Nr zadania:
106

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2018 roku

A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania: **Wpływ stresu niedoboru wody na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)**
Numer zadania: **106** (w załączniku nr 3 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 lipca 2017 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa; Dz. U. 2017, poz. 1470)
Planowany okres realizacji zadania: **2018 r.**
Planowane nakłady w zł: 181 200,00

B. DANE WNIOSKODAWCY

Bogdan Wolko, prof. dr hab., Dyrektor Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60479 Poznań Tel. 61 6550 255 Email – office@igr.poznan.pl

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Anetta Kuczyńska	dr hab., prof. IGR PAN	Zespół Fenotypowania i Genotypowania Zbóż, Zakład Biotechnologii, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Tadeusz Adamski Maria Surma Krzysztof Mikołajczak Piotr Ogrodowicz Michał Kempa Hanna Ćwiek-Kupczyńska Renata Trzeciak Renata Holewińska Alina Anioła	prof. dr hab. prof. dr hab. dr inż. dr mgr mgr inż. mgr prac. techniczny prac. techniczny	Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

2. Kierownik zadania

Anetta Kuczyńska, Instytut Genetyki Roślin PAN, ul Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
e-mail : akuc@igr.poznan.pl, telefon 61- 6550331

W razie nieobecności kierownika:
Maria Surma, Instytut Genetyki Roślin PAN, ul Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
e-mail : msur@igr.poznan.pl, telefon 61- 6550241

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

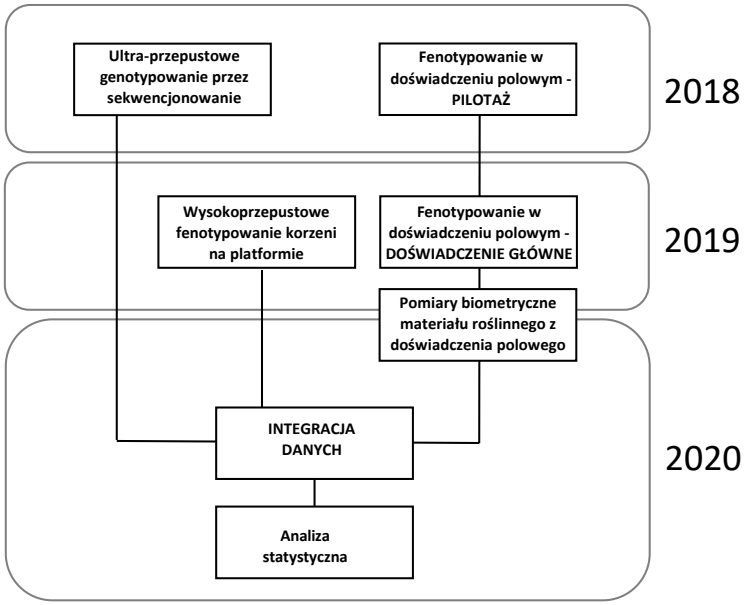
Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie[1]/częściowo[1])
1.	Ultra-przepustowe genotypowanie przez sekwencjonowanie – 150 genotypów jęczmienia jarego.	tak
2.	Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym – pilotaż; opracowanie metodyki analiz systemu korzeniowego materiału roślinnego prowadzonego w warunkach polowych.	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
1.	Ultra-przepustowe genotypowanie przez sekwencjonowanie – 150 genotypów jęczmienia jarego.	12 miesięcy (1.01.2018-31.12.2018)	120 200 zł
2.	Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym – pilotaż; opracowanie metodyki analiz systemu korzeniowego materiału roślinnego prowadzonego w warunkach polowych.	7 miesięcy (1.03.2018-30.09.2018)	61 000 zł
		Razem	181 200,00

[1] Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

3. Opis tematów badawczych



Rysunek 1. Schemat projektu

3. 1. Temat badawczy 1

Cel tematu badawczego 1

Celem tematu było uzyskanie danych genotypowych 150 form jęczmienia jarego w oparciu o najnowsze metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS), tj. genotypowanie przez sekwencjonowanie (GBS).

Materiały i metody

Izolację genomowego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Wizard Genomic DNA Purification Kit firmy Promega. Materiał roślinny do izolacji DNA pozyskano z 14-dniowych siewek. Fragmenty liści (ok. 40 mg) umieszczano w ciekłym azocie w moździerzu i następnie roztarto na proszek, który przeniesiono do 1,5 ml probówek. Po dodaniu 600 µl Nuclei Lysis Solution próby inkubowano przez 15 minut w temperaturze 65ºC. W kolejnym etapie do probówek dodano 3 µl RNAse Solution, a następnie po delikatnym wymieszaniu ponownie inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37ºC. Po podaniu 200 µl Protein Lysis Solution i intensywnym wymieszaniu probówki wirowano przez 3 minuty przy 14 000 rpm. Otrzymany supernatant zawierający DNA przeniesiono do 1,5 ml probówek, w których uprzednio umieszczono izopropanol (600 µl) i mieszano celem wytrącenia DNA. Następnie po wirowaniu (1 minuta, 14 000 rpm) i usunięciu izopropanolu dodano 70% etanol (600 µl) celem oczyszczenia osadu (DNA). Probówki ponownie wirowano w tych samych warunkach i na koniec usunięto etanol. Wyizolowany DNA rozpuszczono w 100 µl DNA Rehydration Solution i przechowywano w temperaturze -70ºC do dalszych analiz. Analizę GBS zlecono firmie zewnętrznej.

Wyniki

Wyniki koncentracji DNA dla poszczególnych form jęczmienia jarego przedstawiono w tabeli 1. Zastosowana procedura izolacji pozwoliła uzyskać stężenie DNA w zakresie od 112 ng/µl (Stratus) do 2043 ng/µl (Kormoran). Na podstawie absorbancji zmierzonej przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoFisher) stwierdzono, że analizowane próby

wykazały odpowedni stopień oczyszczenia, za wyjątkiem ośmiu prób, których stężenie DNA oraz stopień oczyszczenia okazały się zbyt niskie. Genotypy tych ośmiu prób ponownie wysiano, po około dwóch tygodniach liście zebrano, a następnie DNA na nowo wyizolowano i poddano odpowiednim procedurom oceny jakości. Etap ten był kluczowy dla prawidłowego przebiegu sekwencjonowania, ponieważ zastosowanie metody GBS wymaga wysokiej jakości i czystości DNA.

Brak zanieczyszczenia oznacza stosunek wartości absorpcji:

(i) A260/A280 w zakresie 1,8-2,0 – dla białek;
(ii) A260/230 oscylujący wokół 2,0 – dla soli czy węglowodorów.

Celem uzyskania jednolitego stężenia DNA próby wystandaryzowano poprzez rozcieńczenie wodą ultraczystą (Direct Q3 UV System), a następnie umieszczono w dwóch płytkach 96-dołkowych w określonym porządku (rysunek 2).

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Basic	KWS Dante	STH10816	MHR-PJ-1415	MPW14/7	Arthur	Ramzes	Fairytale	Aurora	Fariba	Basza	STH5.2502
B	DC17-3	Beatrix	STH4.1525	MPW15/4	STH10315	MCam 71	MHR PJ 1615	MPW14/19	MCam 75	DC17-2	Signora	STH4.1105
C	TEKSAS	Blask	DC17-9	DM-13	ATICO	STH4.1202	Bente	DM-12	MPS106	DC17-1	POB 565/14	Delphi
D	STH5.2565	CamB	Maresi	Vienna	DC17-4	Goodluck	Estana	Żeglarz	DC17-5	Natasia	DM-15	DM-18
E	Concerto	Radek	POB 2050/14	KWS Olof	Elixia	Kucyk	MHR PJ 1716	Prestige	DC17-8	Zeppelin	MHR PJ 1916	Rubaszek
F	STH4.1642	Marthe	POB 593/14	Niagara	MPS37	STH4.346	BW827	Orthega	Skarb	Despina	Agrippina	KWS Fabienne
G	Lukhas	POB 13379/14	Irone	Justina	POB 123405/14	Evelina	POB 13149/14	MCam 87	STH4.1285	MPW14/9	Arodite	Skald
H	Frontier	BW828	Aksamit	Quench	Sweren	Conchita	Tyra	KWS Orphelia	Barke	Olympic	Serwal	Raskud

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STH10716	Keops	Bowman	Vendela	Lubuski	Nagradowicki	Airway	DM-19	CHAIN	Espinosa	DC17-7	Stratus
B	STH1016	Grace	Soldo	STH4.1523	DM-11	MHR PJ 1816	POB 9917/14	DC17-10	Rosalina	DM-20	MHR PJ 2016	Kormoran
C	Rufus	Argento	DM-14	MHR PJ 2116	Allianz	STH4.1691	Ella	STH5.2638	Class	KWS Vermont	Eliseta	Clooner
D	POB 13085/14	Podarek	Xanadu	POB 2718/12	MHR PJ 2216	Francin	DM-17	POB 623/14	POB 1157/14	Mcam 53	Eifel	Granal
E	Tocada	Crosseway	DM-16	Wiebke	Steward	Rubinek						
F												
G												
H												

Rysunek 2. Układ 150 prób DNA jęczmienia jarego na płytkach 96-dołkowych przygotowanych do sekwencjonowania

Zamrożone próby przetransportowano w kontrolowanych warunkach, tj. w suchym lodzie (-20ºC), do LGC Group, Berlin, Niemcy, gdzie wykonano usługę genotypowania przez sekwencjonowanie (GBS). Bibilioteki DNA do sekwencjonowania przygotowano za pomocą protokołu ddRAD-Seq, czyli trawienia z wykorzystaniem dwóch rodzajów enzymów (PstI oraz MspI) wraz z etykietowaniem za pomocą tzw. „barcode" (Poland i in 2012). W pierwszym etapie wykonano przygotowanie biblioteki DNA wraz z indeksowaniem, a następnie wykonano analizę GBS wykorzystując technologię *NextSeq 500* stosując głębokość sekwencjonowania przypadająca na pojedynczą próbkę 3 M odczytów. Podczas procedury GBS wykonano dwa rodzaje analiz:

- projekt pilotażowy: ocena konstruktów GBS/ddRAD wraz z rekomendacją głębokości odczytu (1,5 - 3 milionów odczytów na próbkę) z wykorzystaniem pięciu losowo wytypowanych próbek,
- projekt główny: wykonanie właściwej analizy z wykorzystaniem zestawu 150 genotypów jęczmienia z zastosowaniem rekomendacji uzyskanych w ramach analizy projektu pilotażowego.

Surowe dane (raw data) z sekwencjonowania (w formacie FASTQ) poddano kontroli dotyczącej jakości odczytów oraz jakości par zasad w odczytach.

Tabela 1. Stężenie DNA dla analizowanych genotypów jęczmienia jarego

Lp.	Genotyp	Stężenie (ng/µl)	Lp.	Genotyp	Stężenie (ng/µl)	Lp.	Genotyp	Stężenie (ng/µl)
1.	Basic	606	51.	POB 2050/14	874	101.	Lubuski	508
2.	KWS Dante	664	52.	KWS Olof	267	102.	Nagradowicki	708
3.	STH10816	593	53.	Elixia	930	103.	Aiway	528
4.	MHR-PJ-1415	250	54.	Kucyk	667	104.	DM-19	152
5.	MPW14/7	1446	55.	MHR PJ 1716	1138	105.	Chain	562
6.	Arthur	1205	56.	Prestige	706	106.	Espinosa	1448
7.	Ramzes	1193	57.	DC17-8	1502	107.	DC17-7	1158
8.	Fairytale	674	58.	Zepplin	966	108.	Stratus	112
9.	Aurora	888	59.	MHR PJ 1916	730	109.	STH1016	1096
10.	Fariba	428	60.	Rubaszek	363	110.	Grace	1092
11.	Basza	1172	61.	STH4.1642	754	111.	Soldo	406
12.	STH5.2502	757	62.	Marthe	1192	112.	STH4.1523	1326
13.	DC17-3	925	63.	POB 593/14	1343	113.	DM-11	604
14.	Beatrix	734	64.	Niagara	671	114.	MHR PJ 1816	635
15.	STH4.1525	1297	65.	MPS37	577	115.	POB 9917/14	917
16.	MPW15/4	1000	66.	STH4.346	937	116.	DC17-10	670
17.	STH10315	496	67.	BW827	593	117.	Rosalina	583
18.	MCam71	770	68.	Orthega	326	118.	DM-20	888
19.	MHR PJ 1615	395	69.	Skarb	471	119.	MHR PJ 2016	679
20.	MPW14/19	547	70.	Despina	302	120.	Kormoran	2043
21.	MCam75	1202	71.	Agrippina	185	121.	Rufus	388
22.	DC17-2	890	72.	KWS Fabienne	1243	122.	Argento	502
23.	Signora	1068	73.	Lukhas	1004	123.	DM-14	821
24.	STH4.1105	565	74.	POB 13379/14	233	124.	MHR PJ 2116	1201
25.	Teksas	507	75.	Irone	1259	125.	Allianz	874
26.	Blask	981	76.	Justina	423	126.	STH4.1691	915
27.	DC17-9	867	77.	POB 123405/14	448	127.	Ella	1053
28.	DM-13	448	78.	Evelina	805	128.	STH5.2638	1010
29.	Atico	1013	79.	POB13149/14	804	129.	Class	1347
30.	STH4.1202	319	80.	MCam 87	855	130.	KWS Vermont	638
31.	Bente	1695	81.	STH4.1285	655	131.	Eliseta	1102
32.	DM-12	427	82.	MPW14/9	1007	132.	Clooner	721
33.	MPS106	1127	83.	Afrodite	646	133.	POB 13085/14	667
34.	DC17-1	875	84.	Skald	1147	134.	Podarek	997
35.	POB 565/14	875	85.	Frontier	750	135.	Xanadu	1014
36.	Delphi	751	86.	BW828	918	136.	POB 2718/12	337
37.	STH5.2565	1189	87.	Aksamit	1160	137.	MHR PJ 2216	911
38.	CamB	1625	88.	Quench	1109	138.	Francin	1442
39.	Maresi	1062	89.	Suweren	1240	139.	DM-17	541
40.	Vienna	1338	90.	Conchita	1136	140.	POB623/14	1137
41.	DC17-4	854	91.	Tyra	1030	141.	POB 1157/14	1198
42.	Goodluck	1096	92.	KWS Orphelia	1053	142.	MCam53	1013
43.	Estana	1087	93.	Barke	140	143.	Eifel	639
44.	Żeglarz	1005	94.	Olympic	557	144.	Granel	225
45.	DC17-5	443	95.	Serwal	306	145.	Tocada	733
46.	Natasia	517	96.	Raskud	245	146.	Crosseway	856
47.	DM-15	1003	97.	STH10716	1430	147.	DM-16	799
48.	DM-18	1044	98.	Keops	1644	148.	Wiebke	814
49.	Concerto	951	99.	Bowman	1266	149.	Steward	1049
50.	Radek	1305	100.	Vendela	198	150.	Rubinek	1140

Dyskusja

Dane uzyskane z GBS posłużą do zadań przewidzianych w projekcie, w tym umożliwią szczegółową analizę zróżnicowania genetycznego w obrębie wybranej puli form jęczmienia jarego. Obecnie GBS stanowi najbardziej odpowiednie narzędzie do analizy roślin o dużych genomach (Elshire i in. 2011) generując nieporównywalnie większą liczbę markerów SNP w porównaniu do innych metod. Możliwość identyfikacji olbrzymiej liczby markerów SNP w genomie wydatnie zwiększa poznanie tła genetycznego badanych roślin, a tym samym wpływa na precyzję analizy sprzężeń marker/cecha. Wykorzystanie nowych technik sekwencjonowania do identyfikacji związku markerów DNA z cechami fenotypowymi zyskuje na znaczeniu, o czym świadczą liczne doniesienia literaturowe dotyczące badań asocjacyjnych – GWAS (ang. genome-wide association study) (Scherer i Christensen 2016, Sharma i in. 2018). Mutacja pojedynczego nukleotydu w genie może być odpowiedzialna za zmiany funkcji tego genu, co w konsekwencji może prowadzić do różnic fenotypowych. Polimorfizm SNP jest warunkiem powiązania tła genetycznego z ważnymi cechami fenotypowymi. Dane fenotypowe otrzymane w ramach proponowanego projektu zostaną zintegrowane z wynikami genotypowymi uzyskanymi w oparciu o genotypowanie przez sekwencjonowanie celem identyfikacji sprzężeń markerów SNP z obserwowanymi cechami. Markery takie, o wysokim stopniu sprzężenia z cechą, mogą być użyte w procesie selekcji wspomaganej markerami dając możliwość wyodrębnienia genotypów mogących stanowić odpowiedni materiał wyjściowy do prac nad wytworzeniem odmian o korzystniejszych cechach fenotypowych, w tym o lepiej rozwiniętym systemie korzeniowym, a zarazem bardziej odpornych na suszę. Jest to tym ważniejsze, że w przeciwieństwie do części nadziemnej selekcja w kierunku systemu korzeniowego o określonych właściwościach nie może być oparta na bezpośredniej obserwacji.

Mierniki dla tematu badawczego 1:

Lp.	miernik[2]	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Ultra-przepustowe genotypowanie przez sekwencjonowanie	150 form jęczmienia jarego	150 form jęczmienia jarego

3. 2. Temat badawczy 2

Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym – pilotaż

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu było opracowanie metodyki analiz systemu korzeniowego materiału roślinnego prowadzonego w warunkach polowych.

Materiały i metody

Pilotaż w pierwszym roku trwania projektu miał na celu ustalenie dokładnych warunków prowadzenia doświadczenia głównego zaplanowanego na rok 2019. Doświadczenie pilotażowe zostało przeprowadzone na poletkach doświadczalnych znajdujących się przy Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Do doświadczenia pilotażowego wybrano losowo 50 odmian jęczmienia jarego. Opracowano metodykę analiz rozwoju i architektury systemu korzeniowego, a także ustalenia stosunku części nadziemnej do części podziemnej rośliny. Poza metodyką manualnych obserwacji biometrycznych korzeni wykorzystano mierniki pracujące w oparciu o pomiar pojemności elektrycznej (ang. electrical capacitance) umożliwiający ocenę systemu korzeniowego *in situ*. Momenty pomiaru pojemności elektrycznej zostały wybrane w oparciu o zmieniającą się wrażliwość rośliny wraz ze wzrostem i stadium rozwojowym.

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

Analizowano cechy korzeni podczas wegetacji, takie jak wielkość systemu korzeniowego *in situ* za pomocą przyrządu mierzącego pojemność elektryczną w czterech fazach: krzewienia (T1), strzelania w źdźbło (T2), kłoszenia (T3) i nalewania ziarna (T4), natomiast po zbiorze roślin mierzono długość i masę korzeni. Ponadto wykonano pomiary cech morfologicznych częsci nadziemnych: wysokość roślin, długość kłosa, liczba i masa ziarna z kłosa, masa ziarna z rośliny, masa 1000-ziaren. Zebrane dane posłużyły do obliczeń statystycznych, w ramach których przeprowadzono ocenę współczynnika korelacji między badanymi cechami.

Tabela 2. Fazy rozwojowe w skali BBCH, w których dokonywano pomiaru pojemności elektrycznej systemu korzeniowego

Numer fazy	Nazwa fazy	Grafika
26	krzewienie	
30	strzelanie w źdźbło	
50	kłoszenie	
90	nalewanie ziarna	

Tabela 3. Cechy fenotypowe podlegające analizom biometrycznym

Lp.	Cecha	Jednostka	Opis cechy
1.	Wysokość rośliny	cm	Wysokość rośliny mierzono od podstawy rośliny wraz z kłosem z ośćmi
2.	Długość kłosa	cm	Długość kłosa mierzona od podstawy do wierzchołka kłosa, bez ości; średnia z 10 kłosów
3.	Liczba ziaren w kłosie	szt.	Liczba ziaren w kłosie głównym; średnia z 10 kłosów
4.	Masa ziarna z kłosa	g	Masa ziaren z kłosa; średnia z 10 kłosów
5.	Masa ziarna z rośliny	g	Średnia waga ziaren zebranych z pojedynczej rośliny, średnia z 10 roślin
6.	Masa 1000-ziaren	g	Średnia waga 1000 ziaren

Zdjęcie 1. Miernik pomiaru pojemności elektrycznej

Wyniki

Wartości średnie dla cech związanych z systmem korzeniowym w doświadczeniu pilotażowym przedstawiono w tabeli 4, natomiast wartości średnie dla cech związanych z częścią nadziemną roślin w tabeli 5. Wartości średnie dla cech związanych z systemem korzeniowym dla badanych 50 genotypów jęczmienia jarego w doświadczeniu pilotażowym wahały się w przedziałach: biomasa 0,13-1,02 g, długość korzeni 10,00-20,67 cm, pojemność elektryczna w fazie krzewienia 3,13-11,67, pojemność elektryczna w fazie strzelania w źdźbło 9,57-18,73, pojemność elektryczna w fazie kłoszenia 32,67-149,00 oraz pojemność elektryczna w fazie nalewania ziarna 75,00-205,00. Z kolei wartości średnie dla cech związanych z częścią nadziemną dla badanych 50 genotypów jęczmienia w doświadczeniu pilotażowym wahały się w przedziałach: wysokość roślin 44,00-62,33 cm, długość kłosa 6,03-10,20, liczba ziaren z kłosa 14,17-23,37, masa ziarna z kłosa 0,64-1,19 g, masa ziarna z rośliny 3,11-7,76 g oraz masa 1000-ziaren 41,86-56,75 g.

W tabeli 6 przedstawiono współczynniki korelacji na podstawie doświadczenia pilotażowego między cechami związanymi z systemem korzeniowym a wyselekcjonowanymi cechami związanymi z częścią nadziemną roślin. Większość cech była ze sobą pozytywnie skorelowana na poziomie istotności $P<0,01$. Nie wykazano korelacji pomiędzy długością korzeni a pomiarem pojemności elektrycznej w fazie T1, T3 oraz T4.

Tabela 4. Wartości średnie dla cech związanych z systemem korzeniowym w doświadczeniu pilotażowym

Genotyp	Biomasa (g)		Długość korzenia (cm)		T1		T2		T3		T4	
	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.
1.	1,02	0,20	17,33	0,33	11,67	0.80	17,73	3,74	51,87	2,18	86,33	4,48
2.	0,64	0,06	20,67	0,67	6,07	0,80	15,90	2,15	32,67	4,67	84,00	12,06
3.	0,58	0,08	18,67	2,03	4,50	0,57	14,87	2,04	57,80	8,38	78,67	14,31
4.	0,86	0,05	19,33	0,67	5,33	0,45	16,80	1,31	56,00	7,09	73,00	6,93
5.	0,68	0,04	16,67	1,20	5,43	0,66	14,03	1,42	58,67	9,84	89,00	8,72
6.	0,51	0,10	15,33	0,88	3,13	0,38	12,87	2,22	42,47	6,34	97,30	16,18
7.	0,64	0,07	19,00	0,58	8,10	1,06	16,33	0,62	56,57	15,88	140,67	45,12
8.	0,60	0,15	16,33	1,45	6,67	1,02	15,53	1,32	55,47	9,82	108,67	13,78
9.	0,42	0,07	18,67	0,67	7,20	0,46	15,40	0,87	67,40	5,47	94,67	10,67
10.	0,82	0,05	18,33	1,20	5,83	0,18	14,10	1,59	81,33	12,91	107,33	13,97
11.	0,73	0,16	15,67	2,85	5,53	0,52	12,43	1,66	61,33	5,24	130,67	9,68
12.	0,33	0,12	15,67	2,33	6,27	0,98	14,70	2,79	85,00	14,42	121,67	26,19
13.	0,75	0,17	18,00	1,15	5,27	0,38	13,87	2,30	86,33	9,24	103,33	20,74
14.	0,42	0,25	15,33	5,67	6,57	2,17	14,80	5,82	57,00	22,61	91,00	20,79
15.	0,52	0,03	16,00	2,00	5,77	0,23	17,50	1,75	67,00	10,69	99,33	13,98
16.	0,72	0,10	14,67	0,88	4,70	1,42	14,77	2,82	112,33	25,67	187,00	43,84
17.	0,53	0,08	11,33	0,88	5,73	0,49	14,83	1,62	104,33	9,56	205,00	27,93
18.	0,28	0,08	15,00	1,73	6,27	0,54	17,10	2,25	92,33	12,72	149,67	34,35
19.	0,20	0,03	14,67	2,30	5,83	1,05	11,80	1,65	65,67	7,22	98,67	14,50
20.	0,50	0,02	17,33	0,33	6,23	0,67	17,20	2,75	86,33	8,09	124,33	2,73
21.	0,55	0,10	19,00	1,00	6,50	0,70	18,43	3,70	95,33	35,41	152,33	12,68
22.	0,28	0,13	15,67	2,96	5,37	0,84	16,17	0,61	81,70	6,99	68,00	8,00
23.	0,61	0,92	20,33	0,88	4,47	0,75	13,37	0,34	58,33	3,49	105,67	9,24
24.	0,32	0,11	17,00	2,08	5,33	0,16	13,73	2,14	109,13	22,43	77,33	7,26
25.	0,48	0,05	18,33	1,86	6,43	0,62	17,00	1,68	106,80	16,23	85,67	15,30
26.	0,36	0,04	15,67	2,19	6,77	1,00	15,00	0,65	63,00	3,22	85,33	13,86
27.	0,38	0,10	15,33	0,67	5,07	0,80	13,97	2,05	73,43	11,09	74,00	20,13
28.	0,69	0,09	14,67	2,67	7,20	1,03	18,73	2,80	113,50	12,69	88,33	5,70
29.	0,46	0,04	16,67	0,67	5,87	0,84	14,77	2,10	83,47	39,28	86,33	4,41
30.	0,48	0,06	17,33	1,45	5,47	0,67	17,17	1,52	100,47	15,01	79,00	7,57
31.	0,43	0,04	14,67	1,45	4,43	0,47	13,53	2,23	74,40	12,80	63,00	13,11
32.	0,28	0,08	13,67	1,86	3,97	0,49	10,30	2,52	90,90	19,18	90,67	10,09
33.	0,31	0,02	15,00	1,53	6,80	0,35	17,60	1,70	138,97	6,54	109,00	28,92
34.	0,52	0,11	16,67	0,33	4,90	0,46	17,90	2,43	93,07	2,40	87,00	14,19
35.	0,55	0,13	19,00	0,58	6,60	0,78	16,07	1,39	120,43	9,03	147,67	25,67
36.	0,52	0,14	16,67	0,33	5,97	0,78	14,03	1,19	90,43	25,72	113,00	28,75
37.	0,23	0,06	13,67	5,33	4,83	0,29	13,33	1,36	59,37	8,69	57,33	14,10
38.	0,39	0,07	18,00	1,00	6,53	0,32	12,73	0,96	69,57	5,34	75,00	20,13
39.	0,21	0,09	14,67	1,86	5,00	0,72	13,47	1,46	59,83	6,48	58,67	5,33
40.	0,31	0,02	15,67	0,88	6,90	1,65	16,10	1,97	114,00	36,12	135,00	41,10
41.	0,43	0,09	15,33	0,88	7,10	0,83	11,00	1,25	149,00	10,58	74,33	16,48
42.	0,13	0,05	10,00	2,52	5,63	1,29	13,63	1,35	95,33	8,11	90,67	35,41
43.	0,13	0,08	15,00	1,53	4,03	0,47	9,60	0,76	82,33	10,73	81,33	28,11
44.	0,18	0,06	15,33	0,67	6,30	0,84	14,87	0,55	106,00	18,15	127,33	17,33
45.	0,39	0,02	13,33	1,45	5,60	0,62	14,30	0,26	85,67	7,22	83,00	9,07
46.	0,39	0,11	17,33	1,33	6,23	0,93	16,43	0,98	96,33	17,84	92,33	12,20
47.	0,45	0,09	16,00	1,53	5,40	0,64	9,67	0,92	58,67	6,17	81,67	15,62
48.	0,39	0,07	17,67	1,45	5,40	0,10	9,57	1,28	93,67	11,10	74,33	11,85
49.	0,34	0,07	16,00	2,31	3,63	0,28	9,67	0,87	102,67	16,27	118,67	35,67
50.	0,29	0,06	15,33	1,33	5,30	1,07	11,20	1,01	78,00	3,46	132,00	32,33

s.e. – błąd standardowy (ang. standard error)

Tabela 5. Wartości średnie dla cech związanych częścią nadziemną roślin w doświadczeniu pilotażowym

Genotyp	Wysokość (cm)		Długość kłosa (cm)		Liczba ziaren z kłosa		Masa ziarna z kłosa (g)		Masa ziarna z rośliny (g)		Masa 1000-ziaren (g)	
	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.	średnia	s.e.
1.	50,33	2,18	7,97	0,27	18,93	0,20	0,83	0,02	7,76	0,93	44,01	0,76
2.	51,67	0,88	8,27	0,38	21,70	1,21	1,09	0,09	7,08	0,71	50,24	1,32
3.	54,33	3,18	8,80	1,00	21,37	1,95	0,92	0,05	4,54	0,28	43,48	1,48
4.	58,33	1,76	8,07	1,17	18,27	0,84	0,86	0,06	5,50	0,76	47,24	2,30
5.	54,67	2,73	7,90	0,44	21,07	0,79	1,02	0,04	5,03	0,88	48,44	0,95
6.	53,67	0,67	7,10	0,17	17,33	0,62	0,86	0,05	5,62	0,54	49,33	1,39
7.	62,33	4,33	9,27	0,58	18,90	1,21	1,01	0,13	5,16	0,32	52,91	3,96
8.	52,67	2,40	6,80	0,30	18,27	0,74	0,84	0,04	6,24	1,37	45,96	0,96
9.	54,33	3,38	8,00	0,12	17,80	0,53	0,79	0,01	6,36	1,41	44,61	0,66
10.	55,33	2,19	10,20	0,21	21,10	0,86	1,03	0,04	4,14	0,15	49,00	0,63
11.	51,67	2,03	7,23	0,35	18,43	0,32	0,94	0,06	6,19	0,45	51,19	3,49
12.	50,00	1,73	7,73	0,46	20,07	1,09	0,95	0,12	6,39	1,06	47,18	3,62
13.	54,00	0,58	7,67	0,33	18,63	0,72	0,98	0,08	4,24	0,49	52,41	2,57
14.	50,67	3,93	6,97	1,00	16,43	0,76	0,93	0,05	4,55	1,88	56,75	1,00
15.	51,00	0,58	7,20	0,67	17,57	1,11	0,84	0,07	5,82	0,10	47,90	1,84
16.	56,33	2,96	7,30	0,68	14,33	2,09	0,64	0,14	4,68	1,06	43,29	3,89
17.	52,00	1,15	8,17	0,61	18,93	1,44	0,93	0,05	5,38	1,60	49,46	1,21
18.	48,00	2,00	6,70	0,06	19,87	0,13	1,01	0,09	5,11	0,94	50,79	4,08
19.	49,67	2,60	7,87	0,61	18,17	1,68	0,91	0,12	5,69	1,80	49,58	2,51
20.	55,00	2,65	8,80	0,98	21,93	1,55	1,03	0,14	6,68	0,52	46,67	3,11
21.	49,33	0,67	6,47	0,69	15,83	2,49	0,68	0,15	4,42	1,05	41,86	3,27
22.	52,00	1,15	7,53	0,17	19,03	0,99	0,92	0,04	5,87	0,47	48,58	1,35
23.	53,33	1,20	8,80	0,31	22,93	0,47	1,19	0,05	5,93	0,25	51,74	1,86
24.	55,67	3,38	6,57	0,78	16,13	1,41	0,73	0,10	5,12	0,35	44,84	2,32
25.	51,00	1,00	6,67	0,33	15,73	0,71	0,75	0,05	5,74	0,57	47,80	0,98
26.	45,67	1,20	6,43	0,47	17,43	1,16	0,81	0,06	6,43	0,11	46,43	0,35
27.	45,67	2,96	6,03	0,15	15,97	0,38	0,77	0,02	4,63	0,37	48,45	0,87
28.	49,67	1,45	6,77	0,32	18,40	1,30	0,80	0,11	7,47	0,94	43,22	3,07
29.	55,00	2,89	7,20	0,31	17,77	2,22	0,85	0,12	5,05	1,03	47,67	1,73
30.	53,67	3,18	8,23	0,32	19,30	0,95	0,96	0,07	5,72	0,25	49,86	2,50
31.	50,00	2,31	7,30	0,56	18,37	1,82	0,80	0,12	5,06	0,81	43,08	2,52
32.	47,67	2,85	7,10	0,49	17,47	2,20	0,82	0,15	3,11	1,36	46,17	2,38
33.	48,00	4,00	7,57	0,84	17,47	0,88	0,82	0,09	4,64	0,61	46,66	2,83
34.	50,67	2,67	7,03	0,41	20,80	1,12	1,03	0,07	6,28	1,00	48,67	1,34
35.	53,00	1,73	7,60	0,40	18,97	0,77	0,85	0,04	4,53	0,50	44,63	0,34
36.	53,33	1,73	9,93	0,58	23,37	0,81	1,11	0,08	4,41	0,31	47,24	1,70
37.	55,33	4,48	8,57	0,87	22,60	1,31	1,16	0,15	2,19	0,52	51,10	3,46
38.	49,33	0,67	7,97	0,93	20,33	1,24	1,16	0,12	4,11	0,59	56,62	2,24
39.	47,00	3,79	7,67	1,25	21,50	3,00	0,99	0,19	3,35	0,83	45,24	2,39
40.	55,33	3,71	8,33	0,33	14,17	1,99	0,75	0,11	3,04	0,85	53,42	3,67
41.	56,00	3,61	9,07	0,97	18,30	1,35	0,95	0,13	3,67	1,42	51,71	3,35
42.	45,00	2,52	7,53	0,50	19,43	1,88	1,00	0,13	3,66	0,85	51,10	2,10
43.	44,67	3,93	7,20	0,38	18,37	3,18	0,77	0,17	2,74	1,18	41,13	2,73
44.	51,33	2,91	8,50	0,75	15,80	2,11	0,84	0,14	3,46	0,11	52,79	1,59
45.	47,67	0,67	7,43	0,43	19,50	1,28	0,93	0,13	4,20	0,95	47,39	3,64
46.	47,67	5,78	8,00	0,81	18,07	1,05	0,87	0,10	3,74	1,12	48,02	3,23
47.	44,00	2,00	6,70	0,80	19,07	1,47	0,93	0,13	4,77	1,41	48,14	2,99
48.	46,33	0,88	8,80	0,25	17,60	1,40	0,86	0,05	3,73	0,50	48,86	1,24
49.	52,33	5,04	7,63	0,83	15,63	1,01	0,68	0,07	3,63	0,55	43,10	1,63
50.	51,67	0,33	8,80	0,17	21,87	0,30	1,09	0,04	4,77	1,09	50,04	2,33

s.e. – błąd standardowy (ang. standard error)

Tabela 6. Współczynniki korelacji dla cech związanych z systemem korzeniowym a wybranymi cechami części nadziemnej roślin w doświadczeniu pilotażowym

	Biomasa części nadziemnej	Masa ziarna z rośliny	Biomasa korzenia	Długość korzenia
Biomasa korzenia	0,581**	0,442**		
Długość korzenia	0,271**	0,211**	0,318**	
T1	0,423**	0,381**	0,337**	n.s.
T2	0,533**	0,496**	0,394**	0,139*
T3	0,240**	0,201*	0,136*	n.s.
T4	0,392**	0,235**	0,323**	n.s.

*P<0,05; **P<0,01
n.s. – nieistotny (ang. not significant)

Dyskusja

Ze względu na trudności metodologiczne związane z monitorowaniem wzrostu korzeni w glebie, istnieje ciągłe zainteresowanie wykorzystaniem i rozwojem prostych, szybkich metod *in situ* dostarczających informacji na temat rozwoju systemu korzeniowego bez uszkodzenia całej rośliny (Milchunas 2012). Jedna z takich nieinwazyjnych technik opiera się na właściwościach elektrycznych systemu korzeniowego. Metoda elektryczności pierwotnej (C_R, ang. root electrical capacitance) została po raz pierwszy zastosowana przez Chloupek (1972), który wykorzystał w swoich badaniach miernik pojemności z niskim napięciem (1V) prądu przemiennego (1000 Hz prądu przemiennego). Chloupek stwierdził, że C_R mierzony między elektrodą uziemiającą (włożoną do gleby) a elektrodą roślinną (przymocowaną do rośliny) wykazuje dodatnią korelację z suchą masą korzenia (RDM, ang. root dry mass), długością korzenia (RL, ang. root length) i powierzchnią korzenia (RSA, ang. root surface area). Podobnie w doświadczeniu pilotażowym, prowadzonym w ramach prezentowanego projektu, stwierdzono pozytywną, istotną korelację między większością cech związanych z częścią nadziemną rośliny oraz cechami systemu korzeniowego potwierdzając, że ta nieinwazyjna metoda jest odpowiednia do powtarzalnej oceny rozwoju systemu korzeniowego w warunkach polowych, dodatkowo prowadzonej także w różnych stadiach rozwojowych rośliny.

Kormanek i in. (2016) stwierdzili, że powierzchnia i kształt elektrody gruntowej silnie wpłynęły na korelację między C_R a parametrami systemu korzeniowego. Niemniej jednak, przy przestrzeganiu stałej wysokości elektrody roślinnej nad powierzchnią podłoża, metoda adekwatnie szacuje rozmiar systemu korzeniowego (Postic i Doussan 2016). Dlatego istotne okazało się w doświadczeniu pilotażowym ustalenie stałej wysokości lokalizowania elektrody zarówno na roślinie, jak i jednakowego oraz o równej głębokości umieszczania drugiej elektrody w glebie. Ogromną zaletą metody pojemnościowej jest to, że skoro prąd elektryczny przepływa wyłącznie przez korzeń, C_R ma potencjał do oceny "funkcjonalnego zasięgu korzenia (Cermák i in. 2006, Cseresnyés i in. 2016). W przeciwieństwie do innych, powszechnie stosowanych technik, metoda pojemnościowa mierzy aktywność korzenia, w tym również włośniki.

W warunkach polowych czasowe zmiany zawartości wody w glebie (SWC, ang. soil water content) uniemożliwiają w większości przypadków ciągłe monitorowanie rozowju systemu korzeniowgo. Z tego powodu rośliny uprawiane na polach mogą być porównywane tylko na podstawie C_R uzyskanego w określonym przedziale czasowym z porównywalnym SWC. Przestrzegając tego metoda C_R została z powodzeniem zastosowana w doświadczeniach prowadzonych w warunkach polowych w celu zbadania cech korzeni jęczmienia i pszenicy (Nakhforoosh i in., 2014, Svacina i in., 2014, Hermanská i in., 2015) oraz scharakteryzowania różnic odmianowych w ich odporności na stres suszy czy efektywności wykorzystania wody (Chloupek i in., 2010, Streda i in., 2012).

Mierniki dla tematu badawczego 2:

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym – pilotaż	50 form jęczmienia jarego	50 form jęczmienia jarego

Literatura:

Cermák J., Ulrich R., Stanek Z., Koller J., Aubrecht L. 2006. Electrical measurement of tree root absorbing surfaces by the earth impedance method: 2. Verification based on allometric relationships and root severing experiments. Tree Physiol. 26: 1113-1121.

Chloupek O. 1972. The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. Biol. Plantarum 14: 227-230.

Chloupek O., Dostál V., Streda T., Psota V., Dvorácková O. 2010. Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. Plant Breed. 129: 630-636.

Cseresnyés I., Rajkai K., Takács T. 2016. Indirect monitoring of root activity in soybean cultivars under contrasting moisture regimes by measuring electrical capacitance. Acta Physiol. Plant. 38:121.

Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Bucler E.S., et al. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS One 6:e19379.

Hermanská A., Streda T., Chloupek O. 2015. Improved wheat grain yield by a new method of root selection. Agron. Sustain. Dev. 35: 195-202.

Kormanek M., Głab T., Klimek-Kopyra A. 2016. Modification of the tree root electrical capacitance method under laboratory conditions. Tree Physiol. 36: 121–127.

Milchunas D. G. 2012. Biases and errors associated with different root production methods and their effects on field estimates of belowground net primary production. In *Measuring Roots,* ed S. Mancuso (Berlin: Springer), 303-339.

Nakhforoosh A., Grausgruber H., Kaul H.-P., Bodner G. 2014. Wheat root diversity and root functional characterization. Plant Soil 380: 211-229.

Poland J.A., Brown P.J., Sorrells M.E., Jannink J-L. 2012. Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping- by-Sequencing Approach. PLoS ONE 7(2): e32253.

Postic F., Doussan C. 2016. Benchmarking electrical methods for rapid estimation of root biomass. Plant Methods 12:33.

Scherer A., Christensen G.B. 2016. Concepts and relevance of genome-wide association studies. Science Progress 99(1): 59-67.

Sharma R., Draicchio F., Bull H., Herzig P., Maurer A., Pillen K., Thomas W.T.B., Flavell A.J. 2018. Genome-wide association of yield traits in a nested association mapping population of barley reveals new gene diversity for future breeding, Journal of Experimental Botany 69 (16): 3811-3822.

Streda T., Dostál V., Horáková V., Chloupek O. 2012. Effective use of water by wheat varieties with different root system size in rain-fed experiments in Central Europe. Agr. Water Manage. 104: 203-209.

Svacina P., Streda T., Chloupek O. 2014. Uncommon selection by root system size increases barley yield. Agron. Sustain. Dev. 34: 545-551.

4. Planowana prezentacja wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1.	Uczestnictwo jednej osoby w 15th Applied Statistics International Conference, 23 – 26 września 2018 r., Ribno, Słowenia, wykład „Statistical approach to evaluate phenotypic variation of barley varieties regarding root and shoot" (Abstracts and program, str. 54)	wykład	1	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	publikacja	liczba publikacji podana w opisie zadania	liczba publikacji zrealizowana
1.	Brak publikacji w 2018 r.			

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

http://www.igr.poznan.pl/pl/dzialalnosc-naukowa/projekty-badawcze/krajowe-projekty-badawcze/ministry-of-agriculture-grants-pl/2014-2020

6. Miernik zadania – stopień realizacji

l.p.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Ultra-przepustowe genotypowanie przez sekwencjonowanie – 150 genotypów jęczmienia jarego.	150	150	1,00
temat badawczy 2				
2.1	Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym – pilotaż; opracowanie metodyki analiz systemu korzeniowego materiału roślinnego prowadzonego w warunkach polowych.	50	50	1,00
			ŚREDNIA	1,00
			% REALIZACJI ZADANIA	100%

Sporządzono: 14 stycznia 2019 r.

Pieczęć jednostki	Osoba reprezentująca jednostkę	Kierownik zadania
data	podpis i pieczęć	podpis