

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:

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

dr hab. inż. Krzysztof Mikołajczak

dr hab. Piotr Ogrodowicz

dr Michał Kempa

mgr Martyna Michałek

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



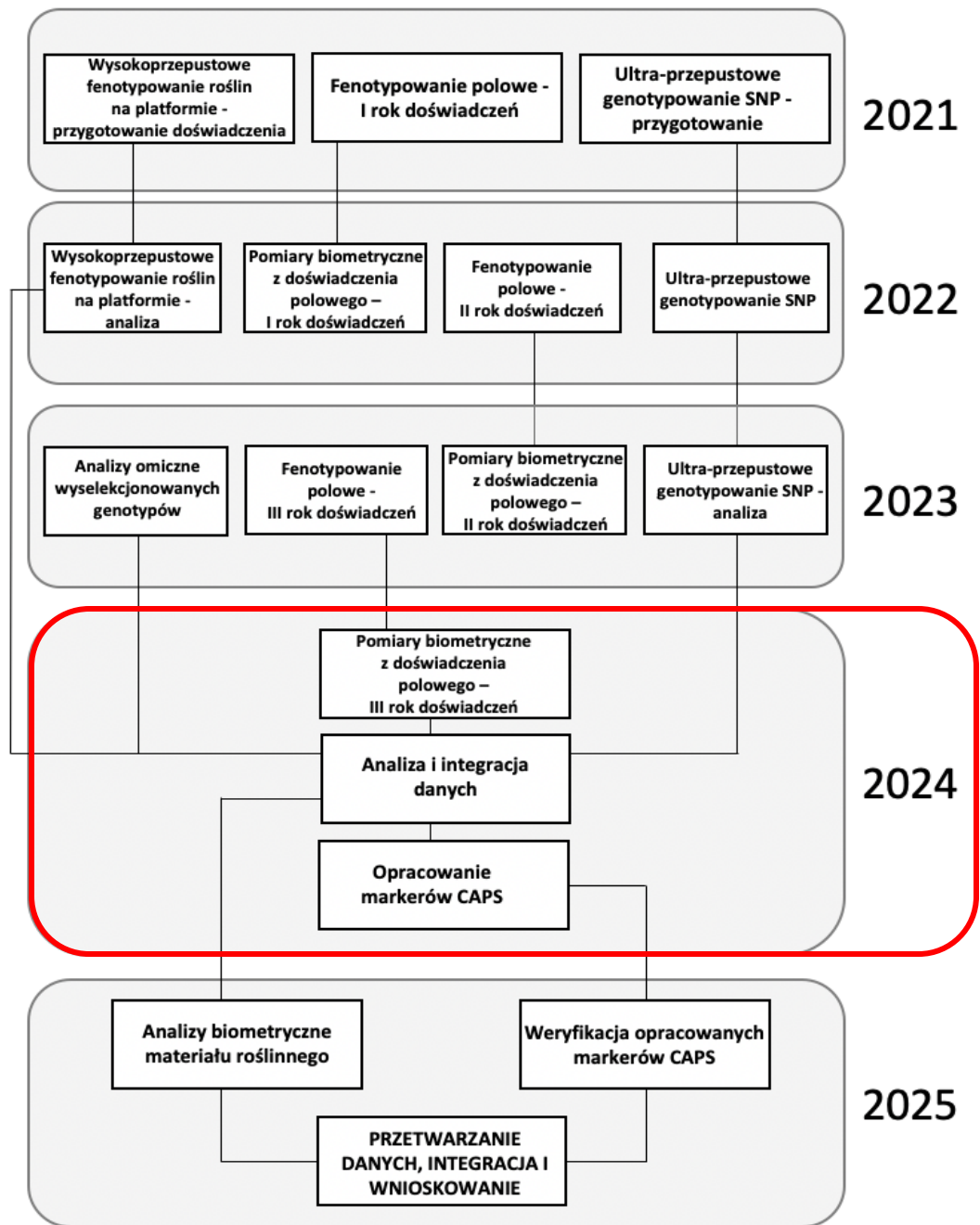


Figura 1. Schemat projektu

Cele projektu w 2024 roku:

1. Analizy biometryczne materiału roślinnego z doświadczenia polowego – III rok doświadczeń (w pełni wykonane).
2. Analiza mapowania asocjacyjnego (w pełni wykonana).
3. Opracowanie markerów CAPS (nie zostało w pełni wykonane, ponieważ przeprowadzone analizy doprowadziły do opracowania czterech nowych markerów funkcjonalnych typu CAPS, zamiast planowanych sześciu. Zastosowana metoda wysokoprzepustowego genotypowania SNP, umożliwiająca identyfikację markerów o polimorficznych allelach w obrębie całego genomu jęczmienia, pozwoliła na uzyskanie obszernego zbioru danych. Z jednej strony, zwiększyło to prawdopodobieństwo wykrycia istotnych sprzężeń marker-cecha, z drugiej jednak znacznie wydłużyło czas analiz bioinformatyczno-statystycznych. Do dnia opracowania raportu zaprojektowano cztery markery typu CAPS, a ich specyficzność została sprawdzona i potwierdzona poprzez sekwencjonowanie oraz cięcie produktów PCR odpowiednią endonukleazą. Aktualnie trwają dalsze analizy, mające na celu opracowanie kolejnych markerów CAPS).

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 (III rok)** – pomiary biometryczne cech plonotwórczych doświadczeń z 2023 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. Analiza mapowania asocjacyjnego** – wyniki genotypowania SNP (Illumina Infinium iSelect SNP 50k), umożliwiające precyzyjne wykrycie polimorfizmów w analizowanych genotypach, wraz z analizą cech fenotypowych roślin w różnych lokalizacjach i w trzech warunkach, posłużyły do przeprowadzenia mapowania asocjacyjnego w odniesieniu do ośmiu cech (wysokość rośliny, długość kłosa, liczba ziaren w kłosie, liczba kłosek w kłosie, masa ziarna z kłosa, masa tysiąca ziaren, stopień porażenia roślin przez *F. culmorum* i termin kłoszenia). Ze względu na niekompletne dane fenotypowe dotyczące stopnia porażenia roślin przez *P. teres* w wszystkich trzech badanych lokalizacjach, ta cecha została wykluczona z analizy. Markery genetyczne o wysokim stopniu sprzężenia ($q\text{-value} < 0,005$) z daną cechą oraz parametrem MAF (ang. minor allele frequency) powyżej 10% zostały zachowane do dalszej analizy.
- 3. Opracowanie markerów CAPS** – dla markerów SNP, które wykazywały największe powiązanie między wersją alleliczną a określoną cechą fenotypową przygotowano markery oparte na technice CAPS.

Wyniki i wnioski

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

Przeprowadzone badania wykazały istotne różnice zależne od lokalizacji w reakcji badanych genotypów jęczmienia wywołanej inokulacją zarodnikami *F. culmorum* oraz w warunkach naturalnego porażenia. Kluczowym czynnikiem było zróżnicowanie puli genotypów wybranych do badań, co wpływało na podatność roślin na porażenie oraz ich potencjał plonowania. Najsilniejszy efekt inokulacji *F. culmorum* odnotowano w Danko i PHR. Uzyskane dane meteorologiczne z firm hodowlanych wskazują, że w tych lokalizacjach lokalne warunki pogodowe w 2023 roku sprzyjały rozwojowi choroby.

Najwyższą masę tysiąca ziaren w warunkach kontrolnych odnotowano w PHR, gdzie jednocześnie zanotowano największą redukcję tej cechy wskutek porażenia. Wyniki sugerują, że w tej lokalizacji fuzarioza kłosów miała najsilniejszy wpływ na wydajność upraw. Z kolei w Danko obserwowano najniższe wartości cech plonotwórczych, takich jak liczba ziaren w kłosie czy liczba kłosków w kłosie, mimo stosunkowo niskiego stopnia porażenia. Warto również zauważyć, że rośliny z tej lokalizacji miały krótsze kłosa oraz niższą masę ziarna w porównaniu do pozostałych lokalizacji. Prawdopodobnie to uwarunkowanie, czyli krótszy kłos, przyczyniło się do niewielkiego negatywnego wpływu porażania na plon, gdyż istnieje pozytywna korelacja między długością kłosa a stopniem dewastacji spowodowanej przez *Fusarium*. W kontekście badań nad plonami roślin, zrozumienie pozytywnych korelacji jest istotne, ponieważ może dostarczać informacji o tym, jak różne czynniki, takie jak struktura kłosa, wpływają na podatność roślin na infekcje i, w konsekwencji, na wydajność plonów.

Przeprowadzone badania udowadniają, że odporność roślin na choroby grzybowe oraz wielkość plonu zależą od złożonych interakcji pomiędzy genotypem a warunkami środowiskowymi, co podkreśla znaczenie precyzyjnego doboru genotypów w hodowli jęczmienia.

Wyniki i wnioski

2. Analiza mapowania asocjacyjnego

Do mapowania asocjacyjnego podzielono badaną pulę genotypów na trzy grupy:

I: BKH1-7, DANKO1-7, PHR2-7, POB2-7, RAH2-7, STH 2-7

II: BKH8-13, DANKO8-13, PHR8-14, POB8-14, RAH8-13, STH8-13

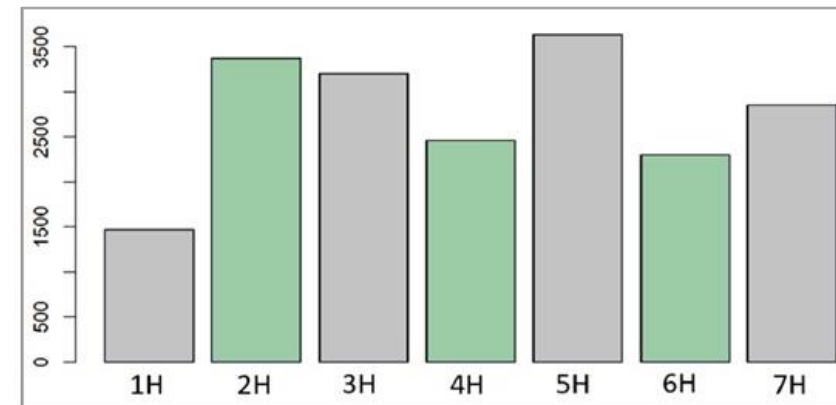
III: BKH14-19, DANKO14-19, PHR15-20, POB15-20, RAH14-20, STH 14-20

Łącznie zidentyfikowano 19 394 markery SNP dla badanej puli genotypów jęczmienia.

W grupie I analizowanych genotypów jęczmienia znaleziono 18 markerów dla wysokości roślin, zlokalizowanych w chromosomach 3H i 7H. Natomiast dla liczba ziaren w kłosie wybrano 55 markerów znajdujących się w chromosomach 2H, 3H i 4H. Nie wykryto wspólnych markerów istotnych dla tych cech.

W grupie II wyselekcjonowano 85 markerów dla wysokości roślin, zlokalizowanych w chromosomach 1H, 2H, 4H, 6H i 7H; 80 markerów dla długości kłosa, zlokalizowanych we wszystkich chromosomach; 28 markerów dla masy ziarna z kłosa w chromosomach 4H i 6H; oraz 363 markery dla masa tysiąca ziaren w chromosomach 1H, 3H, 4H, 5H i 7H. Dodatkowo, zidentyfikowano 434 markery wspólne dla tych cech fenotypowych.

W grupie III dla długości kłosa znaleziono 9 markerów, które zlokalizowano blisko siebie wyłącznie w chromosomie 7H. Ponadto, wybrano 30 markerów dla masy tysiąca ziaren w chromosomach 2H, 3H, 4H i 5H, oraz zidentyfikowano 86 wspólnych markerów dla analizowanych cech.



Wykres 1. Liczba zidentyfikowanych markerów SNP w poszczególnych chromosomach dla analizowanych cech fenotypowych

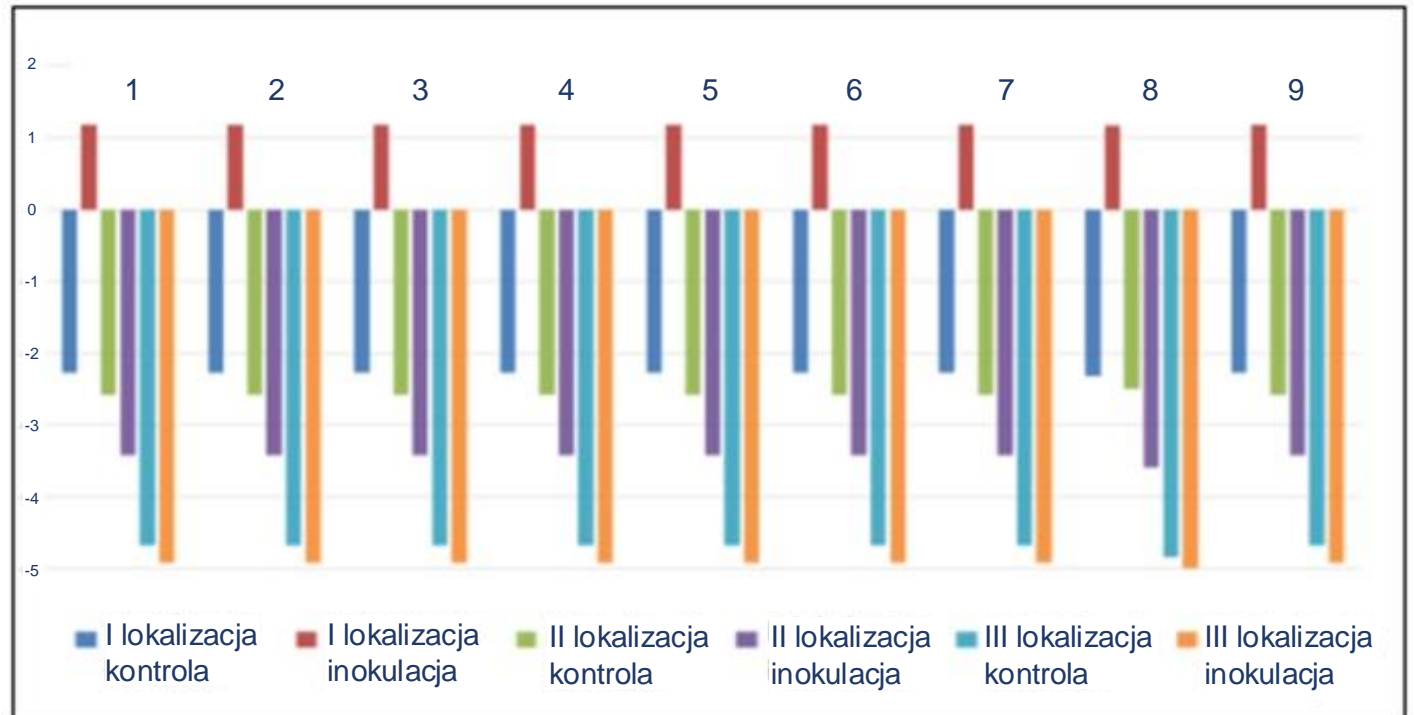
Tabela 1. Markery zidentyfikowane dla długości kłosa w grupie III badanych genotypów jęczmienia

Lp.	Nazwa markera	Pozycja (chromosom 7H)
1	JHI-Hv50k-2016-511529	640831294
2	JHI-Hv50k-2016-511548	640834565
3	JHI-Hv50k-2016-511549	640834665
4	JHI-Hv50k-2016-511554	640835392
5	JHI-Hv50k-2016-511555	640835395
6	JHI-Hv50k-2016-511583	640842768
7	JHI-Hv50k-2016-511585	640843045
8	JHI-Hv50k-2016-511586	640843212
9	JHI-Hv50k-2016-511589	640843442

Wyniki i wnioski

2. Analiza mapowania asocjacyjnego

W kontekście badanych cech obserwowano pozytywny efekt markerów (w której obecność danego markera jest związana z korzystnymi cechami fenotypowymi, takimi jak wyższa odporność na choroby czy lepsza wydajność plonów) oraz negatywny efekt markerów (w której obecność markera jest związana z niekorzystnymi cechami fenotypowymi, takimi jak podatność na choroby, niższa wydajność plonów czy cechy, które mogą ograniczać wzrost roślin). W lokalizacji I efekt markerów był odwrotny w warunkach naturalnych w porównaniu do warunków po inokulacji *F. culmorum*, co wskazuje na istnienie interakcji genotypowo-środowiskowej w odniesieniu do długości kłosa. Jest to szczególnie istotne z perspektywy hodowli odmian o podwyższonej tolerancji na czynniki stresowe, ponieważ takie mechanizmy mogą umożliwić dostosowanie się roślin do zmiennych warunków środowiska.



Wykres 2. Efekty markerów (1 – 9) zidentyfikowanych dla długości kłosa w trzech lokalizacjach w warunkach kontrolnych oraz po inokulacji *F. culmorum*

Wyniki i wnioski

3. Opracowanie markerów CAPS

Sekwencje wybranych markerów posłużyły do identyfikacji dokładnej pozycji każdej zmiany sekwencji typu SNP w sekwencji markera oraz w sekwencji docelowej wiążącej marker.

Tabela 2. Wybrane markery SNP

Cecha	Marker	Chromosom	SNP	Gen
Wysokość roślin	JHI-Hv50k-2016-464760	7H	T/C	HORVU.MOREX.r3.7HG0658720
	SCRI_RS_235084	3H	G/A	HORVU.MOREX.r3.3HG0234470
Liczba ziaren w kłosie	SCRI_RS_168541	3H	G/C	HORVU.MOREX.r3.3HG0234500
	BOPA1_3933-1077	3H	G/A	HORVU.MOREX.r3.3HG0234660

Poznanie sekwencji genomowej otaczającej nukleotyd stanowiący konkretny SNP (~2 kpz) umożliwiło wyszukiwanie odpowiednich sekwencji do przygotowania specyficznych starterów.

Tabela 3. Sekwencje starterowe wykorzystywane w reakcji PCR oraz wybrane endonukleazy

Marker	Starter F	Starter R	Endonukleaza
JHI-Hv50k-2016-464760	GGCAGAACTCTTTCCGGAGC	TGGGATGGACTTGTCAAGCG	DdeI
SCRI_RS_235084	AGATTACTCTTTAGCACTGC	TCTCAGATACTTGCTCAAGC	BsiHKAI
SCRI_RS_168541	CAACAGATTCACCAGTTTCG	ACACCGCTGGTTAAGAATCG	HaeIII
BOPA1_3933-1077	ACATCCAGCTCTCCCTTAGTG	GGATCCGAAGCTGAACATGC	AflIII

Wyniki i wnioski

3. Opracowanie markerów CAPS

Przeprowadzone analizy wykazały, że zmiana typu SNP (T/C) w genie HORVU.MOREX.r3.7HG0658720 ma istotny wpływ na zmniejszenie wysokości roślin. Niestety, pomimo potwierdzenia obecności transkryptu tego genu, białko powstające w wyniku jego translacji (UniProt ID: A0A8I6YJP3) nie zostało dotychczas opisane, co oznacza, że jego funkcja pozostaje nieznana. Hodowla zbóż o obniżonej wysokości roślin jest korzystna nie tylko ze względu na ograniczenie wylegania, ale również na zjawisko zacienienia powodowanej przez niżej osadzone liście, co ogranicza parowanie wody z gleby. Z tego względu wprowadzenie tego markera do hodowli mogłoby ułatwić selekcję genotypów jęczmienia o obniżonej wysokości. Jednakże z uwagi, że wysokość jest na ogół negatywnie skorelowana z indeksem fuzariozy kłosów, to selekcja powinna być prowadzona w kierunku odmian półkarłowych. Należy jednak pamiętać, że ta cecha jest kontrolowana przez więcej niż jeden gen.

Tabela 4. Zmiana SNP w genie HORVU.MOREX.r3.7HG0658720 dla sześciu analizowanych genotypów

Genotyp	Sekwencja w obrębie SNP (5' -> 3')
POB1	TCCAATGCAACTGCAACGGAGC T AAGGCACCAACGCCGTGAAGGCA
PHR1	TCCAATGCAACTGCAACGGAGC C AAGGCACGAACGCCGTGAAGGCA
STH1	TCCAATGCAACTGCAACGGAGC T AAGGCACCAACGCCGTGAAGGCA
RAH1	TCCAATGCAACTGCAACGGAGC T AAGGCACCAACGCCGTGAAGGCA
BKH20	TCCAATGCAACTGCAACGGAGC T AAGGCACCAACGCCGTGAAGGCA
Danko20	TCCAATGCAACTGCAACGGAGC C AAGGCACCAACGCCGTGAAGGCA

Wyniki i wnioski

3. Opracowanie markerów CAPS

Wykazano, że zmiany typu SNP w trzech genach istotnie korelują z liczbą ziaren w kłosie. Przeprowadzona analiza wykazała, że gen 1 koduje białko (UniProt: M0ZDF8) wiążące aktywę; gen 2 koduje białko (UniProt: A0A8I6WZ47) wykazujące aktywność białkowej kinazy wiążącej ATP, klasyfikowane jako transbłonowa, bogata w cysteinę białkowa kinaza 2. Zarówno kinazy białkowe, jak i białka wiążące aktywę pełnią kluczowe role w regulacji cyklu komórkowego oraz w procesie wydłużania komórek.

Z kolei białko (UniProt: A0A8I6WPI4) kodowane przez gen 3 jest białkiem błonowym działającym jako transporter ufosforylowanych cukrowców. Ostatnio coraz więcej badań wskazuje na wpływ sygnalizacji za pośrednictwem cukrowców na funkcjonowanie wysoce konserwatywnej kinazy serynowo/treoninowej TOR (ang. Target of Rapamycin), która odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów rozwojowych w komórkach eukariotycznych.

Tabela 5. Zmienność sekwencji w loci SNP sześciu analizowanych genotypów

1.	2.	3.	Locus	Genotyp	Sekwencja w obrębie SNP (5' -> 3')
1.	HORVU.MOREX.r3.3 HG0234470		POB1		GAGTTATTGAGCTGGAAGATG G CTCAAGGAAGCAATGGAGAACT
			PHR1		GAGTTATTGAGCTGGAAGATG G CTCAAGGAAGCAATGGAGAACT
			STH1		GAGTTATTGAGCTGGAAGATG G CTCAAGGAAGCAATGGAGAACT
			RAH1		GAGTTATTGAGCTGGAAGATG A CTCAAGGAAGCAATGGAGAACT
			BKH20		GAGTTATTGAGCTGGAAGATG A CTCAAGGAAGCAATGGAGAACT
			Danko20		GAGTTATTGAGCTGGAAGATG G CTCAAGGAAGCAATGGAGAACT
2.	HORVU.MOREX.r3.3 HG0234500		POB1		TTGCTTGGCTGCAGCGTGAATG G CCCAGAGAGCTTGCTTGTTTATGA
			PHR1		TTGCTTGGCTGCAGCGTGAATG G CCCAGAGAGCTTGCTTGTTTATGA
			STH1		TTGCTTGGCTGCAGCGTGAATG G CCCAGAGAGCTTGCTTGTTTATGA
			RAH1		TTGCTTGGCTGCAGCGTGAATG C CCCAGAGAGCTTGCTTGTTTATGA
			BKH20		TTGCTTGGCTGCAGCGTGAATG C CCCAGAGAGCTTGCTTGTTTATGA
			Danko20		TTGCTTGGCTGCAGCGTGAATG G CCCAGAGAGCTTGCTTGTTTATGA
3.	HORVU.MOREX.r3.3 HG0234660		POB1		CATAGCCGAAGGCAAGAACCA A GATGTCTTTAGATGGCCAAGGAC
			PHR1		CATAGCCGAAGGCAAGAACCA A GATGTCTTTAGATGGCCAAGGAC
			STH1		CATAGCCGAAGGCAAGAACCA A GATGTCTTTAGATGGCCAAGGAC
			RAH1		CATAGCCGAAGGCAAGAACCA A ATGTCTTTAGATGGCCAAGGAC
			BKH20		CATAGCCGAAGGCAAGAACCA A ATGTCTTTAGATGGCCAAGGAC
			Danko20		CATAGCCGAAGGCAAGAACCA A GATGTCTTTAGATGGCCAAGGAC

P6.27 GENETIC DETERMINANTS SHAPING IMPORTANT AGRONOMIC TRAITS OF SPRING BARLEY UNDER BIOTIC STRESSES

Martyna Bódzak, Michał Kempa, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Monika Mokrzycka, Paweł Krajewski, Anetta Kuczyńska
Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland, e-mail: mbod@igr.poznan.pl



Introduction

The selection of breeding material characterized by high resistance or tolerance to fungal diseases is crucial, as pathogenic fungi are among the major biotic factors that limit the productivity of cereal crops worldwide. Infection by *Pyrenophora teres* causes the formation of dark brown lesions on the leaves (Fig. 1A), and leads to a significant reduction in grain size and density, potentially causing yield losses in barley of up to 40%. In extreme cases, complete crop loss can occur if susceptible varieties are exposed to stressful conditions. Similarly, *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* not only reduces the number of viable grains (Fig. 1B) and yield quality but also contaminates the grain with mycotoxins, posing serious health risks to humans and animals.

The objective of this study was to characterize spring barley genotypes after inoculation with spores of *F. culmorum* and *P. teres*, and to identify genomic regions associated with important agronomic traits and resistance to tested fungal species.

Plant material and methods

The plant material consisted of spring barley varieties and breeding lines from various origins (a total of 120 forms). The experiment was conducted at three separate breeding stations in Poland under three conditions: 1) inoculation with spores of *F. culmorum*, 2) *P. teres*, and 3) natural conditions (without artificial inoculation). Phenotypic observations were made for traits defining the response of the tested genotypes to infection by pathogenic fungi, as well as for main yield structure traits and phenological phases (Tab. 1). Secondly, association mapping was performed using ultra-throughput genotyping (50k Illumina Infinium iSelect SNP), which enabled the identification of SNP markers in the barley genome with a high degree of linkage (q-value < 0.005) to important agronomic traits. Genetic markers with minor allele frequency below 10% were rejected.

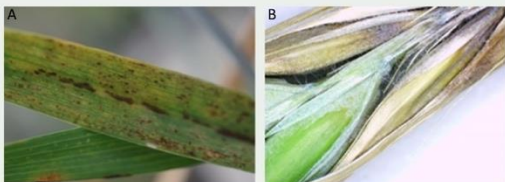


Fig. 1. Symptoms of barley plant infection by pathogenic fungi (A) *Pyrenophora teres* and (B) *Fusarium culmorum*

Tab. 1. Phenotypic traits of plants subject to biometric analysis

No.	Trait	Description
1	Plant height (cm)	Plant height measured from the base of the plant including the spike with awns
2	Spike length (cm)	Spike length measured from the base to the top of the spike, without awns; average of 10 spikes
3	Number of grains per spike	Number of grains per spike; average of 10 spikes
4	Number of spikelets per spike	Average number of spikelets; average of 10 spikes
5	Grain mass per spike (g)	Grain mass per spike; average of 10 spikes
6	Grain mass per plant (g)	Weight of grains collected from a single plant; average of 10 plants
7	Thousand grain weight (g)	Average weight of 1000 grains
8	Yield (g)	Weight of grains collected from all plants
9	Third leaf stage	Number of days from sowing to the appearance of the third leaf observed in more than 50% of plants
10	Tillering stage	Number of days from sowing to tillering observed in more than 50% of plants
11	Flag leaf stage	Number of days from sowing to the appearance of the flag leaf observed in more than 50% of plants
12	Heading	Number of days from sowing to heading observed in more than 50% of plants
13	Severity of plant infection by <i>Fusarium culmorum</i>	Observations at the onset of disease symptoms after inoculation; 9° scale (1-9, where 9 = no infection; 1 = very severe infection)
14	Severity of plant infection by <i>Pyrenophora teres</i>	Observations at the onset of disease symptoms after inoculation; 9° scale (1-9, where 9 = no infection; 1 = very severe infection)

Results

In all investigated locations, no significant impact of inoculation with *P. teres* spores on the degree of plant infection compared to control conditions was observed. A different reaction was noted under *F. culmorum* plant inoculation conditions, where the effect of the treatment was demonstrated in all locations. Furthermore, naturally occurring barley plant infections caused by both *F. culmorum* and *P. teres* were observed in all locations. The conducted field experiment confirms that the physical and chemical properties of the soil and different moisture conditions in different locations have a strong influence on the development of fungal diseases. There was no decrease in the average number of grains per spike observed; however, it is worth noting that the grain mass was low. This is due to the fact that grain from infected spikes is distorted and characterized by a reduced thousand grain weight, resulting in a significant decrease in yield.

A total of 19,394 SNP markers were identified for the studied agronomic traits, and their localization across chromosomes is shown in Fig. 2. We selected markers associated with three agronomically important plant traits: for the trait 'Plant height' 18 markers were identified on chromosomes 3H and 7H, while for 'Number of grains per spike' 55 markers were found on chromosomes 1H, 2H, 3H, and 4H. Notably, for the trait 'Length of spike' 9 markers were found exclusively on chromosome 7H, located close to each other (Tab. 2).

An interesting situation was observed in the I location, where the effect of all markers on the trait was opposite between control and inoculated conditions, namely, negative and positive, respectively (Fig. 3). In other locations this effect was negative regardless of treatment, especially in the III location.

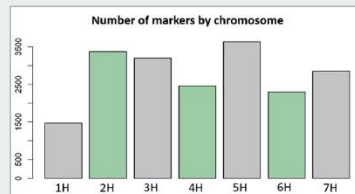


Fig. 2. Number of identified SNP markers for the analyzed phenotypic traits by chromosome

Tab. 2. Markers identified for the trait length of spike

No.	Marker	Chromosome	Positions
1	JHI-Hv50k-2016-511529	7H	640831294
2	JHI-Hv50k-2016-511548	7H	640834565
3	JHI-Hv50k-2016-511549	7H	640834665
4	JHI-Hv50k-2016-511554	7H	640835392
5	JHI-Hv50k-2016-511555	7H	640835395
6	JHI-Hv50k-2016-511583	7H	640842768
7	JHI-Hv50k-2016-511585	7H	640843045
8	JHI-Hv50k-2016-511586	7H	640843212
9	JHI-Hv50k-2016-511589	7H	640843442

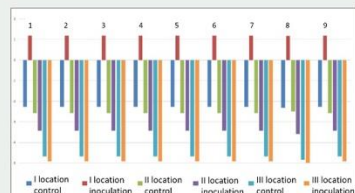


Fig. 3. Effects of markers identified for the trait length of spike in different location under control and inoculation conditions

Conclusions

Significant differences were observed among the studied barley varieties regarding the analyzed phenotypic features. Furthermore, barley varieties treated with *P. teres* and *F. culmorum* spores were selected based on their yield and resistance to fungal infections. The phenotypic data obtained within the project were integrated with the genotypic results, allowing us to identify many promising SNP markers associated with the yield-related barley traits. The proximity of markers associated with spike length on chromosome 7H indicates that this chromosomal region may participate in the regulation of the phenotypic trait. In the future, selected genetic markers with a high degree of linkage to other important phenotypic traits will enable the identification of genotypes that can serve as suitable starting material for developing varieties with more favorable phenotypic traits under biotic stress conditions.

Plakat prezentowany na SEB Conference Prague 2024, 02-05 lipca 2024 r., Praga, Czechy; zaprezentowano wyniki badań uzyskanych w ramach tematu badawczego 1 i 4 w 2023 roku.

Plakat prezentowany na Global Challenges for Crop Improvement, 18-23 sierpnia 2024 r., Lipsk, Niemcy; zaprezentowano wyniki badań uzyskanych w ramach tematu badawczego 3 w 2023 roku.

UNVEILING BARLEY GENETIC SEQUENCES THROUGH CAPS TECHNIQUE: IMPLICATIONS FOR BREEDING AND CULTIVATION



Kempa Michał, Kuczyńska Anetta, Mikołajczak Krzysztof, Ogrodowicz Piotr,

Michałek Martyna, Mokrzycka Monika

Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland; e-mail: mkem@igr.poznan.pl

1. OBJECTIVE

Barley (*Hordeum vulgare* L.) stands as a pivotal cereal crop, profoundly influencing global agricultural landscapes and economies. Advancements in genetic research have accelerated breeding programs, enhancing barley cultivars' resilience, yield, and quality. In this study, we employed the Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) technique to elucidate previously undisclosed genetic variations within barley germplasm, with the ultimate aim of enriching breeding strategies and optimizing cultivation practices.

2. PLANT MATERIAL AND METHODOLOGY

The research material comprised modern varieties of spring barley, as well as breeding lines with diverse origins, totaling 120 forms. The selection of plant material has been consulted with specialists from Polish breeding companies. This set of spring barley genotypes were phenotypically evaluated after inoculation with fungal spores:

- 1) *Fusarium culmorum*;
- 2) *Pyrenophora teres*;
- 3) control – natural conditions, without any artificial inoculation.

Field experiments were conducted in three distant breeding stations in Poland for three consecutive years (2021-2023), and, to assess traits determining response of barley plants to fungal infections. What is more, features of yield structure and phenological phases (plant height; length of the spike; number of spikelets and grains per spike; grain weight from spike and plant; thousand grain weight; grain yield; third leaf, tillering, flag leaf, and heading stages; *F. culmorum* and *P. teres* infection degree) were analyzed.

Association mapping using ultra-throughput genotyping (50k Illumina Infinium iSelect SNP) was performed, allowing to identify markers with polymorphic alleles within the barley genome. For the SNP markers with the strongest linkages identified in association mapping (Fig. 1), CAPS markers were developed using web-available programs.

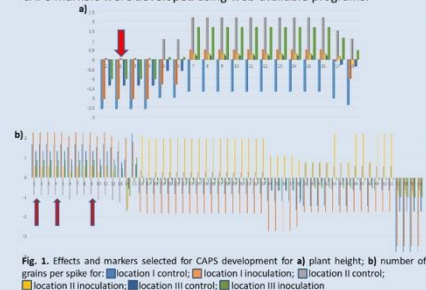


Fig. 1. Effects and markers selected for CAPS development for a) plant height; b) number of grains per spike for location I control; location I inoculation; location II control; location II inoculation; location III control; location III inoculation

After identification of appropriate markers (Tab. 1), their sequences were blasted in GrainGenes and EnsemblPlants databases to identify SNP carrying genes along with the position of each SNP, and to prepare gene specific PCR primers using Primer3 and Multiple Primer Analyzer (Thermo) software.

Tab. 1. Selected SNP marker characterization

trait	marker	chr.	allele I	allele II	gene
plant height	JHI-Hv50k-2016-464760	7H	T	C	HORVU.MOREX.r3.7HG0658720
number of grains per spike	SCRI_RS_235084	3H	G	A	HORVU.MOREX.r3.3HG0234470
	SCRI_RS_168541	3H	G	C	HORVU.MOREX.r3.3HG0234500
	BOPAL_3933-1077	3H	G	A	HORVU.MOREX.r3.3HG0234660

Mentioned genes were sequenced in six of analyzed barley genotypes using Sanger technique on both primers (F and R, Tab. 2). To select appropriate endonuclease capable of cutting only one allele of mentioned sequences, NEB Enzyme Finder as well as the NEBCutter software was used (Tab. 2). During the experiment, appropriate PCR conditions were established for each pair of primers and endonucleases. PCR reaction was performed using HF buffer and the Thermo Scientific Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase kit (#F-549L).

marker	Primer	Rprimer	endonuclease	allele I	allele II	cv
JHI-Hv50k-2016-464760	GGCAGAACTCTCCGGAGC	TGGGATGGACTTCGTGAGGC	DdeI	T*	C**	
SCRI_RS_235084	ACATCTACTCTTGGCAGTC	TCTCAGATCTGTCTCAGC	BspHI	G*	A**	
SCRI_RS_168541	CAACAGATCTCAATTTTTC	ACACCGCTGTAAACATCTC	HinfI	G*	C**	
BOPAL_3933-1077	ACATCAGCTCTCCCTAGTTC	GGATCGCAAGCTGAACATCTC	AflIII	G**	A*	

*digested **not digested

3. RESULTS AND DISCUSSION

Four promising sequences to use as a CAPS markers for plant height and the number of grains per spike in barley were found. Although these important agronomic traits are determined polygenically, the CAPS technique allows for a relatively simple assessment of alleles influencing them in different barley genotypes Fig. 2.

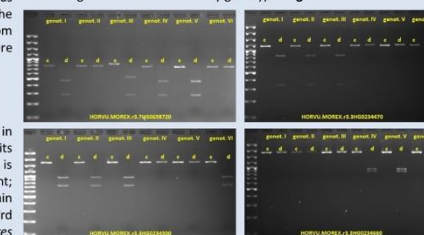


Fig. 2. Electrophoretic separation of endonuclease digested PCR products of four genes (HORVU.MOREX.r3.7HG0658720, HORVU.MOREX.r3.3HG0234470, HORVU.MOREX.r3.3HG0234500, HORVU.MOREX.r3.3HG0234660) obtained from six analyzed genotypes (genot. I - VI). C - control (not digested PCR product), d - digested PCR product, M - 100 bp Plus (Thermo, SM0323)

Based on our analysis, we discovered that genotype I, II, III and V are carrying allele I [T] and genotypes II and VI are carrying allele II [C] in the HORVU.MOREX.r3.7HG0658720 gene taking part in shaping plant height. Breeding of genotypes with reduced plant height is beneficial due to reduced possibility of lodging and greater degree of shading around the plant thanks to lower-set leaves, reducing water evaporation from the soil. The use of this marker in breeding could contribute to the selection of barley genotypes with reduced height. Unfortunately, mentioned gene is not annotated in the EnsemblPlants Database taking away the opportunity of a deeper analysis of the protein function encoded by it. We discovered that second trait – number of grains per spike is influenced by three genes: HORVU.MOREX.r3.3HG0234470 (G/A SNP, GO: actin binding); HORVU.MOREX.r3.3HG0234500 (G/C SNP, GO: protein phosphorylation); HORVU.MOREX.r3.3HG0234660 (G/A SNP, GO: membrane protein). Interestingly, the analysis revealed, that genotypes I, II, III and VI were characterized by presence of the same alleles in all of analyzed genes. According to Gene Ontology, proteins encoded by them participates in performing their functions due to the fact, that nonsynonymous SNPs change the amino acid sequence of encoded protein, which may translate into the manifestation of certain phenotypic features, such as the number of grains in the spike.

4. CONCLUSIONS

CAPS technique allows to identify polymorphic loci, enabling to detect functionally significant genetic variations in the barley genome. These polymorphisms encompass crucial genomic regions associated with agronomically relevant traits, including plant height, yield components, and grain quality thus becoming an important tool in marker-assisted selection. Moreover, learning about as many genes as possible whose products participate in shaping agronomic features and developing CAPS markers for them will enable prediction of the phenotype and yield of the plants even without sowing them (seed DNA extraction). Further validation of developed CAPS markers will allow the high-throughput genotyping, efficient screening and selection of superior barley accessions harbouring desirable alleles for targeted traits.