348 pomiary	348	100%
1.2	Parametr QYmax (=Fv/Fm) dla 29 komponentów żyta	348 pomiary	348	100%
1.3	Parametr Qp Fm'/Fs dla 29 komponentów żyta	348 pomiary	348	100%
1.4	Parametr NPQ dla 29 komponentów żyta	348 pomiary	348	100%
1.5	Parametr gs (wymiana gazowa) żyta	174 pomiary	174	100%
1.6	Plon nasion z danego komponentu żyta	348 pomiary	348	100%
1.7	Pigmenty	174 pomiary	174	100%
temat badawczy 2				
2.1	Pomiar SA w liściach	174 pomiary	174	100%
2.2	Pomiar H ₂ O ₂ w liściach	174 pomiary	174	100%
2.3	Pośredni pomiar wymiany gazowej (długość oraz szerokość aparatów szparkowych) i liczby aparatów szparkowych na jednostkę powierzchni liścia.	174 pomiary	174	100%
2.4	Pomiar poziomu ekspresji dla 5 genów (APX1, EDS1, LSD1 oraz dwóch genów referencyjnych)	1305 reakcji	1305	100%
temat badawczy 3				
3.1	Funkcja zależności SA lub H ₂ O ₂ lub gs lub liczby aparatów szparkowych lub QYmax lub chl a/b od plonowania.	1	1	100%
ŚREDNIA			1,0	
% REALIZACJI ZADANIA			100%	

⁷ Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

Sporządzono: Warszawa, 08.01.2024

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

podpis i pieczęć

podpis