

# 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 Ogrodowicz

mgr Michał Kempa

mgr Renata Trzeciak

Alina Anioła

Renata Holewińska

### *Zakład Biometrii i Bioinformatyki:*

prof. dr hab. Paweł Krajewski

dr 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



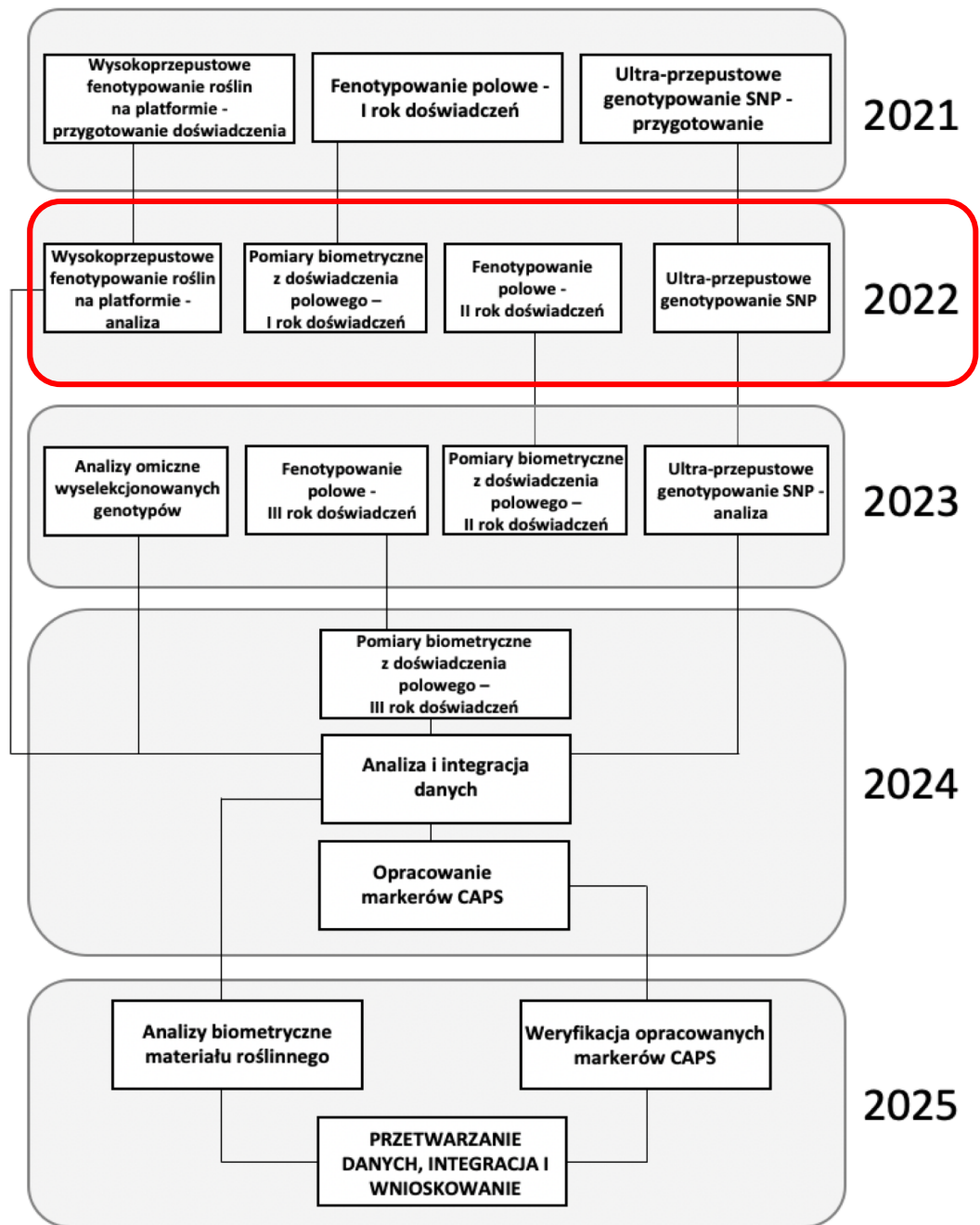


Figura 1. Schemat projektu

## Cele projektu w 2022 roku:

1. Analizy biometryczne materiału roślinnego z doświadczenia polowego – I rok doświadczeń.
2. Wysokoprzepustowe fenotypowanie automatyczne.
3. Ultraprzepustowe genotypowanie SNP.
4. Fenotypowanie badanych form w doświadczeniach polowych – II rok doświadczeń.

Wszystkie cele projektu w 2022 roku zostały w pełni osiągnięte.

# 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.

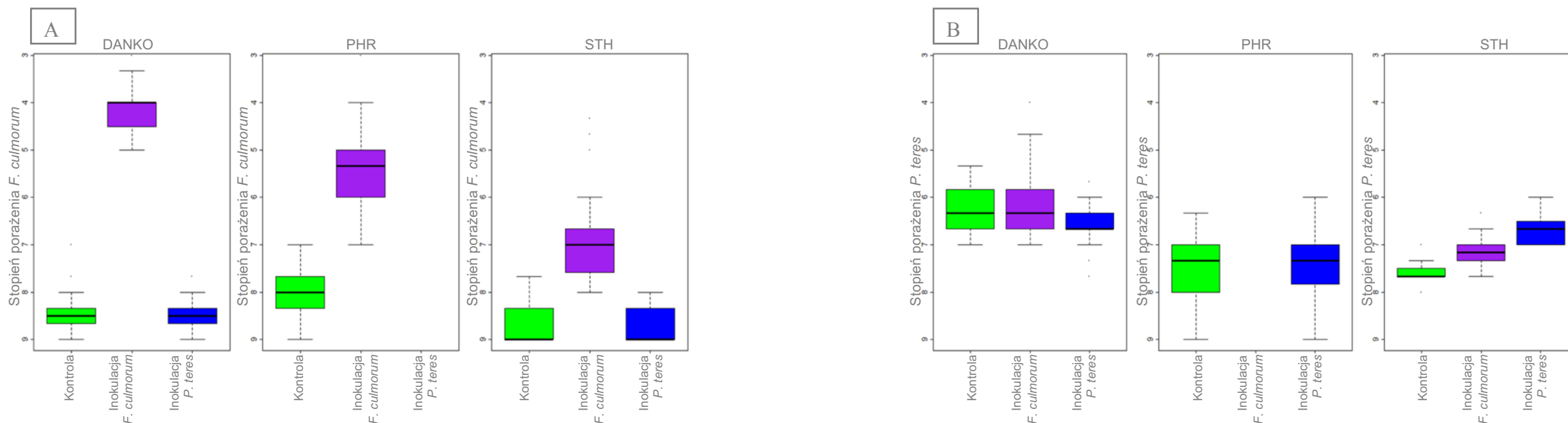
# Metody

- 1. Analizy biometryczne materiału roślinnego z doświadczenia polowego (I 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. Wysokoprzepustowe fenotypowanie automatyczne** – ciągłe i nieinwazyjne obrazowanie pełnej puli 120 genotypów jęczmienia jarego w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem platformy do automatycznego fenotypowania roślin (LemnaTec Scanalyzer3D, ALSIA-Metapontum Agrobios Research Center, Metaponto (MT) Włochy).
- 3. Ultra-przepustowe genotypowanie SNP** – analizy bioinformatyczne 60 genotypów jęczmienia jarego na podstawie wyników z najnowszej macierzy do genotypowania 50K Illumina Infinium iSelect SNP.
- 4. Fenotypowanie badanych form w doświadczeniach polowych (II 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 2023 i zostaną przedstawione w sprawozdaniu w przyszłym roku.

# Wyniki i wnioski

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

Efekty inokulacji obserwowano zarówno w przypadku roślin traktowanych opryskiem z zawartością *F. culmorum* jak i *P. teres*. Objawy porażenia *Fusarium* odnotowano we wszystkich badanych lokalizacjach, choć w większym stopniu w Firmach Hodowli Roślin zlokalizowanych na terenie Wielkopolski (Danko i PHR). Dodatkowo we wszystkich lokalizacjach w warunkach kontrolnych zaobserwowano tzw. naturalne porażenie przez *Fusarium*. Z kolei w traktowaniach, w których zastosowano inokulację *P. teres* w Danko i PHR obserwowano podobny stopień nasilenia infekcji jak w warunkach kontrolnych. W stacji doświadczalnej STH odnotowano ogólnie niższy stopień nasilenia objawów chorobowych.

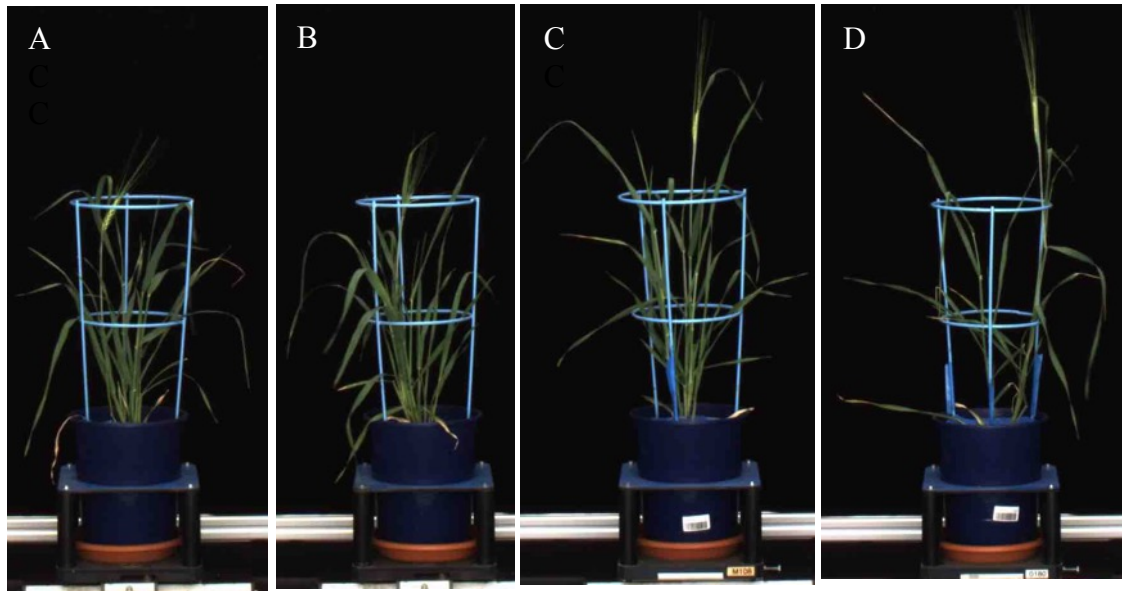


Wykres 1. Wpływ inokulacji *F. culmorum* (A) oraz *P. teres* (B) w trzech lokalizacjach: Danko, PHR oraz STH

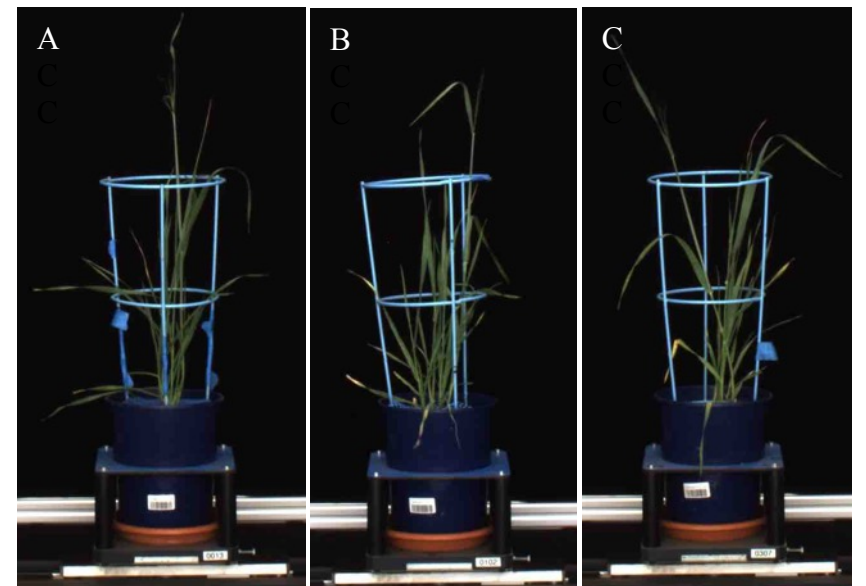
# Wyniki i wnioski

## 2. Wysokoprzepustowe fenotypowanie automatyczne

W trakcie obrazowania na platformie podczas prowadzenia warunków niedoboru wody (wilgotność 20% pojemności polowej FC) obserwowano różne tempo osiągnięcia poszczególnych stadiów rozwojowych przez badane genotypy. Stadium kłoszenia najszybciej osiągnęły genotypy DANKO 2, DANKO 11, DANKO 17, DANKO 18. W tym samym dniu obserwowano wierzchołki ości nad liściem flagowym w przypadku genotypów: STH 15, STH 16 oraz STH 17. Pozostałe analizowane genotypy na tym etapie obserwacji pozostawały w stadium krzewienia.



Zdjęcie 1. Obrazowanie w widmie światła widzialnego genotypów wchodzących najszybciej w stadium kłoszenia: DANKO 2 (A), DANKO 11 (B), DANKO 17 (C), DANKO 18 (D)



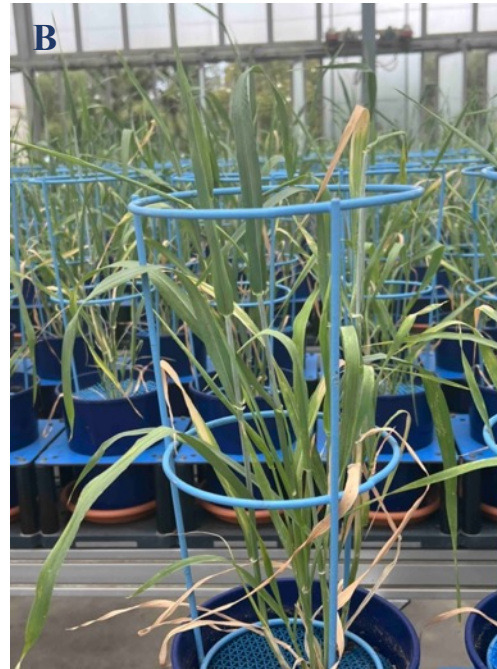
Zdjęcie 2. Obrazowanie w widmie światła widzialnego genotypów z wierzchołkami ości nad liściem flagowym: STH 15 (A), STH 16 (B), STH 17 (C)



# Wyniki i wnioski

## 2. Wysokoprzepustowe fenotypowanie automatyczne

W pierwszym dniu przywracania optymalnej wilgotności podłoża (powyżej 80% pojemności połowej FC) obserwowano zarówno genotypy, które się kłosiły (np. DANKO 2) jak i takie, które w czasie deficytu wody nie przeszły w to stadium rozwojowe (np. POB 11).



Zdjęcie 3. Obserwacje stadium rozwojowego roślin prowadzone po zakończeniu stresu suszy;  
(A) – DANKO 2, przykład genotypu kłoszącego się  
(B) – POB11, przykład genotypu będącego przed fazą kłoszenia

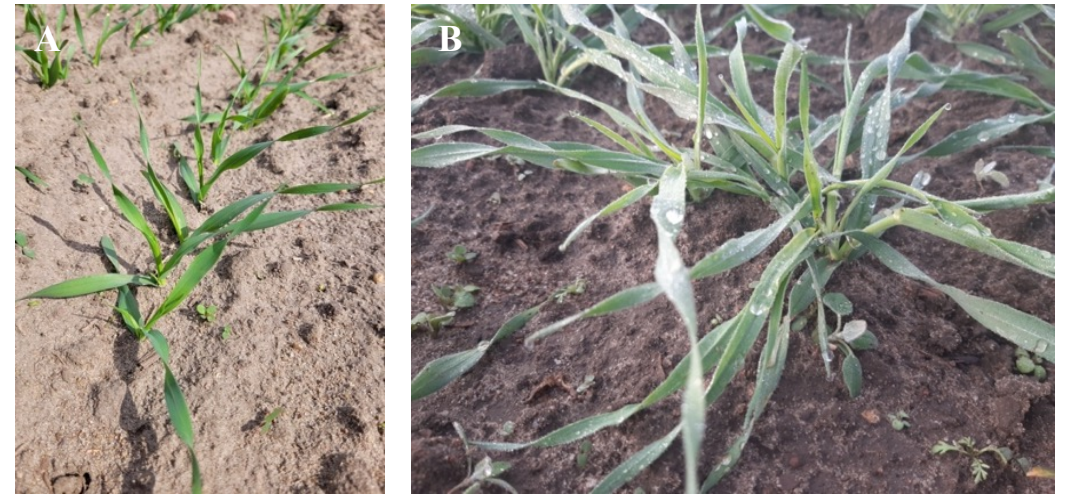
# Wyniki i wnioski

## 3. Ultra-przepustowe genotypowanie SNP

Dane uzyskane z ultra-przepustowego genotypowania SNP (ang. single nucleotide polymorphism) przy użyciu macierzy 50K SNP Illumina Infinium posłużą do zadań przewidzianych w projekcie, w tym umożliwią szczegółową analizę zróżnicowania genetycznego w obrębie wybranej puli form jęczmienia jarego.

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

Rośliny charakteryzowały się wyrównaniem pod względem wczesności w warunkach kontrolnych (kłoszenie 70-79 DAS, ang. days after sowing), natomiast opóźnienie w osiąganiu badanej fazy obserwowano w przypadku wprowadzenia warunków stresu biotycznego – inokulacja *P. teres* (kłoszenie 72-79 DAS). Różnice pomiędzy danymi genotypami były obserwowane również pod względem wysokości roślin (od 70 do 100 cm – warunki kontrolne). Obserwowano zróżnicowanie w stopniu nasilenia objawów chorobowych w obrębie badanych genotypów, przy czym stosunkowo silne nasilenie *P. teres* było obserwowane również w przypadku roślin rosnących w warunkach kontrolnych. Dla inokulacji *P. teres* obserwowano większe zróżnicowanie w nasileniu objawów (2-8) niż dla inokulacji *F. culmorum* (4-8).



Zdjęcie 4. Fazy rozwojowe: trzech liści – BBCH 13 (A) oraz 3-5 pędów bocznych – BBCH 24-25 (B) obserwowane w doświadczeniu Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. (fot. Dorota Jasińska)

# Wyniki i wnioski

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

W trakcie wykonywania oprysków kontrolowano jakość stosowanych roztworów infekcyjnych za pomocą mikroskopów biologicznych znajdujących się w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu.



Zdjęcie 5. Obraz przedstawiający konidia *F. culmorum* (barwione za pomocą błękitu laktofenolowego) wykonany za pomocą kamery Moticom mikroskopu biologicznego Motic BA410-E; powiększenie: 40 × (fot. Piotr Ogrodowicz)



# Wykaz publikacji wyników projektu w 2022 r.



## THE SPRING BARLEY SUSCEPTIBILITY ON FUNGAL INFECTIONS UNDER NATURAL ENVIRONMENTAL CONDITION

MICHAŁ KEMPA\*, KRZYSZTOF MIKOŁAJCZAK, PIOTR OGRODOWICZ, MARTYNA BODZAK, MONIKA MOKRZYCKA, ANETTA KUCZYŃSKA

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Polska  
\*e-mail: mkempa@igr.poznan.pl

### Introduction:

Crop plants, including barley, are exposed to many stress factors, biotic and abiotic, of which Fusarium Head Blight and barley net blotch are among the most harmful barley diseases. Harmful barley diseases as well as water scarcity is one of the major causes of reduced productivity (Anjum et al. 2011). Drought is an extreme phenomenon, but it is quite common in almost all continents. The major fungal diseases that reduce the quantity and quality of barley yields include net blotch (*Pyrenophora teres*) and spike fusariosis (*Fusarium* spp.), although net blotch is closely related to barley and does not occur in other cereals. For these reasons, the project will conduct research to determine the differences between the simultaneous and separate effects of drought and biotic stress on plants, especially since the effects of drought and barley diseases may be more damaging when they occur simultaneously than separately. The integrated research conducted under the project will provide new insights into the molecular adaptation of plants to stress conditions.

The aim of the study was the phenotypic evaluation of the set of barley genotypes in a field experiment with the use of fungal inoculation. Finally, in the project, phenotypic and genotypic data obtained using the latest methods of phenome and genome analysis will provide original data and will expand the knowledge about barley response to abiotic stress.

### Material and methods

The plant material consisted of 120 spring barley cultivars and lines/breeding lines of various origins. The experiments were carried out on the experimental fields of three Polish Breeding Companies - Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o. (abbrev. Danko), Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. (abbrev. PHR), and Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. IHAR group (abbrev. STH), under three conditions: natural (no inoculation), inoculation with *Fusarium culmorum* (abbrev. Fcl) and inoculation with *Pyrenophora teres* (abbrev. Ptl). Phenotypic observations were carried out in relation to the traits that determine the response of the studied genotypes to infection, as well as the main traits linked to yield structure (Table 1). Biometric measurements of yield traits will be repeated in two more years (giving together results from three years).

Table 1. Description of yield related-traits (and abbreviations) observed under field conditions

Trait (unit)	Trait description	Abbrev.
Length of spike (cm)	Length of spike from 10 randomly selected spikes in a plot (without awns)	LS
Number of grains per spike	Number of grains collected from 10 randomly selected spikes in a plot	NGS
Number of spikelets per spike	Number of spikelets observed on 10 randomly selected spikes in a plot	NSS
Grain weight per spike (g)	Average weight of grain per spike, calculated from 10 randomly selected spikes in a plot	GWS
F. culmorum inoculation	The degree of intensity of infestation of plants by <i>F. culmorum</i> . The total surface of all heads of a group of spikes was rated on a 9 <sup>o</sup> scale (9- no spikelet infected; 1- almost all of the spikelets destroyed)	Fcl
P. teres inoculation	The degree of intensity of infestation of plants by <i>P. teres</i> . The total surface of all heads of a group of spikes was rated on a 9 <sup>o</sup> scale (9- no spikelet infected; 1- almost all of the spikelets destroyed)	Ptl

### Inoculum preparations and applications:

**P. teres** - *P. teres* single-conidial isolate was obtained and tested separately (IPG PAS collection). Isolation of the fungus and propagation of the isolates were performed on Czapek's modified medium according to Benken et al. 1969 (with minor modifications). After 10 days at 20–22°C under constant illumination with a daylight lamp (3000 lx), the cultures were flooded with distilled water containing Tween 20 and the conidia were dislodged with a sterile spatula. The spore concentration of the suspension was adjusted to 5000 conidia/ml for inoculation. The inoculation was performed at the tillering stage (26-29 BBCH, about 4 weeks after sowing).

**F. culmorum** - *F. culmorum* isolates were incubated on wheat grain (50 g) in 300 ml Erlenmeyer glass flasks for five weeks. The colonies were covered with 15 ml of sterile distilled water. Inoculum was prepared just before the inoculations by liquid cultures of *Fusarium culmorum* (isolate KF846) and 0.0125% TWEEN (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Inoculum concentration was adjusted to 105 spore/ml. Mist irrigation to promote fungal infection was performed for three days in the field using a sprinkler system with DN881A-type sprinkler heads equipped with 1.50-mm-diameter nozzles (Sun Hope Inc., Meguro-ku). The inoculation was performed at the tillering stage (51-58 BBCH).

### Results and Discussion:

Significant effects of inoculation were observed in plants treated both with both with *F. culmorum* and *P. teres* (Figure 1). More effects of *Fusarium* infestation were observed in experimental stations in the Wielkopolska region (Danko and PHR). In addition, a so-called natural infection rate was observed in plants grown under control conditions in these fields. In the treatments where *Pteris* (Ptl) was inoculated at Danko and PHR stations, the severity of disease infection overlapped with that of natural infection observed under control conditions. A lower expression of disease symptoms was observed in the STH field station than in the Danko and PHR stations.

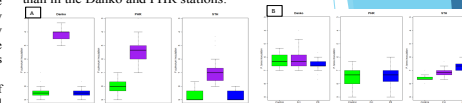


Figure 1. Effects of inoculation by *F. culmorum* (A) and *Pteris* (B) observed in Danko, PHR and STH experimental stations

In turn, Figure 2 shows the distributions of traits associated with yield grain among the three investigation sites (Figure 2). No differences were observed in NGS among treatments at the Danko station. Slightly lower NGS mean values were observed for Fcl treatment at the PHR station compared to the control condition. Larger NGS mean values were noted for all treatments at the STH station (the highest NGS mean values was noted for the Fcl treatment at this location). A rapid decrease in GWS under Fcl treatment was observed in Danko and PHR stations. Interestingly, this type of decrease in grain weight was not observed at the STH station.

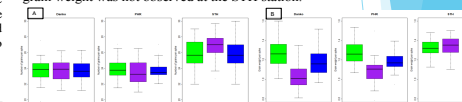


Figure 2. NGS (A) and GWS (B) traits observed under three different treatments in Danko, PHR and STH experimental stations

The evaluation of inoculation effects from Figure 1 were confirmed by PCoA analysis (Figure 3) - the studied genotypes cluster in relation to the type of applied fungal inoculation, but clear clustering is visible only for the experimental stations in the Wielkopolska region (Danko nad PHR). In addition, the biplots obtained for Danko and PHR are similar in the case of natural and inoculation Ptl conditions. The traits where vectors were longest and had the greatest influence on PC1 were traits associated with grain yield (NGS, NSS, GWS).

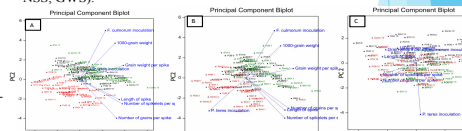


Figure 3. Biplots analysis for yield-related traits in three different environmental conditions - Danko (A), PHR (B) and STH (C)

The results of this study show the strong influence of soil quality and moisture conditions on the development of fungal diseases, since the experimental stations are located at different sites. These results are consistent with the conclusions of Doohan et al. (2003) and Hoheneder et al. (2022), which confirmed the significant influence of moisture conditions on the development of fungal symptoms. Interestingly, the mean values of grain number did not show any decrease in two out of three experimental stations (in fact, an increase in NGS was observed in the STH station). Interestingly, grain quality seems to be low, as grain yield mean values decreased rapidly in the treatments where fungus inoculation was performed. This phenomenon is consistent with the studies of Rózewicz et al. (2021), in which the authors indicated that fungal diseases in cereals limit plant growth and development and reduce grain yield and quality, which was also confirmed by the PCoA analysis in our study, where the importance of yield-related traits was emphasized.

### References:

Wang, S. A., Wang, L. C., Farnsworth, M., Hossain, M., Nair, L. R., and Zhai, C. M. (2011). Biostimulant application improves the drought tolerance in maize through modulation of stomatal conductance and leaf gas exchange. *J. Agron. Crop Sci.* 197, 177–182.

Doohan, A. A., M. V. Gaska, L. R. Harkness (1989) Net Blotch of Barley. Proc. 5. All-Union Conference on Plant Insectary 5, Kiev, 36-42.

Doohan M. J., Bennett, B. M. Cooke (2001) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenesis in cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 109–120.

Hoheneder, J., Rózewicz, J., Rózewicz, K., Pienkowiak, J., Góral, J., Hara, M., Białucha, M., Hübner, M., Hübner, R. (2022) Host Genotype and Weather Effects on Fourteen Head Blight Severity and Microbial Load in Spring Barley. *Toxins*, 14, 125.

Rózewicz, M., Wyrzykowska, M., Góral, J. (2021) The Most Important Fungal Diseases of Cereals - Problems and Possible Solutions. *Agronomy* 2021, 11, 714.