

Określenie fizjologicznych i genetycznych podstaw odporności pszenicy i jęczmienia na rozhartowywanie

Okres realizacji: 2021 -2026 (72 miesiące)

Kierownik: dr inż. Magdalena Wójcik-Jagła

magdalena.wojcik-jagla@urk.edu.pl

Wykonawcy: Prof. dr hab. Marcin Rapacz

Dr hab. inż. Barbara Jurczyk, prof. URK

Dr inż. Monika Sasal



Cele projektu w 2024 roku

1. Temat badawczy „Fenotypowanie aktywnego rozhartowywania”: określenie mrozoodporności całych roślin oraz mrozoodporności na poziomie komórkowym po rozhartowaniu aktywnym pszenicy i jęczmienia. Cel zrealizowano
2. Temat badawczy „Typowanie genów kandydujących związanych z aktywnym rozhartowywaniem u pszenicy”: 1) pomiary integralności membran komórkowych metodą wypływu elektrolitów; 2) zsekwencjonowanie mRNA 8 obiektów oraz uzyskanie informacji o genach ulegających różnej ekspresji. Cele zrealizowano
3. Temat badawczy „Mapowanie asocjacyjne aktywnego rozhartowywania”: wykonanie mapowania asocjacyjnego. Cel zrealizowano
4. Temat badawczy „Analiza aktywności antyoksydacyjnej”: identyfikacja 10 najbardziej wrażliwych i najbardziej odpornych wobec aktywnego rozhartowywania rodów/odmian pszenicy i jęczmienia. Cel zrealizowano



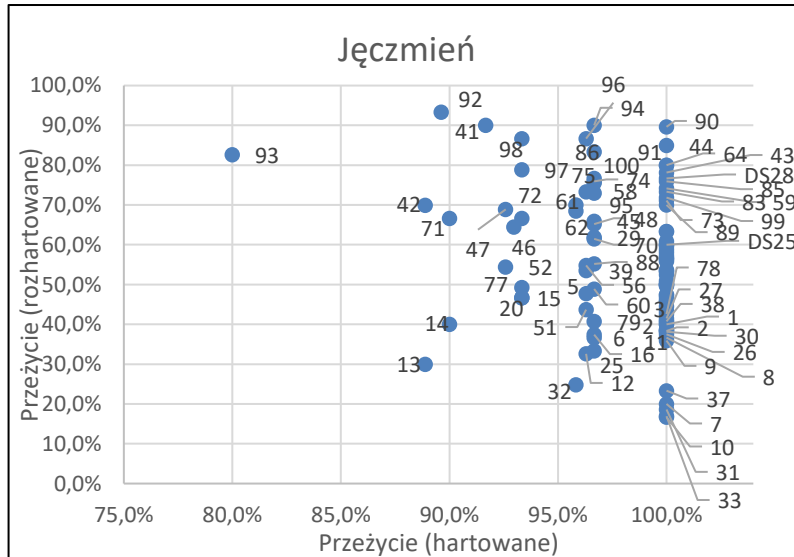
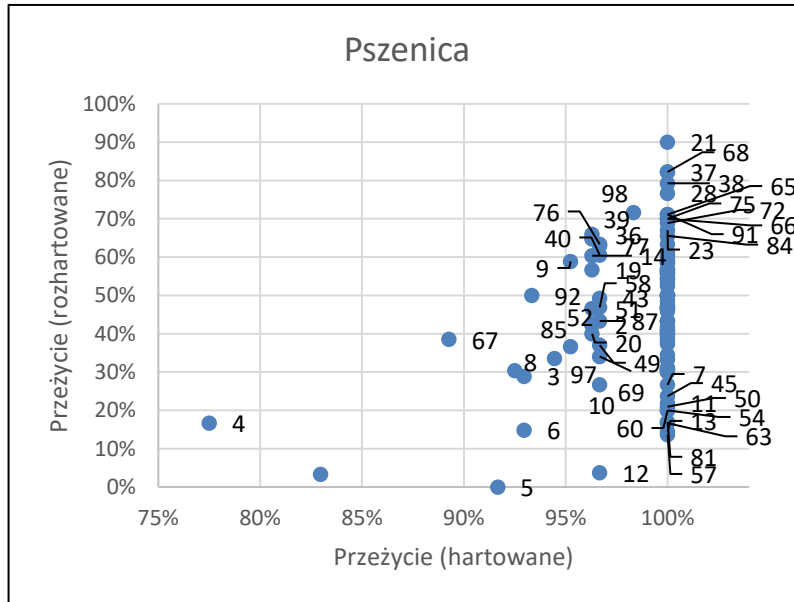
Materiały i metody

- **Materiał roślinny:** 100 zaawansowanych rodów hodowlanych i odmian pszenicy ozimej pochodzących z 5 spółek hodowlanych oraz 100 zaawansowanych rodów hodowlanych jęczmienia ozimego z 3 spółek + 2 własne wzorce. Wzrost roślin, rozhartowywanie i mrożenie przeprowadzano w warunkach kontrolowanych. Dodatkowo w zadaniu 2: 8 linii i odmian pszenicy ozimej z 5 spółek fenotypowanych w 2021, 2022 i 2023 roku
- **Metody:**
 - 1) Polowo-laboratoryjna ocena mrozoodporności (wg. Kocha i Lehmana, 1969)
 - 2) Fluorescencyjna ocena mrozoodporności na poziomie komórkowym
 - 3) Konduktometryczne pomiary integralności membran komórkowych
 - 4) Mapowanie do referencyjnego genomu pszenicy (program Hisat2 v.2.1.0 (Kim et al., 2019))
 - 5) Analiza genów ulegających różnicowej ekspresji (program DESeq2 v.1.24.0 (Love et al., 2014))
 - 6) Analiza ontologii genów „GO enrichment” (program Genprofiler)
 - 7) Mapowanie asocjacyjne (program Tassel (Bradbury i in. 2007))



Fenotypowanie aktywnego rozhartowywania

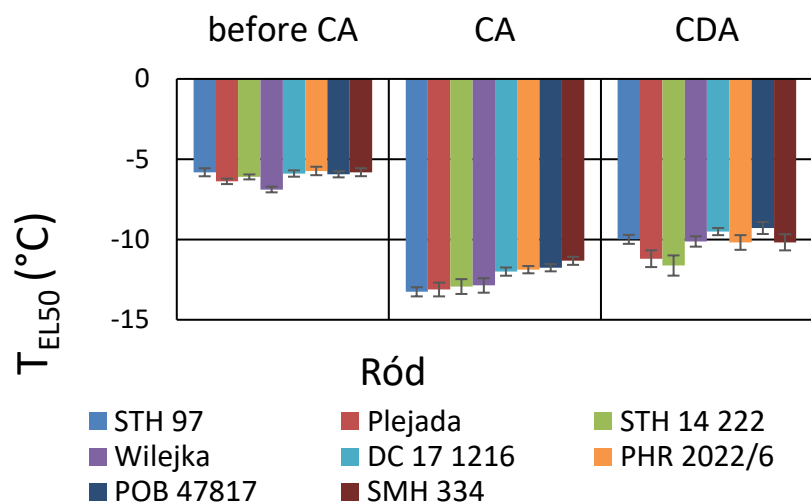
Wyniki



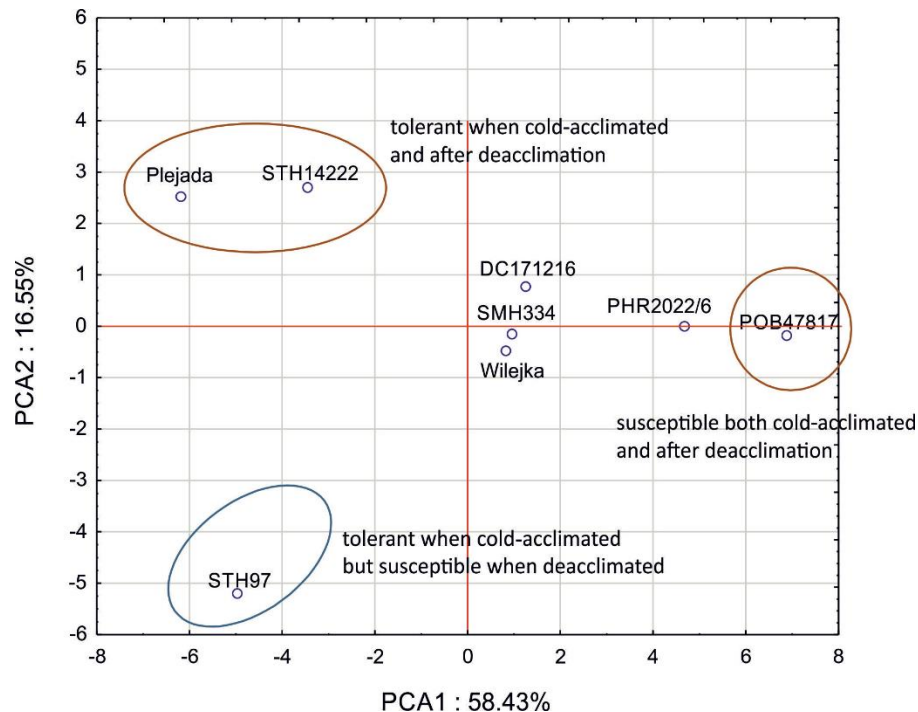
Ryc. 1. Mrozoodporność zahartowanych i rozhartowanych roślin pszenicy (A) i jęczmienia (B). Przedstawiono wyniki oceny przeżywalności po 10 dniach od mrożenia (odrost).

Typowanie genów kandydujących związanych z aktywnym rozhartowywaniem u pszenicy

Wyniki: pomiary integralności membran komórkowych metodą wypływu elektrolitów



Ryc. 2. Mrozoodporność wybranych rodów i odmian pszenicy określona poprzez wyznaczenie temperatury mrożenia powodującej 50% wypływ elektrolitów z liści (TEL50). Przedstawiono wartości dla kontroli (before CA), po hartowaniu (CA) i po rozhartowaniu (CDA). Pionowe słupki błędów oznaczają granice przedziałów ufności dla $P=0.05$ (oznacza to, że jeżeli wąsy nie pokrywają się to średnie różnią się od siebie istotnie dla $P=0.05$).

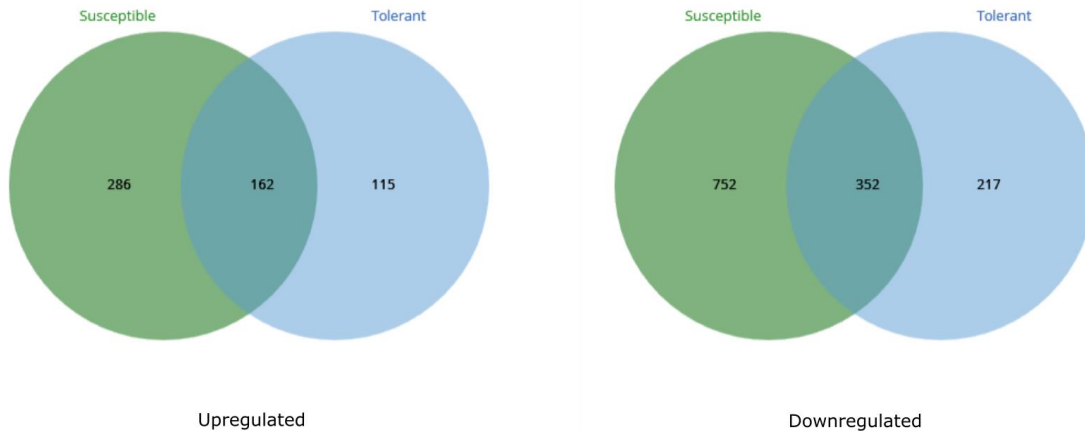


Ryc. 3. Sposób różnicowania badanych odmian i rodów przez wyniki wykonanych pomiarów fluorescencji chlorofilu po zahartowaniu (CA) i po rozhartowaniu (DA).

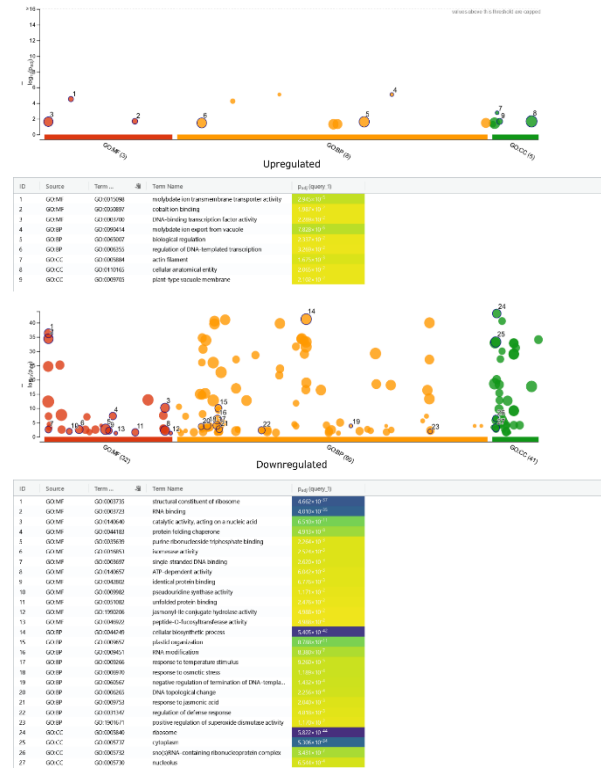


Typowanie genów kandydujących związanych z aktywnym rozhartowywaniem u pszenicy

Wyniki: uzyskanie informacji o genach ulegających różnej ekspresji

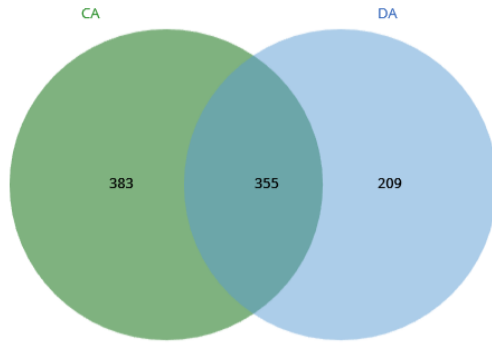


Ryc. 4. Geny ulegające różnicowej ekspresji (DEG) specyficzne jedynie dla procesu aktywnego rozhartowywania u wrażliwych i tolerancyjnych wobec aktywnego rozhartowywania obiektów pszenicy, ($1 \leq \log_2 FC \leq -1$, $P \leq 0,01$). Tolerant – tolerancyjne wobec rozhartowania, Susceptible – wrażliwe, Upregulated – DEG, których ekspresja uległa zwiększeniu, Downregulated – DEG, których ekspresja uległa zmniejszeniu.

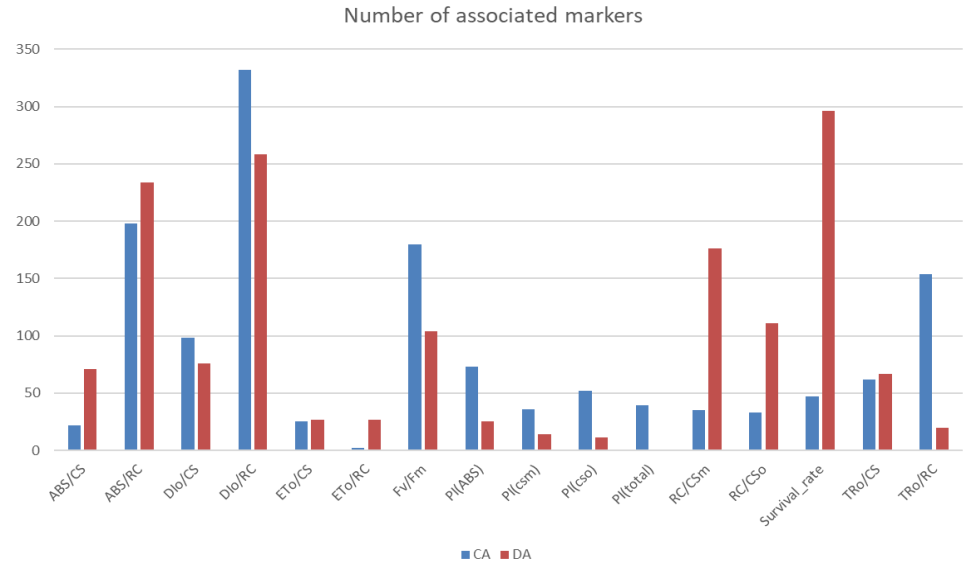


Ryc. 5. Wyniki analizy ontologii genów (GO) dla genów ulegających różnicowej ekspresji (DEG) specyficznych jedynie dla procesu aktywnego rozhartowywania (DA-28/CA-21) u wrażliwych wobec aktywnego rozhartowywania obiektów pszenicy.

Mapowanie asocjacyjne aktywnego rozhartowywania

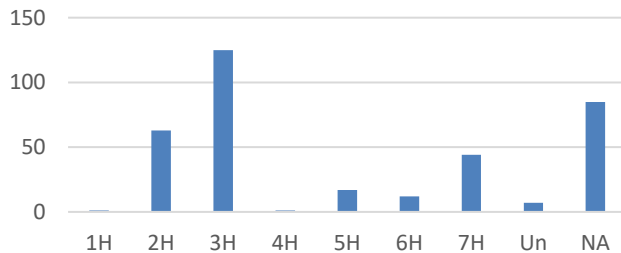


Ryc. 6. Liczba markerów powiązanych tylko z mrozoodpornością (CA, zielony), tylko z tolerancją na aktywne rozhartowywanie (DA, niebieski) i z oboma cechami (wspólny obszar, turkusowy).

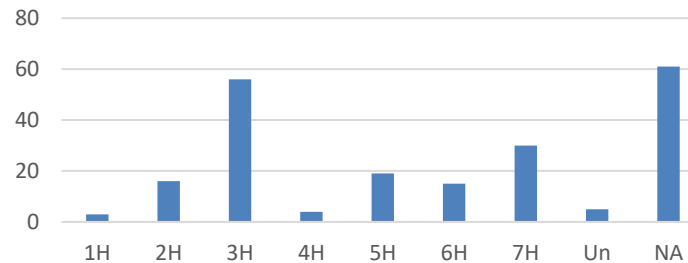


Ryc. 7. Liczba markerów zasocjowanych z poszczególnymi parametrami fluorescencji chlorofilu oraz z przeżywalnością po mrożeniu (Survival_rate) u zahartowanych (niebieski) i rozhartowanych (czerwony) rodów jęczmienia.

A) Liczba zasocjowanych markerów wspólnych dla CA i DA



B) Liczba markerów zasocjowanych jedynie z mrozoodpornością w stanie DA



Ryc. 8. Pozycja chromosomowa markerów zasocjowanych z mrozoodpornością. A) wspólnych dla mrozoodporności w stanie zahartowanym (CA) i rozhartowanym (DA); B) w stanie rozhartowanym (DA).



Wybór rodów i odmian pszenicy i jęczmienia tolerancyjnych i wrażliwych wobec aktywnego rozhartowywania

Wyniki

Tabela 1. Zestawienie rodów i odmian zidentyfikowanych jako najbardziej tolerancyjne i najbardziej wrażliwe wobec rozhartowywania aktywnego w latach 2021-2024 wraz z uzyskanymi wynikami. W – wrażliwy, T – tolerancyjny, Rok F – rok fenotypowania, FR-T – przeżywalność [%], Fluo – wynik pomiaru fluorescencji chlorofilu (parametr najbardziej informatywny w roku badania).

Ród / odmiana	W / T	Rok F	FR-T	Średnia FT-R w roku F	Fluo	Średnia Fluo w roku F
Pszenica:						
STH13421	T	2022	67%	16%	153 (PI)	204,91 (PI)
STH 14222	T	2023	93%	27%	451 (PI)	444,57 (PI)
Plejada	T	2023	87%	27%	463 (PI)	444,57 (PI)
Wilejka	T	2023	85%	27%	192 (PI)	444,57 (PI)
Euforia	T	2023	74%	27%	601 (PI)	444,57 (PI)
DC 17 1216	W	2021	0%	28,78%	332 (RC/CSm)	604 (RC/CSm)
POB 47817	W	2021	0%	28,78%	261 (RC/CSm)	604 (RC/CSm)
PHR 2022/6	W	2022	0%	16%	55 (PI)	204,91 (PI)
SMH 334	W	2022	0%	16%	58 (PI)	204,91 (PI)
SMH 34/22	W	2024	0%	46%	0, 593 (Fv/Fm)	0,608 (Fv/Fm)
Jęczmień:						
BKH 7942	T	2021	56,7%	18,98%	239 (RC/CSm)	272,40 (RC/CSm)
BKH 9988	T	2022	33%	5%	212 (PI)	241,44 (PI)
Danko 2/22	T	2022	33%	5%	197 (PI)	241,44 (PI)
PHR 8/24	T	2024	55%	27%	172,1 (PI)	126,62 (PI)
PHR 14/24	T	2024	70%	27%	227,8 (PI)	126,62 (PI)
Danko 8/21	W	2021	3,3%	18,98%	209 (RC/CSm)	272,40 (RC/CSm)
PHR 24/21	W	2021	0%	18,98%	232 (RC/CSm)	272,40 (RC/CSm)
PHR 10/21	W	2022	0%	5%	158 (PI)	241,44 (PI)
PHR 5/22	W	2022	0%	5%	154 (PI)	241,44 (PI)
STH221.27	W	2022	0%	5%	168 (PI)	241,44 (PI)



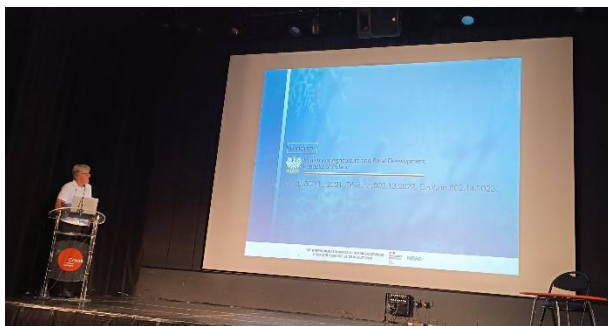
Wnioski

- Uzyskane wyniki potwierdzają poprzednie obserwacje, że tolerancja rozhartowania jest cechą odmienną od mrozoodporności w stanie zahartowanym. Cecha rozhartowywania aktywnego nie jest również jedynie odwrotnością hartowania do mrozu u pszenicy – stanowi odrębną cechę wymagającą osobnego traktowania
- Wyniki tegoroczne potwierdziły, że zróżnicowanie tolerancji rozhartowywania w grupie najbardziej mrozoodpornych rodów obserwuje się zarówno u jęczmienia, jak u pszenicy. Wskazuje to na konieczność zastosowania podobnej strategii selekcji u obydwu gatunków, gdzie powinna być ona skierowana na eliminowanie z hodowli genotypów najsilniej reagujących na rozhartowywanie z puli rodów najsilniej mrozoodpornych w stanie pełnego rozhartowania
- Stosowana w badaniach rejestrowych ocena mrozoodporności pszenicy może w coraz większym stopniu uwzględniać mrozoodporność roślin rozhartowanych co rodzi potencjalne niebezpieczeństwo wymarzania w warunkach ostrej zimy
- Wśród genów, których ekspresja zmienia się znacząco na skutek rozhartowywania u pszenicy znaczną grupę stanowią geny związane z reakcją obronną na stres, ponieważ najprawdopodobniej rozhartowywanie jest odbierane przez rośliny jako sposobność do regeneracji po stresie niskich temperatur
- Formy wrażliwe pszenicy wykazują znacznie więcej zmian ekspresji w wyniku rozhartowywania niż formy tolerancyjne, co wskazuje na to, że tolerancja rozhartowywania polega głównie na braku lub jak najsłabszej reakcji na to zjawisko
- Polskie linie hodowlane są bardziej zróżnicowane genetycznie pod względem reakcji na zamarzanie w stanie rozhartowanym niż w stanie zahartowanym
- Wspólna selekcja w kierunku mrozoodporności w stanie zahartowanym i tolerancji aktywnego rozhartowywania jest możliwa przy pomocy dedykowanych markerów molekularnych



Wykaz doniesień konferencyjnych

- Rapacz M., Bani I., Jurczyk B., Sasal M. „Facing a changing winter climate: A step towards breeding of deacclimation-tolerant wheat.” - 13th International Plant Cold Hardiness Seminar, Clermont-Ferrand, 26-30 Sierpnia 2024, prezentacja ustna.
- Wójcik-Jagła M., Bani I., Jurczyk B., Sasal M., Rapacz M. „Freezing and de-acclimation tolerance in Polish winter barley – a two year study.” - 13th International Plant Cold Hardiness Seminar, Clermont-Ferrand, 26-30 Sierpnia 2024, prezentacja ustna.



Wykaz publikacji

- Marcin Rapacz, Barbara Jurczyk, Ipsa Bani, Magdalena Wójcik-Jagła. „Phenotyping the effects of spring frost on the yield of barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.)” - Scientific Reports, wysłane do redakcji, 14.10.2024.

