

Rozprawa doktorska pt.
**Wysokoprzepustowe fenotypowanie roślin uprawnych
w warunkach szklarniowo-polowych** – zbiór 5 publikacji.

High-throughput phenotyping of crop plants in greenhouse and field conditions.
- compilation of 5 publications.

mgr inż. Piotr Stefański

Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. – Grupa IHAR

Przewód doktorski realizowany
w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie
o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie agronomia*/

Promotor: dr hab. Krystyna RYBKA prof. Instytutu

Streszczenie

Według szacunków, pomiędzy rokiem 2010, a 2050 trzeba będzie wyprodukować biomasę równą tej, którą ludzkość wytworzyła od początku istnienia rolnictwa, aby zaspokoić zapotrzebowanie w żywność i produkty rolne nieżywnościowe. Jest to wyzwanie, które wymaga skutecznych i nowatorskich rozwiązań w hodowli i zarządzaniu. Zmiany klimatu pogłębiają zwiększające się ryzyko dla rolnictwa. Chociaż zwiększone stężenie CO₂ w atmosferze i niektóre skutki zmian klimatu mogą działać na korzyść pewnych upraw w niektórych regionach świata, to ich całościowy wpływ będzie negatywny i zagrozi globalnemu bezpieczeństwu żywnościowemu. Skutki zmian klimatycznych odczuwane są już obecnie. Prawie każdy kolejny rok jest cieplejszy od poprzedniego, coraz częstsze są susze o zasięgu ogólnokrajowym, zimy są coraz krótsze i mniej mroźne, a lata coraz bardziej gorące. Zmiany tego typu wpływają na obniżenie plonów. Badania wskazują, że w ciągu ostatnich trzech dekad zmiany klimatu doprowadziły do spadku globalnych plonów kukurydzy i pszenicy o 3.8% i 5.5% odpowiednio.

Tak silna presja, w połączeniu z gwałtownym rozwojem technologicznym, wymusza przyspieszenie rozwoju technik wysokoprzepustowego fenotypowania roślin, w którym należy się skupić na czynnikach stresu abiotycznego i biotycznego, w powiązaniu ze skutkami globalnych zmian klimatu. Fenotypowanie bada wydajność i produktywność roślin (= genetyka x środowisko x zarządzanie). W przyszłości fenotypowanie umożliwi nam ściśle powiązanie hodowli roślin, fizjologii i produkcji roślinnej.

W ramach tego zagadnienia zajęliśmy się przeprowadzeniem badań w zakresie:

1. przyspieszenia cyklu hodowlanego, za pomocą modyfikacji widm i natężenia światła stosowanego do doświetlania roślin w szklarniach;
2. obserwacji materiałów hodowlanych w warunkach polowych, za pomocą platformy HTPP (ang.: High Throughput Plant Phenotyping).

Skracanie cyklu hodowlanego, przyspieszenie we wdrażaniu nowych odmian na rynek, na tym zależy każdej firmie hodowlanej. Ten pęd w głównej mierze polega na wyprzedzeniu konkurencji. Dlatego każda spółka hodowlana dąży do modernizacji narzędzi i metodyk hodowlanych w celu usprawnienia całego cyklu.

Przyspieszenie cyklu hodowlanego tzn. otrzymanie 3 pokoleń w jednym roku jest zadaniem trudnym, lecz realnym. Wymagania w tym zakresie cały czas rosną. Mówi się już nawet o 5 pokoleniach w jednym roku, lecz to jest zależne od gatunku oraz wysokości nakładów finansowych koniecznych do ich uzyskania. W przypadku zbóż ozimych są co najmniej dwa etapy w przyspieszeniu uzyskania kolejnego pokolenia. Pierwszy etap to jarowizacja, która przy zoptymalizowanym świetle, według własnych obserwacji, może trwać krócej o 10-15%. Na dalszym etapie wzrostu roślin możliwa jest konfiguracja światła pod

względem barwy i natężenia w różnych okresach wegetacyjnych roślin. W doświadczeniu szklarniowym zrealizowanym w HR-Strzelce testowaliśmy lampy ledowe o różnym widmie światła na zbożach jarych: pszenicy, jęczmieniu i owsie. W doświadczeniu testowaliśmy w sumie 17 lamp, różniących się widmem generowanego światła i jego natężeniem. Doboru lamp dokonano w oparciu o dane literaturowe, konsultacje z firmami produkującymi lampy ledowe oraz własne obserwacje. Do badań wykorzystano odmiany: pszenicy jarej - Harenda, Tybalt, Kamelia; jęczmienia jarego - Radek, Soldo; owsa - Bingo, Nawigator. Ocenialiśmy cechy fenotypowe oraz stan fizjologiczny roślin. Każdy gatunek miał indywidualne wymagania świetlne, lecz znaleźliśmy widmo optymalne, pozwalające na prawidłowy wzrost roślin, bez uszkodzeń spowodowanych nieodpowiednim światłem. Stwierdziliśmy, że lampa ledowa zbudowana w oparciu o tzw. białą diodę o widmie wzbogaconym o światło niebieskie jest optymalna dla testowanych gatunków, pozwala skrócić cykl hodowlany oraz wpływa na 50% spadek zużycia energii elektrycznej przez lampy szklarniowe. W mojej rozprawie doktorskiej zastosowałem klasyczne fenotypowanie wysokości roślin oraz terminów kłoszenia i kwitnienia w celu oceny tempa wzrostu roślin; obserwacje połączone były z pomiarami fluorescencji chlorofilu *a* mającymi na celu ocenę stanu fizjologicznego roślin. Pomiar fluorescencji chlorofilu jest metodą wysokoprzepustową. Najbardziej tolerancyjny na widmo i natężenie sztucznego światła był owies, w przeciwieństwie do wrażliwego jęczmienia, i pszenicy o umiarkowanej wrażliwości. Najskuteczniejsze okazały się lampy zbudowane w oparciu o tzw. „białe” diody; były one również najbardziej optymalne dla równoległej pracy z różnymi gatunkami w tej samej przestrzeni szklarni.

Obserwacje polowe są jednym z ważniejszych aspektów procesu hodowli roślin. Fenotypowanie roślin polega na wizualnej ocenie roślin w zdefiniowanym okresie wegetacyjnym. Nie trzeba przypominać, że ludzkie oko bywa zawodne, w szczególności po 8 godzinach pracy w ekstremalnych warunkach pogodowych. Dalego też obserwacje za pomocą odpowiednich kamer są w stanie uniezależnić jakość zbieranych danych. Ocenie podlegają m.in. wschody roślin, zagęszczenie poletka, występowanie chorób, kłoszenie. Coraz intensywniej wprowadzane są technologie automatycznego fenotypowania. Doświadczenia polowe polegały na obrazowaniu pszenżyta ozimego za pomocą kamery RGB zainstalowanej na platformie HTPP. Fenotypowanie wykonano, w sumie, na 27 odmianach wysianych w ramach doświadczeń PDO (Porejestrowe Doświadczalnictwo Odmianowe), uprawianych w dwóch reżimach agrotechnicznych, w dwóch powtórzeniach przez dwa sezony wegetacyjne. Oceniano zagęszczenie łąnu i przezimowanie (obserwacje jesienią i wiosną, faza BBCH 22-29) oraz kłoszenie (faza BBCH 77-85). W obu przypadkach szukano korelacji z plonowaniem badanych genotypów. Zliczanie kłosów na początku fazy kłoszenia pozwala oszacować plon jeszcze przed fizycznym zbiorem co jest ważne na etapie hodowlanym oraz przy prowadzeniu plantacji nasiennych i dalszej logistyce produkcyjnej. W ramach doświadczeń polowych w związku z niniejszą pracą zarejestrowano w sumie ok. 800 zdjęć w dużej rozdzielczości (30 Mb każde). Uzyskano istotne korelacje, jednakże w przypadku korelacji z liczbą kłosów była to jedynie korelacja istotna statystycznie. W przypadku korelacji wielkości plonu z zagęszczeniem łąnu jesienią oraz wiosną współczynniki Pearsona wyniosły 0,79. Są to współczynniki o wysokiej wartości mające praktyczne znaczenie dla hodowli.

Summary

According to estimates, between 2010 and 2050, it will be necessary to produce biomass equal to what humanity has produced since the beginning of agriculture to meet the demand for food and non-food agricultural products. This challenge requires more effective and innovative breeding and management solutions. Climate change is exacerbating the increasing risks to agriculture. While increased atmospheric CO₂ and some of the effects of climate change may benefit certain crops in some regions of the world, their overall impact will

be negative and threaten global food security. The effects of climate change are already being felt. Almost every year is warmer than the previous one, nationwide droughts are becoming more frequent, winters are getting shorter and less frosty, and summers are getting hotter. Changes of this type reduce yields. Research shows that climate change has diminished global corn and wheat yields by 3.8% and 5.5% over the past three decades, respectively.

Such strong pressure, combined with rapid technological development, forces the acceleration of the development of high-throughput plant phenotyping techniques. These techniques should focus on abiotic and biotic stress factors in connection with the effects of global climate change. Phenotyping examines plant performance and productivity (= genetics x environment x management). In the future, it will enable us to link plant breeding, physiology, and production closely.

As part of this issue, we conducted research on:

1. accelerating the breeding cycle by modifying the spectra and intensity of light used to illuminate plants in greenhouses;
2. observation of breeding materials in field conditions using the HTP (High-Throughput Phenotyping) platform.

Every breeding company cares about shortening the breeding cycle and accelerating the introduction of new varieties to the market. This momentum is mainly about getting ahead of the competition. Therefore, each breeding company strives to modernize breeding tools and methodologies to improve the cycle.

Accelerating the breeding cycle, i.e., obtaining three generations in one year, is a complex but real task. The requirements in this area are constantly growing. There is talk of up to 5 generations in one year, but it depends on the species and the amount of financial outlays necessary to obtain them. In the case of winter cereals, there are at least two stages in accelerating the production of the next generation. According to our observations, the first stage, vernalization, may take 10-15% less time with optimized light. Configuring the light in color and intensity for different plant growing stages is possible. In the greenhouse experiment in HR-Strzelce, we tested totally 17 LED lamps differing in light spectra and intensities on spring cereals: wheat, barley, and oats. The lamps were selected based on literature data, consultations with companies producing LED lamps, and our observations. The following varieties were used for research: spring wheat - Harenda, Tybalt, Kamelia; spring barley - Radek, Soldo; oats - Bingo, Navigator. We assessed the plants' phenotypic characteristics and physiological conditions. Each species had individual light requirements, but we found the optimal spectrum, allowing the plants to grow correctly without damage caused by inappropriate light. We found that the LED lamp based on the so-called white diode with a spectrum enriched with blue light is optimal for the tested species; shortens the breeding cycle, and reduces the electricity consumption of greenhouse lamps by 50%. In my doctoral dissertation, I used classic phenotyping of plant height and earing and flowering dates to assess the plant growth rate; observations were combined with chlorophyll fluorescence measurements to evaluate plants' physiological condition. Measuring chlorophyll fluorescence is a high-throughput method. Oats were the most tolerant to the spectrum and intensity of artificial light, unlike sensitive barley and moderately sensitive wheat. The most effective turned out to be lamps based on the so-called "white" diodes; they were also the most optimal for parallel work with different species in the same greenhouse space.

Field observations are one of the most critical aspects of the plant breeding process. Plant phenotyping involves the visual assessment of plants during a defined growing season. The human eye can be unreliable, especially after 8 hours of work in extreme weather conditions. Moreover, observations using appropriate cameras can make the quality of the collected data independent. The following are subject to assessment: plant emergence, plot density, occurrence of diseases, and earing. Automatic phenotyping technologies are being

introduced more and more intensively. Field experiments included imaging winter triticale using an RGB camera installed on the HTPP (High Throughput Plant Phenotyping) platform. Phenotyping was performed on a total of 27 varieties sown as part of PDO trials (post-registration variety testing), cultivated at two agrotechnical levels (A1, A2), in two repetitions for two growing seasons. Canopy density and overwintering, observations in autumn and spring (BBCH 22-29 phase), and earing (BBCH 77-85 phase) were assessed. In both cases, correlations with the yield of the tested genotypes were sought. Counting the ears at the beginning of the earing phase allows you to estimate the yield before physical harvesting, which is important at the breeding stage and when running seed plantations and further production logistics. As part of field experiments in the frames of my dissertation, approximately 800 high-resolution photos (30 Mb each) were recorded. Significant correlations were obtained; however, the correlation with the number of ears was only statistically significant. In the case of correlation of yield with canopy density in autumn and spring, Pearson's coefficients were 0.79. These are high-value coefficients that have practical significance for breeding.

Publications list. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. **Stefański P.**, Siedlarz P., Matysik P., Rybka K. (2019) Usefulness of LED lightings in cereal breeding on example of wheat, barley and oat seedlings. International Journal of Agricultural and Biological Engineering (IJABE) 12(6):32-37. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20191206.3646>
IF₂₀₁₈ = 1.349, pkt_{MNSW/MEiN} = 70
2. **Stefański P.**, Siedlarz-Słowacka P., Matysik P., Rybka K. (2022) Efficiency of LED lamps usage in cereal crop breeding greenhouse. International Journal of Agricultural and Biological Engineering 15:75-83. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20221502.5775>
IF₂₀₂₂ = 2.032 (dane ze strony czasopisma dostęp 21.02.2024), pkt_{MNSW/MEiN} = 70
3. Siedlarz P., **Stefański P.**, Matysik P., Nita Z., Rybka K. (2018) Wpływ różnych oświetlaczy LED na indeks kiełkowania ziarna pszenicy uzyskanego w etapie szklarniowym procesu hodowlanego SSD. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 282:3-15.
<https://doi.org/10.37317/biul-2017-0011>
pkt_{MNSW/MEiN} = 20
4. **Stefański P.**, Rybka K., Matysik P. (2024) Fenotypowanie zagęszczenia ładu pszenżyta ozimego w warunkach polowych przy użyciu kamery RGB (Bilingual. Eng.: Phenotyping of winter triticale canopy density in field conditions using an RGB camera). Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 301:1-9 <https://doi.org/10.37317/biu-2024-0001>
pkt_{MNSW/MEiN} = 20
5. **Stefański P.**, Ullah S., Matysik P., Rybka K. (2024) Triticale field phenotyping using RGB camera for ear counting and yield estimation. Journal of Applied Genetics n:nn. Artykuł opublikowany online 14.02.2024. <https://doi.org/10.1007/s13353-024-00835-6>
IF_{5-letni} = 3.0 (dane ze strony czasopisma dostęp 21.02.2024), pkt_{MNSW/MEiN} = 140

Łączny IF publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej wynosi 6.381.

Suma punktów na Liście MNSW wynosi 320.

Strzelce, 21.03.2024 r.

(-) mgr inż. Piotr Stefański

*/ Przewód doktorski wszczęty do 30 kwietnia 2019 r. realizowany jest w dyscyplinie agronomia, a nadanie stopnia następuje w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, która została określona dla IHAR-PIB po 30 kwietnia 2019 r.