



Sprawozdanie

**z działalności i wyników naukowych
uzyskanych w ramach projektu**

Żywa ściółka w parze z zero tillage

Nr 00006.DDD.6509.00321.2022.14

realizowanego pod kierunkiem

Agnieszki Baudet

Gospodarstwo rolne Łazdoje

woj. warmińsko-mazurskie

Cel operacji Łazdoje Zero Tillage

Celem operacji było opracowanie i wdrożenie nowej technologii zero tillage z żywą ściółką dla rzepaku ozimego i pszenicy ozimej. Zgodnie z planem operacja polegała na bezpośrednim wysiewie rzepaku ozimego i pszenicy ozimej z nasionami wybranymi na żywą ściółkę, następnie wysiewie tych roślin w już istniejącą żywą ściółkę i utrzymanie okrywy gleby z żywej ściółki przez czas trwania operacji. Na żywą ściółkę wybrano na wstępie komonicę rożkową *Lotus corniculatus* oraz koniczynę białą *Trifolium repens*.

Metoda zero tillage ma za zadanie odejście od uprawy mechanicznej gleby, zatrzymanie erozji gleby powodowanej opadami deszczu i wiatrem, zatrzymanie wody i części węgla w glebie. Założono także, iż rośliny plonu głównego będą się charakteryzowały niepogorszoną lub ulepszoną zdrowotnością.

Dalekosiężnymi celami tego typu uprawy jest wprowadzenie niskoemisyjnej produkcji przez zmniejszenie zużycia azotu oraz paliwa, podwyższenie konkurencyjności, harmonijne korzystanie z zasobów z głębszych partii ziemi, łagodzenie zmian klimatu, utworzenie pomostu pomiędzy wiedzą badawczą a rolnikami poprzez propagowanie nowych metod produkcji lepszej jakościowo żywności.

Przyjęto zatem następujące dalekosiężne cele:

1. innowacyjna metoda produkcji - opracowanie szczegółowych założeń i wprowadzenie ich do praktyki rolniczej;
2. uzyskanie roślin plonu głównego (rzepak, pszenica) o dobrych parametrach zdrowotnych;
3. zwiększenie ekonomiczności uprawy;
4. zwiększenie ochrony środowiska poprzez:
 - a) uprawę roślin żyjących w symbiozie z bakteriami brodawkowymi,
 - b) wprowadzenie systemu zero till nie wymagającego naruszania wierzchniej warstwy gleby;
5. łagodzenie zmian klimatycznych poprzez wprowadzenie systemu uprawy ograniczającego liczbę przejazdów, zmniejszenie zużycia azotu oraz zatrzymujących większą ilość węgla w glebie.

Partnerzy operacji Łazdoje Zero Tillage

W celu realizacji projektu Łazdoje Zero Tillage nawiązano umowę konsorcjum z następującymi partnerami:

1) Agnieszka Baudet

Gospodarstwo rolne w Łazdojach

Łazdoje 3A, 11-440 Reszel

REGON: 519479446

NIP: 742-178-27-36

tel: 604 453 115, 660 235 356

email: a.bode@interia.pl

reprezentowana przez radczynię prawną Agnieszkę Baudet (Partner nr 1, **Lider Grupy Operacyjnej Łazdoje Zero Tillage**)

2) Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Regon: 000326204

NIP: 781-16-21-455

tel: (+48 61) 65 50 200, 65 50 255

fax: (+48 61) 65 50 301

email: office@igr.poznan.pl

reprezentowany przez prof. dr hab. Pawła Krajewskiego (Partnerem nr 2).

3) Franck-Xavier Baudet

Gospodarstwo rolne

Łazdoje 3A, 11-440 Reszel

REGON 280483458,

NIP: 742-203-49-82

Tel: 602 520 533

email: a.bode@wp.pl

reprezentowany przez mgr. inż. Franck-Xavier Baudet (Partner nr 3).

4) Zenon Wiszniewski

Gospodarstwo rolne

ul. M.C. Skłodowskiej 9/2, 11-400 Kętrzyn

PESEL: 54021508854

NIP: 742-113-35-93

tel: 604 503 572

email: zenon.wiszniewski@vp.pl

reprezentowany przez Zenona Wiszniewskiego (Partner nr 4).

5) Warmińsko-Mazurski Ośrodek Doradztwa Rolniczego z siedzibą w Olsztynie

ul. Jagiellońska 91, 10-356 Olsztyn

NIP: 7393452902

REGON: 519653022

tel./fax 89 535 76 84; 89 526 44 39

e-mail: sekretariat@w-modr.pl

reprezentowany przez mgr inż. Damiana Godzińskiego (Partner nr 5).

6) Kancelaria Radcy Prawnego Aneta Przedpelska

ul. Jana Pawła II, nr 80, lok. 10, 00-175 Warszawa

NIP: 5251541144

REGON: 141190497

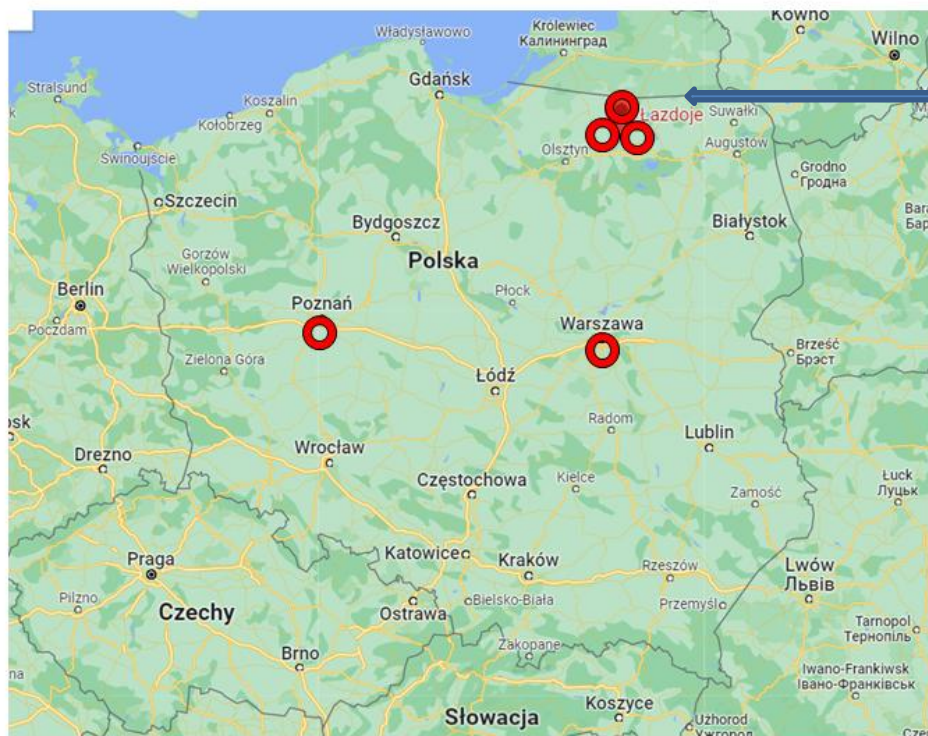
Tel: 603 604 372

email: anetapzedpelska@gmail.com

reprezentowana przez radczynię prawną Anetę Przedpelską (Partner nr 6).

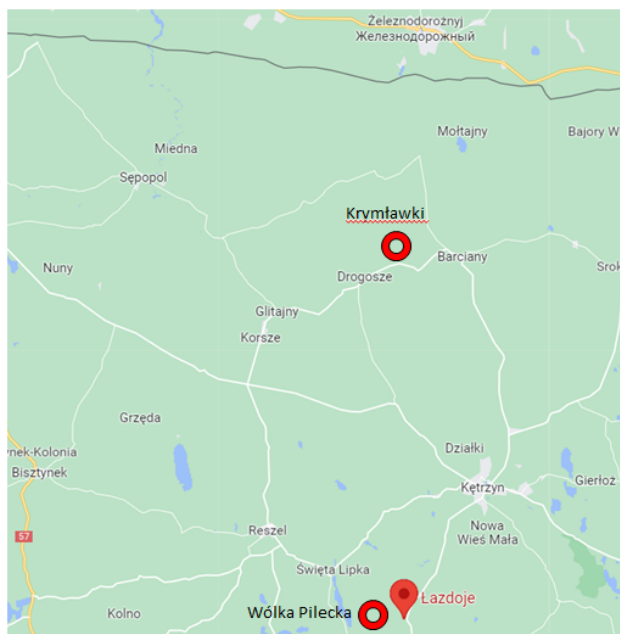
Członkowie grupy operacyjnej

trzy gospodarstwa rolne
instytut naukowy
biuro prawne



Lider GO

Lokalizacja gospodarstw rolnych uczestniczących w projekcie OTill



Etapy projektu OTill

Operacja polega na bezpośrednim wysiewie **pszenicy ozimej i rzepaku ozimego** z nasionami wybranymi na żywą ściółkę.

Następny etap to wsiew pszenicy/rzepaku w już istniejącą żywą ściółkę i utrzymanie okrywy gleby z żywej ściółki przez czas trwania operacji.

Jednocześnie zakłada się opracowanie i wdrożenie lepszyc zdrowotnie roślin pszenicy ozimej i rzepaku ozimego.

Prezentacja misji i obszarów badawczych Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, uzasadniających udział w projekcie projekt Łazdoje Zero Tillage:

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu



Dyscyplina: **rolnictwo i ogrodnictwo**

Obszary działalności:

- ✓ genetyka, cytogenetyka, genomika
- ✓ fenotypowanie, fenomika, fizjologia
- ✓ odporność roślin
- ✓ metabolomika
- ✓ biotechnologia
- ✓ biometria i bioinformatyka
- ✓ zintegrowana biologia roślin

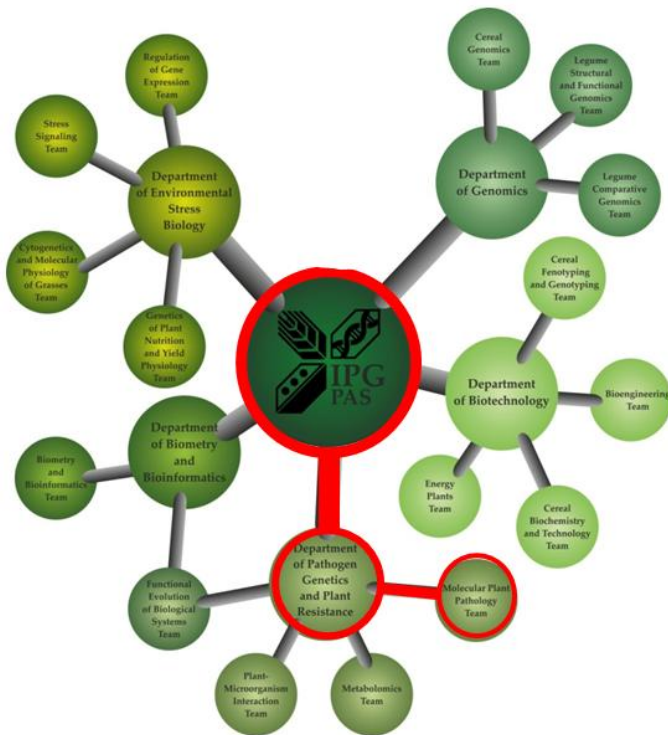
Instytut Genetyki Roślin PAN jest ważnym centrum badawczym działającym od 70 lat w obszarze nauk biologicznych i rolniczych, ze specjalnym uwzględnieniem genetyki i genomiki roślin uprawnych i modelowych.

Misją IGR PAN jest prowadzenie i promocja badań naukowych zgodnie z najwyższymi standardami. W 2014 Komisja Europejska przyznała Instytutowi logo "HR Excellence in Research".



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Prezentacja Zakładu i zespołu naukowego realizującego projekt łazdoje Zero Tillage:



- ✂ **Odporność roślin uprawnych na grzyby chorobotwórcze**
- ✂ **Aerobiologia rolnicza: detekcja zarodników w powietrzu**
- ✂ **Polimorfizm fitopatogenów**

Prof. Małgorzata Jędrzycka →
Kierownik zespołu
badawczego realizującego



Dr Magdalena Gawłowska
wykonawczyni analiz
transkryptomycznych



Dr hab. Grzegorz Koczyk
wykonawca analiz
bioinformatycznych



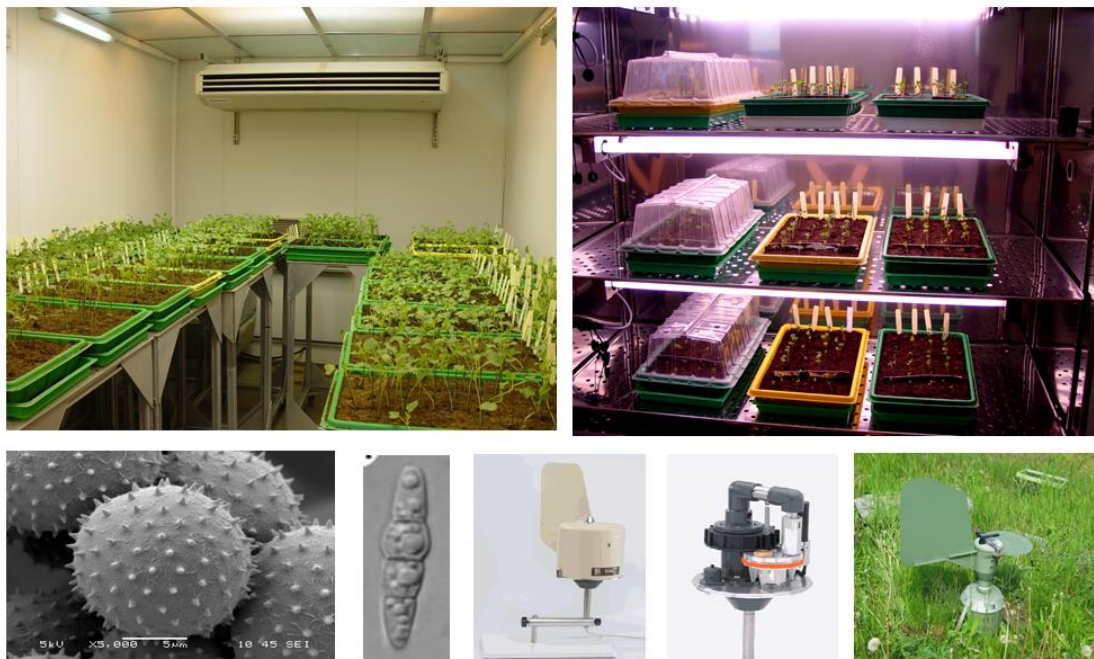
Dr Dariusz Kruszk
wykonawca analiz
metabolomicznych

Wachlarz techniczny badań prowadzonych przez zespół naukowy z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (zdjęcia ilustracyjne laboratoriów, komór klimatycznych i kompleksu szkalniowego, w których realizowano prace badawcze):

Doświadczenia laboratoryjne



Komory klimatyczne i sprzęt do wychwytywania zarodników



Kompleks szklarniowy



Doświadczenia szklarniowe



Zespół badawczy realizuje także badania polowe. W niniejszym projekcie nie zakładano jednak doświadczenia polowego na Polu Doświadczalnym IGR PAN w Cerekwicy. Wszystkie badania polowe prowadzone były w gospodarstwach rolnych uczestniczących w projekcie łądzoje Zero Tillage.

Doświadczenia polowe



Zespół uczestniczy w przekazywaniu swojej wiedzy podczas spotkań z rolnikami i doradcami:

Dni Pola

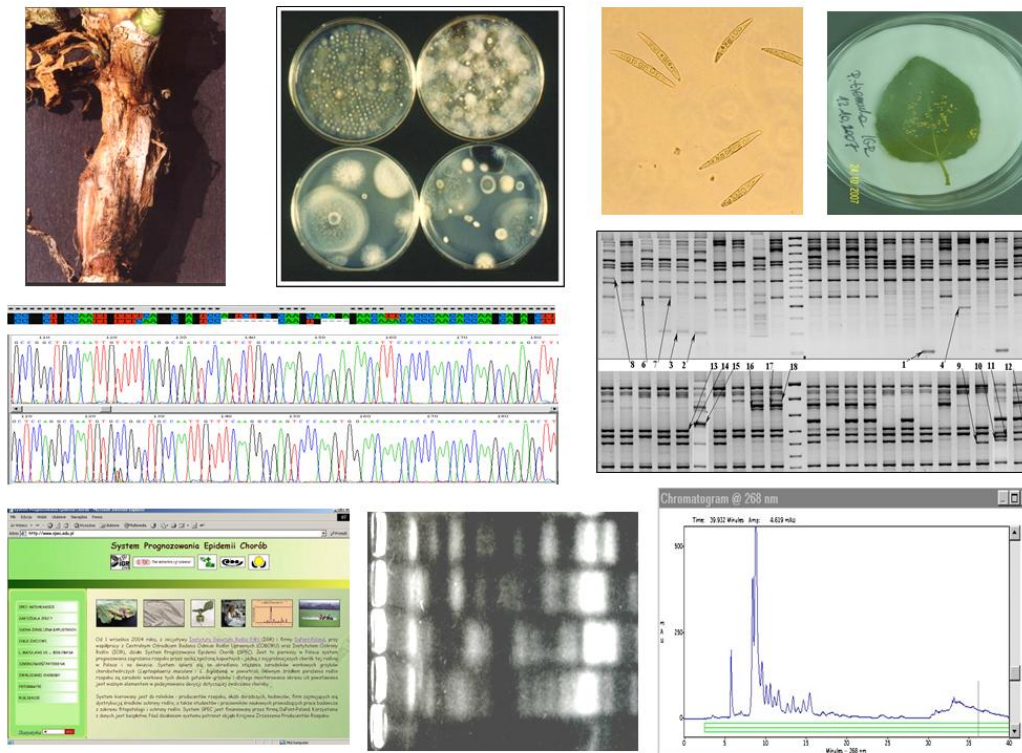


Zespół prowadzi też transfer wiedzy dla studentów oraz młodych i dojrzałych stażem ekspertów:

Kursy dla studentów oraz dojrzałych naukowców












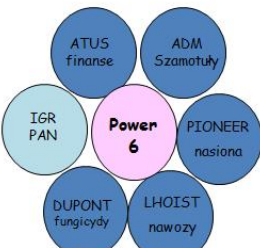





Kursy te dotyczą różnych aspektów pracy naukowej z dziedzin uprawy, fitopatologii, diagnostyki molekularnej metodami PCR oraz sekwencjonowania nowej generacji, fenotypowania roślin, badania metabolomu, transkryptomu roślin i mikrobiomu roślin uprawnych:



Zespół badawczy realizował ponad 30 projektów naukowych:

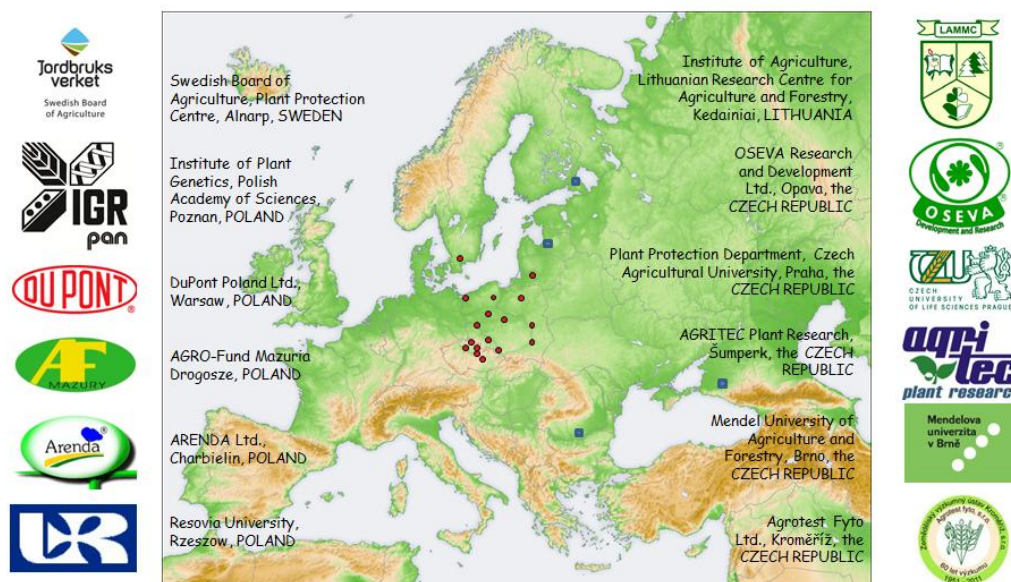
<p>IMAScore 1998-2000 FAIR3-CT96-16697</p> <p>Integrated strategies for the management of stem canker of oilseed rape in Europe</p>  	<p>SECURE 2002-2006 QLK5-CT-2002-01813</p> <p>Stem canker of oilseed rape: molecular tools and mathematical modelling to deploy durable resistance</p>  
<p>PAGEN</p> <p>Centre of Excellence in Plant Agrobiolgy and Molecular Genetics</p>   	<p>DeIPHE EUROPA KANADA - CHINY</p> <p>Protection of brassicas in China by preventing invasion of <i>Leptosphaeria maculans</i></p>    

oraz projektów bezpośrednio związanych z transferem wiedzy do praktyki rolniczej:

<p>International Organisation for Biological Control West Palaearctic Regional Section</p>    	<p>SYSTEM PROGNOZOWANIA EPIDEMII CHOROÓB (od 2004)</p> <p>www.spec.edu.pl</p>     
<p>Współpraca z przemysłem</p>   	<p>BIO-TALENT FP7-ERChairs-Pilot Call-2013</p> <p>Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland</p>   

Największym obszarem (obejmującym teren całej Polski) był jak dotąd monitoring suchej zgnilizny kapustnych na rzepaku. System był także transferowany do Czech, Szwecji, Estonii, Litwy i na Łotwę.

Monitoring aerobiologiczny patogenów grzybowych rzepaku w Europie Centralnej



W połowie października 2024 r. Instytut Genetyki Roślin PAN obchodził 70.-lecie swojej działalności:

70-lecie Instytutu (14.X.2024)



Nowe wyzwania przed naukami rolniczymi:

1. Zmiany **klimatu**, nowe rośliny uprawne, nowe patogeny.
2. Techniki **omiczne**, 'big data', metody bioinformatyczne.
3. Rosnąca **populacja** ludzi, mieszanie się kultur i zwyczajów.
4. Potrzeba **ochrony środowiska**, gospodarstwa ekologiczne.
5. Zapobieganie chorobom cywilizacyjnym, produkcja zdrowej **żywności funkcjonalnej**.
6. **Robotyka** i sztuczna inteligencja w rolnictwie, techniki fenotypowe.



Charakterystyka roślin badanych w operacji Łazdoje Zero Tillage

Operacja polegała na bezpośrednim wysiewie **rzepaku ozimego** i **pszenicy ozimej** z nasionami wybranymi na żywą ściółkę, następnie wysiewie tych roślin w już istniejącą żywą ściółkę i utrzymanie okrywy gleby z żywej ściółki przez czas trwania operacji. Na żywą ściółkę wybrano komonicę rożkową *Lotus corniculatus* oraz koniczynę białą *Trifolium repens*, zwaną też koniczyną rozesłaną. W tradycyjnej uprawie rośliny plony głównego i rośliny okrywowe uprawiane są zawsze oddzielnie, w osobnych latach lub w międzyplonach. W stosowanej technologii rośliny te zastosowano łącznie. Rośliny okrywowe stosowano jako żywy mulcz, natomiast rośliny plonu głównego były wysiane w pierwszym roku łącznie z rośliną okrywową (komonica rożkowa), a w drugim roku do uprzednio ściętej żywej ściółki.

W doświadczeniu polowym jako roślina do mulczu zastosowana była wyłącznie komonica rożkowa, natomiast w doświadczeniu szklarniowym zastosowano zarówno komonicę jak i koniczynę.

Rośliny plonu głównego i żywej ściółki



Komonica różkowa

Lotus conniculatus L.



Komonica zwyczajna to gatunek byliny z rodziny **bobowatych**. Nazywana jest także komonicą pospolitą i komonicą różkową. Pochodzi z obszarów Azji, Europy i Afryki Północnej, ale obecnie występuje na wszystkich kontynentach oprócz Antarktydy.

Charakterystyka komonicy

Roślina **światłolubna** – w stanie dzikim porasta nasłonecznione łąki, leśne polany oraz rowy przydrożne. W uprawie należy ją **wysiewać na stanowiskach słonecznych**.

Lubi gleby **lekkie, przepuszczalne**, umiarkowanie wilgotne, o zasadowym odczynie pH. Może jednak rosnąć również na glebach ciężkich, zbitych, wilgotnych, o niewielkiej zawartości składników odżywczych i kwaśnym odczynie pH.

Odporna na niekorzystne warunki pogodowe: dobrze radzi sobie zarówno z krótkotrwałymi suszami, jak i mrozami bez okrywy śnieżnej wytrzymuje temperatury nawet do **-25°C**.

Jeżeli warunki są odpowiednie, często pozostaje **rośliną zimozieloną**.

Komonica zwyczajna wyróżnia się też odpornością na zdeptywanie i przygryzanie przez zwierzęta. **Dobrze znosi wielokrotne koszenie, a po ścięciu szybko odrasta.**



Charakterystyka komonicy

Wartościowa roślina pastewna – uprawiana jest na paszę zieloną, jak i susz. Cechuje ją **wysoka zawartość białka i składników mineralnych (Ca, Mg) i karotenu.**

Największą **wadą** komonicy zwyczajnej jako rośliny pastewnej są obecne w jej kwiatach **związki cyjanogenne o gorzkim smaku.** W okresie kwitnienia nie należy podawać jej zwierzętom, gdyż może powodować zatrucia. Gorzki smak znika przy suszeniu, więc kwitnącą komonicę można ścinać i przeznaczать na siano.



Jedyną polską odmianą komonicy zwyczajnej jest odmiana Skrzeszowicka (hodowca: Małopolska Hodowla Roślin)

Współżyje z bakteriami brodawkowymi, które **wiążą azot atmosferyczny i wzbogacają glebę** w ten pierwiastek. Warto ją sadzić na glebach wyjałowionych.

Właściwości przeciwozyjne – poprawia strukturę gleby. Sadzona na nieużytkach, zboczach czy nasypach zapobiega niszczeniu gleb niestabilnych i zubożałych.

Koniczyna biała, k. rozestłana

Trifolium repens L.

Gatunek rośliny **wieloletniej** z rodziny **bobowatych.**

Pochodzi z terenu Europy, Azji, północnej Afryki, rozprzestrzenił się także w Australii, Nowej Zelandii oraz Ameryce Środkowej.

Uprawiana w wielu rejonach świata także w Polsce. Pospolita na stanowiskach naturalnych.



Hemikryptofit (roślina naziemnopączkowa) – tworzy pąki, umożliwiające roślinie odnawianie się, znajdują się tuż przy powierzchni ziemi (na lub tuż pod ziemią)

Płytki ale rozbudowany system korzeniowy, pomaga poprawić strukturę gleby, zwiększa jej porowatość i przepuszczalność dla wody oraz zmniejsza zagęszczenie gleby.



Ma zdolność do symbiozy z bakteriami brodawkowymi *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

wzbogaca glebę w azot



Koniczyna biała, k. rozestłana

Trifolium repens L.

Roślina pastewna. Znajduje się w rejestrze roślin rolniczych Unii Europejskiej a także COBORU.

Jedna z najcenniejszych roślin pastwiskowych, zawiera **dużo białka** i bardzo długo jest mięsista.

Jest **odporna na przygryzanie i deptanie**. Dzięki rozłogom szybko wypełnia wydeptane miejsca.

Nie nadaje się jednak do uprawy jako samodzielna roślina pastewna z powodu zbyt niskiego wzrostu (30 cm) uniemożliwiającego koszenie.



Podsiewana:

- w zbożach na poplon
- w mieszankach na użytkach zielonych



Charakterystyka koniczyny

Lecznicza i miododajna

Surowcem zielarskim są kwiaty (*Flos Trifolii albi*) zbierane w okresie kwitnienia jako składnik mieszanek ziołowych stosowanych przeciwrzecznicznie i przeciwartretycznie.



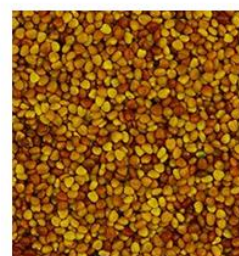
Napary z kwiatów stosowane są w schorzeniach reumatycznych, dnie, grypie, przeziębieniach, chorobach kobiecych. Kąpiel z dodatkiem naparu z kwiatów w chorobach reumatycznych i w stanach zapalnych żył. Kwitnie od maja do września, po przekwitnięciu kwiaty brunatnieją.

Jest doskonałą rośliną miododajną. W odróżnieniu od koniczyny czerwonej zapylanej głównie przez trzmielę, nektar koniczyny białej jest osiągalny również dla **pszczół miodnych**, których języczki są krótsze niż u trzmieli.

Wydajność miodowa zwarcie rosnącej koniczyny białej osiąga **100 kg/ha**

Dawniej z jej kwiatów uzyskiwano żółty barwnik do barwienia tkanin.

Nasiona rozsiewane są przez zwierzęta (**zoochoria**) – po przejściu przez ich układ pokarmowy nie tracą zdolności do kiełkowania.



W projekcie porównano siew tradycyjny:



z siewem w systemie bezorkowym (wysiew bezpośredni):



Zdjęcia umieszczone powyżej obrazują wysiew tradycyjny i w systemie bezpługowym siewnikiem SKY do siewu bezpośredniego. Siewy wykonano jesienią 2023 roku a następnie jesienią 2024 roku w trzech gospodarstwach rolnych uczestniczących w projekcie.

W projekcie zastosowano unikalny sprzęt do siewu bezpośredniego (siewnik SKY) z możliwością podłączenia do ciągnika na gąsienicach oraz możliwością wysiewu do czterech roślin jednocześnie, lub nasion dwóch roślin oraz dwóch rodzajów nawozów, każdego w odrębnym dozowaniu.

Unikalny sprzęt w projekcie OTill



Siewnik SKY



Badania naukowe wykonane przez Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

W ramach projektu „Żywa ściółka w parze z zero tillage” wykonano kompleksowe badania naukowe obejmujące wiele aspektów nowo wprowadzanej technologii uprawy, w zakresie następujących zagadnień:

1. zasobność gleby
2. wschody i wigor nasion
3. pokrycie gleby
4. spływy powierzchniowe
5. wydajność fotosyntezy
6. zachwaszczenie pola
7. transkryptom roślin
8. metabolom roślin
9. zdrowotność roślin
10. mikrobiom glebowy



Warianty:

1. pszenica w uprawie tradycyjnej,
2. pszenica w technologii no-till z żywą ściółką,
3. rzepak w uprawie tradycyjnej,
4. rzepak w technologii no-till z żywą ściółką.

**Komonica w
siewie czystym**

**Koniczyna w
siewie czystym**

Osiem wariantów w doświadczeniu w warunkach kontrolowanych:

**Rzepak w
siewie czystym**

**Rzepak z
komonica**

**Rzepak z
koniczyną**

**Pszenica w
siewie czystym**

**Pszenica z
komonica**

**Pszenica z
koniczyną**

Siew czysty oraz sposób przygotowania siewu w żywy mulcz w szklarni, w sposób analogiczny do siewu w polu:



Parametry wzrostu i rozwoju roślin badanych w operacji Łazdoje Zero Tillage w polu i szklarni

Wschody i wigor nasion w polu

Wysiew komonicy odmiany Leo: 10 kg/ha

Łopoty z wysiewem: drobne nasiona

Łopoty z kiełkowaniem: nasiona komonicy wymagają spoczynku

Łopoty z uzyskaniem nasion w ilościach potrzebnych na wielohektarowych polach

Wschody w warunkach polowych:

32%



Wschody i wigor nasion

Badania objęły oznaczenie szybkości i wyrównania wschodów oraz wielkości siewek (parametry: T1, 10, 25, 50, 75, 90). Porównano procent wschodów w wariantach tradycyjnej uprawy pszenicy i rzepaku oraz w żywej ściółce. Wyniki badań polowych porównano z prowadzonymi w szklarni (doświadczenia w kastach).



Wschody w szklarni:

98%



Parametry wschodów:

przy obsadzie rzepaku 45 roślin/m²

przy obsadzie pszenicy 330 roślin/m²

Procent kiełkowania / średnia liczba roślin

siew czysty: 98% / 44 rośliny

siew z komonią: 47% / 21 roślin

siew z koniczyną: 11% / 5 roślin

siew czysty: 99% / 328 roślin

siew z komonią: 38% / 124 rośliny

siew z koniczyną: 11% (36 roślin)

Wniosek: w mulczu stwierdzono zblizony udzial kiełkujacych roślin rzepaku i pszenicy, przy czym był on istotnie wyższy, gdy roślinę okrywową stanowiła komonica różkowa.



**Koniczyna przygotowana do wsiania
roślin plonu głównego**



**Komonica przygotowana do wsiania
roślin plonu głównego**



**Koniczyna ścięta w celu przygotowania
do wsiania roślin plonu głównego**



**Mulcz z koniczyny przed wsianiem
roślin plonu głównego**



Komonica ścięta w celu przygotowania do wsiania roślin plonu głównego [1]



Komonica ścięta w celu przygotowania do wsiania roślin plonu głównego [2]



Wzrost roślin w bardzo gęstym mulczu oraz w siewie czystym

Rzepak w konicyicy



Pszenica w konicyicy



Rzepak w koniczynie



Pszenica w koniczynie



Rzepak w siewie czystym

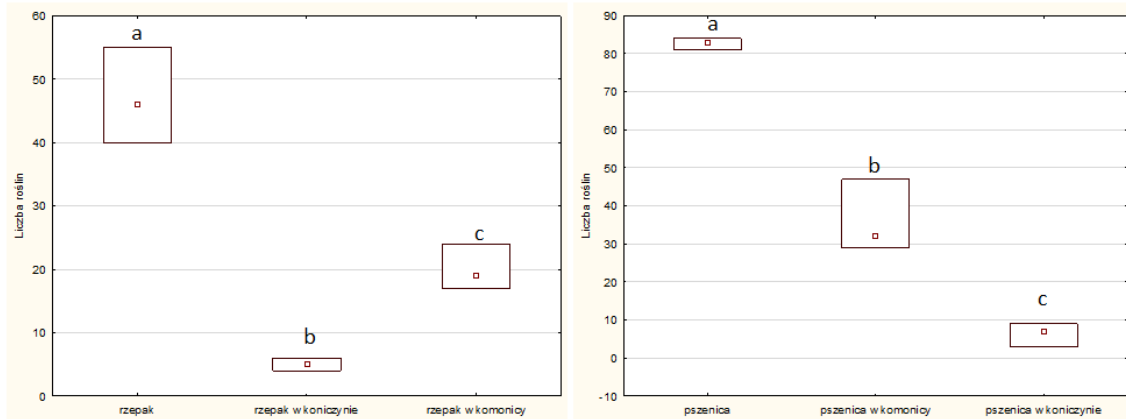


Pszenica w siewie czystym



Parametry wschodów w doświadczeniach szklarniowych w dwóch doświadczeniach z roślinami plonu głównego (rzepak, pszenica) i dwoma gatunkami roślin okrywowych (koniczyna, komonica):

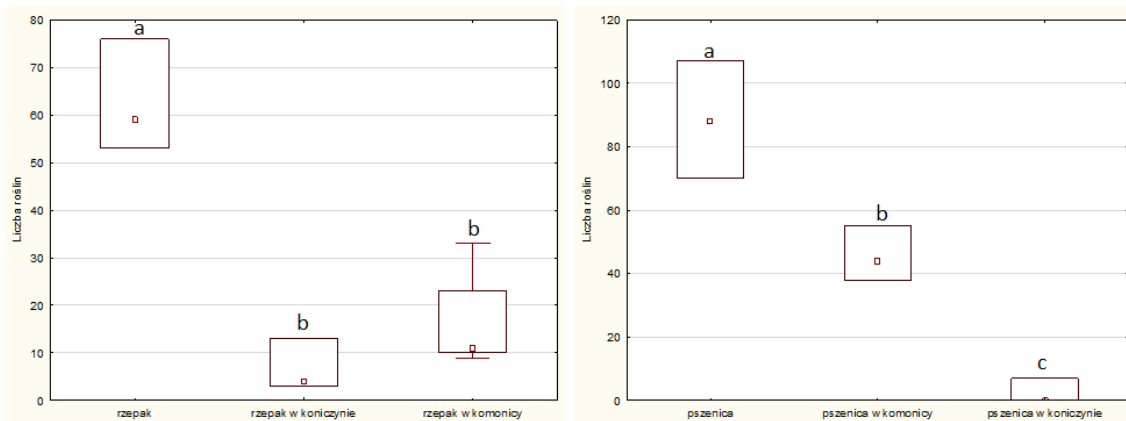
Wschody – doświadczenie szklarniowe 1



Rzepak

Pszenica

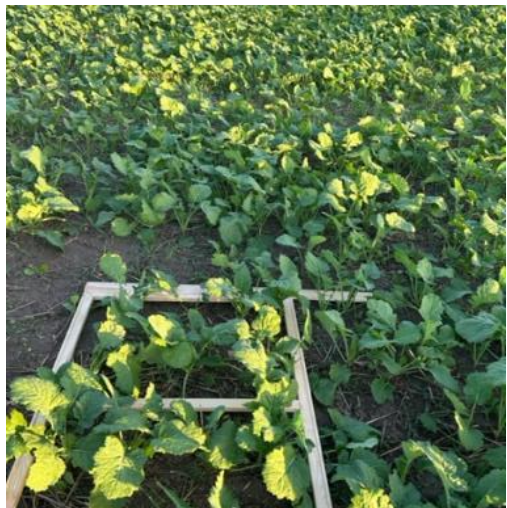
Wschody – doświadczenie szklarniowe 2



Rzepak

Pszenica

Wschody roślin w warunkach polowych



Obserwacje i pomiary wschodów rzepaku i komonicy różkowej
w gospodarstwie Łazdoje (jesień 2023)

Pola dwukrotnie monitorowano przy użyciu drona (usługa firmy AgriGrow)

Raport:
Łazdoje, 06.09.2024



Prezentacja wyników doświadczenia uprawy rzepaku ozimego z konicą zwyczajną przy użyciu wskaźników wegetacyjnych (VI)



Raport:
Łazdoje, 06.09.2024



Lokalizacja i warunki lotu

Lokalizacja:

Łazdoje, woj.: warmińsko-mazurskie, pole wskazane przez Złeceniodawcę

Data i godzina lotu:

06.09.2024 ok. 11.25–13.30

Wysokość lotu:

10 m i 50 m nad poziomem ziemi

Zachmurzenie:

zachmurzenie małe (3/8 pow. nieba)

Lokalizacja poletek:

Łazdoje woj. War.-maz., powiat kętrzyński, gm. Kętrzyn; współrzędne GPS
53°59'27.59" N 21°17'23.40" E

Typ BSP:

wielowirnikowiec

Typ kamery:

RGB + multispektralna

Prędkość wiatru:

4 - 7 m/s,

Opady:

W ciągu kilku dni poprzedzających lot opadów nie było



RGB
50 m



RGB
10 m



RGB
50 m



MS
10 m



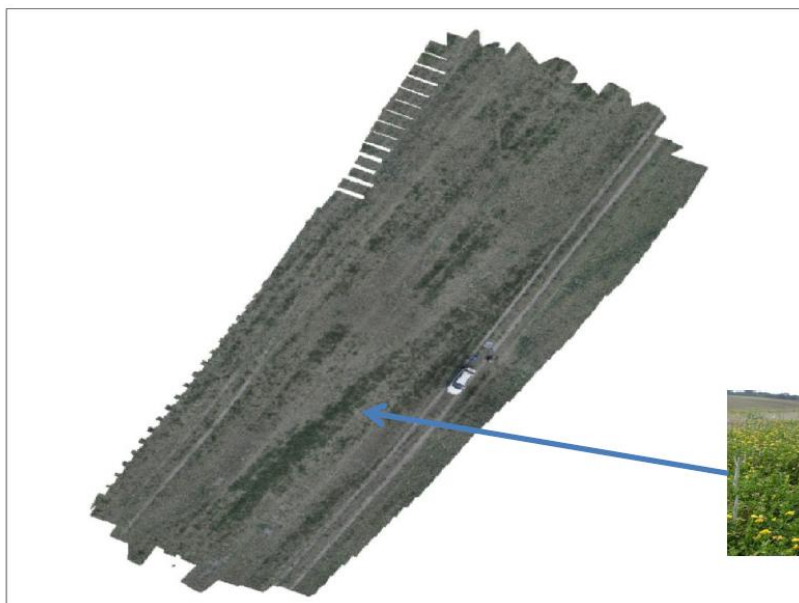
Fotografie sprzętu oraz wykorzystania drona w operacji „Żywa ściółka w parze z zero Tillage” - wykorzystano kamerę RGB oraz multispektralną na bezzałogowym wielowirnikowcu.

Na zdjęciach: Paweł Wrzesiński - operator drona oraz Agnieszka Baudet - właścicielka gospodarstwa rolnego w Łazdojach k/ Kętrzyna, woj. warmińsko-mazurskie.

ORTOFOTOMAPA ze zdjęć RGB



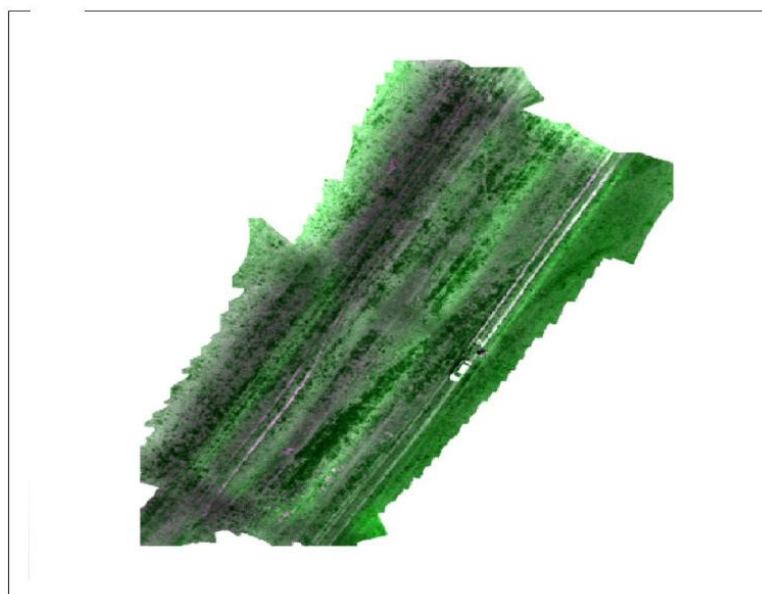
Field	Survey Date	Field Area
Lazdoje p1	06 Sep. 2024	1.43 ha
Crop	Altitude	Resolution
Komonica w OSR	10 m	0.18 cm/px



ORTOFOTOMAPA ze zdjęć multispektralnych



Field	Survey Date	Field Area
Lazdoje p1	06 Sep. 2024	1.43 ha
Crop	Altitude	Resolution
Komonica w OSR	10 m	0.98 cm/px



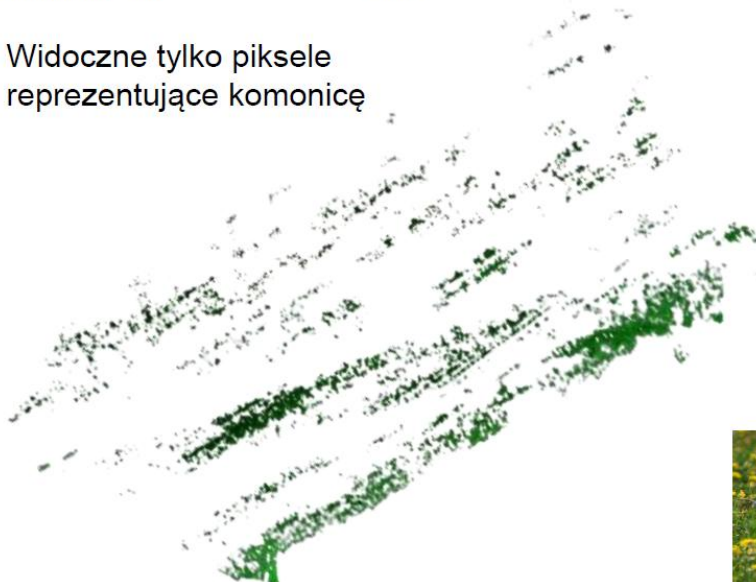
Ortofotomapa
z zdjęć MS

ORTOFOTOMAPA ze zdjęć multispektralnych



Field	Survey Date	Field Area
Lazdoje p1	06 Sep, 2024	1.43 ha
Crop	Altitude	Resolution
Komonica w OSR	10 m	0.98 cm/px

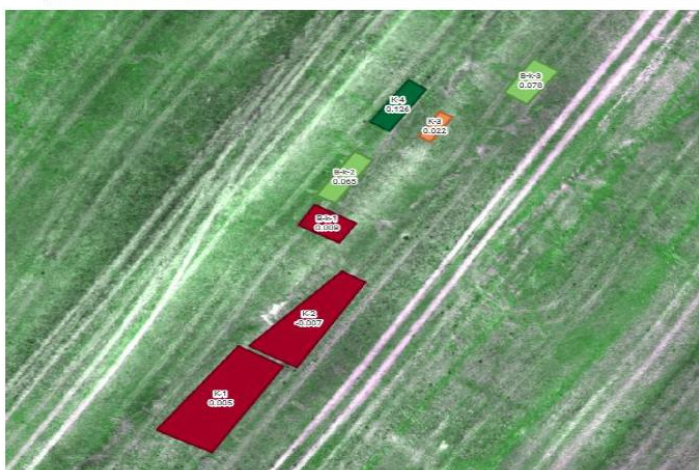
Widoczne tylko piksele reprezentujące komonicę



PLANT HEALTH – ocena kondycji/zdrowotności



Field	Survey Date	Field Area
Lazdoje p1	06 Sep, 2024	1.43 ha
Crop		
Komonica w OSR		



NDVI

24.07.2024; 50m



06.09.2024; 10m

Podsumowanie

1. **Uprawa pszenicy w koniczynie** wiąże się ze słabym kiełkowaniem i niewielką możliwością przebicia się roślin plonu głównego (w tym głównie pszenicy) przez mulcz.
2. W żywej ściółce **istotnie spada liczba kiełkujących roślin plonu głównego** (uwaga: obserwacja ze SZKLARNI, gdzie darń z koniczyny i koniczyny była bardzo gęsta a warunki odrastania roślin były zdecydowanie korzystniejsze dla koniczyny i koniczyny aniżeli w warunkach polowych.



Wnioski:

- 1) W warunkach szklarniowych wschody roślin w siewie czystym były istotnie wyższe od wschodów w gęstym mulczu, jednakże należy zauważyć iż mulcz w szklarni był zdecydowanie gęściejszy aniżeli mulcz w warunkach polowych.
- 2) Cenniejszą rośliną dla żywego mulczu była koniczyna różkowa. Koniczyna znacznie utrudniała przebicie się roślin plonu głównego przez gęsty mulcz.

Zasobność gleby

Oznaczono pH oraz zawartości podstawowych mikro i makroelementów

w tym fosforu, potasu, magnezu, manganu, miedzi, cynku, żelaza, boru oraz azotu z trzech warstw (0-30 cm, 30-60 cm, 60-90 cm) a także zawartości próchnicy.

Próby pobierano z pól doświadczalnych gospodarstw rolnych uczestniczących w projekcie z czterech następujących wariantów:

- rzepak w uprawie tradycyjnej,
- rzepak w badanej technologii no-till z żywą ściółką
- pszenica w uprawie tradycyjnej,
- pszenica w badanej technologii no-till z żywą ściółką.

Próby pobierano łaską Egnera do głębokości 90 m wgłąb gleby.

Usługa oznaczania zawartości makro- i mikroelementów oraz pH i próchnicy została przeprowadzona w akredytowanych laboratoriach:

- 1) Okręgowa Stacja Chemiczno-Rolnicza w Poznaniu
- 2) Okręgowa Stacja Chemiczno-Rolnicza w Olsztynie

Badania sływu powierzchniowego wody zostały wykonane po konsultacji w Europejskim Regionalnym Centrum Ekohydrologii (ERCE PAN w Łodzi).

Badania wykonano korzystając z akredytowanych laboratoriów, opłacając usługi zgodnie ze standardowymi cennikami:



Cennik usług podstawowych OSCHR Poznań	
Obowiązuje od 01.08.2018 r.	
Wszystkie ceny są cenami brutto w zł i odnoszą się do jednej próby.	
Podstawę prawną: Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Reformy Wsi z dnia 8 sierpnia 2014 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie warunków i sposobu realizacji zadań z zakresu laboratoryjnych usług w zakresie analizy chemicznej (Dz.U. z 2014 r., poz. 1210)	
Badanie gleb rolniczych	Cena Grupa
Zakres podstawowy: pH, fosfor, potas, magnez	13,12 1
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe, B (jeśli razem z makro)	52,48 5
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe (jeśli razem z makro)	34,99 5
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe, B (jeśli tylko, to dochodzi ośm pH)	58,73 5
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe (jeśli tylko, to dochodzi ośm pH)	41,24 5
Zawartość N min (1 warstwa 0-30 cm) - gleba mineralna	59,37 2
Zawartość N min (2 warstwy 0-60 cm) - gleba organiczna	28,12 2
Zawartość N min (3 warstwy 0-90 cm)	42,48 2
Oznaczenie samego pH w KCl lub H ₂ O gleba rolnicza	15,62 3
Badanie gleb ogrodniczych	Cena Grupa
Odczyt pH, P, K, Mg, Ca, Cl, N-NO ₃ , azotanie, odczyt objętościowy	52,48 4
Mikroelementy ogrodnicze (Mn, Cu, Zn, Fe) - jeśli razem z makro	81,25 5
Mikroelementy ogrodnicze (Mn, Cu, Zn, Fe) - tylko mikro	87,30 5
Oznaczenie samego pH w H ₂ O gleba ogrodnicza	12,50 4
Oznaczenie samego azotanie	13,75 4
Woda ogrodnicza (pH, P, K, Mg, Ca, Cl, N-NO ₃ , azotanie)	68,12 16
Zaczenie nawozowe ogrodnicze lub sadownicze	18,75 16
Badanie gleb sadowniczych (pH, fosfor, potas, magnez)	Cena Grupa
Z warstwy	26,24 4
1 warstwy (glebięty)	13,12 4
Opracowania na mapkach, zalecenia, opiniowanie Planów Nawożenia	Cena Grupa
Opracowanie wykładki na mapkach (kolorystyka) - 1 polska	8,75 10
Zaczenie nawozowe - broszura (plakata klasyczna)	8,75 10
Wykładka broszura (CaO)	2,13 13
Opracowanie Planu Nawożenia - za 1 rolnictwo do 5 ha	7,11 15
Badania nawozów naturalnych	Cena Grupa
Pomoc kurzy (s.m., Nop, P ₂ O ₅ , K ₂ O)	212,46 11
Obornik (s.m., Nop, P ₂ O ₅ , K ₂ O)	212,46 11
Obornik (s.m., Nop, P ₂ O ₅ , K ₂ O + MgO)	224,96 11
Obornik (s.m., Nop, P ₂ O ₅ , K ₂ O + CaO)	212,46 11
Obornik (s.m., Nop, P ₂ O ₅ , K ₂ O + MgO + CaO)	231,21 11
Gnojowica (s.m., Nop, P ₂ O ₅ , K ₂ O)	188,72 11
Gnojowka (Nop, P ₂ O ₅ , K ₂ O)	148,97 11

Cennik usług dodatkowych OSCHR Poznań	
Pozostałe badania gleb	
Oznaczenie sianki szarłatowej w glebie S-S ₀ (tylko S-S ₀)	53,11 16
-S-S ₀ (jeśli razem z makro)	49,86 16
-S-S ₀ (jeśli razem z mikro)	37,49 16
Oznaczenie (sianki ogólnie)	84,35 16
Oznaczenie zawartości próchnicyCorg - gleba mineralna	40,81 16
Corg (jeśli z makro)	38,36 16
Oznaczenie substancji organicznej	59,36 16
Oznaczenie metali opalnych w glebie (s.m., Pb, Cd, Cr, Ni)	343,69 6
Oznaczenie metali opalnych w glebie (s.m., Pb, Cd, Cr, Ni)	306,19 6
-jeśli badane metal pod wyrywki, to dochodzi ośm pH	19,25 3
-jeśli badane metal pod wyrywki w glebie mineralno-organicznej to dochodzi ośm pH	+24,99 16
Opracowanie nt. zawartości metali opalnych (kompaty)	3,75 16
Inne badania	Cena Grupa
Badanie gleby pod osady surowicze	53,11 16, 3
1 etap - sieć granulometryczny laser + pH w H ₂ O	413,68 6, 16
2 etap (s.m., Pb, Cd, Hg, Ni, Cr, Zn, Cu, P ₂ O ₅)	413,68 6, 16
Skład granulometryczny osm. membranek basenowym	46,86 16
Skład granulometryczny wg Polczyńskiego - gleby	105,34 16
Badanie materiału roślinnego (Pb, Cd)	212,46 9
Badanie materiału roślinnego (Pb, Cd, Ni, Cr)	324,94 9
Pobranie próbek gleby, materiału roślinnego, wody	Cena Grupa
Warstwa warstwowo	18,75 16
Warstwa orna + podpalce (albo tylko podpalce)	37,49 16
Warstwa orna + podpalce + warstwa gleby (albo tylko gleby)	56,24 16
Pobranie próbek materiału roślinnego lub paszy	37,49 16
Pobranie próbek wody z powierzchni gleby	56,24 16
Pobranie próbek nawozów	Cena Grupa
Pobranie próbek nawozu np. wraze doposażeniem do odczytu obornicznego	74,98 16
organicznego, mineralno-organicznego, naturalnego, kompostu	104,97 16
piłynowego naturalnego (gnojowica, gnojowka)	203,95 16
piłynowego (zosta naturalny)	87,48 16
Wapno nawozowe zawierające magnez (sterilizowane, sepiolizowane)	Cena Grupa
CaO, MgO wilgotność	249,93 11
CaO, MgO	212,44 11
CaO	127,48 11
CaO i wilgotność	174,95 11
Wapno nawozowe niezawierające magnezu (sterilizowane, sepiolizowane)	Cena Grupa
Surowe - CaO	137,46 11
Surowe - CaO i wilgotność	174,95 11
Mokre, np. krusza jęczmienna, delekacyjna - CaO	198,21 11
Mokre, np. krusza jęczmienna, delekacyjna - CaO i wilgotność	193,70 11

Badanie gleb rolniczych		Cena
Zakres podstawowy: pH, fosfor, potas, magnez		13,12
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe, B (jeśli razem z makro)		52,48
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe (jeśli razem z makro)		34,99
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe, B (jeśli tylko, to dochodzi ośm pH)		58,73
Zawartość mikroelementów Mn, Cu, Zn, Fe (jeśli tylko, to dochodzi ośm pH)		41,24
Zawartość N min (1 warstwa 0-30 cm) - gleba mineralna		59,37
Zawartość N min (2 warstwy 0-60 cm) - gleba organiczna		28,12
Zawartość N min (3 warstwy 0-90 cm)		42,48
Oznaczenie samego pH w KCl lub H ₂ O gleba rolnicza		15,62

Oznaczenie zawartości próchnicyCorg - gleba mineralna	40,81
Corg (jeśli z mikro)	38,36
Oznaczenie substancji organicznej	59,36

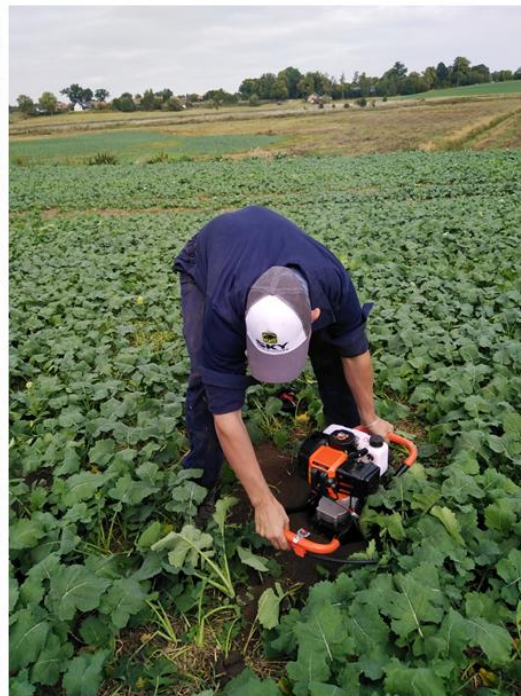


Próby pobierano łaską Egnera a odwierty w łanie rzepaku wykonywano świdrem glebowym:

Pobieranie prób gleby łaską Egnera



Odwierty świdrem glebowym






Początkowa zawartość azotu w glebie bez komonicy

Tabela wyników

Kod laboratoryjny próbki	Informacje od Klienta			Zawartość w mg/kg s.m. gleby		Zawartość Nmin w kg/ha ²⁾	Zawartość Nmin w kg/ha w warstwie 0-90 ²⁾	zasobność ¹⁾ dotyczy warstw 0-60cm	
	Warstwa cm	Oznaczenie próbki	Kategoria agronomiczna gleby	N-NO ₃	N-NH ₄				
GR/1612/22	0-30	8 A	średnia	8,51	0,65(n)	39,4	98,80	niska	✗
GR/1612/23	31-60	8 B		5,78	0,71(n)	27,90			
GR/1612/24	61-90	8 C		6,22	1,11(n)	31,50			
GR/1612/25	0-30	9 A	średnia	4,06	0,09(n)	17,8	61,30	bardzo niska	✗
GR/1612/26	31-60	9 B		6,34	0,43(n)	29,10			
GR/1612/27	61-90	9 C		1,91	1,45(n)	14,40			
GR/1612/28	0-30	10 A	średnia	5,14	0,28(n)	23,3	69,30	bardzo niska	✗
GR/1612/29	31-60	10 B		2,11	0,22(n)	10,00			
GR/1612/30	61-90	10 C		6,33	2,04(n)	36,00			
GR/1612/31	0-30	11 A	średnia	10,09	0,66(n)	46,2	110,50	niska	✗
GR/1612/32	31-60	11 B		5,02	0,41(n)	23,30			
GR/1612/33	61-90	11 C		8,50	1,04(n)	41,00			
GR/1612/40	0-30	14 A	średnia	4,83	2,08	29,7	85,80	niska	✗
GR/1612/41	31-60	14 B		1,65	3,64	22,70			
GR/1612/42	61-90	14 C		5,58	2,19	33,40			
GR/1612/19	0-30	7 A	średnia	9,61	0,43(n)	43,2	124,00	średnia	✗
GR/1612/20	31-60	7 B		6,77	0,83(n)	32,70			
GR/1612/21	61-90	7 C		10,28	0,90(n)	48,10			

Zdecydowana poprawa zawartości azotu w glebie po zastosowaniu wsiewki z komonicy – pole 1

Tabela wyników

Kod laboratoryjny próbki	Informacje od Klienta			Zawartość w mg/kg s.m. gleby		Zawartość Nmin w kg/ha ²⁾	Zawartość Nmin w kg/ha w warstwie 0-90 ²⁾	zasobność ¹⁾ dotyczy warstw 0-60cm	
	Warstwa cm	Oznaczenie próbki	Kategoria agronomiczna gleby	N-NO ₃	N-NH ₄				
GR/1612/1	0-30	1 A	średnia	12,82	2,99	68,0	119,10	wysoka	
GR/1612/2	31-60	1 B		5,86	0,79(n)	28,60			
GR/1612/3	61-90	1 C		3,95	1,28(n)	22,50			
GR/1612/4	0-30	2 A	średnia	8,22	0,40(n)	37,1	100,90	niska	✗
GR/1612/5	31-60	2 B		6,64	1,07(n)	33,20			
GR/1612/6	61-90	2 C		5,81	1,30(n)	30,60			
GR/1612/7	0-30	3 A	średnia	15,38	1,26(n)	71,6	135,30	bardzo wysoka	
GR/1612/8	31-60	3 B		7,79	0,75(n)	36,70			
GR/1612/9	61-90	3 C		5,85	0,42(n)	27,00			
GR/1612/10	0-30	4 A	średnia	9,52	1,00(n)	45,2	107,30	średnia	✗
GR/1612/11	31-60	4 B		8,32	0,48(n)	37,80			
GR/1612/12	61-90	4 C		5,27	0,38(n)	24,30			
GR/1612/13	0-30	5 A	średnia	14,51	1,14(n)	67,3	117,80	wysoka	
GR/1612/14	31-60	5 B		6,47	0,43(n)	29,70			
GR/1612/15	61-90	5 C		3,68	1,16(n)	20,80			
GR/1612/16	0-30	6 A	średnia	8,08	0,21(n)	35,6	59,90	bardzo niska	✗
GR/1612/17	31-60	6 B		3,06	0,35(n)	14,70			
GR/1612/18	61-90	6 C		1,45(n)	0,79(n)	9,60			

Zdecydowana poprawa zawartości azotu w glebie po zastosowaniu wsiewki z komonicy – pole 2

Tabela wyników

Kod laboratoryjny próbki	Informacje od Klienta			Zawartość w mg/kg s.m. gleby		Zawartość Nmin w kg/ha ²⁾	Zawartość Nmin w kg/ha w warstwie 0-90 ²⁾	zasobność ¹⁾ dotyczy warstw 0-60cm
	Warstwa cm	Oznaczenie próbki	Kategoria agronomiczna gleby	N-NO ₃	N-NH ₄			
GX/477/1	0-30	1	ciężka	16,70	0,50(n)	67,1	237,10	bardzo wysoka
GX/477/2	31-60	2		16,00	0,90	65,90		
GX/477/3	61-90	3		22,00	4,70	104,10		
GX/477/4	0-30	4	ciężka	11,50	0,50(n)	46,8	145,80	wysoka
GX/477/5	31-60	5		12,00	0,60(n)	49,10		
GX/477/6	61-90	6		10,40	2,40	49,90		
GX/477/7	0-30	7	ciężka	12,50	1,40	54,2	138,00	bardzo wysoka
GX/477/8	31-60	8		12,10	1,60	53,40		
GX/477/9	61-90	9		6,40	1,40	30,40		
GX/477/10	0-30	10	ciężka	13,20	3,60	65,5	222,60	bardzo wysoka
GX/477/11	31-60	11		16,40	3,30	76,80		
GX/477/12	61-90	12		11,10	9,50	80,30		
GX/477/13	0-30	13	ciężka	19,60	12,20	124,0	196,50	bardzo wysoka
GX/477/14	31-60	14		17,20	0,60(n)	49,90		
GX/477/15	61-90	15		5,60	0,20(n)	22,60		
GX/477/16	0-30	16	średnia	13,10	0,60(n)	58,9	145,40	bardzo wysoka
GX/477/17	31-60	17		11,60	0,30(n)	51,20		
GX/477/18	61-90	18		8,10	0,10(n)	35,30		



Na korzeniach komonicy stwierdzono występowanie licznych brodawek korzeniowych:



W brodawkach korzeniowych bytują bakterie brodawkowe, zwane też bakteriami korzeniowymi, należące do kilku rodzajów taksonomicznych, znanych głównie jako *Rhizobium*. Bakterie te mają zdolność do wiązania azotu atmosferycznego, dzięki czemu zaopatrują rośliny i zostawiają w glebie dobrze przyswajalny azot, wpływając pozytywnie na wzrost roślin i ich plonowanie.



Z brodawek tych izolowano bakterie należące do różnych rzędów, w tym Rhizobiales..





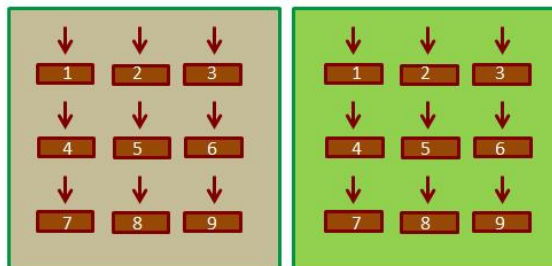
Bakterie wyizolowane z brodawek korzeniowych komonicy różkowej odmiany Leo, uprawianej w warunkach polowych jako wsiewka w rzepak i pszenicę (identyfikacja metodą molekularną, przypisanie do gatunku na podstawie identyfikacji fragmentu 16S rRNA. Jest to obecnie powszechnie stosowana metoda identyfikacji molekularnej flory bakteryjnej.



W doświadczeniu polowym poza mikrobiomem badano także spływy powierzchniowe gleby, stosując dwie metody: 1) trepy gumowe wychwytyjące resztki gleby spływające z pola o określonym pochyleniu (10° tj. 10 stopni kątowych); 2) pochylenie kastr w warunkach szklarniowych (10°).



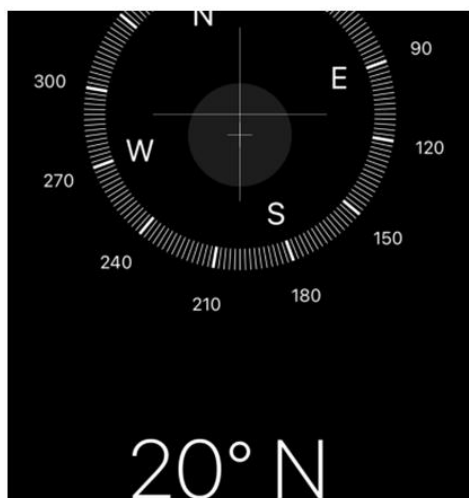
Spływy powierzchniowe



	RR	RK
1	37,6	34,9
2	32,2	34,7
3	31,8	30,0
4	30,0	32,5
5	32,2	26,1
6	36,9	31,2
7	32,2	32,9
8	34,6	29,8
9	30,4	29,3
Suma	297,9	281,4
Średnia	33,1	31,3

Z każdego z trepów gumowych wyjęto glebę z każdego rowka (9 trepów x 2 warianty x 15 rowków) a glebę pozostawiono do wyschnięcia i osobno zważono. Uzyskano wagi suchej masy od 0,2 g do 4,5 g. Wartości te dodano i policzono sumy oraz średnie wartości suchej masy z każdego wariantu. W przypadku wariantu (RK - rzepak w komonicy) uzyskano nieznacznie mniejszy parametr erozji glebowej aniżeli w przypadku wariantu RR (rzepak bez wsiewki), jednak zauważyć należy, iż z powodu nierównomiernego siewu i kiełkowania komonicy niektóre z trepów gumowych znalazły się w strefie o bardzo niewielkiej obsadzie komonicy, nie wpływającej na wynik pomiaru. Z dalszych pomiarów zrezygnowano z uwagi na uciążliwość badania i przeniesiono obserwacje do szklarni IGR PAN.

Trepy gumowe pod kątem 10°



Wydłubywanie osadów ze szpar i ważenie: **brak różnic statystycznie istotnych między wariantami z koniczą i bez, znaczne zróżnicowanie danych, brak komonicy w wielu miejscach wyłożenia trepów gumowych.**

Obecnie: ocena spływów powierzchniowych w doświadczeniu szklarniowym (pochylenie kast pod kątem 10°).



Spływy powierzchniowe gleby z upraw w siewie czystym były istotnie wyższe w porównaniu do spływów roślin plonu głównego w koniczynie i koniczy. Najsilniejsze związanie gleby z podłożem wystąpiło w koniczynie, a następnie w koniczy w siewie czystym i z wsiewką pszenicy. W rzepaku erozja wodna była najwyższa i wnosila ok. 1 mm/1m/1 msc.



Do określenia wielkości spływów powierzchniowych wskazane są szeroko zakrojone metody hydrologiczne (badanie zlewni), które nie były planowane w niniejszym projekcie.

Życiodajny proces fotosyntezy

Fotosynteza to proces biochemiczny zachodzący **wyłącznie w obecności światła** w komórkach roślinnych zawierających **zielony barwnik chlorofil** i **żółty karoten** (lub sinicach zawierających bakteriochlorofil).

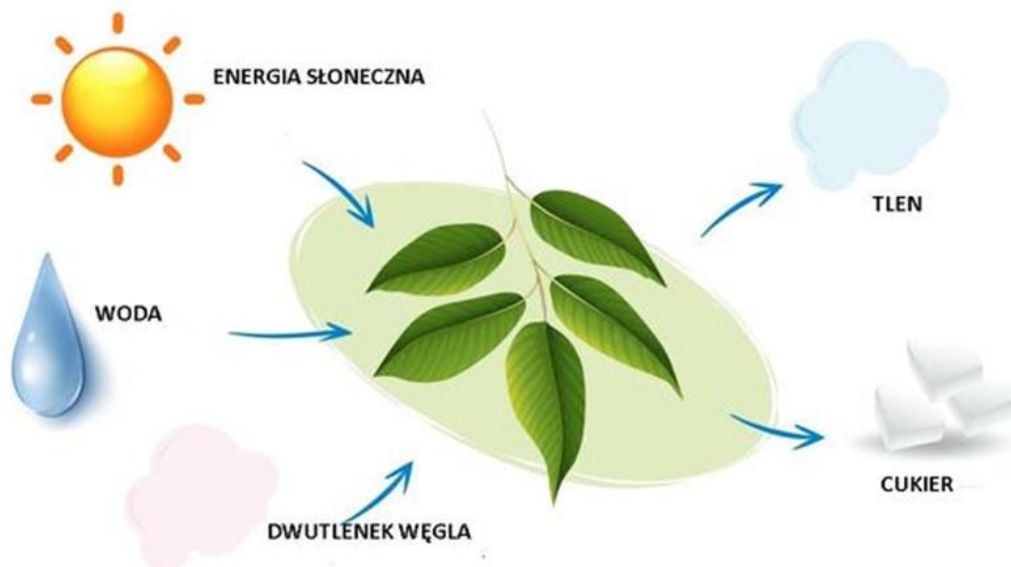


chloroplast
organellum komórkowe

W wyniku reakcji chemicznych **z prostych związków nieorganicznych** (dwutlenek węgla, woda i rozpuszczone w niej sole mineralne) powstają **związki organiczne**, takie jak węglowodany (cukry proste i złożone), białka, tłuszcze i inne.

Produktem ubocznym jest **tlen, oddawany przez rośliny do atmosfery**. Z powietrza nasyconego tlenem korzystają wszystkie organizmy wyższe, które same w sposób naturalny go nie wytwarzają, a jest im niezbędny do życia.

FOTOSYNTENZA



Życiodajny proces fotosyntezy

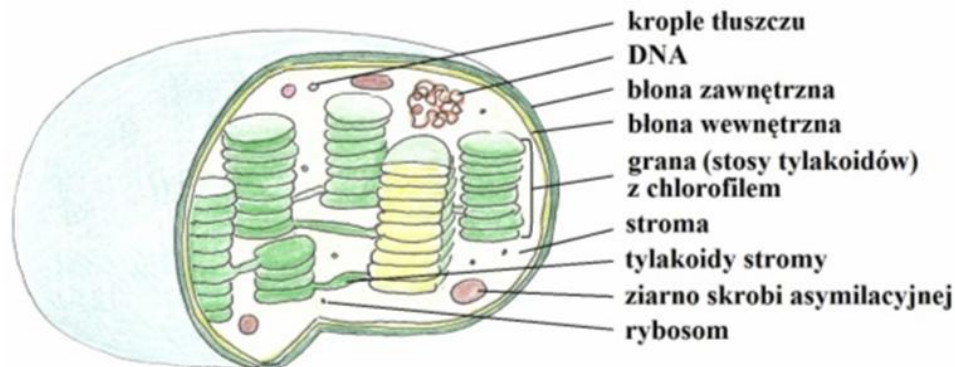
- Dwutlenek węgla pobierany jest z atmosfery przez **aparaty szparkowe liści**, a wodę wraz z rozpuszczonymi w niej związkami chemicznymi (solami) roślina pobiera z gleby przez swój **system korzeniowy**.

faza świetlna polega na **rozszczepieniu wody pod wpływem energii świetlnej** pochłoniętej i przetworzonej przez **chlorofil**. **Uwolniony zostaje tlen**, a wodór i energia zmagazynowane w tkankach rośliny



faza ciemna to kolejny etap, podczas którego reakcje biochemiczne zachodzą bez udziału światła, ale niezbędna jest do tego energia chemiczna (zwana **siłą asymilacyjną**) pochodząca z fazy pierwszej. Po szeregu reakcji chemicznych **powstają związki organiczne**. Proces ten ma miejsce **w chloroplastach** i nazywany jest **cyklem fotosyntetycznej redukcji węgla (cykl Calvina)**.

Budowa chloroplastu



Chlorofil w roślinach

W 1925 roku niemiecki chemik Richard Wildstätter zdobył nagrodę Nobla za odkrycie chlorofilu. Odkrył, że struktura **chlorofilu** – zielonego barwnika roślin i **hemoglobiny** – czerwonego barwnika krwi są do siebie bardzo podobne. Główna różnica polega na tym, że w centrum hemoglobiny znajduje się **atom żelaza** a w centrum cząsteczki chlorofilu – **atom magnezu**.



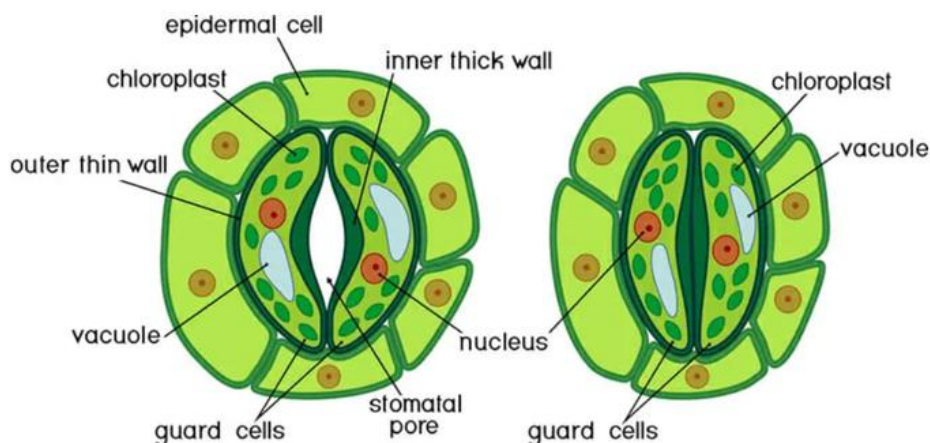
Obie te substancje są **niezbędne do życia**.

<p>HEMOGLOBINA</p> <p>substancja zawarta we krwi ludzkiej, która przenosi tlen z płuc do wszystkich tkanek i komórek w organizmie.</p> <p>ŻELAZO</p>	<p>CHLOROFIL</p> <p>Zielony pigment w roślinach, który przekształca promienie słoneczne w energię chemiczną poprzez proces fotosyntezy.</p> <p>MAGNEZ</p>
--	---



Richard Wildstätter

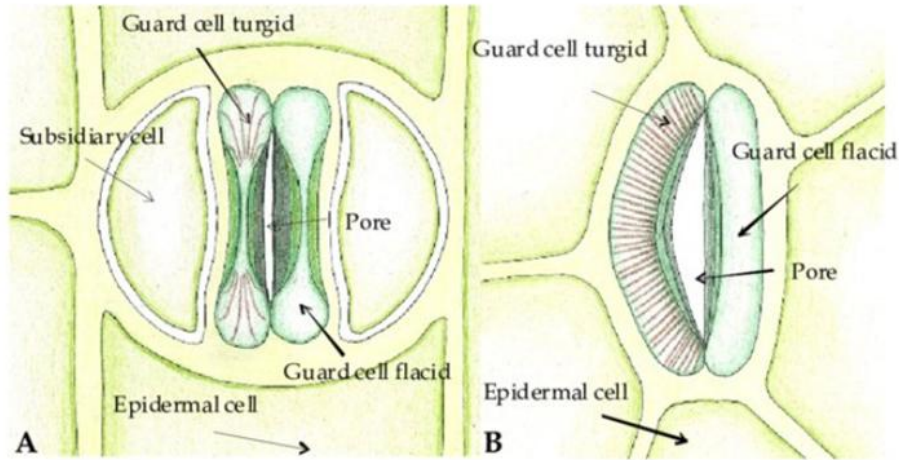
Aparat szparkowy jest podstawowym elementem odpowiedzialnym za przewodność dyfuzyjną powierzchni liści i jest wykorzystywany przez roślinę zarówno do kontrolowanej utraty wody, jak i do asymilacji CO₂ w procesie fotosyntezy.



otwarty aparat szparkowy

zamknięty aparat szparkowy

Kompleksy szparkowe



trawy

dwuliścienne

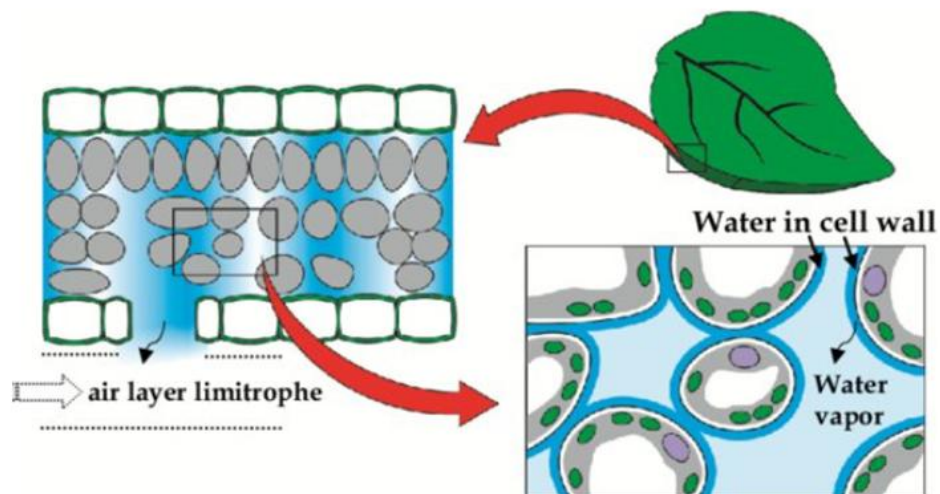
Lewe komórki ochronne nabrzmiałe (otwarte), prawe wiotkie (zamknięte)



Henrique Pessoa dos Santos

Doctor in Plant Physiology · Head of Department at Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) Brazil

Parowanie wody ze ścian komórkowych mezofilu



Para wodna uchodzi przez otwór szparkowy. Na ten przepływ bezpośrednio wpływa **graniczna warstwa powietrza**

Przewodnictwo aparatów szparkowych

Pomiar przewodności szparkowej jest istotnym wskaźnikiem stanu wodnego rośliny i dostarcza ważnych informacji na temat wzrostu roślin i ich adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych.

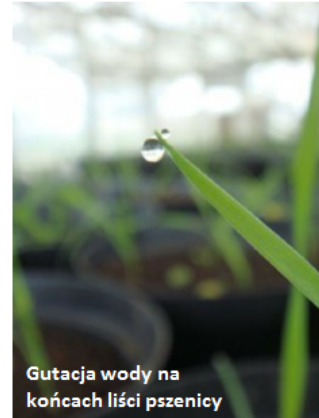
Przewodnictwo aparatów szparkowych, zwykle mierzone w $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ za pomocą **porometru**, szacuje szybkość wymiany gazowej i transpiracji przez aparaty szparkowe.

Przewodnictwo szparkowe jest miarą:

- 1) **stopnia otwarcia** aparatów szparkowych
- 2) **liczby** aparatów szparkowych
- 3) **wielkości** aparatów szparkowych

Szybkość reakcji szparkowej na zmieniające się warunki środowiskowe ma duży wpływ na fotosyntezę i wykorzystanie wody przez roślinę.

Przewodnictwo szparkowe jest głównym czynnikiem determinującym **plon roślin**.



Pomiar przewodnictwa aparatów szparkowych



Porometr AP4

- Bezpośredni pomiar przewodności / oporu szparkowego liścia
- Prosta kalibracja w terenie
- Minimalny stres liścia w trakcie pomiaru
- Prosty interfejs użytkownika



Porometr AP4 wykonuje pomiar przewodności szparkowej poprzez porównanie precyzyjnie zmierzonej zmiany wilgotności wewnątrz głowicy pomiarowej do odczytów uzyskanych przy użyciu płytki kalibracyjnej. **Płytki kalibracyjna** posiada 6 ustawień przewodności dokładnie dobranych w procesie szczegółowych analiz.

Analiza parametrów procesu fotosyntezy

Badania prowadzono w warunkach polowych oraz w szklarni przy zastosowaniu następującej aparatury badawczej:

- w warunkach polowych (Gospodarstwo Łazdoje)

Porometr AP4 (przewodnictwo szparkowe)

HandyPea (fluorescencja chlorofilu)

SPAD (zawartość chlorofilu)



- w warunkach szklarniowych (IGR PAN)

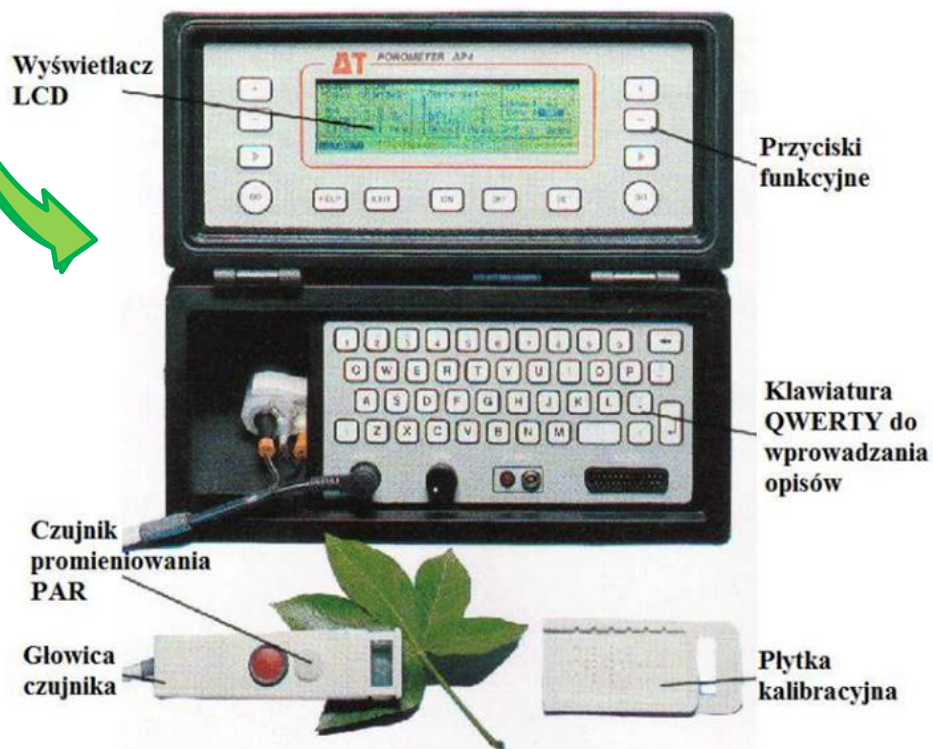
Porometr AP4

HandyPea

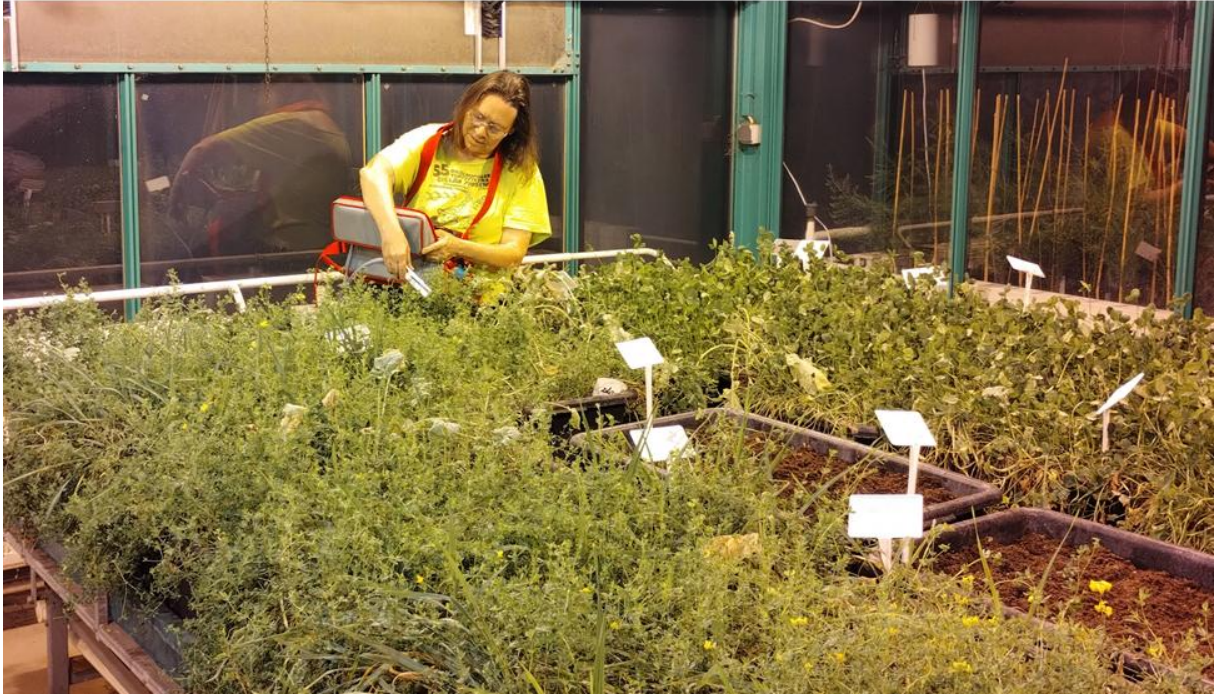
SPAD



PLAN: przy zastosowaniu aparatu **LiCOR**
z komorami dobranymi do typu badanych liści



**Przewodnictwo aparatów szparkowych
pomiaru w szklarni aparatem porometr AP4**

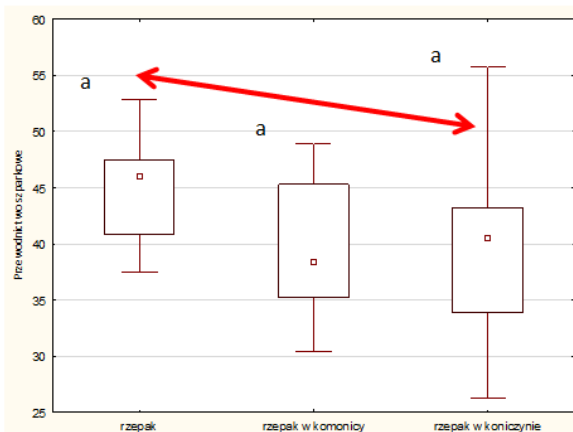


**Przewodnictwo aparatów szparkowych
pomiaru na polu aparatem porometr AP4**

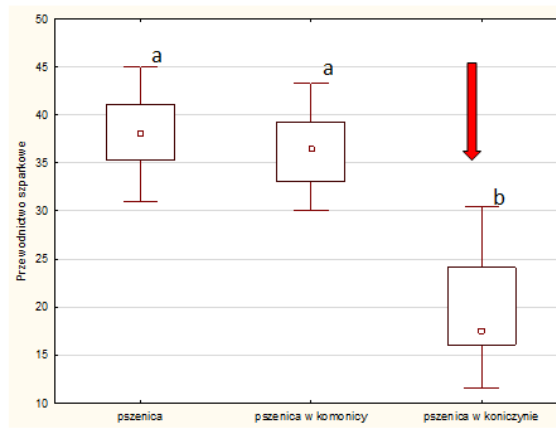


Przewodnictwo szparkowe

Porometr AP4



Rżepak



Pszenica



Handy Pea

fluorescencja chlorofilu

Urządzenia przenośne



SPAD

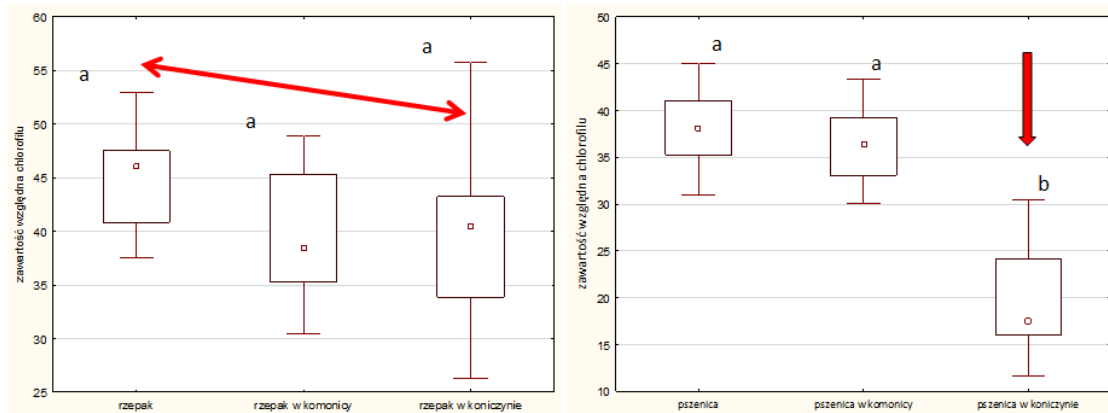
Zawartość chlorofilu



LiCOR 6800

Liczne parametry wydajności fotosyntezy

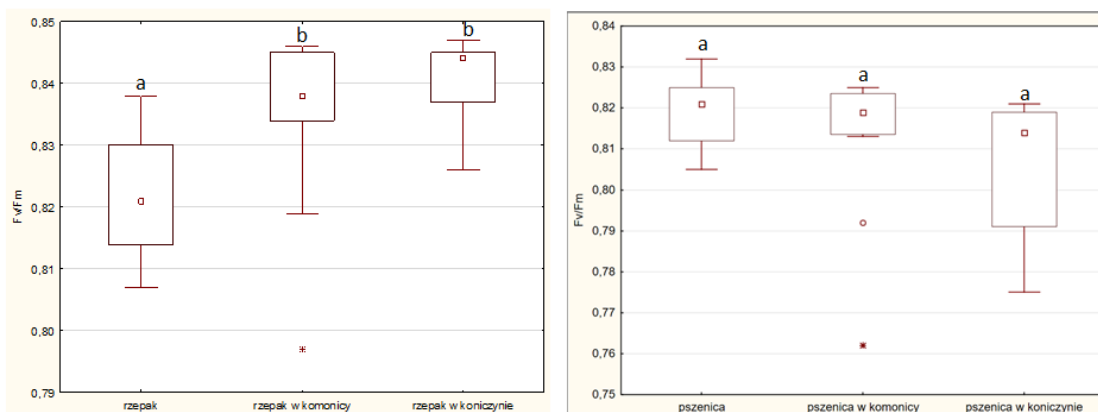
Zawartość chlorofilu chlorofilomierz SPAD



Rzepak

Pszenica

Fluorescencja chlorofilu parametr F_v/F_m



Rzepak

Pszenica

Parametr F_v/F_m (maksymalna wydajność fotosystemu II) jest najbardziej popularnym, porównawczym testem pozwalającym na wykrycie stresu roślin.

Wartości z zakresu **0,83-0,85** wskazują na wzrost roślin w warunkach optymalnych (bez stresu).

Wniosek:

Rzepak i pszenica w koniczynie charakteryzowały się najmniej korzystnymi parametrami fotosyntezy, natomiast najkorzystniejsze były parametry dla roślin w siewie czystym. Natomiast maksymalna wydajność fotosystemu II dla rzepaku w koniczy nie wskazywała na uprawę rzepaku w warunkach stresu.

Zdrowotność roślin

Zbieranie okazów porażonych roślin



Na zdjęciach widoczne objawy suchej zgnilizny kapustnych i werciliozy, brak objawów zgnilizny twardzikowej, słabe objawy czerni kapustowatych, brak kiły kapusty (także w okresie jesiennym).

Ocena zdrowotności roślin

Zdrowotność roślin oceniono w warunkach polowych.

Rośliny w plonie głównym wybrane losowo z pola oceniono pod względem wszystkich patogenów obserwowanych makroskopowo.

Rośliny z objawami chorobowymi będą cięto na fragmenty, odkażano powierzchniowo i wykładano na pożywki mikrobiologiczne odpowiednie do spodziewanej grupy patogenów.

Patogeny biotroficzne oznaczono wizualnie.

Sapro-i nekrotrofy rosnące na pożywkach agarowych i płynnych hodowano aż do uzyskania czystego izolatu i także identyfikowano mikroskopowo i molekularnie.

Porównano liczbę roślin z objawami porażenia oraz nasilenie każdej z obserwowanych chorób.

Dla oceny występowania grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* zastosowano **test płatkowy**.



Ocena zdrowotności roślin

	Rzepak bez żywej ściółki	Rzepak z żywą ściółką	
Sucha zgnilizna kapustnych:			
• procent roślin porażonych	24	26	brak różnic
• średni stopień porażenia 0-9	3,6	2,2	słabsze objawy
Zgnilizna twardzikowa			
• procent roślin porażonych	0,2	0	brak różnic
• średni stopień porażenia 0-9	4	0	brak różnic
Kiła kapusty			
• procent roślin porażonych	0	0	brak różnic
• średni stopień porażenia 0-4	0	0	brak różnic
Czerń kapustowatych			
• procent roślin porażonych	18	16	brak różnic
• średni stopień porażenia 0-9	4,5	3,2	słabsze objawy
Wercilioza			
• procent roślin porażonych	28	19	mniej chorych roślin
• średni stopień porażenia 0-4	2,8	2,3	słabsze objawy



Chwasty zaobserwowane w gospodarstwach biorących udział w doświadczeniu (czerwiec 2024)

Ocena zachwaszczenia



babka
lancetowata &
fiołek polny.jpg



babka
lancetowata
bniec biały.jpg



babka
lancetowata.jpg



blekot
pospolity.jpg



gwiazdnica
pospolita.jpg



jaskier rozłogowy
gwiazdnica
polna.jpg



jasnota
purpurowa
bodzisek drobny
.jpg



mniszek lekarski
wiechlina
roczna.jpg



bluszczyk
kurdybanek.jpg



bniec biały.jpg



bodzisek
drobny.jpg



bodzisek tasznik
pospolity.jpg



bylica
pospolita.jpg



ostrożeń polny
skrzyp polny.jpg



pięciornik gęsi
krwawnik
pospolity
gwiazdnica pos...



podagrycznik
pospolity szczaw
kędzierzawy.jpg



podbiał
pospolity.jpg



pokrzywa
zwyczajna &
przytulia
czepna.jpg

Ocena zachwaszczenia



pokrzywa
zwyczajna wyka
ptasia.jpg



pokrzywa
zwyczajna.jpg



powój polny.jpg



przytulia
czepna.jpg



skrzyp polny &
wyka ptasia.jpg



skrzyp polny.jpg



stokłosa
miękka.jpg



Szczaw.jpg



rdest ptasi.jpg



rezeda żółta &
maruna
bezwonna(1).jpg



rezeda żółta
maruna
bezwonna
tobołki polne.jpg



rezeda żółta
maruna
bezwonna(1).jpg



sałata
kompasowa.jpg



tobołki polne
maruna
bezwonna
rumian polny.jpg



uczep.jpg



wiechlina
roczna.jpg



wilczomlec
sosnka & fiołek
polny.jpg

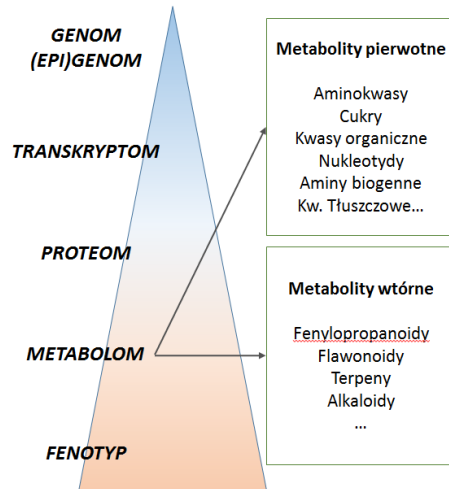


ziarnopłon
wiosenny.jpg

Wynik: Zachwaszczenie obserwowano wyłącznie na obrzeżach plantacji i placach bez roślin plonu głównego oraz tych części pola w siewie czystym, na których nie zastosowano chemicznej ochrony herbicydowej. W komonicy obserwowano występowanie zachwaszczenia fiołkiem polnym.

Metabolomika

- Jest to dziedzina nauki, która bada w sposób ilościowy i jakościowy niskocząsteczkowe związki pochodzenia naturalnego – endogenne metabolity, które tworzą metabolom.
- Wraz z genomiką, transkryptomiką, proteomiką zaliczana jest do biologii systemów.



Podejścia w metabolomice

Metabolomika niecelowana

- Analizie podlegają wszystkie metabolity, które zostały wyekstrahowane z próbki i są możliwe do zbadania wybraną techniką instrumentalną.
- Profile metabolomiczne porównywane są pomiędzy wariantami eksperymentalnymi w celu zobrazowania różnic między różnymi stanami biologicznymi organizmu.
- Bardzo często podejście niecelowane generuje kolejne pytania badawcze i hipotezy.

Metabolomika celowana

- Analiza jest ukierunkowana tylko na określony metabolit lub panel metabolitów np.: auksyny, panel fitohormonów, aminokwasy biogenne.
- Metoda została zoptymalizowana i zwalidowana w celu uzyskania optymalnego odzysku dla określonego metabolitu lub grupy metabolitów.
- Bardzo zawężona analiza odpowiada na konkretne pytanie badawcze.

Zastosowanie:

- Poszukiwanie biomarkerów np.: chorób lub ekspozycji
- Poszukiwanie nowych punktów uchwytu terapii
- Poszukiwanie szlaków zmienionych w danych warunkach eksperymentalnych

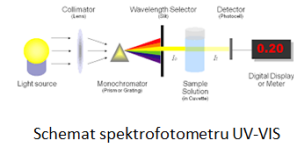
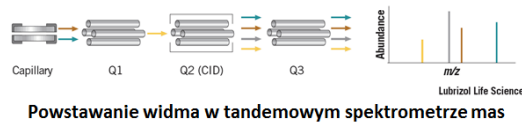
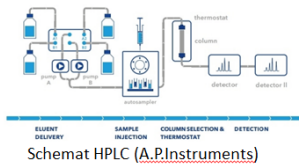
Zastosowanie:

- Walidacja biomarkerów
- Monitorowanie konkretnych metabolitów w szlakach
- Kontrola jakości produktów rolnych

Techniki stosowane w metabolomice

Techniki separacyjne	Spektrometria mas	Techniki spektroskopowe
Służą do rozdzielenia składników mieszaniny wykorzystując zjawisko podziału między fazę stacjonarną i ruchomą lub migracji w polu elektrycznym.	Służą do pomiaru stosunku masy do ładunku (m/z) zjonizowanego analitu oraz fragmentacji jonów w celu analizy jakościowej i ilościowej.	Metody analityczne, które badają oddziaływanie promieniowania z materiałem/analitem.
<ul style="list-style-type: none"> • Chromatografia gazowa • (Ultra)wysokosprawna chromatografia ciekłowa • Chromatografia jonowymienna • Elektroforeza kapilarna 	<ul style="list-style-type: none"> • Niskorozdzielcza spektrometria mas (pojedynczy kwadrupol, pułapka jonowa) • Niskorozdzielcza tandemowa spektrometria mas (potrójny kwadrupol) • Wysokorozdzielcza spektrometria mas (TOF, Orbitrap, FTICR) • Hybrydowa spektrometria mas (łączy nisko i wysokorozdzielczy analizator: qTOF, Q-exactive MS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego • Spektroskopia Ramana • Spektroskopia IR • Spektroskopia UV-VIS

Techniki stosowane w metabolomice



- 1) Za pomocą elektrospreju lub elektrorozpylacza wyciek z kolumny jest **rozpylany** i **jonizowany**.
- 2) **Kwadrupol**: powstałe jony są kierowane do pierwszego analizatora - kwadrupola, który działa jak filtr mas. Jony są odfiltrowane zgodnie ze stosunkiem masy do ładunku (np. tylko jony z zakresu 100-1000) a następnie kierowane są do drugiego analizatora - orbitrapa.
- 3) **Orbitrap** to dwie elektrody zewnętrzne i jedna wewnętrzna. Jon trafiając między te elektrody jest przyspieszany i zaczyna oscylować przemieszczając się wzdłuż osi. Częstotliwość oscylacji jonów jest proporcjonalna do wartości m/z . Poruszająca się wzdłuż analizatora wiązka wytwarza różnice potencjałów między elektrodami zewnętrznymi.
- 4) Sygnał ten jest przekształcany w widmo masowe przy pomocy **Transformacji Fouriera**.

Pracownia Laboratorium Multiomiki IGR PAN

Ultrawysokosprawy chromatograf ciekowy

Detektor fotodiodowy

Wysokorozdzielczy hybrydowy spektrometr masowy



Wysokosprawy chromatograf ciekowy

Niskorozdzielczy spektrometr masowy – pułapka jonowa

Preparatywny chromatograf ciekowy

Przygotowanie próbki

1. Ręczna homogenizacja materiału w ciekłym azocie
2. Homogenizacja w młynie kulowym przez 30 s przy częstotliwości 27 Hz.



Ekstrakcja materiału

3. Tkanka (50 mg) była ekstrahowana przy użyciu 1 ml 80 % metanolu (LC-MS, Merck) z dodatkiem wzorców wewnętrznych (0.1 µg/ml):

- formononetyna,
- myo-inositol,
- d₅-glicyna.

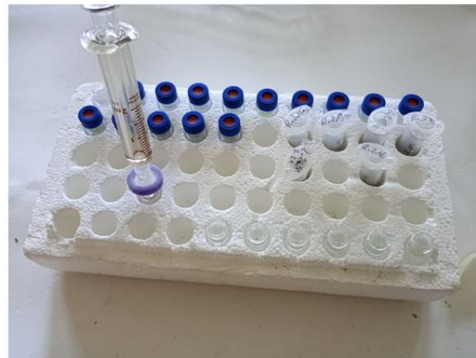
4. Próbkę były wytrząsane przez 15 min z rozpuszczalnikiem, a następnie ekstrakcja była wspomagana ultradźwiękami przez 5 min.



Ekstrakcja materiału

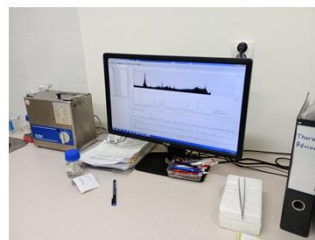
5. Próbkę były następnie wirowane z prędkością 15 000 rpm przez 15 min w temperaturze 4 °C.

6. Następnie supernatanty zostały przefiltrowane przez sączki strzykawkowe PTFE o śr. porów 0.22 µm i śr. zewnętrznej 14 mm do fiolek chromatograficznych.



Analiza UPLC-HRMS

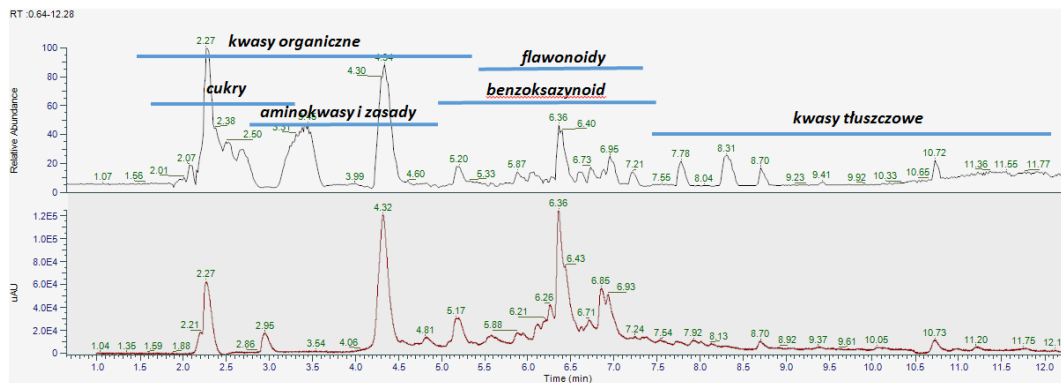
- Rozdział chromatograficzny:
 - UPLC-Acquity (Waters)
 - Kolumna HSS T3 (150 x 2.1 mm, 1.7 µm)
 - Temperatura kolumny 40 °C, temperatura autosamplera 4 °C
 - Gradient dwuskładnikowy (A: 0.1 % kwasu mrówkowego w wodzie, B: acetonitryl)
- Detekcja PDA przy długości fal 250-550 nm
- Detekcja MS:
 - Źródło HESI-II (podgrzewany elektrospray)
 - Tryb jonizacji ujemny i dodatni z fragmentacją (FullMS-ddMS²)





Metabolom - pszenicy

Główne grupy związków występujące w próbce QC (mieszanka wszystkich próbek)

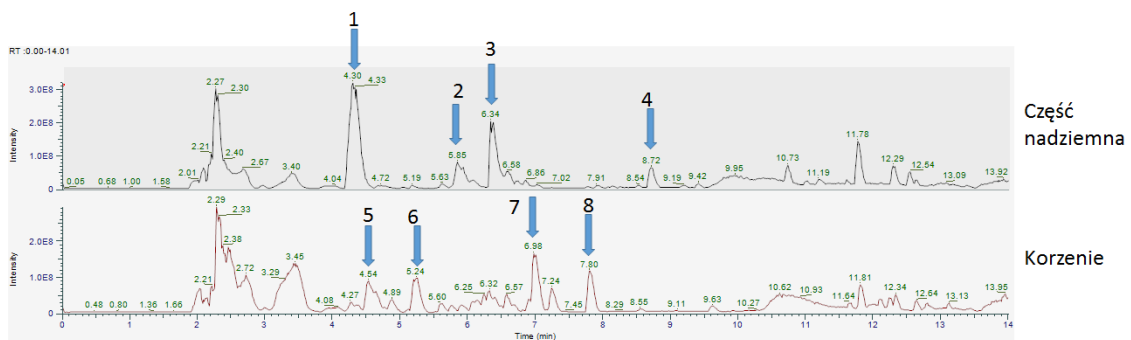


A.

B.

Chromatogramy uzyskane techniką UPLC-HRMS (chromatogram pików bazowych) oraz techniką UPLC-PDA (detekcja przy 254 nm).

Korzenie a części nadziemne pszenicy



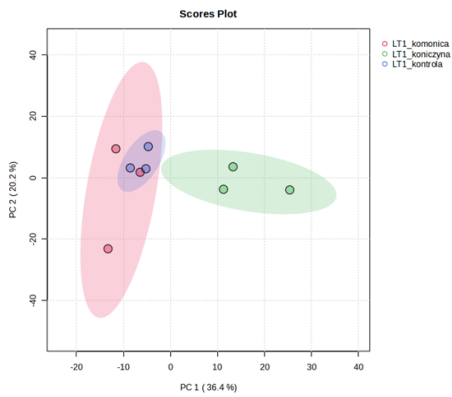
Część nadziemna

Korzenie

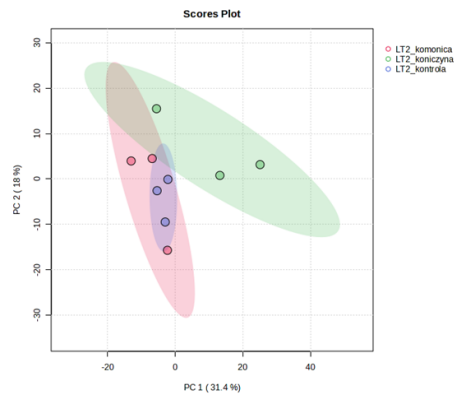
Przykładowe związki różnicujące części nadziemne i korzenie: 1 - kwas akwitowy, 2 - glukuronid kwasu ferulowego, 3 - apigenin 6-C-glucoside 8-C-araboside, 4 - nieznany lignan, 5 - piccin, 6 - O-heksozyd DIBOA, 7 - O-heksozyd HDMBOA, 8 - kwas nonanodiowy

Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej pszenicy

Pierwszy punkt czasowy



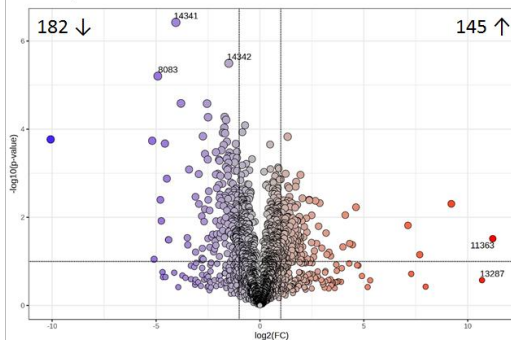
Drugi punkt czasowy



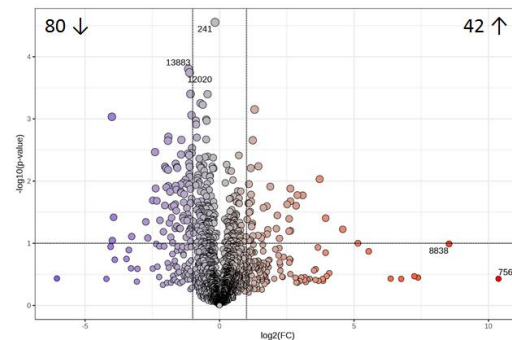
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej pszenicy

Punkt czasowy

Konieczyna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola

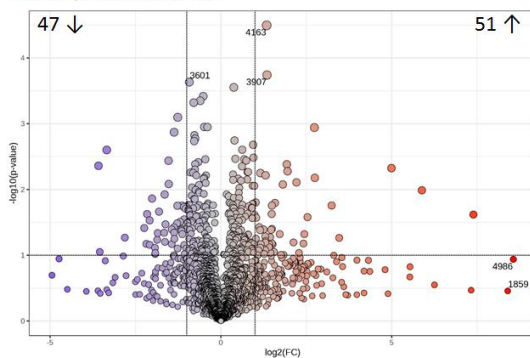


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

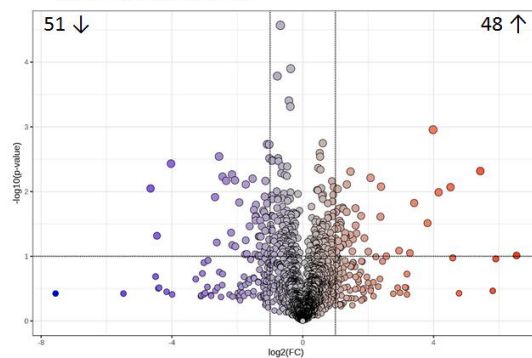
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej pszenicy

2. Punkt czasowy

Konieczyna vs. Kontrola

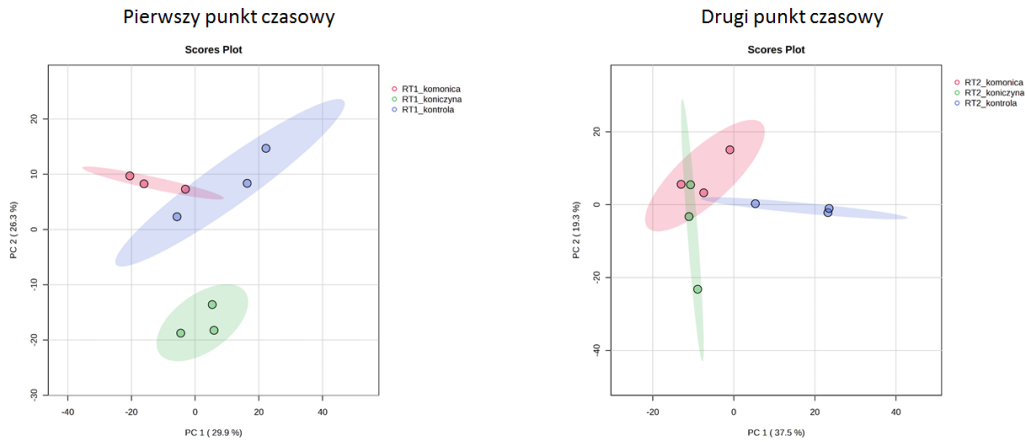


Komonica vs. Kontrola



Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

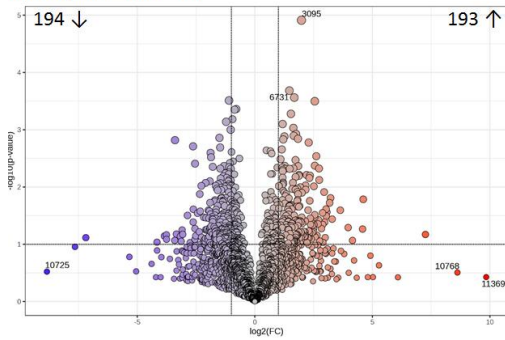
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach pszenicy



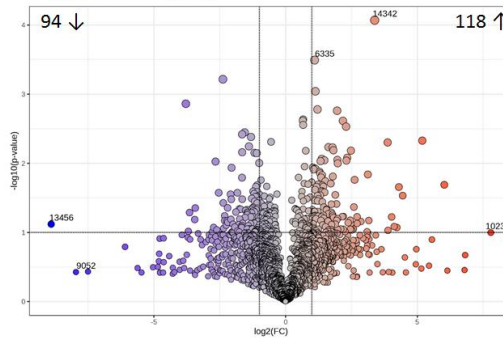
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach pszenicy

1. Punkt czasowy

Koniczna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola

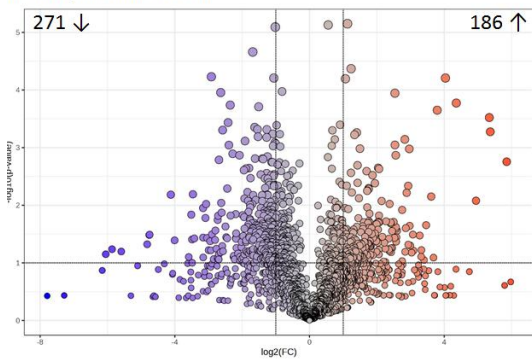


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

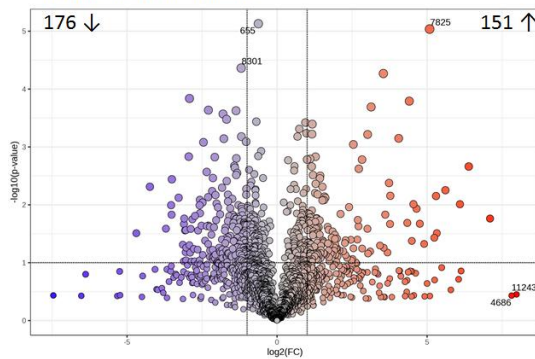
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach pszenicy

2. Punkt czasowy

Koniczna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola



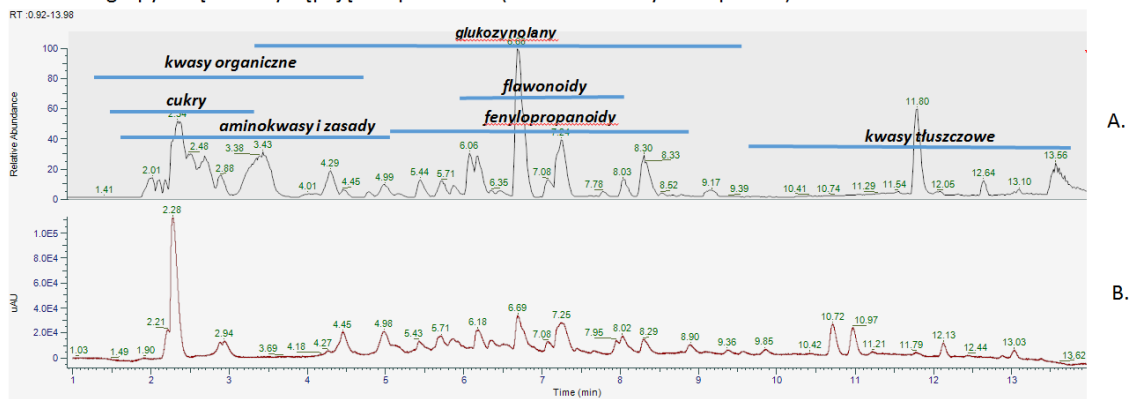
Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)



Glukozytolany

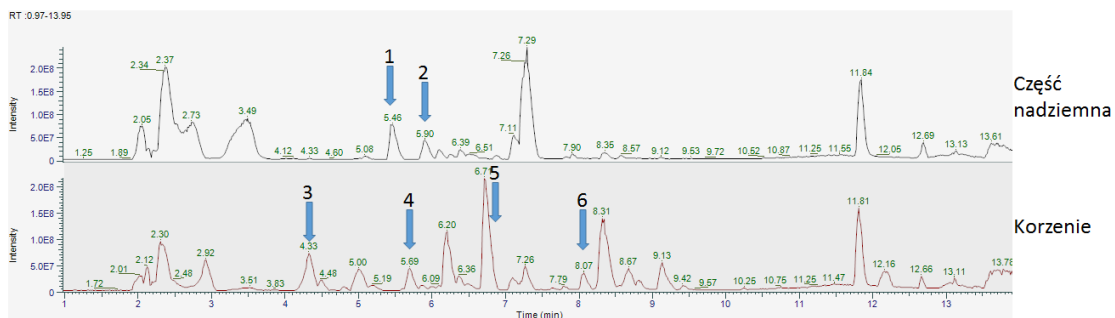
Metabolom - rzepaku

Główne grupy związków występujące w próbce QC (mieszanka wszystkich próbek)



Chromatogramy uzyskane techniką UPLC-HRMS (chromatogram pików bazowych) oraz techniką UPLC-PDA (detekcja przy 254 nm).

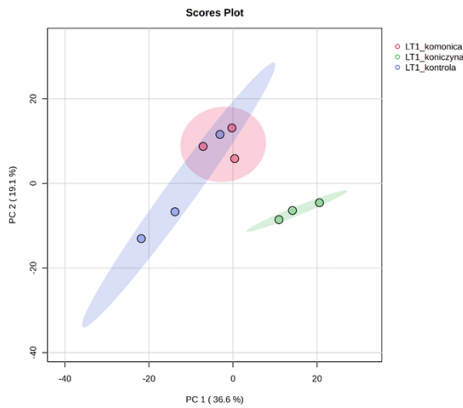
Korzenie a części nadziemne rzepaku



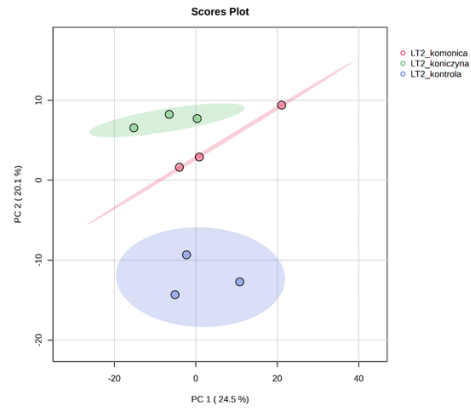
Przykładowe związki różnicujące części nadziemne i korzenie: 1 – skopolina, 2 – ramnozyd skopoletyny, 3 – $C_9H_{16}N_2O_5S$, 4 – glukobrasycyna, 5 – metoksyglukobrasycyna, 6 – kwas N-feruloyloasparaginowy

Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej rzepaku

Pierwszy punkt czasowy



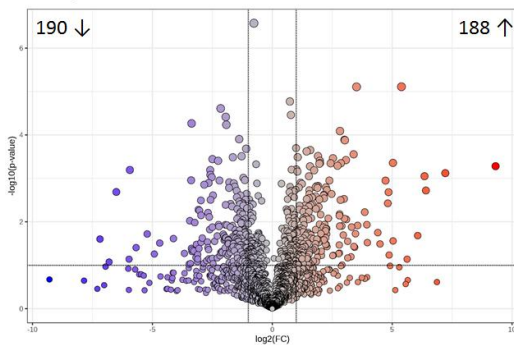
Drugi punkt czasowy



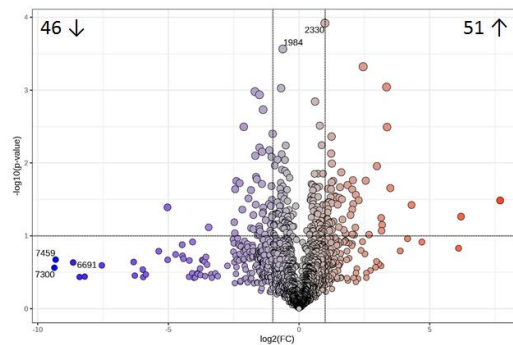
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej rzepaku

Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola



Komanica vs. Kontrola

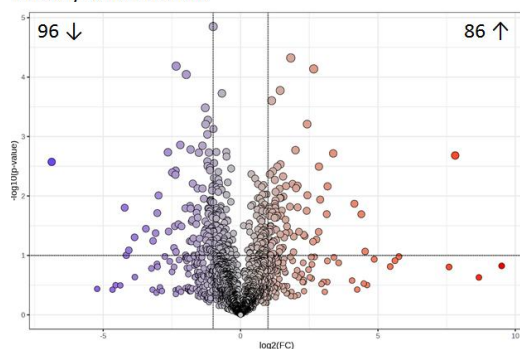


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

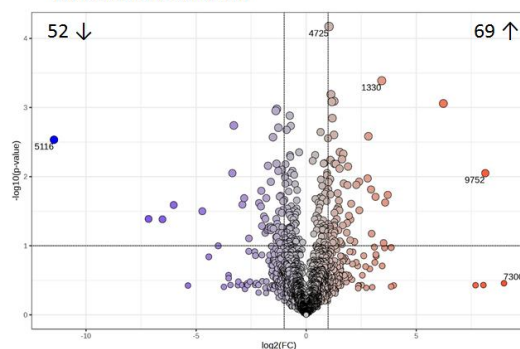
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej rzepaku

2. Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola

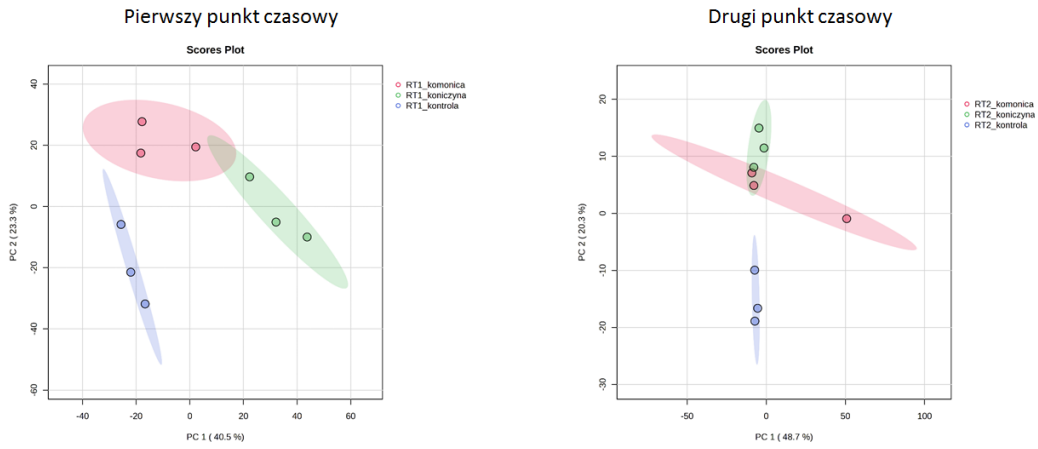


Komanica vs. Kontrola



Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

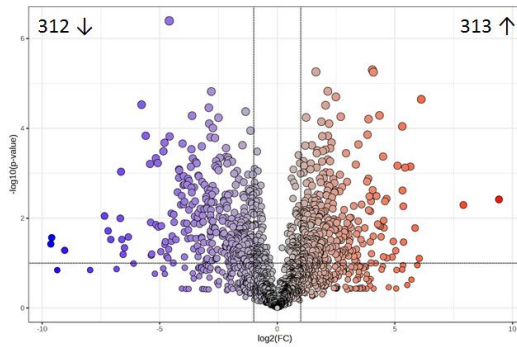
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach rzepaku



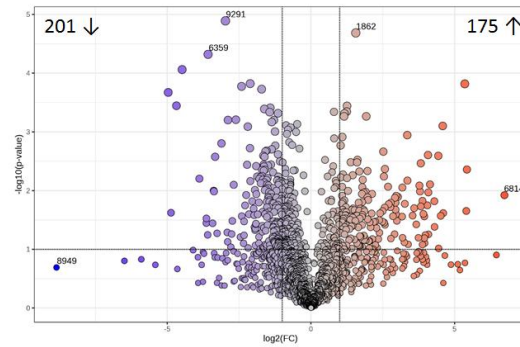
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach rzepaku

1. Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola

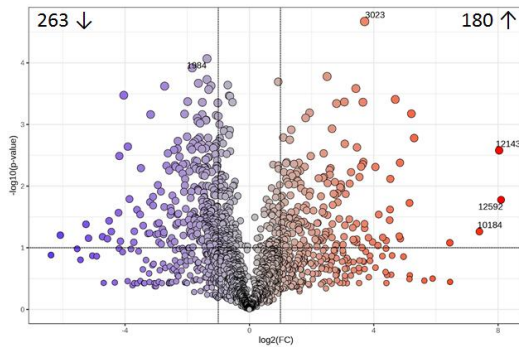


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

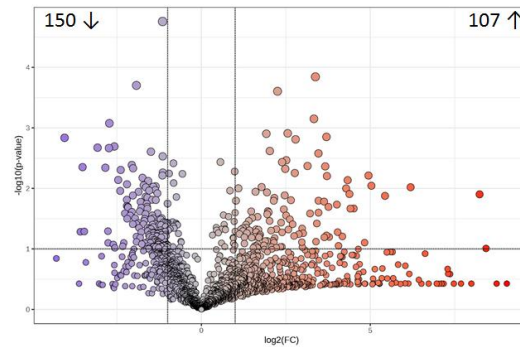
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach rzepaku

2. Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola



Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

Statystycznie istotna liczba metabolitów różniących próbki:

 Spadek  Wzrost

Część nadziemna:

Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	182	145
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	80	42
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	47	51
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	51	48

System korzeniowy:

Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	194	193
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	94	118
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	271	186
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	176	151

Część nadziemna:

Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	190	188
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	46	51
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	96	86
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	52	69

System korzeniowy:

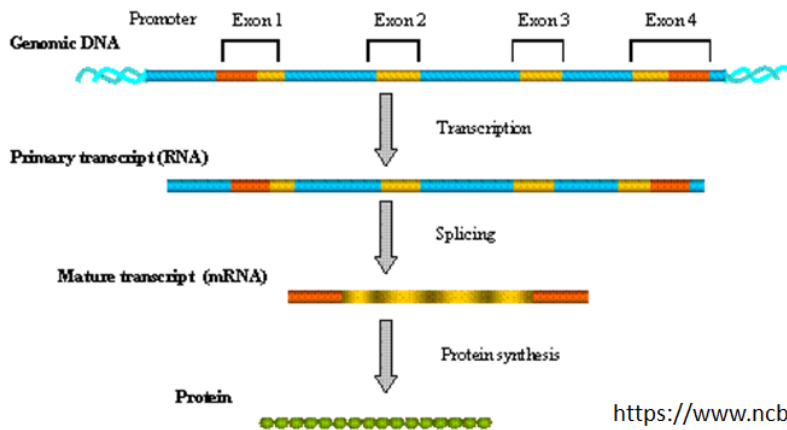
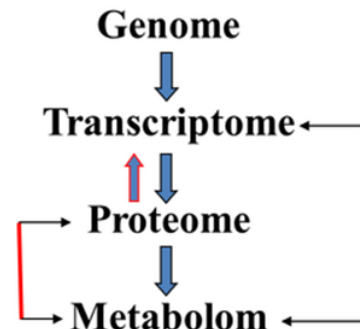
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	312	313
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	201	175
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	263	180
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	150	107

Podsumowanie

Metabolizm roślin plonu głównego rosnących w mulczu jest w warunkach początkowego wzrostu odmienny od warunków wzrostu roślin w tradycyjnej uprawie orkowej.

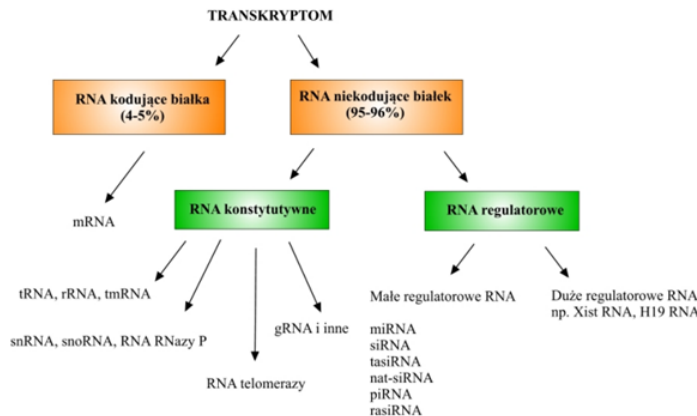
Analizy transkryptomyczne

Analiza **transkryptomów** roślin pszenicy i rzepaku objęty rośliny rosnące w kontrastujących ze sobą systemach uprawy.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/applexpression/>

Transkryptom to zestaw cząsteczek mRNA (lub ogólniej: transkryptów) obecny w określonym momencie w komórce, grupie komórek lub organizmie.



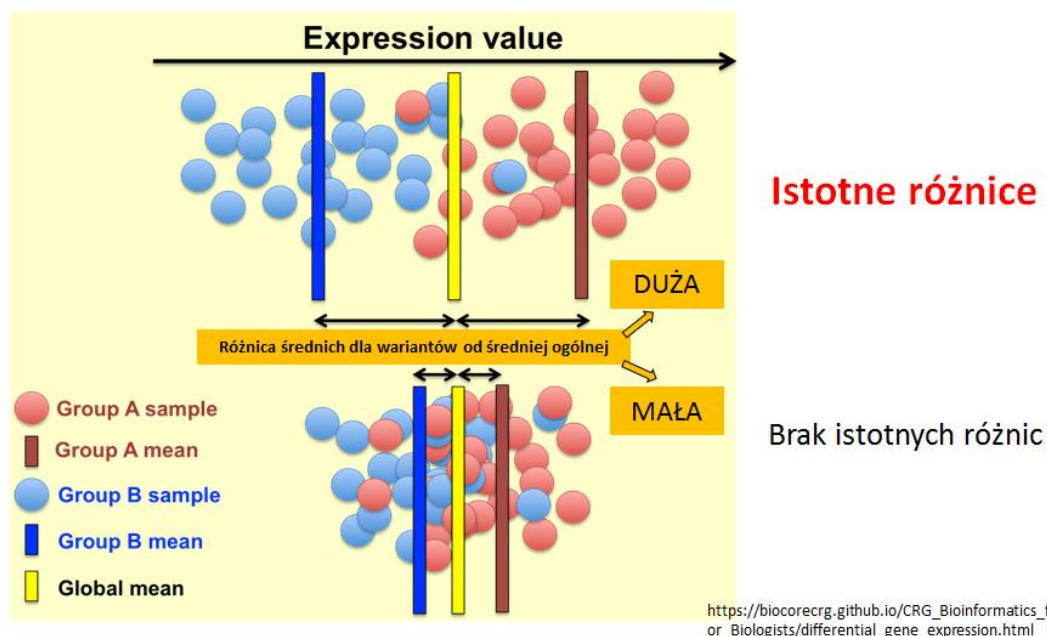
Kodujące RNA to **matryce do syntezy białek**, rzadko stanowią więcej niż 5% RNA komórkowego. U eukariontów syntetyzowane są jako **transkrypty pierwotne** a następnie **ulegają obróbce posttranskrypcyjnej**, podczas której dodawana jest czapeczka na końcu 5', ogon poli-A na końcu 3' oraz wycinane są introny. Dojrzała cząsteczka mRNA poza centralnie usytuowaną sekwencją kodującą zawiera również regiony nie ulegające translacji (3'- i 5'-UTR, ang. *untranslated region*).

Kodujące **mRNA** ulega **ciągłym modyfikacjom**, czas półtrwania **kilka minut, godzin**.

Transkryptom w przeciwieństwie do genomu jest tworem bardzo dynamicznym.

Komórki w odpowiedzi na różne czynniki uruchamiają i wyłączają transkrypcję genów, zmieniając w ten sposób swój transkryptom.

Często już kilka minut po zadziałaniu jakiegoś czynnika (np. stresu) na komórki można obserwować powstawanie transkryptów genów reakcji na ten czynnik.



Cel badań

1. Zidentyfikowanie genów o zróżnicowanej ekspresji związanych z uprawą czystą lub z pokryciem
2. Interakcja między roślinami, wpływ roślin strączkowych na sąsiadujące rośliny poprzez cykle składników odżywczych, sygnalizację chemiczną i interakcje z mikroorganizmami.
3. Poznanie genów i szlaków metabolicznych uaktywnianych podczas odpowiedzi na uprawę czystą lub mieszaną

Materiał i metody

1. Wybrane linie, w warunkach kontrolowanych, ocena liczby wschodów.
2. Analiza RNAseq dla linii w siewie czystym i mieszanym.
Analiza różnicowej ekspresji genów.
3. Analiza metodą qPCR genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na sposób uprawy, projektowanie markerów na sekwencje wskazane po analizie danych z RNAseq.

Materiał i metody



Czysty



Czysty



Z koniczyną

Z koniczyną

Z koniczyną



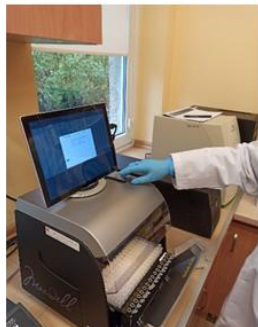
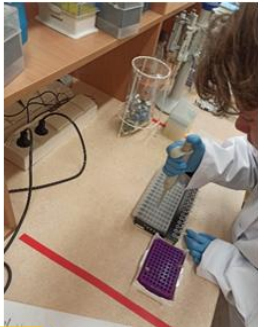
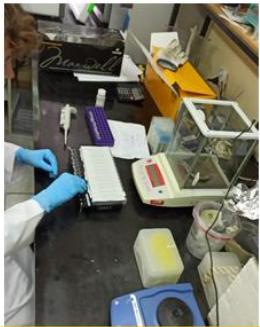
Z koniczyną



Homogenizacja prób



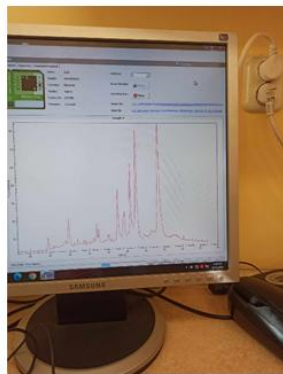
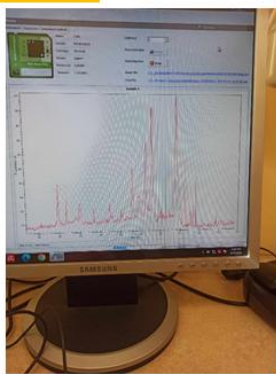
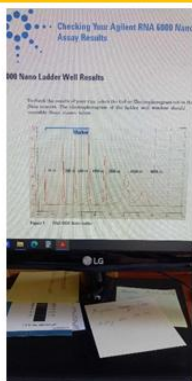
Izolacja RNA



Przechowywanie prób



Ocena jakości RNA



Profilowanie ekspresji genów pozwala na poznanie genów i szlaków metabolicznych uaktywnianych podczas odpowiedzi na zróżnicowaną uprawę. Celem było zidentyfikowanie genów o zróżnicowanej ekspresji, związanych z uprawą rzepaku w siewie czystym i z wsiewką.

Materiały i metody:

Materiał do RNAseq: listki z 6 linii rzepaku z uprawy czystej, 8 linii z uprawy w komonicy, 7 linii z uprawy w koniczynie. Doświadczenie zostało przeprowadzone w szklarni. Całkowity RNA z liści został wyizolowany za pomocą zestawu do izolacji RNA. Stężenie i jakość matryc została oznaczona z wykorzystaniem Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies).

Jakość materiału została potwierdzona po przesłaniu przez usługobiorcę. Również przez usługobiorcę została przygotowana biblioteka TruSeq mRNA stranded. Sekwencjonowanie wykonane zostało na NovaSeq6000 w konfiguracji 2x150bp, 40M odczytów. Dane zostały zapisane na dysku przenośnym i przekazane wykonawcy.

Grupa bioinformatyczna przeprowadziła analizę uzyskanych danych. Surowe dane zostały odniesione do sekwencji referencyjnej (sekwencja genomu rzepaku *Brassica napus* ssp. *oleifera*). Złożone sekwencje zostały scharakteryzowane funkcjonalnie. Wyznaczone zostały geny o ekspresji zróżnicowanej w odpowiedzi na sposób uprawy (DEGs). Została wykonana analiza typu KEGG (the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), która pozwoliła na identyfikację poszczególnych szlaków metabolicznych, do których należą wytypowane geny (charakterystyka funkcjonalna).

Wyniki:

Wybrano 6 linii rzepaku z uprawy czystej, 8 linii rzepaku z uprawy w komonicy i 7 linii rzepaku z uprawy w koniczynie. Ich dobrą jakość po izolacji potwierdzono parametrem RIN (**Tab. 1**).

Tabela 1.

Linie, wybrane do doświadczenia, z warunków szklarniowych wraz z parametrem jakości matrycy.

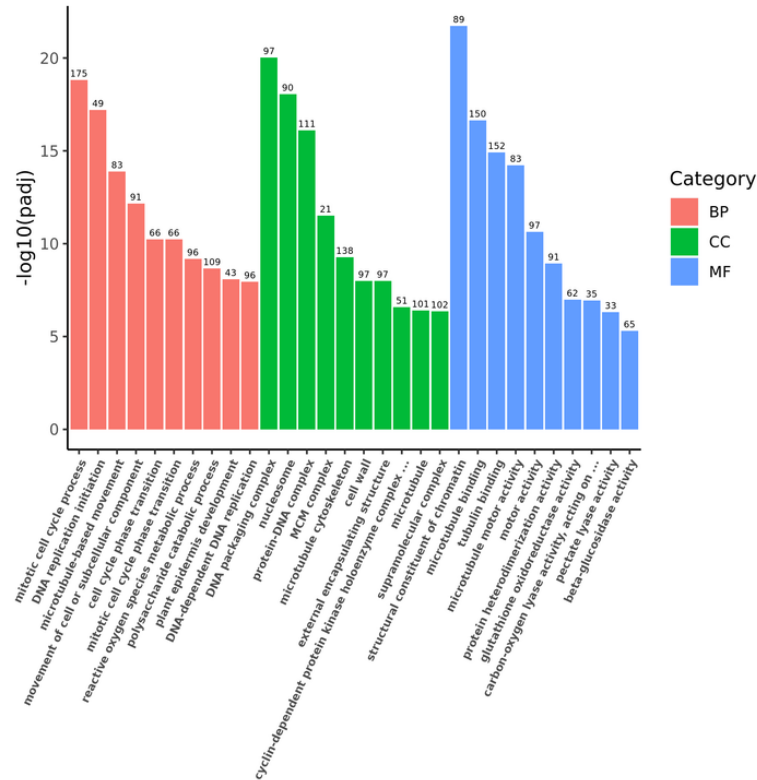
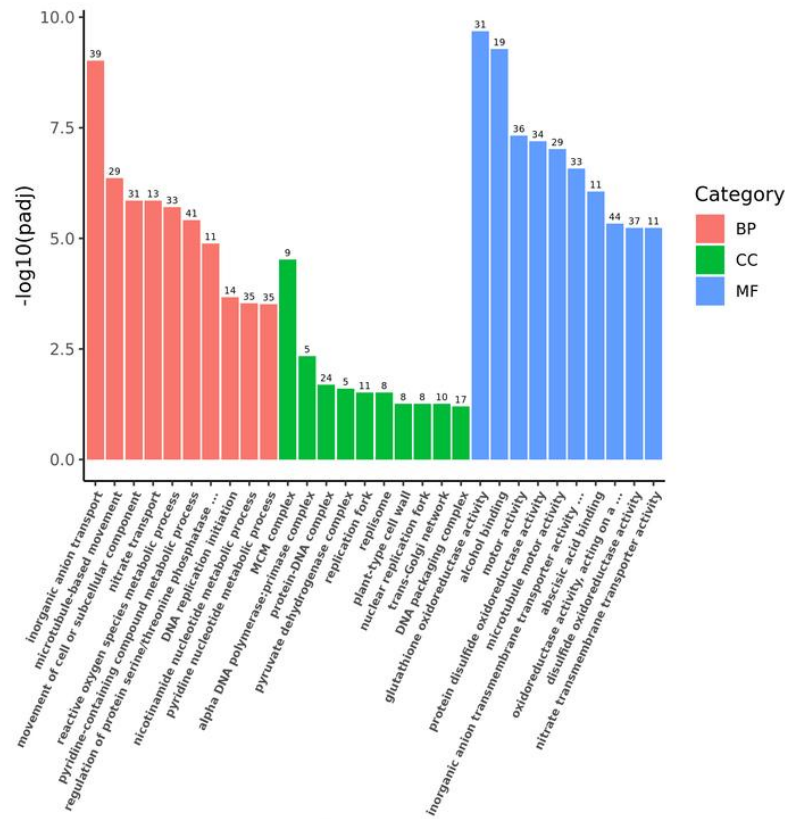
Próba	Name on the list	ng/ul	RIN	Próba	Name on the list	ng/ul	RIN
1	Rz2_2	624	8.1	15	Rz_kon1_21	377	6.8
2	Rz3_3	89	7.5	16	Rz_kon2_22	127	6.4
3	Rz4_4	1028	9.4	17	Rz_kon3_23	279	6.9
4	Rz5_25	810	9.1	18	Rz_kon4_24	102	6.5
5	Rz6_26	577	8.7	19	Rz_kon5_42	120	6.4
6	Rz7_27	914	9	20	Rz_kon6_43	199	8
7	Rz_kom1_17	218	6.8	21	Rz_kon7_44	127	8.8
8	Rz_kom2_18	396	7.4				
9	Rz_kom3_19	188	4.4				
10	Rz_kom4_20	133	6.7				
11	Rz_kom5_38	948	8.6				
12	Rz_kom6_39	661	8.5				
13	Rz_kom7_40	67	7.5				
14	Rz_kom8_41	187	7.5				

Odczytane sekwencje mogą zawierać odczyty o niskiej jakości lub odczyty z adapterami, które wpływają na jakość i wiarygodność biblioteki. Aby tego uniknąć niezbędne jest „przefiltrowanie” odczytów i uzyskanie odczytów czystych. Usuwane są odczyty z adapterami, odczyty, w których zawartość nukleotydów z odczytem niepewnym wynosi >10% i odczyty o niskiej jakości (**Tab. 2**). Duża liczba uzyskanych odczytów (min. 74 mln) gwarantuje wysoką jakość analiz transkryptomicznych.

Tabela 2. Analiza statystyczna wyników sekwencjonowania.

Próba	Biblioteka	Raw_reads	Raw_ bases	Clean_ reads	Clean_ bases	Error_ rate
Rz2_2	MRRA240019647-1a	79015256	11.85G	76137590	11.42G	0.01
Rz3_3	MRRA240019648-1a	89669950	13.45G	81338594	12.2G	0.01
Rz4_4	MRRA240019649-1a	99952450	14.99G	93561452	14.03G	0.01
Rz5_25	MRRA240019654-1a	105644380	15.85G	100166232	15.02G	0.01
Rz6_26	MRRA240019655-1a	82145460	12.32G	74954758	11.24G	0.01
Rz7_27	MRRA240019656-1a	95788230	14.37G	91610602	13.74G	0.01
Rz_kom1_17	MRRA240019682-1a	89922308	13.49G	83223450	12.48G	0.01
Rz_kom2_18	MRRA240019683-1a	79951628	11.99G	79924050	11.99G	0.01
Rz_kom3_19	MRRA240019684-1a	78701664	11.81G	78661596	11.8G	0.01
Rz_kom4_20	MRRA240019685-1a	80965358	12.14G	73098586	10.96G	0.01
Rz_kon1_21	MRRA240019690-1a	81597780	12.24G	74766902	11.22G	0.01

- Raw_bases – liczba odczytów* długość sekwencji
- Clean reads – odczyty sekwencji po odrzuceniu odczytów o niskiej jakości.
- Zmapowano uzyskane sekwencje do genomu referencyjnego *Brassica napus ssp oleifera*.
- Zmapowano >85% sekwencji, z czego ~81% sekwencji to sekwencje unikalne.
- Wykonano kwalifikację zidentyfikowanych genów do poszczególnych kategorii funkcjonalnych (GO).
- Rzepak w czystej uprawie vs rzepak w koniczynie: najwięcej genów należało do kategorii „podziały mitotyczne komórki” i „inicjacja replikacji DNA” (**Rys.1A**).
- Rzepak w czystej uprawie vs rzepak w koniczynie: najwięcej genów należało do kategorii „transport anionów” i „ruch w oparciu o mikrotubule” (**Rys. 1B**).

A**B**

Ryc.1. Przyporządkowanie zidentyfikowanych genów do poszczególnych kategorii funkcjonalnych (GO). **A**) rzepek w czystej uprawie vs rzepek w koniczynie, **B**) rzepek w czystej uprawie vs rzepek w koniczynie

Sekwencje odniesiono do genomu referencyjnego rzepaku. Posłużono się programem HISAT2 (Tab. 3).

Tabela 3. Podsumowanie statystyczne mapowania do genomu referencyjnego.

Próba	Liczba odczytów	Liczba i %przypisanych odczytów	Unique_map	Multi_map
Rz2_2	76137590	69425851 (91.18%)	66205697 (86.96%)	3220154 (4.23%)
Rz3_3	81338594	75656689 (93.01%)	71343652 (87.71%)	4313037 (5.3%)
Rz4_4	93561452	86854429 (92.83%)	82666761 (88.36%)	4187668 (4.48%)
Rz5_25	100166232	93064240 (92.91%)	88525237 (88.38%)	4539003 (4.53%)
Rz6_26	74954758	69085739 (92.17%)	65737015 (87.7%)	3348724 (4.47%)
Rz7_27	91610602	85358025 (93.17%)	81145771 (88.58%)	4212254 (4.6%)
Rz_kom1_17	83223450	76456682 (91.87%)	71754043 (86.22%)	4702639 (5.65%)
Rz_kom2_18	79924050	73347615 (91.77%)	68725612 (85.99%)	4622003 (5.78%)
Rz_kom3_19	78661596	71895599 (91.4%)	67536718 (85.86%)	4358881 (5.54%)
Rz_kom4_20	73098586	66620649 (91.14%)	63072080 (86.28%)	3548569 (4.85%)
Rz_kon1_21	74766902	69241201 (92.61%)	65048971 (87.0%)	4192230 (5.61%)

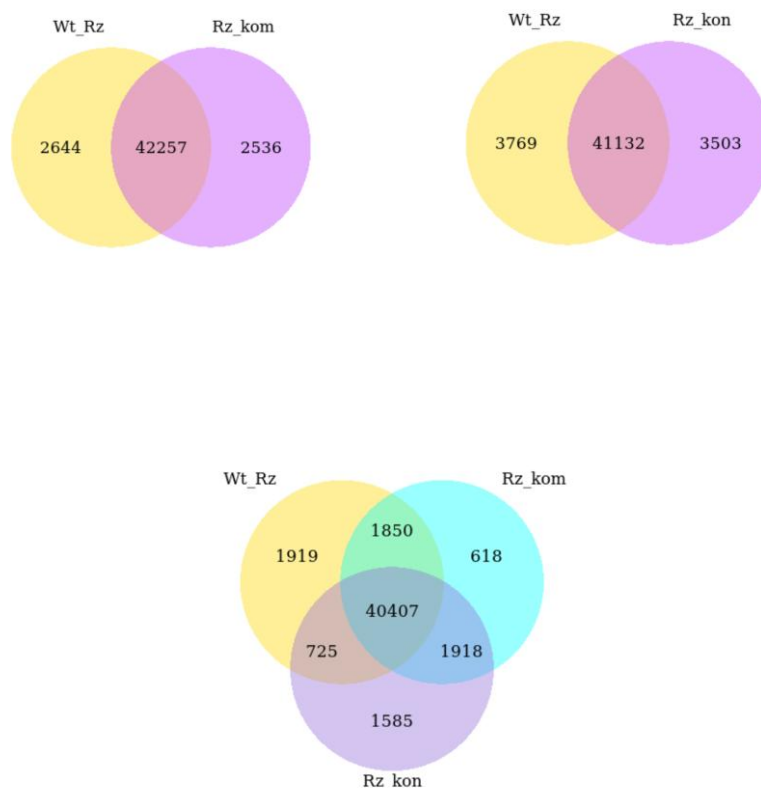
Total reads – wszystkie odczyty,

Total map – liczba odczytów, odniesiona do genomu referencyjnego,

Unique map – liczba odczytów, zmapowanych w miejsca unikalne w genomie,

Multi-map – liczba odczytów, zmapowanych w liczne miejsca w genomie,

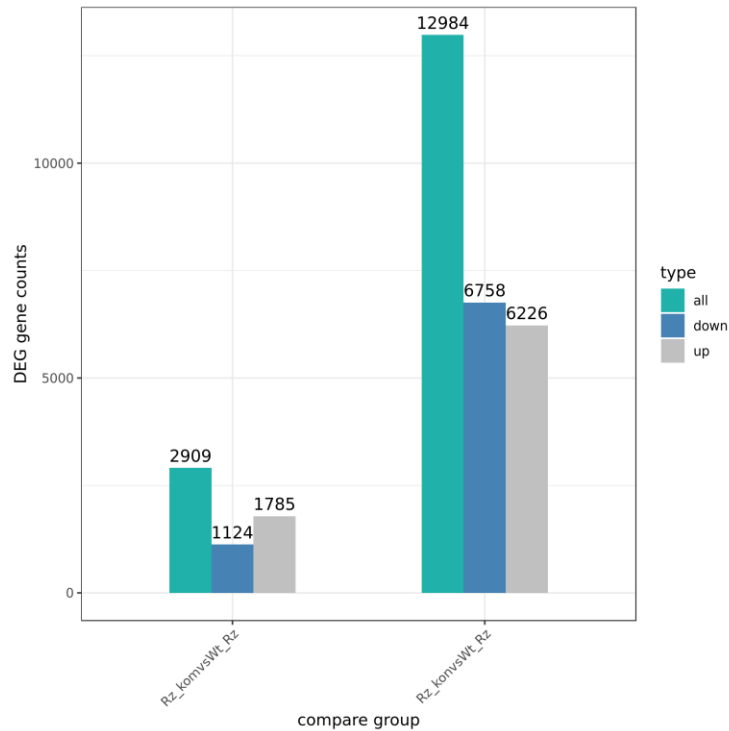
Dokonano porównania liczby sekwencji aktywowanych w uprawie czystej i mieszanej, rzepak i rzepak w komonicy oraz rzepak i rzepak w koniczynie. W porównaniu pierwszym, sekwencji specyficznych tylko dla rzepaku w siewie czystym było 2644, dla rzepaku w komonicy 2536. W porównaniu drugim zidentyfikowano dla rzepaku w siewie czystym 3769 sekwencji *versus* 3503 w siewie z koniczyną. Porównanie trzecie – rzepak w siewie czystym vs rzepak w komonicy i rzepak w koniczynie wykazała 4122 sekwencji specyficznych wobec 40407 wspólnych (**Rys 2**).



Ryc 2. Diagram Venna, porównanie liczby sekwencji wspólnych i oddzielnych dla rzepaku w siewie czystym, siewie w komonicy i siewie w koniczynie

Zidentyfikowano sekwencje o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy rzepakiem w siewie czystym i mieszanym. Wskazano sekwencje, których ekspresja wzrosła lub zmalała oraz podsumowano wszystkie (**Rys.3**).

compare	all	up	down	threshold
Rz_konvsWt_Rz	12984	6226	6758	DESeq2 padj<=0.05 log2FoldChange >=1.0
Rz_komvsWt_Rz	2909	1785	1124	DESeq2 padj<=0.05 log2FoldChange >=1.0



Ryc.3. Sekwencje o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy rzepakiem w siewie czystym i mieszanym.

Oddziaływanie licznych genów zebrano w poszczególne szlaki metaboliczne (analiza KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). W przypadku porównania rzepak w siewie czystym vs rzepak w koniczynie wskazano pięć najważniejszych szlaków metabolicznych: replikacja DNA, biosynteza fenylpropanoidów, białka motoryczne, metabolizm cysteiny i metioniny, wydłużanie kwasów tłuszczowych. Dla porównania rzepak w siewie czystym vs rzepak w koniczynie również najważniejszym szlakiem okazała się replikacja DNA, białka motoryczne, ale oprócz tego metabolizm azotu, siarki, synteza alkaloidów piperidynowych i pyridynowych.

Wybrano pięć sekwencji o największej różnicy ekspresji pomiędzy rzepakiem w uprawie czystej, a rzepakiem w uprawie z koniczyną (**Tab. 4**).

Tabela 4. Sekwencje o największej różnicy ekspresji pomiędzy rzepakiem w uprawie czystej a rzepakiem w uprawie z koniczyną

1	BnaA01g21560D	530.9	530.9	6.3	ATP phosphoribosyltransferase 1
2	BnaA09g06210D	36.5	1664.4	5.5	BnaA09g06210D protein
3	BnaC03g49300D	112.3	2135.0	4.2	Asparagine synthetase
4	BnaA01g14450D	33.1	7294.0	7.7	Superoxide dismutase [Fe] 1
5	BnaC05g16070D	1.8	231.7	6.9	Cysteine protease XCP2

Log2FoldChange – wartość logarytmu z parametru określającego różnicę pomiędzy poziomem ekspresji jednej porównywanej grupy wobec drugiej

Podsumowanie analiz transkryptomycznych dla prób rzepaku:

Do sekwencjonowania RNAseq wybrano linie rzepaku z uprawy czystej, uprawy z komonicą i koniczyną. Po izolacji potwierdzono jakość i integralność uzyskanego materiału parametrem RIN>4.4. W wyniku sekwencjonowania uzyskano 74 mln odczytów, co gwarantuje wysoką jakość analiz transkryptomu. Odniesiono pozyskane sekwencje do genomu referencyjnego grochu. Udało się zmapować ok. 85% sekwencji. 81% z nich zostało ulokowanych w miejscach unikalnych w genomie. Wskazano sekwencje o największej różnicy ekspresji pomiędzy liniami w uprawie czystej i mieszanej. Scharakteryzowano funkcjonalnie wskazane sekwencje (Tabela 4). Określono ich potencjalny udział w różnych szlakach metabolicznych: replikacja DNA, biosynteza fenyl-propanoidów, białka motoryczne, metabolizm cysteiny i metioniny, wydłużanie kwasów tłuszczowych. Dla porównania rzepak w siewie czystym vs rzepak w komonicy również najważniejszym szlakiem okazała się replikacja DNA, białka motoryczne, ale oprócz tego metabolizm azotu, siarki, synteza alkaloidów piperidynowych i pyridynowych.

Profilowanie ekspresji genów pozwala na poznanie genów i szlaków metabolicznych uaktywnianych podczas odpowiedzi na zróżnicowaną uprawę. Celem było zidentyfikowanie genów o zróżnicowanej ekspresji, związanych z uprawą pszenicy w siewie czystym i w żywym mulczu.

Materiały i metody:

Materiał do RNAseq: materiał z 7 linii pszenicy z uprawy czystej, 8 linii z uprawy w komonicy, 8 linii z uprawy w koniczynie. Doświadczenie zostało przeprowadzone w szklarni. Całkowity RNA z liści został wyizolowany za pomocą zestawu do izolacji RNA. Stężenie i jakość matryc została oznaczona z wykorzystaniem Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies).

Jakość materiału została potwierdzona po przesłaniu przez usługobiorcę. Również przez usługobiorcę została przygotowana biblioteka TruSeq mRNA stranded. Sekwencjonowanie wykonane zostało na NovaSeq6000 w konfiguracji 2x150bp, 40M odczytów. Dane zostały zapisane na dysku przenośnym i przekazane wykonawcy.

Grupa bioinformatyczna przeprowadziła analizę uzyskanych danych. Surowe dane zostały odniesione do sekwencji referencyjnej [sekwencja genomu pszenicy *Triticum_aestivum*. Złożone sekwencje zostały scharakteryzowane funkcjonalnie. Wyznaczone zostały geny o ekspresji zróżnicowanej w odpowiedzi na sposób uprawy (DEGs). Została wykonana analiza typu KEGG (the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), która pozwoliła na identyfikację poszczególnych szlaków metabolicznych, do których należą wytypowane geny (charakterystyka funkcjonalna).

Wyniki:

Wybrano 7 linii pszenicy z uprawy czystej, 8 linii pszenicy z uprawy w komonicy i 8 linii pszenicy z uprawy w koniczynie. Ich dobrą jakość po izolacji potwierdzono parametrem RIN.

Tabela 5. Linie, wybrane do doświadczenia, z warunków szklarniowych wraz z parametrem jakości matrycy.

Próba	Name on the list	ng/ul	RIN	Próba	Name on the list	ng/ul	RIN
1	Psz1_5	645	5.6	15	Psz_kom10_76	958	6
2	Psz3_7	488	5.9	16	Psz_kon2_14	140	5
3	Psz4_8	713	5.8	17	Psz_kon5_35	250	6.3
4	Psz2_6prime	22	4.6	18	Psz_kon6_36	122	4.6
5	Psz5_28	144	6.9	19	Psz_kon7_37	271	5.4
6	Psz6_29	480	5.8	20	Psz_kon9_78	255	6.7
7	Psz7_30	622	7.1	21	Psz_kon10_79	177	7
8	Psz_kom1_9	739	6.8	22	Psz_kon11_80	166	6.7
9	Psz_kom4_12	373	5.8				
10	Psz_kom5_31	200	5.8				
11	Psz_kom6_32	316	7.5				
12	Psz_kom7_33	583	7.7				
13	Psz_kom8_34	334	8.1				
14	Psz_kom9_75	459	6.5				

Odczytane sekwencje często zawierają odczyty o niskiej jakości lub odczyty z adapterami, które wpływają na jakość i wiarygodność biblioteki. Aby tego uniknąć niezbędne jest „przefiltrowanie” odczytów i uzyskanie odczytów czystych. Usuwane są odczyty z adapterami, odczyty, w których zawartość nukleotydów z odczytem niepewnym wynosi >10% i odczyty o niskiej jakości (**Tab. 6**). Duża liczba uzyskanych odczytów (min. 80 mln) gwarantuje wysoką jakość analiz transkryptomicznych.

Tabela 6. Analiza statystyczna wyników sekwencjonowania.

sample	library	raw_reads	raw_base s	clean_reads	clean_base s	error_rate
Psz1_5	MRRA240019657-1a	108979860	16.35G	106090914	15.91G	0.01
Psz3_7	MRRA240019659-1a	105145268	15.77G	102416782	15.36G	0.01
Psz4_8	MRRA240019660-1a	111285340	16.69G	108218682	16.23G	0.01
Psz2_6prime	MRRA240019662-1a	90336494	13.55G	87294048	13.09G	0.01
Psz5_28	MRRA240019665-1a	109338862	16.4G	106287664	15.94G	0.01
Psz6_29	MRRA240019666-1a	91733330	13.76G	89030068	13.35G	0.01
Psz7_30	MRRA240019667-1a	109511058	16.43G	106872010	16.03G	0.01
Psz_kom1_9	MRRA240019697-1a	88176808	13.23G	84877852	12.73G	0.01
Psz_kom4_12	MRRA240019700-1a	94982980	14.25G	90767744	13.62G	0.01
Psz_kom5_31	MRRA240019705-1a	86757372	13.01G	80223756	12.03G	0.01
Psz_kom6_32	MRRA240019706-1a	102660974	15.4G	96086268	14.41G	0.01
Psz_kom7_33	MRRA240019707-1a	103763412	15.56G	96051348	14.41G	0.01
Psz_kom8_34	MRRA240019708-1a	101085858	15.16G	95907058	14.39G	0.01
Psz_kon2_14	MRRA240019710-1a	95793224	14.37G	88735178	13.31G	0.01
Psz_kon5_35	MRRA240019717-1a	87919386	13.19G	80196780	12.03G	0.01
Psz_kon6_36	MRRA240019718-1a	94069108	14.11G	85237058	12.79G	0.01
Psz_kon7_37	MRRA240019719-1a	93389628	14.01G	89909834	13.49G	0.01
Psz_kom9_75	MRRA240022551-1a	90255638	13.54G	87553736	13.13G	0.02
Psz_kom10_76	MRRA240022552-1a	93768350	14.07G	91112058	13.67G	0.02
Psz_kon8_77	MRRA240022553-1a	85689380	12.85G	83691926	12.55G	0.02
Psz_kon9_78	MRRA240022554-1a	85688376	12.85G	83386224	12.51G	0.02
Psz_kon10_79	MRRA240022555-1a	97710098	14.66G	95625340	14.34G	0.02
Psz_kon11_80	MRRA240022556-1a	95313190	14.3G	92254482	13.84G	0.02

Raw_bases – liczba odczytów*dlugość sekwencji

Clean reads – odczyty sekwencji po odrzuceniu odczytów o niskiej jakości.

Zmapowano uzyskane sekwencje do genomu referencyjnego *Triticum aestivum*. Udało się zmapować >81% sekwencji, z czego ~76% sekwencji to sekwencje unikalne (Tab. 7).

Tabela 7. Wyniki mapowania prób do genomu referencyjnego pszenicy.

Sample	Total_reads	Total_map	Unique_map	Multi_map
Psz1_5	106090914	96352374 (90.82%)	91027935 (85.8%)	5324439 (5.02%)
Psz3_7	102416782	86297142 (84.26%)	80320213 (78.42%)	5976929 (5.84%)
Psz4_8	108218682	91369982 (84.43%)	86288088 (79.73%)	5081894 (4.7%)
Psz2_6prime	87294048	79768321 (91.38%)	75327132 (86.29%)	4441189 (5.09%)
Psz5_28	106287664	94244389 (88.67%)	88547583 (83.31%)	5696806 (5.36%)
Psz6_29	89030068	81571225 (91.62%)	77152027 (86.66%)	4419198 (4.96%)
Psz7_30	106872010	97970616 (91.67%)	91686914 (85.79%)	6283702 (5.88%)
Psz_kom1_9	84877852	77457795 (91.26%)	73235683 (86.28%)	4222112 (4.97%)
Psz_kom4_12	90767744	82729129 (91.14%)	77805368 (85.72%)	4923761 (5.42%)
Psz_kom5_31	80223756	71781978 (89.48%)	67513560 (84.16%)	4268418 (5.32%)
Psz_kom6_32	96086268	85852914 (89.35%)	80251567 (83.52%)	5601347 (5.83%)
Psz_kom7_33	96051348	85826957 (89.36%)	80323208 (83.63%)	5503749 (5.73%)
Psz_kom8_34	95907058	86677615 (90.38%)	81340976 (84.81%)	5336639 (5.56%)
Psz_kon2_14	88735178	76484336 (86.19%)	72484201 (81.69%)	4000135 (4.51%)
Psz_kon5_35	80196780	72881959 (90.88%)	68850747 (85.85%)	4031212 (5.03%)
Psz_kon6_36	85237058	78051869 (91.57%)	74045845 (86.87%)	4006024 (4.7%)
Psz_kon7_37	89909834	81766131 (90.94%)	77471665 (86.17%)	4294466 (4.78%)
Psz_kom9_75	87553736	73625810 (84.09%)	69068451 (78.89%)	4557359 (5.21%)
Psz_kom10_76	91112058	78116918 (85.74%)	73654242 (80.84%)	4462676 (4.9%)
Psz_kon8_77	83691926	71506909 (85.44%)	67208019 (80.3%)	4298890 (5.14%)
Psz_kon9_78	83386224	68636670 (82.31%)	64597927 (77.47%)	4038743 (4.84%)
Psz_kon10_79	95625340	80577111 (84.26%)	75732901 (79.2%)	4844210 (5.07%)
Psz_kon11_80	92254482	74330155 (80.57%)	69779004 (75.64%)	4551151 (4.93%)

Total reads – wszystkie odczyty,

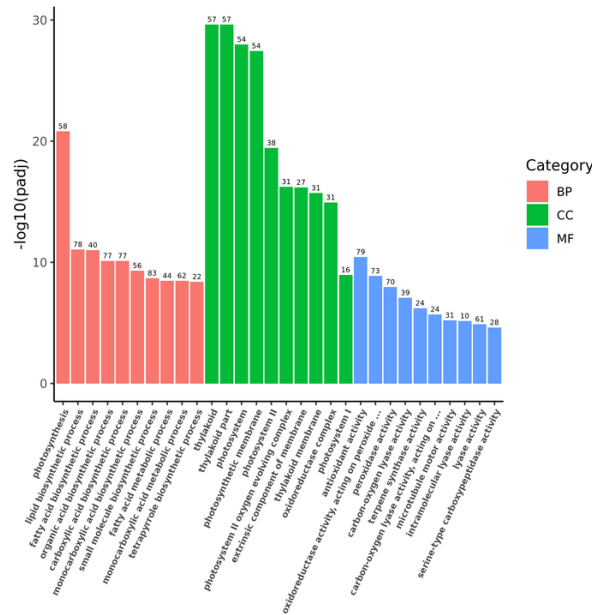
Total map – liczba odczytów, odniesiona do genomu referencyjnego,

Unique map – liczba odczytów, zmapowanych w miejsca unikalne w genomie,

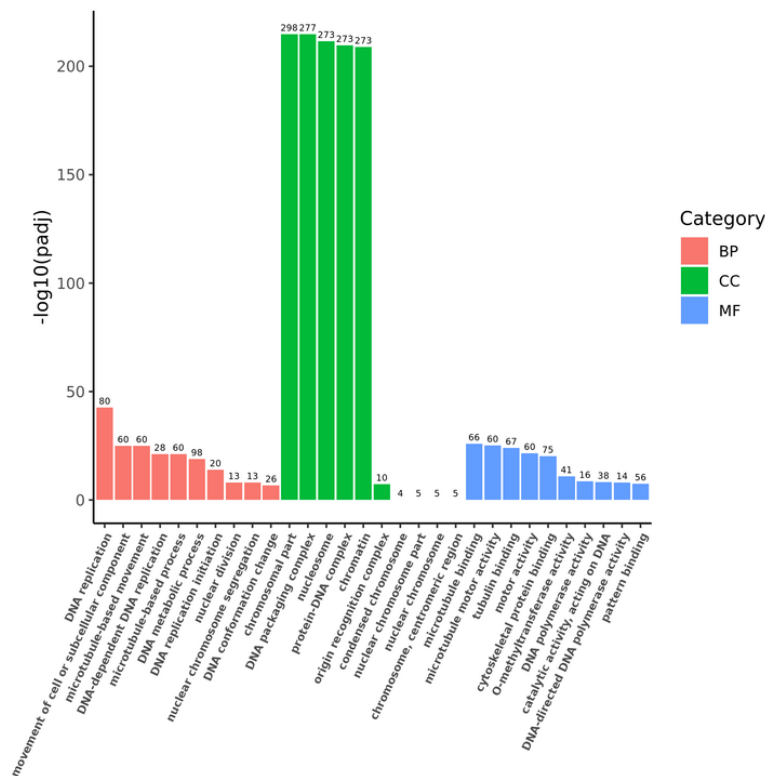
Multi-map – liczba odczytów, zmapowanych w liczne miejsca w genomie,

Wykonano kwalifikację zidentyfikowanych genów do poszczególnych kategorii funkcjonalnych (GO). W porównaniu pszenica w czystej uprawie vs pszenica w koniczynie najwięcej genów należało do kategorii „fotosynteza” i „biosynteza lipidów” (Ryc.4). W porównaniu pszenica w czystej uprawie vs pszenica w komonicy najwięcej genów należało do kategorii „replikacja DNA” i „ruch w oparciu o mikrotubule”.

A

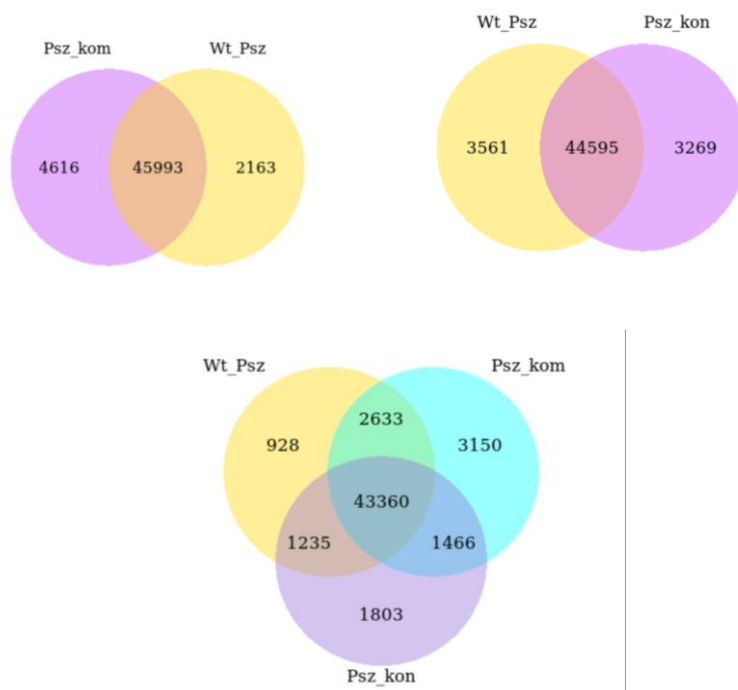


B



Ryc.4. Przyporządkowanie zidentyfikowanych genów do poszczególnych kategorii funkcjonalnych (GO). **A)** pszenica w czystej uprawie vs pszenica w koniczynie, **B)** pszenica w czystej uprawie vs pszenica w komonicy.

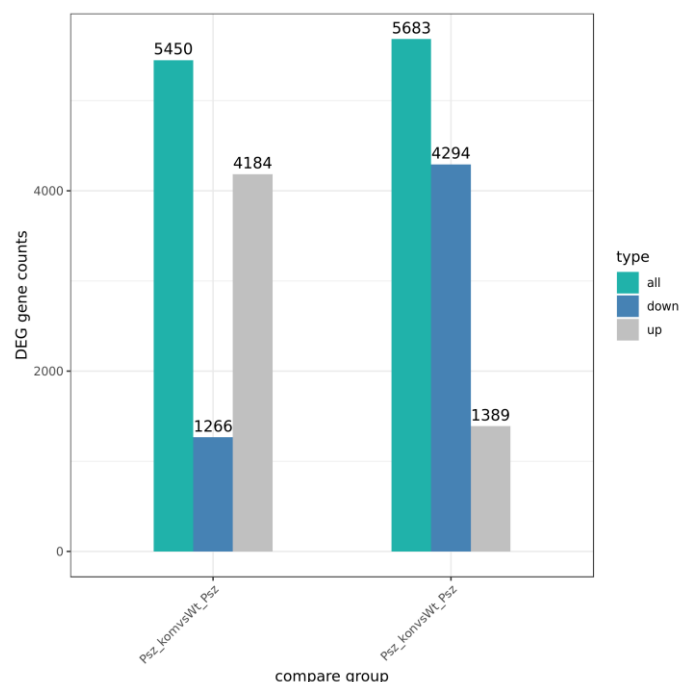
Porównano liczbę sekwencji aktywowanych w uprawie czystej i mieszanej, pszenica i pszenica w komonicy oraz pszenica i pszenica w koniczynie. W porównaniu pierwszym, sekwencji specyficznych tylko dla pszenicy w siewie czystym było 2163, dla pszenicy w komonicy 4616. W porównaniu drugim zidentyfikowano dla pszenicy w siewie czystym 3269 sekwencji versus 3561 w siewie z koniczyną. Porównanie trzecie – pszenica w siewie czystym vs pszenica w komonicy i pszenica w koniczynie wykazała 5881 sekwencji specyficznych wobec 43360 wspólnych (**Rys 5**).



Ryc 5. Diagram Venna, porównanie liczby sekwencji wspólnych i oddzielnych dla pszenicy w siewie czystym, siewie w komonicy i siewie w koniczynie

Zidentyfikowano sekwencje o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy pszenicą w siewie czystym i mieszanym. Wskazano sekwencje, których ekspresja wzrosła lub zmalała oraz podsumowano wszystkie (**Rys.6**).

compare	all	up	down	threshold
Psz_konvsWt_Psz	5683	1389	4294	DESeq2 padj<=0.05 log2FoldChange >=1.0
Psz_komvsWt_Psz	5450	4184	1266	DESeq2 padj<=0.05 log2FoldChange >=1.0



Ryc.6.

Sekwencje o różnicowanej ekspresji pomiędzy pszenicą w siewie czystym i mieszanym.

Oddziaływanie licznych genów zebrano w poszczególne szlaki metaboliczne (analiza KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). W przypadku porównania pszenica w siewie czystym vs pszenica w koniczynie wskazano pięć najważniejszych szlaków metabolicznych: fotosynteza, biosynteza lipidów, kwasów tłuszczowych, kwasów organicznych i karboksylowych. Dla porównania pszenica w siewie czystym vs pszenica w komonicy najważniejszym szlakiem okazała się replikacja DNA, ruch komponentów subkomórkowych, ruch oparty na mikrotubulach, podział komórkowy (**Tab. 8**).

Tabela 8. Najważniejsze szlaki metaboliczne, do których należą sekwencje o różnicowanej ekspresji pomiędzy pszenicą w uprawie czystej, a pszenicą w uprawie z koniczyną

Category	GOID	Description	Gene Ratio	BgRatio	pvalue	padj	Count	Up	Down
BP	GO:0015979	fotosynteza	58/1688	160/21452	2.70879399432771e-24	1.56568292872142e-21	58	2	56
BP	GO:0008610	biosynteza lipidów	78/1688	396/21452	2.9198636609878e-14	8.43840598025475e-12	78	1	77
BP	GO:0006633	biosynteza kwasów tłuszczowych	40/1688	133/21452	4.96497810105915e-14	9.56585780804062e-12	40	0	40
BP	GO:0016053	biosynteza kwasów organicznych	77/1688	411/21452	6.43375828196081e-13	7.4374245739467e-11	77	4	73
BP	GO:0046394	biosynteza kwasów karboksylowych	77/1688	411/21452	6.43375828196081e-13	7.4374245739467e-11	77	4	73

GeneRatio: stosunek liczby genów o zróżnicowanej ekspresji do liczby wszystkich genów, które mogą zostać odnalezione w bazie GO (Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>))

BgRatio: stosunek wszystkich genów z danej kategorii GO do wszystkich genów

padj: skorygowana wartość p-value, 0.05 oznacza istotność

Count: liczba genów o zróżnicowanej ekspresji z danym nr anotacji GO

Wybrano pięć sekwencji o największej różnicy ekspresji z doświadczenia z pszenicą w uprawie czystej, a pszenicą w uprawie z koniczyną (**Tab. 9**)

Tabela 9. Sekwencje o największej różnicy ekspresji pomiędzy pszenicą w uprawie czystej, pszenicą w uprawie z koniczyną i pszenicą w uprawie z komonicą

	Sekwencja	Wt_Psz	Psz_kon	log2FoldChange	Charakterystyka funkcjonalna
1	123166933	336.3	3.4	-6.5	Mannose/glucose-specific lectin
2	123163177	199.7	0	-10.0	Lecithin-cholesterol acyltransferase-like
3	123114541	80.0	0	-8.7	ARATH 3-ketoacyl-CoA synthase
4	123096494	434.2	85.2	-2.3	elongation factor P-like
5	123112831	125.1	0	-9.7	wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase

	Sekwencja	Psz_kon vs Wt_Psz_log2FoldChange	Psz_kom vs Wt_Psz_log2FoldChange	Charakterystyka funkcjonalna
1	732707	-0.56	-0.06	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase
2	123086288	-0.80	-0.12	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase
3	123091750	-0.48	-0.017	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase
4	123103336	-1.27	-0.021	ribulose biphosphate carboxylase small subunit
5	123120782	-1.43	-0.079	ribulose biphosphate carboxylase small subunit

Log2FoldChange – wartość logarytmu z parametru określającego różnicę pomiędzy poziomem ekspresji jednej porównywanej grupy wobec drugiej

Podsumowanie analiz transkryptomicznych dla prób pszenicy:

Do sekwencjonowania RNAseq wybrano linie pszenicy z uprawy czystej, uprawy z komoniką i koniczyną. Po izolacji potwierdzono jakość i integralność uzyskanego materiału parametrem RIN>4.6. W wyniku sekwencjonowania uzyskano 80 mln odczytów, co gwarantuje wysoką jakość analiz transkryptomu. Odniesiono pozyskane sekwencje do genomu referencyjnego pszenicy. Zmapowano ok. 81% sekwencji. 76% z nich zostało ulokowanych w miejscach unikalnych w genomie. Wskazano sekwencje o największej różnicy ekspresji pomiędzy liniami w uprawie czystej i mieszanej. Scharakteryzowano funkcjonalnie wskazane sekwencje. Określono ich potencjalny udział w różnych szlakach metabolicznych: fotosynteza, biosynteza lipidów, kwasów tłuszczowych, kwasów organicznych i karboksylowych. Dla porównania pszenica w siewie czystym vs pszenica w komonicy najważniejszym szlakiem okazała się replikacja DNA, ruch komponentów subkomórkowych, ruch oparty na mikrotubulach, podział komórkowy.

Szlak metaboliczny wydłużania kwasów tłuszczowych jest kluczowy dla zdrowia i adaptacji roślin. Monokultury pszenicy narażają rośliny na stresy środowiskowe, które mogą zakłócać ten proces. Uprawa mieszana z koniczyną zapewnia lepsze warunki glebowe i odżywcze, wspierając metabolizm lipidowy, co przekłada się na lepsze plony i odporność roślin. W monokulturze intensywne pobieranie składników odżywczych (np. fosforu, magnezu, azotu) prowadzi do degradacji gleby. Niedobory kluczowych pierwiastków ograniczają procesy metaboliczne, w tym wydłużanie kwasów tłuszczowych. Brak roślin motylkowych, takich jak koniczyna, oznacza mniejszą dostępność biologicznie związanego azotu, który jest ważny dla biosyntezy koenzymów wspierających szlaki lipidowe. Rośliny w monokulturze są bardziej narażone na stres wodny i patogeny, co może prowadzić do zaburzeń w syntezie lipidów ochronnych, takich jak kutykula. Obniżona ekspresja genów związanych z fotosyntezą w pszenicy w uprawie z koniczyną w porównaniu z uprawą czystą może wynikać z zacielenia pszenicy w koniczynie.

Jako pomoc dla rolników chcących zastosować podobny model uprawy opracowano kalkulator do obliczania nasion rzepaku do wysiewu w komonicy. W obliczeniu uwzględniono zaplanowaną liczbę roślin na 1 m², masę tysiąca nasion oraz siłę kiełkowania.

Kalkulator do rzepaku z wsiewką komonicy

🔄 lazdojezerotillage.com/rezultaty/



Po dokonanych obserwacjach uprawy rzepaku i pszenicy z wsiewką komonicy zalecamy:

Rozpocząć od siewu jednoczesnego rzepaku z komoniką w uprawie zerowej, czyli w ściernisko, przy czym siew rzepaku wg. poniższego wzoru z kalkulacji a ilość komonicy dodana do nasion rzepaku to 10 kg/ha. Optymalna ilość rzepaku to 50 szt/m kw przy odmianach hybrydowych

KALKULACJA OBSADY RZEPAKU DO SIANIA Z KOMONICĄ:

KALKULATOR

Sztuk na m2:	50	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
... kg/ha		

Kalkulator obsady rzepaku rosnącego w komonicy

Sztuk na m2:	50	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
1.94 kg/ha		

Sztuk na m2:	45	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
1.74 kg/ha		

Sztuk na m2:	50	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,0	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
1.61 kg/ha		

Sztuk na m2:	50	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	90	(%)
Przelicz		
2.00 kg/ha		

Uwzględniając wyżej podane parametry w ramach projektu opracowano także kalkulator do obliczania nasion pszenicy do wysiewu w komonicy. Strzałkami pokazano przykładowe wyniki po wzroście lub spadku w/w parametrów.

Kalkulator do pszenicy z wsiewką komonicy

lazdojezerotillage.com/rezultaty/



Po zbiorze rzepaku, należy zasiać pszenicę wg. wzoru z kalkulacji i następnie zmulczować pole przed wzejściem pszenicy. Komonica w tej fazie jest już odporna na herbicyd. Zalecana dawka to 350 szt/m kw

KALKULACJA OBSADY PSZENICY W ROSNĄCEJ KOMONICY:

Sztuk na m2:	350	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
... kg/ha		

Kalkulator obsady pszenicy rosnącej w komonicy

Sztuk na m2:	350	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
13.55 kg/ha		

Sztuk na m2:	340	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
13.16 kg/ha		

Sztuk na m2:	350	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,0	(g)
Siła kiełkowania:	93	(%)
Przelicz		
11.29 kg/ha		

Sztuk na m2:	350	(szt/m2)
MTZ masa 1000 nasion:	3,6	(g)
Siła kiełkowania:	90	(%)
Przelicz		
14.00 kg/ha		

Zalety uprawy w żywej ściółce

1. Zdecydowany wzrost zasobności gleby w azot.
2. Spodziewane mniejsze spływy powierzchniowe.
3. Wzrost zdrowotności roślin: spodziewany zwłaszcza w kolejnych latach uprawy.
4. Mniejsze zachwaszczenie pola.
5. Przykrycie gleby, zmniejszenie erozji.
6. Roślina miododajna.



Problemy

1. Problemy z pozyskaniem nasion.
2. Spoczynek nasion wymagany do ich obfitego kiełkowania i wigoru.
3. Mniejsza obsada roślin plonu głównego.
4. Drobne nasiona, trudny wysiew.

Podsumowanie

- Wszystkie zaplanowane analizy w **kompleksowy** sposób przedstawiają zależności pomiędzy kondycją badanych roślin i porównują liczne parametry w obrębie obu metod uprawy pszenicy i rzepaku: tradycyjnej i no-tillage z żywą ściółką.
- Wykonane badania umożliwiają **zrozumienie procesów** zachodzących podczas uprawy roślin wsiewanych w mulcz do nienaruszonej gleby, w porównaniu do roślin uprawianych samodzielnie w glebie z orką i stosowaniem wszystkich tradycyjnych narzędzi pielęgnacyjnych i ochrony chemicznej.
- Rośliny wysiane w mulcz rozwijają się w **innych warunkach**, osiągając odmienne parametry fizjologiczne. Sukces ich rozwoju najsilniej **zależy od początkowych faz rozwoju** i są prawidłowe jeśli nie są zagłuszone przez zbyt dynamiczny wzrost żywej ściółki.

Operacja jest przykładem udanej i harmonijnej współpracy pomiędzy nauką a praktyką rolniczą. Projekt powinien być kontynuowany, by ustalić wysokość uzyskiwanych parametrów ilości i jakości plonu, kontrolować stan środowiska oraz rozwiązywać ewentualne problemy, które mogą pojawiać się przy tak nowatorskim sposobie uprawy.