

# Badania asocjacyjne oraz molekularne uwarunkowania odporności jęczmienia jarego na stresy środowiskowe

Zadanie 14

Okres realizacji: 2021-2025



## Zespół wykonawców:

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

### *Zakład Fenomiki Zbóż:*

dr hab. Anetta Kuczyńska, prof. IGR PAN; e-mail: akuc@igr.poznan.pl

dr inż. Krzysztof Mikołajczak

dr Piotr Ogradowicz

dr Michał Kempa

mgr Martyna Bodzak

mgr Renata Trzeciak

Alina Anioła

Renata Holewińska

### *Zakład Biometrii i Bioinformatyki:*

prof. dr hab. Paweł Krajewski

dr inż. Monika Mokrzycka

ALSIA-Metapontum Agrobios Research Center, Metaponto, Włochy

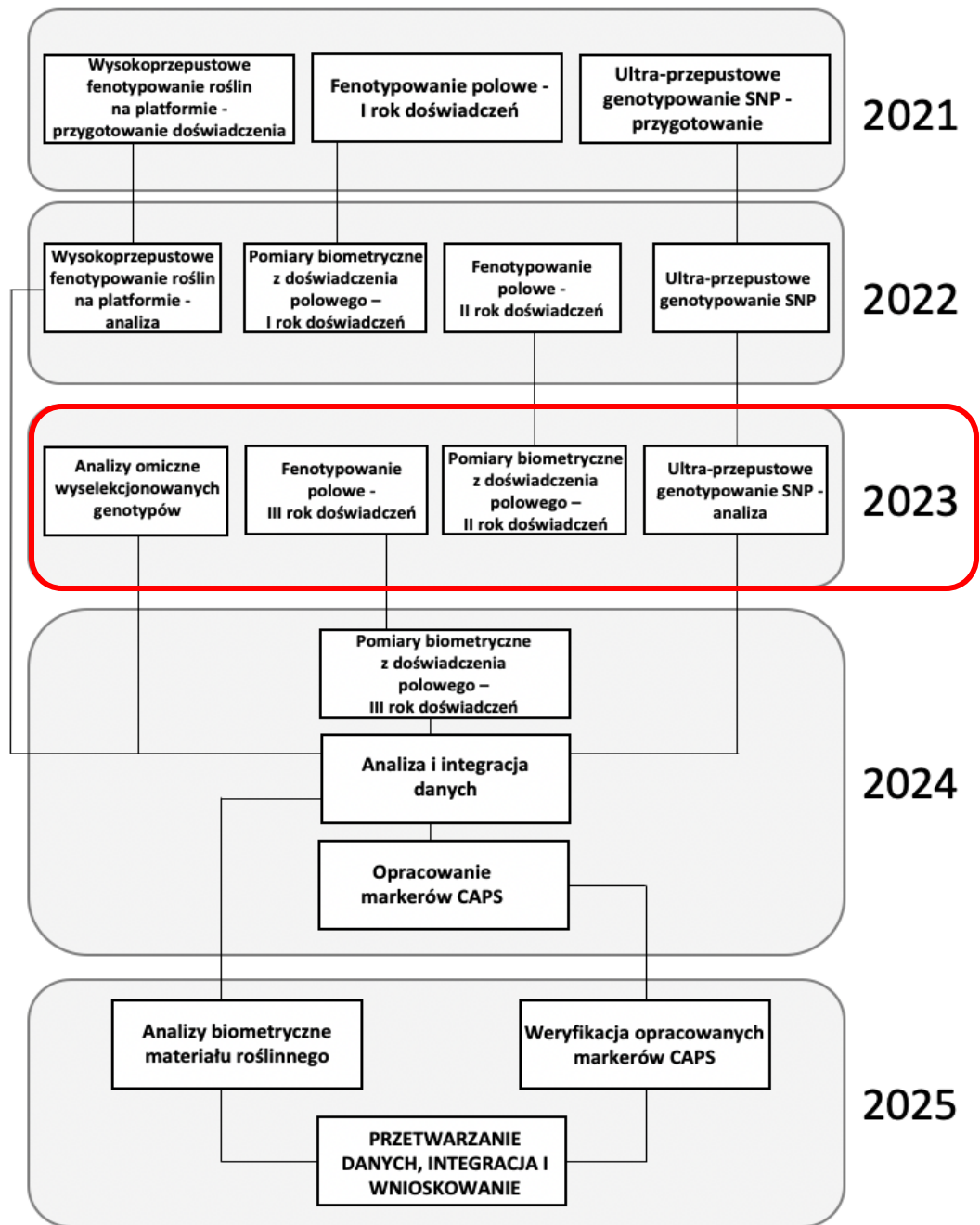
dr Francesco Cellini - Director of Research and Development

dr Angelo Petrozza

dr Stephan Summerer

Angelo Mossuto





## Cele projektu w 2023 roku:

1. Analizy biometryczne materiału roślinnego z doświadczenia polowego – II rok doświadczeń.
2. Ultraprzepustowe genotypowanie SNP - analiza.
3. Analizy omiczne wyselekcjonowanych genotypów.
4. Fenotypowanie badanych form w doświadczeniach polowych – III rok doświadczeń.

Wszystkie cele projektu w 2023 roku zostały w pełni osiągnięte.

Figura 1. Schemat projektu

# Materiały

Materiałem badawczym są odmiany jęczmienia jarego oraz rody/linie hodowlane o różnym pochodzeniu – łącznie 120 form. Dobór materiału roślinnego został skonsultowany ze specjalistami z Firm Hodowlanych.

# Metody

- 1. Analizy biometryczne materiału roślinnego z doświadczenia polowego (II rok)** – pomiary biometryczne cech plonotwórczych doświadczeń z 2021 roku prowadzonych w trzech lokalizacjach: Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o. (Danko), Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR (STH), Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. (PHR) oraz w trzech warunkach środowiska: warunki naturalne (bez inokulacji), z zastosowaniem inokulacji *Fusarium culmorum* i z zastosowaniem inokulacji *Pyrenophora teres*.
- 2. Ultra-przepustowe genotypowanie SNP** – analizy bioinformatyczne 60 genotypów jęczmienia jarego na podstawie wyników z najnowszej macierzy do genotypowania 50K Illumina Infinium iSelect SNP.
- 3. Analizy omiczne wyselekcjonowanych genotypów** – określenie profilu reakcji jęczmienia na stres abiotyczny i biotyczny działające symultanicznie poprzez analizy mikroskopowe, fizjologiczne, transkryptomiczne, metabolomiczne oraz fenotypowe.
- 4. Fenotypowanie badanych form w doświadczeniach polowych (III rok)** – doświadczenia na poletkach doświadczalnych trzech Firm Hodowlanych współpracujących bezpośrednio w ramach Projektu oraz w trzech warunkach środowiska. Obserwacje fenotypowe prowadzono w zakresie cech określających reakcję badanych genotypów na infekcję grzybami z rodzaju *Fusarium* oraz *P. teres*, jak również głównych cech struktury plonu oraz faz fenologicznych. Pomiary biometryczne cech plonotwórczych będą kontynuowane w roku 2024 i zostaną przedstawione w sprawozdaniu w przyszłym roku.

# Wyniki i wnioski

## 1. Analizy biometryczne materiału roślinnego z doświadczenia polowego (II rok)

Największy wpływ stresu biotycznego, którym był oprysk zarodnikami *P. teres* odnotowano w stacji STH. W stacjach PHR i Danko nie obserwowano znaczącego wpływu inokulacji na stopień porażenia roślin względem warunków kontrolnych. Odmienną reakcję odnotowano w warunkach inokulacji roślin *F. culmorum*, gdzie wykazano wpływ zabiegu we wszystkich stacjach hodowlanych, przy czym największy efekt obserwowano w STH a najmniejszy w Danko. Niezależnie od lokalizacji odnotowano zbliżoną liczbę ziaren w kłosach badanych roślin. Z kolei dla liczby kłosek w kłosie w przypadku roślin ze stacji hodowlanej PHR i STH obserwowano znaczący spadek ich liczby (o około połowę) w porównaniu do stacji Danko.

We wszystkich lokalizacjach odnotowano naturalnie występujące porażenie roślin jęczmienia spowodowane zarówno przez *F. culmorum* jak i *P. teres*.

## 2. Ultra-przepustowe genotypowanie SNP

Analizy bioinformatyczne ultraprzepustowego genotypowania SNP objęły drugą połowę (60) puli genotypów podlegających badaniom w projekcie. Prowadzone one były na podstawie wyników otrzymanych z najnowszej macierzy do genotypowania 50k Illumina Infinium iSelect SNP umożliwiającej dokładne wykrycie polimorfizmów między badanymi genotypami. W kolejnych etapach wyniki genotypowania pełnej puli 120 genotypów zostaną zintegrowane ze wszystkimi danymi fenotypowymi otrzymanymi w ramach projektu, co umożliwi zidentyfikowanie regionów w genomie jęczmienia związanych z odpornością na analizowane stresy, komponentami plonu oraz cechami fenotypowymi mierzonymi w czasie rzeczywistym.

# Wyniki i wnioski

## 3. Analizy omiczne wyselekcjonowanych genotypów

Korelacja cech składających się na potencjał plonowania roślin w suszy z cechami dynamicznymi z platformy (wykonana w 2022 r.) umożliwiła uzyskanie informacji na temat zachowania się badanych genotypów jęczmienia w różnych warunkach środowiska. Pozwoliło to na wybór czterech genotypów:

- dwa genotypy dobrze plonujące w warunkach suszy (Danko 20, PHR 15),
- dwa genotypy słabo plonujące w warunkach suszy (Danko 5, STH 15).

Wyselekcjonowane genotypy poddane były stresom łączonym w pełni kontrolowanych warunkach:

- susza + inokulacja *F. culmorum*,
- susza + inokulacja *P. teres*.



Zdjęcie 1. Wyselekcjonowane genotypy jęczmienia po inokulacji *P. teres*

# Wyniki i wnioski

## 3. Analizy omiczne wyselekcjonowanych genotypów

- analizy mikroskopowe

Analizy mikroskopowe wykazały wysoki poziom porażenia kłosów przez *F. culmorum*, włącznie z ich odbarwieniem i występowaniem na niektórych plam nekrotycznych. Analizy mikroskopowe pozwoliły na zaobserwowanie zwiększonej produkcji wosków na pochewce kłosów roślin inokulowanych *F. culmorum* w porównaniu do roślin kontrolnych potwierdzając, że jest to jeden z mechanizmów odpowiedzi roślin na infekcję mającą na celu zminimalizowanie jej postępu. Powstała warstwa woskowa może zmniejszać dostępność wody dla konidiów *Fusarium*, przyczyniając się do zwiększania odporności typu I oraz ograniczenia rozprzestrzeniania się mykotoksyn.



Zdjęcie 2. Symptomy porażenia *F. culmorum* obserwowane na ziarniakach (a, b), plewach (c, d) i niedojrzałych kłosach jęczmienia (e, f)

# Wyniki i wnioski

## 3. Analizy omiczne wyselekcjonowanych genotypów

- pomiary cech fizjologicznych, m.in. RWC

Pomiar względnej zawartości wody (ang. Relative Water Content, RWC) wykazał znaczny wpływ stresu suszy na spadek poziomu wody w liściach jęczmienia, co świadczy o postępującej dehydratacji tkanek związanej z niedostatkim wody w środowisku. Ponadto wykazano, że inokulacja jęczmienia w suszy zarodnikami *P. teres* i w mniejszym stopniu *F. culmorum* zwiększyła stopień uwodnienia tkanek.

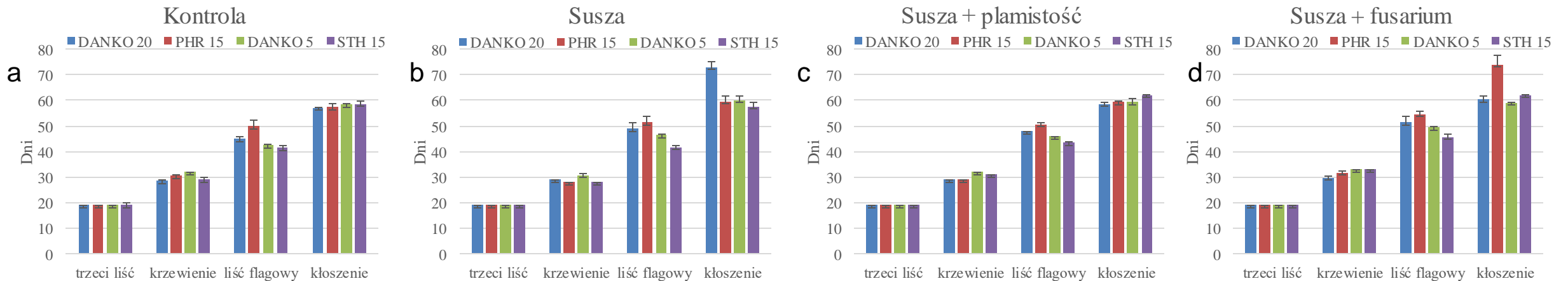
Dane literaturowe wskazują, że polepszenie stosunków wodnych w liściach roślin w takich warunkach jest związane z włączeniem syntezy i akumulacji białek w odpowiedzi na stres biotyczny. W regulacji stosunków wodnych znaczenia nabiera też zwiększone odkładanie wosków lub zmiana składu tej frakcji na powierzchni epidermy liści, co zaobserwowano prowadząc analizy mikroskopowe roślin po inokulacji. Grzyby kolonizujące tkanki roślinne oprócz wpływu na proces translacji, transkrypcji czy też depozycji wosków na wierzchniej stronie naskórka wpływają również modyfikująco na sygnalizację hormonalną roślin, prowadząc np. do zwiększenia długości korzenia lub zwiększenia mobilizacji składników odżywczych prowadząc również do poprawy stosunków wodnych w roślinie.

# Wyniki i wnioski

## 3. Analizy omiczne wyselekcjonowanych genotypów

- obserwacje fenotypowe

Genotypy Danko 20 i PHR 15 cechowały się większymi kłosami z większą liczbą kłosek, większą masą tysiąca ziaren w suszy w porównaniu do Danko 5 i STH 15. Otrzymane wyniki mogą świadczyć o większej stabilności procesów enzymatycznych w obrębie genotypów dobrze plonujących w suszy. Dodatkowo zaobserwowano, że genotypy Danko 20 i PHR 15 były wyższe i charakteryzowały się większym stopniem rozkrzewienia. Większy stopień rozkrzewienia może przyczyniać się do zwiększonego zacienienia gleby w obrębie roślin zmniejszając parowanie wody. Wykazano istnienie różnic w stopniu porażenia genotypów. Warunki stresowe miały wpływ na tempo osiągnięcia przez badane rośliny fazy liścia flagowego czy kłoszenia. Późne kłoszenie PHR 15 może być wynikiem próby „ucieczki przed porażeniem” stanowiącej jedną ze strategii radzenia sobie z warunkami stresowymi.



Wykres 1. Liczba dni niezbędnych do osiągnięcia wybranych faz rozwojowych przez jęczmień rosnący w różnych warunkach środowiskowych



# Wyniki i wnioski

## 4. Fenotypowanie badanych form w doświadczeniach polowych (III rok)

Obserwowano znaczne zróżnicowanie fenotypowe badanych genotypów jęczmienia w warunkach stresowych. W tabeli 1 przedstawiono genotypy jęczmienia o najwyższych wartościach cech plonotwórczych, tj. długości kłosa i liczby ziaren w kłosie wraz ze stopniem porażenia roślin fuzariozą.

Genotyp	Liczba ziaren w kłosie [szt.]	Długość kłosa [cm]	Fcl
RAH 11	25	10,5	5
PHR 9	23	8,3	6
BKH 13	23	8,5	7
RAH 9	23	7,9	7
STH 12	23	8,7	6
BKH 10	23	8,8	7
STH 10	23	8,2	6

Tabela 1. Wybrane genotypy jęczmienia jarego po inokulacji *F. culmorum*; Fcl – stopień porażenia roślin fuzariozą (9-brak porażenia; 1-bardzo duże porażenie)

Rośliny genotypu RAH 11 charakteryzowały się najdłuższym kłosem i największą liczbą ziaren w kłosie wśród badanych genotypów z objawami fuzariozy. W grupie genotypów wybranych na podstawie cech plonotwórczych zaobserwowano, że trzy z nich – PHR 9, BKH 13 i STH 12, wyróżniały się dobrymi parametrami plonu we wszystkich warunkach doświadczalnych. W porównaniu ww. genotypów stwierdzono, że genotyp PHR 9 w warunkach kontrolnych charakteryzował się najwyższą, a po inokulacji jedną z najwyższych wartości średniej liczby ziaren w kłosie.

# Wykaz publikacji wyników projektu w 2023 r.

Na The EUCARPIA Cereals Section Conference "Cereal Breeding - Challenges and Opportunities for Global Improvement", Szeged, Węgry (15-20.05.2023) zaprezentowano doświadczenie przeprowadzone z wykorzystaniem systemu LemnaTec Scanalyzer3D udostępnionym przez ALSIA-Metapontum Agrobios Research Center, Metaponto (MT) Włochy wykonanego w ramach tematu badawczego nr 2 w 2022 roku.

Prezentacja miała formę plakatu (sesja posterowa P-36).

## Introduction

Non-invasive methods of automatic plant phenotyping are providing a new tool for plant biology studies employing high-throughput, large scale measurements of various features in a non-destructive way in real time. Thanks to this, imaged plants are not damaged and are able to reach full maturity hence the yield potential can be assessed. Real-time phenotyping made it possible to observe dynamics of plant growth, during the entire vegetation period. Dynamic assessment of plant traits is particularly important for understanding plant adaptation and response to environmental factors such as drought, one of the main abiotic factors limiting plant productivity worldwide.

The aim of the study was continuous and non-invasive imaging of the set of spring barley genotypes in real time on a platform for automatic plant phenotyping.

## Material and method

Set of 120 spring barley genotypes was phenotyped on the LemnaTec Scanalyzer3D system provided by ALSIA-Metapontum Italy, equipped with RGB, UV and NIR cameras.

Five seeds per barcoded pot were sown. After germination, the number of plants was reduced to one per pot. The experiment was carried out in triplicate. Pots, mats and the supports preventing plants from laying down in later stages of development were blue (Fig. 1A) allowing background to be eliminated while the processing of the plant image.

Drought stress started in the tillering stage (BBCH 26-29) and the water deficit was maintained for three weeks (to reach and maintain 20% FC field capacity), then the plants were re-watered. During imaging, the weight of each pot was automatically measured and, if necessary, a precise volume of water was added to prevent the substrate moisture falling below 20% FC (Fig. 1B). Plant imaging was performed at 15 time points, each occurring every third day of the experiment, for a total of approximately 40 days:

1. three time points before water shortage occurs (70% FC),
2. nine time points during stress (20% FC),
3. three time points after rehydration (70% FC).

Each plant was imaged with an overhead and side view camera (0° and 90°) that covered the visible (RGB) and near infrared (NIR) spectrum. This allowed to obtain information on the height and dynamics of plant growth, plant shape (rotational symmetry), predicted shoot area, shoot biomass, colour distribution (yellow to green ratio) and water use efficiency (WUE) for all tested barley genotypes. Images were processed using Python and PlantCV/OpenCV packages. After the imaging was completed, plants were moved to the greenhouse to reach full maturity, and then spikes were harvested to assess the characteristics of yield components (spike length, number of spikelets and grains per spike, grain weight per spike, total yield grains per plant and weight of 1000 grains).



Fig. 1 A – blue pots with blue mats and supports; B – precise watering

## Results

Imaging showed, that during drought, different rates of achievement of individual developmental stages by the tested genotypes were observed. The heading stage was reached the fastest by genotypes DANKO 2, DANKO 11, DANKO 17, DANKO 18 (Fig. 2). On the same day, awns above the flag leaf were observed for genotypes: STH 15, STH 16 and STH 17 (Fig. 3). The remaining genotypes analysed at this stage of observation remained in the tillering stage.

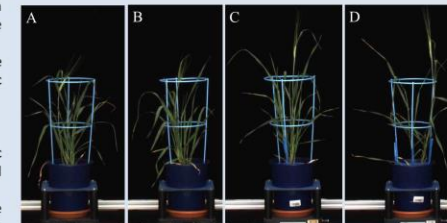


Fig. 2 First genotypes at the heading stage in the experiment: DANKO 2 (A), DANKO 11 (B), DANKO 17 (C), DANKO 18 (D)

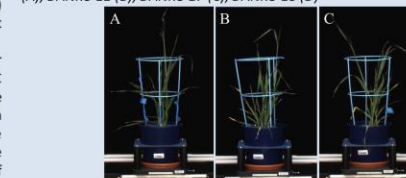


Fig. 3 Genotypes with awns above the flag leaf: STH 15 (A), STH 16 (B), STH 17 (C)

On the first day of re-watering, both genotypes that headed 37-39 BBCH (e.g. DANKO 2 - Fig. 4A) and those that did not go to this stage 23-29 BBCH (e.g. POB11) were observed - Fig. 4B).



Fig. 4 Developmental stage of plants after the end of drought stress; (A) - DANKO 2 - example of the heading genotype (39 BBCH), (B) - POB11, example of the tillering genotype (29 BBCH)

## Conclusions

Dynamic assessment of plant traits during growth is important for understanding plant adaptation and response to environmental factors such as drought. The dynamic features analysed using a modern platform, allowed the observation of the growth dynamics of the genotypes of spring barley, especially under stress conditions, during the entire growing season, instead of only in a single moment, as it is in conventional phenotyping. The correlation of the yield forming traits under drought with the dynamic features from the platform provides information on the behaviour of barley in various environmental conditions. Integration of the results from the experiment conducted in water shortage conditions from the platform for high-throughput plant phenotyping and data obtained from plant phenotyping in natural conditions will allow for a deeper understanding of the response of barley plants to abiotic stress.