

Robuste og produktive afgrøder til bæredygtig intensivering af fremtidens planteavl (Robusta)

Statusrapport 2018



SEGES

Konkurrencedygtig Planteproduktion



AARHUS UNIVERSITET

Støttet af:

Promilleafgiftsfonden for landbrug

Forord

Nærværende rapport er resultatet af et samarbejde mellem Københavns og Aarhus Universiteter, samt SEGES. Arbejdet er udført af Universiteterne, mens SEGES er projektleder og bevillingsindehaver. Projektet er initieret af Udvalget for Konkurrencedygtig Planteproduktion, der har deltagelse af Bæredygtigt Landbrug, Landbrug og Fødevarer og de danske planteforædlingsfirmaer repræsenteret ved Crop Innovation Denmark. Projektet er støttet af Promilleafgiftsfonden for Landbrug, og arbejdet udføres i årene 2017, 2018 og 2019. I rapporten præsenteres status på projektet ved udgangen af 2018.

Projektets overordnede formål er at sikre danske landmænd adgang til sorter af korn, græs og kartofler, med en bedre udnyttelse af de for plantevæksten afgørende ressourcer kvælstof og vand. Københavns Universitet undersøger sorter og linjer af korn, græs og kartofler, for deres rodvækst og kvælstofoptag, mens Aarhus Universitet genotyper og undersøger den genetiske baggrund for egenskaberne. Projektet skal resultere i ny viden om effektiv udnyttelse af vand og kvælstof, der kan udnyttes af forædlerne i arbejdet med at forædle nye og bedre sorter, tilpasset et skiftende klima.

Der har løbende været afholdt møder, hvor resultaterne er præsenteret for de fire danske firmaer der forædler korn græs og kartofler, det er Nordic Seed, Sejet Planteforædling, DLF og Danespo.

Efter indledning og et kort sammendrag, følger rapportens struktur de enkelte arbejdsplaner og del-arbejdsplaner i projektansøgningen.

Indhold

Forord	2
Introduktion	5
Sammendrag af de enkelte arbejdsplaner	7
Arbejdsplan 1. Fænotypning for rodvækst og rodfunktion	7
Arbejdsplan 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale	8
2.1. Udvikling af analyseprocedurer til selektion for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet	8
Arbejdsplan 2.2. Prædiktion og selektion for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet i græsser, cerealier og kartofler	9
Arbejdsplan 1. Fænotypning for rodvækst og rodfunktion	10
1.1. Vand og kvælstofeffektivitet	10
1.1.3. ¹⁵ N mærkning, kvælstofeffektivitet og dokumentation af RadiMax anlægget i 2017	11
1.1.4. Mærkning af vand med ² H ₂ O, måling af vandeffektivitet og dokumentation af RadiMax anlægget	11
1.1.5. d ¹³ C analyser og vandeffektivitet i RadiMax og i markforsøgene	11
1.3. Markforsøg med sorter og N udnyttelse	12
1.3.1. Markforsøg med sorter og N udnyttelse, - aktiviteter 2018	12
1.3.2. Fysiologisk fænotypning via enzymaktivitet, vårbyg 2017	13
1.4. Fænotypning i RadiMax	16
1.4.1. Rodfænotypning fra RadiMax rodbilleder	16
1.4.2. Automatisk storskala kvantificering af levende rod-strukturer på multispektrale billeder	17
1.4.3. Mulige forbedringer ved brug af kunstig intelligens	20
1.4.4. Fænotypning af overjordiske plantedele i RadiMax	22
Arbejdsplan 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale	30
Plantemateriale	30
Vårbyg	30
Transkriptomanalyse	30
SNP identifikation	30
Differential genekspressionsanalyse	31
Epigenetik	31
Fremstilling af epiGBS biblioteker og dataanalyse	31
DNA-metylering ved cytosin residues	32
Multi-OMICS prædiktionsmodeller	33
Almindelig rajgræs	33
Transkriptomanalyse	33

Differentiel genekspressionsanalyse	34
DNA-metylation ved cytosin residues	34
Co-ekspression og gen-coekspressions netværksanalyse	36
Prædiktionsmodeller	36
Kartoffel	37
DNA-metylation ved cytosin residues	37

Introduktion

Der er et forstærket politisk fokus i retning af et biobaseret samfund, hvor planteproduktionen også skal erstatte fossile råstoffer samtidig med, at der er lagt op til en mere bæredygtig produktion. Planteproduktionen er derudover konstant udfordret af strenge krav til hvor meget miljøet må belastes. Samtidig stiger verdens befolkning, uden at det globale landbrugsareal kan udvides.

Danmark får i fremtiden et varmere og vådere vejr med flere ekstremer. Temperaturen i Danmark er steget med 1,5 grader siden 1873. I samme periode er nedbøren steget med 15 %, og vindforhold og vandstande har også ændret sig. Den globale gennemsnitstemperatur er siden 1880 steget med ca. 0,85° celsius (<https://www.klimatilpasning.dk>).

Baseret på viden fra The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) er de vigtigste forventede ændringer:

- **Mere regn.** Vi får mere regn om vinteren og mindre om sommeren. Om sommeren får vi både flere tørkeperioder og kraftigere regnskyl.
- **Mildere vintre.** Vintrene vil blive mildere og fugtigere. Det betyder, at planternes vækstsæson kan blive forlænget.
- **Varmere somre.** Somrene bliver varmere, og der kan komme flere og længere hedebølger.
- **Højere vandstand.** Der forventes en generel vandstandsstigning i havene omkring Danmark.
- **Mere vind.** Vi kan forvente flere kraftige storme.
- **Større skydække.** Vi får generelt et svagt stigende skydække og stigningen vil være størst om vinteren.

Således bliver fremtidens klima i Danmark varmere og mere ekstremt, og landbrugsafgrøderne vil blive udsat for flere hårde tørkeperioder i løbet af vækstsæsonen.

Klimaændringer, kombineret med miljøkrav betyder, at hvis fødevareproduktionen fortsat skal holde trit med behovet kræver det store investeringer i forædlingen af en række landbrugsafgrøder. Der er behov for at udvikle sorter der er mere ressource effektive og hårdføre, og har en større stresstolerance. Udvikling af sorter med bedre rodvækst vil være et vigtigt bidrag til at opnå afgrøder med større stresstolerance, især dybere rodvækst vil være vigtig for bedre vandudnyttelse i tørre perioder, og også for optagelse af dybtliggende N, som ellers er under høj risiko for at tabes ved udvaskning.

Forædling for bedre og dybere rodvækst hæmmes i høj grad af at studier af rodvækst er tids- og ressourcekrævende, der mangler metoder der gør det muligt at lave fænotyping af mange genotyper for god rodvækst og funktion. RadiMax rodanlægget på Københavns Universitet er bygget med netop det formål. En stor del af arbejdet i Robusta projektet handler om at udvikle og udnytte mulighederne i RadiMax anlægget. Så det bliver muligt at gennemføre omfattende målinger af høj kvalitet i RadiMax anlægget, og bruge resultaterne i den videre genetiske kortlægning og forædling for forbedrede rodsystemer.

Det overordnede formål med Robusta projektet er at sikre danske landmænd adgang til robuste sorter af korn, græs og kartofler, der er tilpasset fremtidens klima.

Referencer

IPCC. AR6 Synthesis Report: Climate Change 2022: <https://www.ipcc.ch/report/sixth-assessment-report-cycle/>

Sammendrag af de enkelte arbejdsplaner

Arbejdsplan 1. Fænotypning for rodvækst og rodfunktion

1.1. Vand og kvælstofeffektivitet

Der er igennem 2017 og 2018 gennemført en række forsøg med isotopmærkning og naturlig isotop berigelse, da disse metoder kan give direkte fænotypning for rodfunktion, der ligesom data fra dronebilleder kan udgøre et vigtigt supplement til data for rodvækst. Der er i 2018 gennemført et stort arbejde hvor vi måler sorternes optagelse af ^{15}N kvælstof fra stor dybde, og ved hjælp af naturlig berigelse med ^{13}C måler hvor tørkestressede de har været. De mange prøver er sendt til analyse, og vi afventer resultaterne i løbet af de første måneder af 2019. Vi har i løbet af 2018 fået resultater af de mindre omfattende isotopstudier der blev gennemført i 2017. Resultaterne har vist at isotopmetoderne er lovende, at vi kan arbejde med både ^{15}N , ^{13}C samt tungt vand $^2\text{H}_2\text{O}$ for direkte måling af dyb vandoptagelse. De opnåede data er også med godt resultat brugt som test af RadiMax anlæggets funktion.

1.2. Herbicidkasse

Det blev aftalt i styregruppen at nedprioritere arbejdet med videreudvikling af herbicidkasse metoden, fordi det var afgørende at sikre de nødvendige ressourcer til udviklingen af billedanalyse for rodvækst, og for at kunne fokusere også arbejdet med isotop-tracere til RadiMax anlægget og i mindre omfang markforsøgene.

1.3. Markforsøgene, måling af vækst og N effektivitet

Der er gennemført forsøg med hvedesorter i 2018 på 4 lokaliteter, sorter som også indgår i RadiMax studierne, sådan at vi kan sammenholde effekterne målt på de 4 lokaliteter med rodvækst målt i RadiMax. Der er anlagt nye vinterhvedeforsøg på 4 lokaliteter hvor der også er installeret minirhizotruer til måling af rodvækst i løbet af 2019. Sorterne er udvalgt på baggrund af roddata målt i RadiMax i 2018. Endelig er der gennemført "fysiologisk phenotyping" på materiale fra bygforsøg i 2017, fra de 4 lokaliteter i 2018 og fra dele af RadiMax forsøgene i 2019. Et vigtigt delresultat er at måling af bestemte enzymaktiviteter i fanebladene ved skridning giver en høj grad af forudsigelse af sorternes proteinindhold ved høst.

1.4. Fænotypning i RadiMax anlægget

1.4.1-3. Billedanalyse af rodvækst

Efter indsatsen i Robusta projektet i 2017 var vi i stand til at gennemføre de første billedanalyse-baserede rodopgørelser fra RadiMax. Arbejdet i 2018 har især været fokuseret på tre problemstillinger, 1) dels at forbedre kvaliteten af billedanalysen ud fra de første resultater med der blev opnået med billedanalysen, 2) at få udviklet og opskaleret systemet så de store mængder billeder kan analyseres inden for kort tid efter filmning i marken, og 3) at få analyseret rodbilleder fra 2018, og billeder fra 2017 forsøgene, som det ikke var muligt at få analyseret i 2017, eller som kun er analyseret med manuel opgørelse.

Sidst på året 2018 tog vi en ny metode til billedanalyse i brug, hvor vi ved hjælp af "kunstig intelligens" kan træne computere til at identificere rødder på billederne. Metoden gav meget hurtigt lovende resultater, med både høj kvalitet af billedanalysen og reduktion af arbejdstiden for at opnå gode data, og vi planlægger derfor

at arbejde videre med denne metode til at forbedre rodopgørelserne, både af eksisterende billeder og de fremtidige billeder vi opnår.

1.4.4. Fænotyping af overjordiske plantedele i RadiMax

Hovedaktiviteterne i 2018 har været at udvikle og effektivisere billedanalysen af dronebillederne, så billeder taget i marken nu hurtigt kan omsættes til data der kan anvendes i statistisk analyse, og at gennemføre omfattende droneflyvning og billedtagning af både hvede og kartoffelafgrøderne i RadiMax forsøget. De første data fra dronebilleder er nu sammenholdt med roddata, udbyttedata og genetiske informationer.

Arbejdspakke 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale

Arbejdspakke 2 udføres af Aarhus Universitet. Formålet med Arbejdspakke 2 er:

- At udvikle og implementere en anvendelsesorienteret selektionsstrategi, som gør det muligt at identificere det bedste forædlingsmateriale for byg, hvede, græsser og kartofler til bæredygtig intensivring af dansk landbrug.
- At udvikle og implementere en anvendelsesorienteret forædlingsstrategi, der hurtigere og mere præcist kan selekttere for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet i græsser, byg, hvede og kartofler.
- At udvikle og implementere en anvendelsesorienteret analysestrategi som gør det muligt at forædle for forbedret abiotisk- og biotisk stresstolerance og udbyttestabilitet i forskellige miljøer.

2.1. Udvikling af analyseprocedurer til selektion for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet

Når planteforædleren i dag udvælger materiale til en ny sort, sker det på baggrund af forskellige forsøgsdata, der er indsamlet gennem vækstsæsonen. I de senere år er forædlingsprogrammerne blevet forbedret for en del arter. Teknologien hedder Genomisk Selektion (GS) og baserer sig på det genetiske potentiale, der ligger gemt i planternes DNA (genomet).

Genomisk selektion gav forskere og forædlere håb om, at moderne GS-baseret planteforædling ville blive hurtigere og mere effektivt. Men så enkelt skulle det ikke være. Det har nemlig vist sig, at planters fænotype ikke kun opstår som følge af ændringer i den genetiske kode – men også som følge af ændringer i vores genes organisering eller, populært sagt, deres arkitektur.

Den information, som påvirker genarkitekturen, findes ikke i vores genetiske kode, men i modifikationer omkring vores DNA. Og det har vist sig, at denne information bliver kopieret og givet videre i lighed med den genetiske kode, når vores celler deler sig.

Vores celler indeholder altså anden 'arvelig' information end den genetiske kode. Med den erkendelse er forskning i såkaldt 'epigenetik' stormet frem i den internationale forskningsverden de seneste år.

Resultaterne har på flere punkter vendt op og ned på vores forståelse af helt grundlæggende forhold omkring planters udvikling, og det har udfordret vores opfattelse af, at den genetiske kode eksklusivt betinger disse processer.

Vi har som en del af arbejdsplan 2.1 udviklet analyseprocedurer på DNA-, RNA- epigenetisk niveau til selektion for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet. Procedurerne er blevet anvendt i byg (150 prøver), kartofler (96 prøver) og i rajgræs (600 prøverne).

Arbejdsplan 2.2. Prædiktation og selektion for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet i græsser, cerealier og kartofler

I arbejdsplan 2.2 kombineres de fænotypiske data fra AP1, med data på DNA-, RNA- epigenetisk niveau fra AP2.1 for at forklare den fænotypiske variation mellem sorterne. Målet er at udvikle mere præcise prædiktionsmodeller der forklarer den fænotypiske variation, og derigennem øge præcisionen i selektionen for bedre udnyttelse af vand og kvælstof i RadiMax-faciliteten.

I 2018 er der udført transcriptomanalyse, differentiell genekspressionsanalyse og epigenetiske analyser i vårbyg. Der blev prædikeret en række komplekse egenskaber bl.a. roddybde, hvor hele 64 pct. af den fænotypiske varians kunne forklares vha. alle OMICS-data.

I alm. rajgræs blev der udført transkriptomanalyse, differentiell genekspressionsanalyse og gen-coekspressionsanalyse. Analysedataene blev brugt i prædiktionsmodeller, for at prædiktere forskellige kvalitetsparametre og for rodlængde målt i RadiMax anlægget. Modellerne forklarede 71 procent af variationen i rodlængde dybere end 100 cm.

Der blev gennemført epigenetiske analyser i kartofler, og identificeret en række positioner på genomet der blev methyleret som respons på tørkestress.

Resultaterne viser, at man kan opnå en betydelig højere præcisionen i selektion for bedre udnyttelse af vand og kvælstof ved at inkludere data på DNA-, RNA- epigenetisk niveau i forædlingsprocessen. Vi har derfor som nogle af de første i verden udviklet metoder til, hvordan vi kan inkludere epigenetik i praktisk plante-forædling. Det giver nogle helt nye perspektiver og vil kunne afhjælpe nogle af de begrænsninger, der ligger i de nuværende forædlingsstrategier.

Arbejdspakke 1. Fænotypning for rodvækst og rodfunktion

Arbejdspakke 1 udføres af Københavns Universitet. Formålet med arbejdspakken er at skaffe data for sortsvariation i rodvækst og rodfunktion hos sorter af vinterhvede, vårbyg, græsser og kartofler. Metodiske udfordringer er fortsat en væsentlig forhindring for effektiv rodfænotypning. Der er derfor lavet en betydelig indsats med forbedring af metoder både til den direkte rodobservation (billedanalyse), til måling af rodfunktion (især isotopstudier af vand og N optagelse), og metoder til indirekte måling af rodfunktion via måling på respons i topvækst og stress.

1.1. Vand og kvælstofeffektivitet

Kristian Thorup-Kristensen, Tomke Susanne Wacker og Simon Fiil Svane

Der er i 2018 gennemført omfattende studier med brug af isotoptracere til at måle afgrødernes dybe optagelse af vand og kvælstof (mærkning med $^2\text{H}_2\text{O}$ og ^{15}N), samt lavet analyse for naturlig berigelse med ^{13}C som indikator for tørkestress. Alle 3 isotoper kan dermed bidrage til fænotyping for dyb rodvækst i RadiMax forsøgene, og ^{13}C kan også bidrage til estimater for tørkestres i markforsøgene i Robusta. Der går en del proces-tid fra forsøgene er gennemført til vi har isotop-analyse data til rådighed, det er derfor data fra de mindre omfattende isotopstudier i 2017 vi nu har klar, mens data fra forsøgene i 2018 vil blive tilgængelige i løbet af de første måneder af 2019.

Vi har arbejdet med ^{15}N i udvalgte genotyper i RadiMax forsøgene siden 2016, og i 2018 har vi forsøgt at bruge det til egentlig fænotyping, på linje med selve rodmålingerne. For både hvede og kartofler blev ^{15}N tilført med vandingssystemet i en dybde udvalgt til at være i den dybeste del af rodsystemet. Dermed kunne vi tilføre ^{15}N til alle linjer, i både den side af RadiMax hvor der er minirhizotroner og i den modsatte side. Dermed får vi dobbelt så mange gentagelser på ^{15}N målingerne som vi har på rodmålingerne, hvilket vil give en forbedret sandsynlighed for at vi kan opnå god statistisk sikkerhed. Måling af ^{15}N optagelse er samtidig et direkte mål på sorterens rodaktivitet, så det er alt i alt en meget lovende metode. Prøverne er sendt til analyse, vi afventer nu resultaterne i starten af 2019.

For $^2\text{H}_2\text{O}$ og ^{13}C lavede vi de første studier i RadiMax i 2017, og opnåede foreløbige lovende resultater. I 2018 har vi tilført $^2\text{H}_2\text{O}$ til udvalgte linjer i stigende dybde langs mini-rhizotroner i både hvede og kartofler. Der blev i de følgende dage opsamlet transpirationsvand fra 5 forskellige tilførselsdybder i hver af linjerne. Formålet var dels at få bedre resultater for den generelle sammenhæng imellem tilførselsdybde, rodvækst og vandoptagelse, og at undersøge om vi kan finde sikre genotype forskelle med metoden, og få større erfaring med metoden og dens potentiale, så den evt. fremover kan bruges til egentlig phenotyping på samme måde som vi har prøvet med ^{15}N i 2018. De første resultater med naturlig berigelse med ^{13}C fra 2017 var lovende, og vi har derfor valgt at få analyseret alle prøverne fra ^{15}N mærkningen i 2018, prøver af halm/kerne/kartofler fra KU linjerne i de to arter, og det samme med hvedeprøver fra markforsøgene, både prøver af biomasse ved blomstring og af halm og kerne ved høst. Med den kraftige tørke i 2018 er der ekstra god chance for at vi ^{13}C målingerne vil give værdifulde resultater.

1.1.3. ^{15}N mærkning, kvælstofeffektivitet og dokumentation af RadiMax anlægget i 2017

Forsøgene med ^{15}N mærkning af udvalgte genotyper i byg i 2017 viste en klar sammenhæng imellem roddybde og optagelse af ^{15}N fra de forskellige dybder, og der blev fundet en større ^{15}N berigelse i genotyper der viste høj rodtæthed i de dybere jordlag. Ud fra resultaterne frem til og med 2017 har vi konkluderet at metoden er lovende som egentlig fænotyping metode, og det har dannet grundlag for arbejdet i 2018, som beskrevet ovenfor.

1.1.4. Mærkning af vand med $^2\text{H}_2\text{O}$, måling af vandeffektivitet og dokumentation af RadiMax anlægget

I 2017 blev der tilført $^2\text{H}_2\text{O}$ vand til udvalgte linjer af græs. Som med ^{15}N fandt vi en god sammenhæng imellem berigelsen i transpirationsvandet fra forskellige dybder og den generelle rodvækst af græsset. Der blev ikke fundet nogen sammenhæng imellem de enkelte sorters rodvækst og $^2\text{H}_2\text{O}$ berigelse. Vi forventer at resultaterne kan forbedres ved optimere metoden, bl.a. ved at vente længere vente længere fra tilførsel af $^2\text{H}_2\text{O}$ til opsamling af transpirationsvand til analyse. Metoden ser generelt lovende ud, og er som med ^{15}N en direkte måling af rodaktivitet, men skal optimeres for mere omfattende brug, f.eks. som egentlig fænotyping metode. I forsøgene i 2018 har vi arbejdet med at optimere metoden, så vi kan vurdere og forbedre dens anvendelighed.

1.1.5. d^{13}C analyser og vandeffektivitet i RadiMax og i markforsøgene

Måling af d^{13}C bygger på naturlig isotop diskrimination, hvor der bygges lidt mindre ^{13}C ind i planternes biomasse når planterne er velforsynede med vand, end når planterne er tørkestressede. Målinger på materiale af både græs og byg i 2017 bekræftede at tørkestres gradienten i RadiMax virker som ønsket, det kunne måles på d^{13}C i begge plantearter, selvom 2017 var fugtigt og køligt. I græsserne var der en klar sammenhæng imellem de målte roddybder 23. maj og d^{13}C i plantematerialet, dog baseret på kun 6 sorter. I byggen var sammenhængen ikke så klar, måske på grund af de problemer der også har gjort det svært at finde tilstrækkeligt sikre forskelle i sorternes rodvækst. Analyser af prøver fra markforsøget på KU viste også lovende resultater, hvor effekten af den tørre periode tidligt på vækstsæsonen 2017 så ud til at give resultater udslag på d^{13}C på prøverne taget ved skridning og i halmen ved høst, men ikke i kernerne som var dannet under de fugtige forhold midt på sommeren.

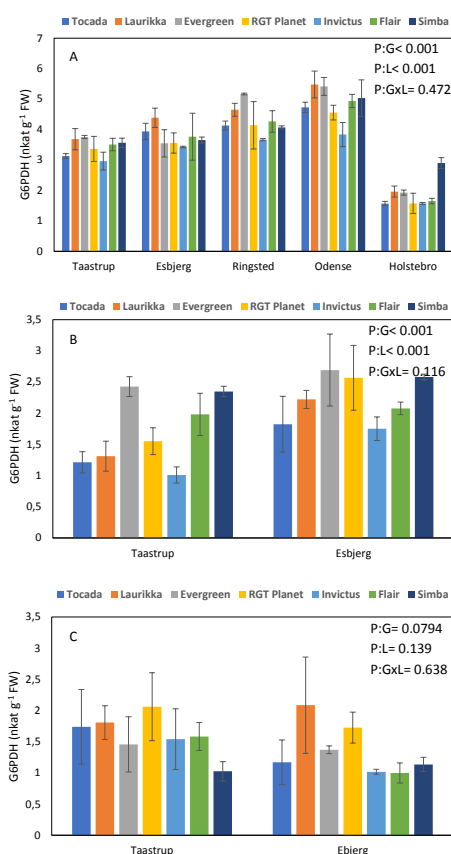
1.3. Markforsøg med sorter og N udnyttelse

Kristian Thorup-Kristensen, Saqib Saleem Akhtar, Thomas Georg Roitsch

1.3.1. Markforsøg med sorter og N udnyttelse, - aktiviteter 2018

- 1) Der er gennemført forsøg med sorter af vinterhvede som del af Landsforsøgene, på 4 lokaliteter.
- 2) Vi har fortsat analysen af prøver og resultater fra de tilsvarende forsøg med vårbygssorter gennemført i 2017, ikke mindst "fysiologisk fænotyping".
- 3) I efteråret er hvedeforsøg til sæsonen 2019 blevet anlagt på 4 lokaliteter. Der er blevet udvalgt sorter ud fra rodmålinger i RadiMax forsøget i 2018, så der indgår sorter som vi har målt til at have henholdsvis dyb og ikke så dyb rodvækst. I 4 af sorterne, med størst mulig variation i rodvækst er der installeret minirhizotroner til rodmålinger i 2019 på alle 4 lokaliteter.

Hvedeforsøg 2018: Der blev planlagt i alt 5 forsøg, et på KUs arealer og 4 andre steder. Der blev dyrket 7 sorter, valgt på baggrund af bl.a. RadiMax resultater fra 2016, forskelle kvælstofudnyttelse og proteinindhold, og valg af sorter som samtidig indgik i forsøget i RadiMax i 2018. Prøver fra skridning og fra halm og kerne fra høsttidspunktet er nu under analyse for kvælstofindhold og for ^{13}C berigelse, som kan vise i hvor høj grad planterne har været tørkestressede under væksten. Samtidig er der taget prøver til "fysiologisk fænotyping", incl. prøver fra de samme sorter i RadiMax, både under velvandede og tørre forhold, prøverne er nu under analyse. Forsøgene har desværre været ramt af de meget specielle vejrforhold i 2017 og 2018. Et forsøg kunne ikke anlægges på grund af de meget våde forhold i efteråret 2017, og to af forsøgene var hårdt ramt af tørken som bl.a. betød meget stor variabilitet i forsøgene, så resultaterne er af begrænset værdi. Dermed er 2 forsøg, på KU og ved Holstebro, gennemført med godt resultat, mens resultater fra 2 andre skal tolkes med forsigtighed.



Figur 1 Effekt af vårbyg genotyper dyrket på 5 lokaliteter på aktivitet af G6PDH i faneblade ved blomstring (A), under kernefyldning (B) og i kerner under kernefyldning (C). Error bars viser SE (n=2).

Vårbygforsøg 2017: Forsøgene er afrapporteret i statusrapporten fra 2017, men analyse af resultaterne er i betydeligt omfang gennemført i 2018, med analyse af N i planteprøver fra skridning og i kerne og halm ved høst, samt måling af enzymaktiviteter (fysiologisk fænotyping). Afgrødens udvikling på de 5 lokaliteter var meget forskellig, f.eks. blev de højeste udbytter målt ved Holstebro og Taastrup, men mens tilvæksten frem til skridning var meget høj ved Holstebro var den lav i Taastrup. Det betød bl.a. at mens afgrøden i Taastrup optog ca. 40 kg N/ha fra skridning til høst, mistede afgrøden ved Holstebro ca. 40 kg N/ha i samme periode. Ved Odense var den tidlige tilvækst relativt stor, men kerneudbyttet lavere end på de andre lokaliteter. Forskellene imellem sorterne var lavere, men sorter som RGT Planet og Invictus havde højere udbytter og lavt N indhold, mens det var omvendt for Simba og Tocada. Selvom N optagelsen over tid og N indhold i halmen varierer imellem sorter og især imellem lokaliteter, så er forskellene på N i kerne (kg/ha) ret små, ca. 120 kg N/ha i Taastrup og ca. 100 kg N/ha på de 4 andre lokaliteter, og fra ca. 100 kg N/ha for Invictus og Laurikka til ca. 96 kg N/ha for Evergreen og Tocada. Med den store variation imellem de 4 lokaliteter giver resultaterne en god baggrund for forståelse af forskellene i kvælstof-

udnyttelse, og sammenhænge imellem N udnyttelse og enzymaktiviteter.

1.3.2. Fysiologisk fænotyping via enzymaktivitet, vårbyg 2017

Baggrund

Enzymaktiviteter udgør de grundlæggende processer som er afgørende for afgrødernes vækst og agronomiske egenskaber. I planterne foregår der regulering på flere niveauer, fra genetiske forskelle, til regulering af genekspression frem til aktive enzymer, men det er enzymaktiviteten der er afgørende for de processer der faktisk foregår i planten under dens vækst og tilpasning til omgivelserne. Enzymaktiviteter antages derfor at give robuste mål for plantens reaktion på vækstbetingelserne, både biotiske og abiotiske påvirkninger.

Metode til måling af enzymaktiviteter for kulhydratomsætning

Der blev taget prøver af bygplanter af 7 vårbygssorter. Prøverne blev taget af fanebladene ved blomstring og igen af henholdsvis faneblade og den umodne kerne midt under kernefyldningen. Ved blomstring blev der taget prøver fra alle 5 lokaliteter, og under kernefyldning fra 2 lokaliteter (Esbjerg og Tåstrup). I Tåstrup blev der taget prøver af planter dyrket ved 2 kvælstofniveauer (standard, og standard minus 40 kg N/ha). Analyserne blev gennemført som beskrevet i Jammer et al, (2015) using buffer B, og aktiviteten af 13 vigtige enzymer der indgår i planternes omsætning af kulhydrater blev målt, de 13 enzymer var: cell wall invertase (cwlInv), vacuolar invertase (vacInv), cytoplasmic invertase (cytInv), sucrose synthase (Susy) possess sucrolytic activity, fructokinase (FK), hexokinase (HXK), phosphoglucisomerase (PGI), phosphofructokinase (PFK), aldolase (Ald) ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), phosphoglucumutase (PGM), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) og glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH).

Enzymes	Flag leaves_Anthesis			Flag leaves_Grain Filling			Grains_Grain filling stage		
	Genotype	Location (5)	Genotype x Location	Genotype	Location (2)	Genotype x Location	Genotype	Location (2)	Genotype x Location
PGI	<0.001	<0.001	0.119	<0.001	<0.001	<0.001	0.188	<0.001	0.711
PGM	0.008	<0.001	0.094	0.002	<0.001	0.014	0.056	<0.001	0.331
G6PDH	<0.001	<0.001	0.473	<0.001	<0.001	0.116	0.079	0.139	0.638
FK	<0.001	<0.001	0.025	<0.001	<0.001	<0.001	0.049	<0.001	0.193
PFK	0.002	<0.001	0.438	0.012	0.84	0.25	0.662	0.007	0.369
HXK	0.0414	<0.001	0.0241	0.926	<0.001	0.827	0.029	0.007	0.082
aldolase	<0.001	<0.001	0.049	<0.001	<0.001	<0.001	0.166	0.004	0.635
AGPase	0.235	<0.001	0.831	0.089	0.539	0.467	0.024	<0.001	0.012
UGPase	0.05	<0.001	0.837	0.038	<0.001	0.087	0.318	<0.001	0.808
CwlInv	<0.001	<0.001	0.082	0.002	<0.001	0.258	0.33	0.989	0.636
VacInv	<0.001	<0.001	0.05	0.001	<0.001	0.171	0.537	0.119	0.516
CytInv	0.023	<0.001	0.556	0.23	0.025	0.297	0.348	0.957	0.061
Data of 5 locations Taastrup, Esbjerg, Ringsted, Holstebro, Odense				Data of 2 locations Taastrup, Esbjerg					

Figure 2:: "Heat map" der viser overblik over aktivitet af 13 enzymer i forskellige genotyper dyrket på forskellige lokaliteter. Error bars viser SE (n=2). Grøn viser

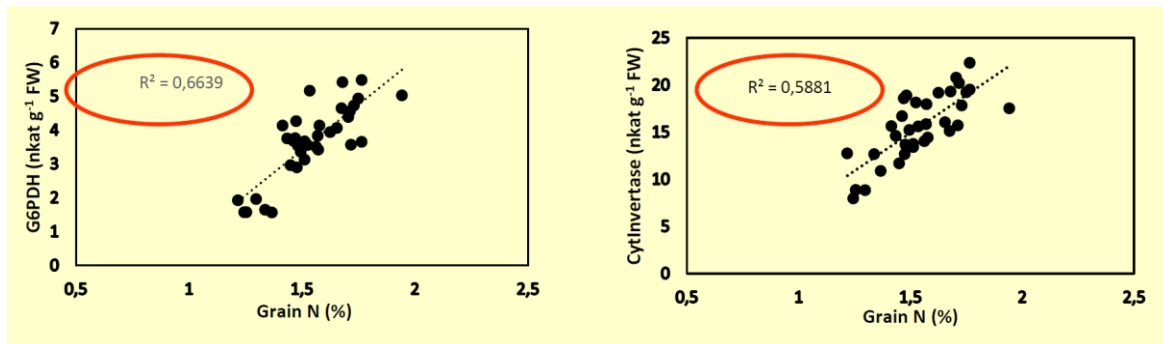
Resultater

Resultaterne for enzyme G6PDH er vist i Figur 1, som et typisk eksempel. Resultaterne viser at aktiviteten af G6PDH i fanebladene afhænger signifikant af både sort og lokalitet ($P < 0.001$) men der var ingen sikker forskel i målingerne på kernerne. I Tåstrup havde også niveau af N gødskning var klart signifikant.

En oversigt over alle enzymerne er vist i figur 2. I fanebladene ved blomstring var der signifikant effekt af lokalitet på alle enzymerne og af sort på de 12 af de 13 enzymer. Forskellene var mindre klare målt i faneblade og kerner midt under kernefyldning, men der var dog stadig nogen enzymer der viste klar signifikans (FK, HXK and AGPase). For 7 af enzymerne var der signifikant effekt af gødningsniveau, selvom forskellen kun var på 40 kg N/ha.

Et særligt spændende resultat var at der blev fundet en meget klar korrelation imellem aktivitet af 2 enzymer (G6PDH og cytINV) i fanebladene ved blomstring og %N i kernerne i de senere høstprøver, med R^2 værdier

på henholdsvis 0,66 og 0,59, på tværs af sorter og lokaliteter (Fig. 3). Dette eksempel viser at enzymaktiviteterne kan være effektive tidlige indikatorer af vigtige agronomiske egenskaber i afgrøderne.



Figur 3: Korrelation imellem vacINV og G6PDH aktiviteter i alle prøver af faneblade ved blomstring og efterfølgende %N i kernerne ved høst.

Reference

Jammer A, Gasperl A, Luschin-Ebengreuth N, Heyneke E, Chu H, Cantero-Navarro E, Großkinsky DK, Albacete AA, Stabentheiner E, Franzaring J, et al (2015) Simple and robust determination of the activity signature of key carbohydrate metabolism enzymes for physiological phenotyping in model and crop plants. J Exp Bot 66: 5531–5542

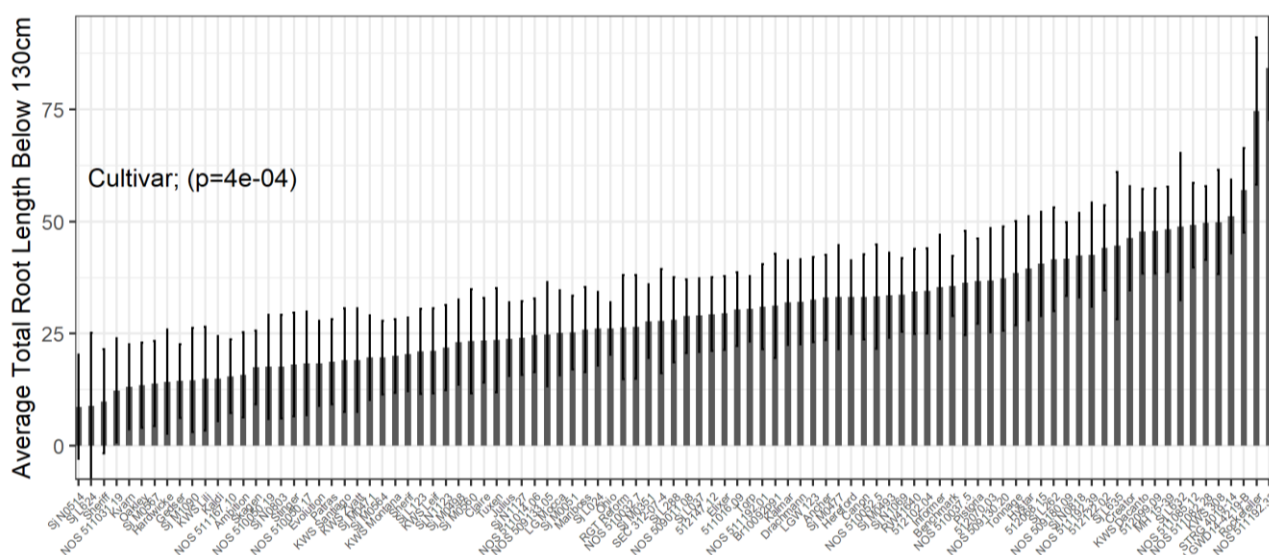
1.4. Fænotypning i RadiMax

1.4.1. Rodfænotyping fra RadiMax rodbilleder

Simon Fiil Svane, Tomke Susanne Wacker, Olga Popovic, Niels Alvin Olsen og Kristian Thorup-Kristensen

I RadiMax anlægget måler vi rodvækst på i alt 600 minirhizotruer, gennemsigtige rør på 5m længde som vi filmer og derefter analyserer billederne for forekomst af rødder. Brugen af minirhizotruer til måling af rodvækst er velafprøvet, normalt ikke i så stor skala. Traditionelt opgøres rodvæksten ved manuel opgørelse på billederne, men det er ikke realistisk i RadiMax. Ved en dags filmning af hele RadiMax anlægget vil vi typisk tage op til 60.000 billeder, så det bliver til flere hundrede tusinde billeder på en sæson. Kerasystemet i RadiMax er lavet så vi opnår multispektrale billeder, for at forbedre muligheden for at lave automatiseret billedanalyse for rodvækst. Især den korteste bølgelængde i det violette område har vist sig at forbedre muligheden for billedanalyse, men den hjælper dog især til at identificere de helt unge rødder.

I løbet af 2018 har vi arbejdet videre med billedanalysen, som beskrevet i afsnittet herunder, dels for at 1) videreudvikle og optimere billedanalysen og 2) for at få udviklet et workflow der betyder at vi effektivt kan udnytte metoden på det store antal billeder fra RadiMax. Arbejdet er lykkedes godt, så vi i løbet af 2018 er blevet i stand til at analysere rodbilleder fra RadiMax forsøgene, både byg og græs fra 2017 og hvede og kartofler fra 2018, og har opnået resultater som vist med eksemplet for hvede i figur 1.4.1 herunder. Den automatiske billedanalyse af resultater fra 2017 viste mere statistisk sikker adskillelse imellem genotyperne end hvad vi havde fundet med manuel opgørelse, så det tyder på at den automatiske billedanalyse ikke bare er væsentligt hurtigere end den manuelle opgørelse, men også af højere kvalitet!



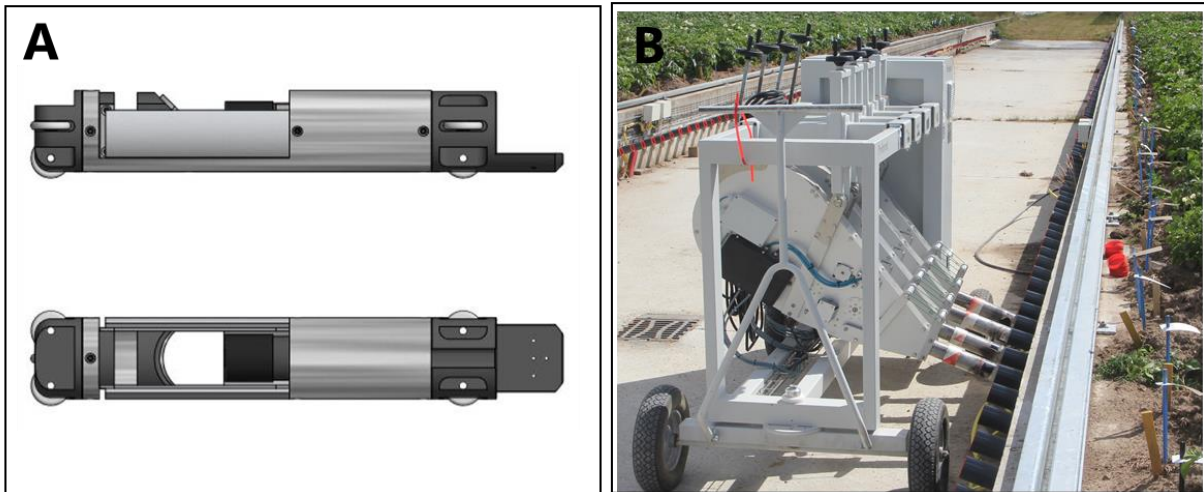
opgøre, i øvrigt både manuelt og med billedanalyse. For at løse disse problemer har vi sidst på året inddraget en ny metode i arbejdet med billedanalyse: Artificial Intelligence (AI) baseret billedanalyse. Som beskrevet i afsnittet herunder, er de første resultater af AI arbejdet meget lovende, det ser ud til at vi kan opnå endnu bedre og endnu hurtigere opgørelser af rodforekomsten på billederne. Vi fortsætter derfor arbejdet med AI metoden, vi er lige nu ved at færdiggøre analysen af hele sættet af rodbilleder for hvede i juni 2018, så vi kan sammenligne resultaterne af metoden med det vi har opnået med den allerede gennemførte billedanalyse.

1.4.2. Automatisk storskala kvantificering af levende rod-strukturer på multispektrale billeder

Simon Fiil Svane, Niels Alvin Olsen, Abraham George Smith

Udvikling af software og analyse strategi

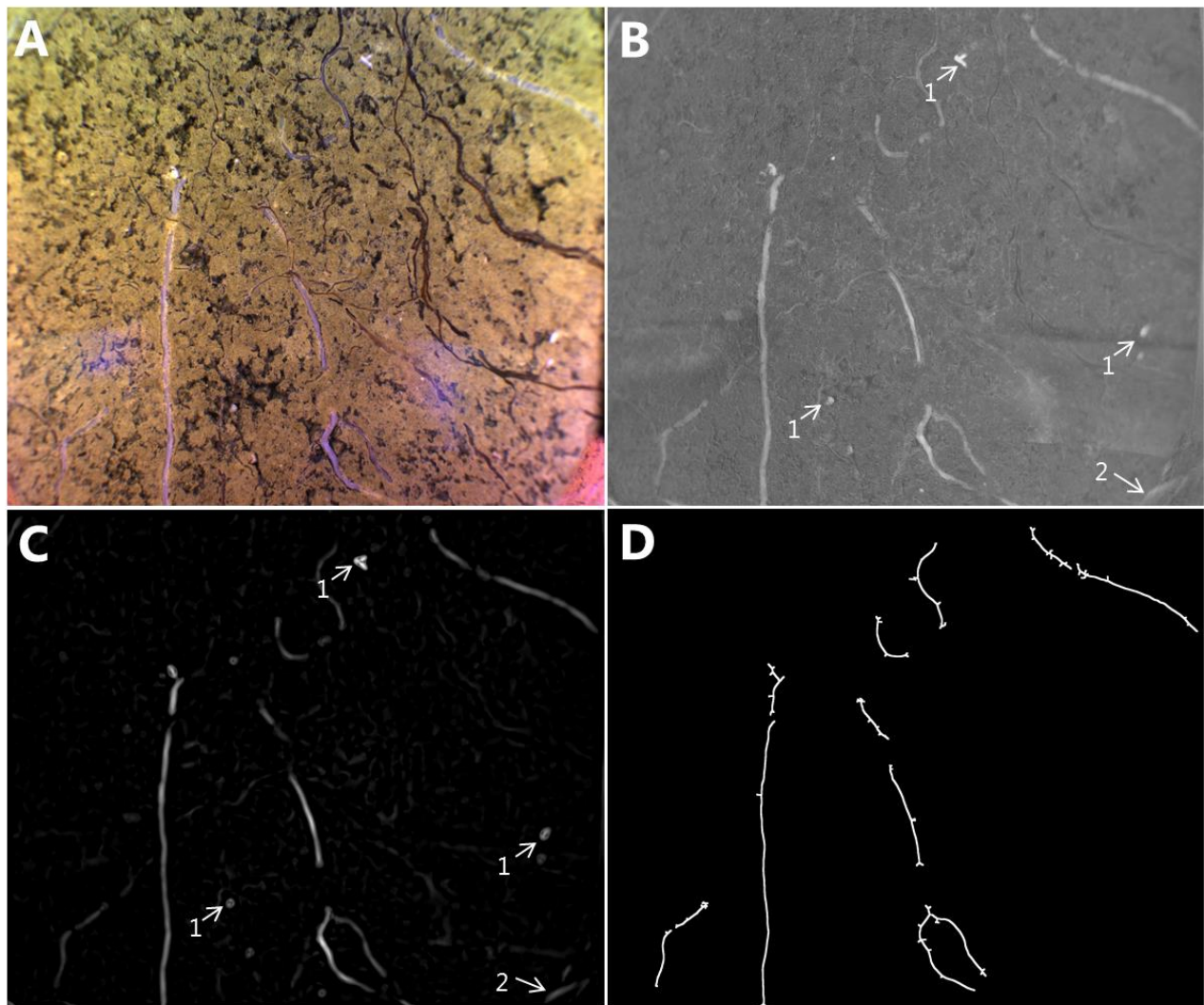
Efter et nyudviklet multi-spektralt rod kamera system er sat i drift i RadiMax anlægget i Tåstrup, bliver der nu indsamlet store mængder af billede-data (+200000 billeder, + 50 TB) per år (Figur1). I alt er der installeret omkring 3.2 km gennemsigtige rør for rodobservationer. Billederne bliver leveret i en høj kvalitet bestående af 5 spektrale lag fra UV til nær-infrarød. Herved er det muligt at fremhæve levende rødder i forhold til jord og døde rødder da de i mange tilfælde har en unik reflektants profil i forhold til andre komponenter i jorden (Nakaji, Noguchi, & Oguma, 2007). Den efterfølgende billedbehandling består af 2 separate analyser (Figur2). I første omgang er billederne blevet analyseret med traditionelt multispektralt billedanalyse ved at træne en klassifikation model (normalized Canonical Discriminant Analysis, nCDA model) (Dörge, Carstensen, & Frisvad, 2000; Svensgaard, Roitsch, & Christensen, 2014). Pixels tilhørende levende rødder bliver herved fremhævet og tildelt en gråskala værdi fra -2 (støj) til 2 (levende rod) (Figur 2B). Selvom denne analyse giver en stærk separation, bliver der i visse tilfælde fremhævet komponenter med samme reflektants-profil som rødder. En speciel udfordring i rodanlægget Tåstrup har været kalk-stykker i underjorden som har vist sig at have samme farveprofil som levende rødder. Derudover kan dug afsættes på indersiden af røret giver anledning til refleksioner. Dette giver anledning til en lille andel falske positive fremhæves af nCDA modellen. For at løse dette problem er der udviklet et værktøj i MatLab som fremhæver aflange strukturer ved brug af et såkaldt Frangi filter (Frangi, Niessen, Vincken, & Viergever, 1998). Herefter er det relativt let af fjerne støj ved at "rense" ved brug af tærskelværdier på intensitet, rundhed samt minimum størrelses krav. Analysen blev udviklet i samarbejde med Erik Bjørnager Dam (Datalogisk institut, Københavns Universitet). Hele analysen er netop blevet beskrevet i en videnskabelig artikel som netop er indsendt til et tidsskrift.



Figur 1.4.2 Mobilt multispektralt minirhizotron kameravogn til brug under markforhold, samt i RadiMax anlægget i Tåstrup udviklet af Videometer A/S og ProInvent A/S. Systemet er automatiseret og billederne bliver navngivet med dybde, rør-nummer Samt et tidsstempel for hvornår de er taget. I alt er der monteret 4 kamera-moduler og herved kan der indsamles billeder fra et helt eksperiment på 2 arbejdsdage.

Resultat

Resultatet af den udviklede analysemetode er præsenteret i figur 1.4.3. Systemet fungerede med høj præcision i byg og græs og nye unge rødder kunne fint separeres fra selv en kompleks baggrund bestående af døde rødder og lys kalkholdig underjord. Der er foretaget et valideringsstudie og systemet har i de analyserede dataset haft tilsvarende eller forbedret analysen i forhold til den traditionelle manuelle metode som beskrevet i (Rasmussen, Dresbøll, & Thorup-Kristensen, 2015). Udover, en kraftig tidsbesparelse giver den automatiske billedanalyse en mere stabil analyse af rødder. Det er oftest observeret at manuelle tællinger driver over tid, specielt hvis det er svært at skelne mellem levende og døde rødder. Systemet er nu i brug og gennem 2018 er der blevet analyseret +200000 billeder bestående af data fra Vårbyg, Hvede, Græs og Kartoffler er afleveret til de respektive partnerne i RadiMax/Robusta projektet.

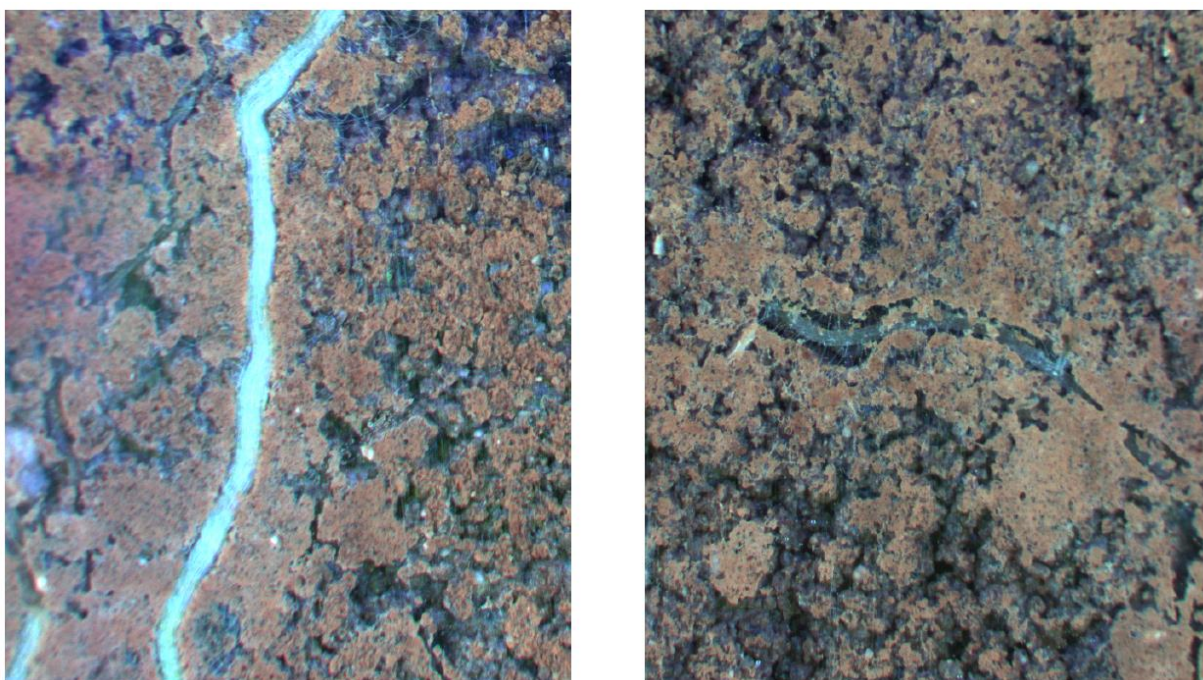


Figur 1.4.3. Multispektralt billedanalyse ved brug af nCDA model kombineret med et frangi filter efterfulgt af center-linje beregning samt fjernelse af støj ved brug af tærskelværdi af pixel intensitet samt størrelse og rundhed (excentricitet). A) Pseudo RGB billeder af vårbyg fra den 5. juni under våde jord-forhold i 112 cm's dybde. B) gråskala billede efter nCDA transformering. C) fremhævede "linje-strukturer" efter brug af frangi filter D). Resultat af billedanalysen efter center linje beregning og brug af tærskelværdier til oprensning. Kun pixels med en kraftig intensitet tages i betragtning derudover fjernes små og runde komponenter. Pilene indikerer eksempler hvor små stykker af kalk giver anledning til refleksioner som bliver fremhævet ved en fejl, men fjernes ved brug af de ovennævnte tærskelværdier.

1.4.3. Mulige forbedringer ved brug af kunstig intelligens

Den udviklede multispektrale billedanalyse protokol havde en række begrænsninger. Det var ikke muligt at fremhæve ældre rødder under tørre forhold. I sådanne tilfælde var der begrænset forskel i reflektants mellem rødderne og jorden. Derudover blev der ved studier i græs observeret at rødderne mistede den karakteristiske forskel i reflektants efter 1. slæt (Figur 1.4.4). Det blev derfor forsøgt belyst om andre billedanalyse metoder ville være bedre egnet til formålet.

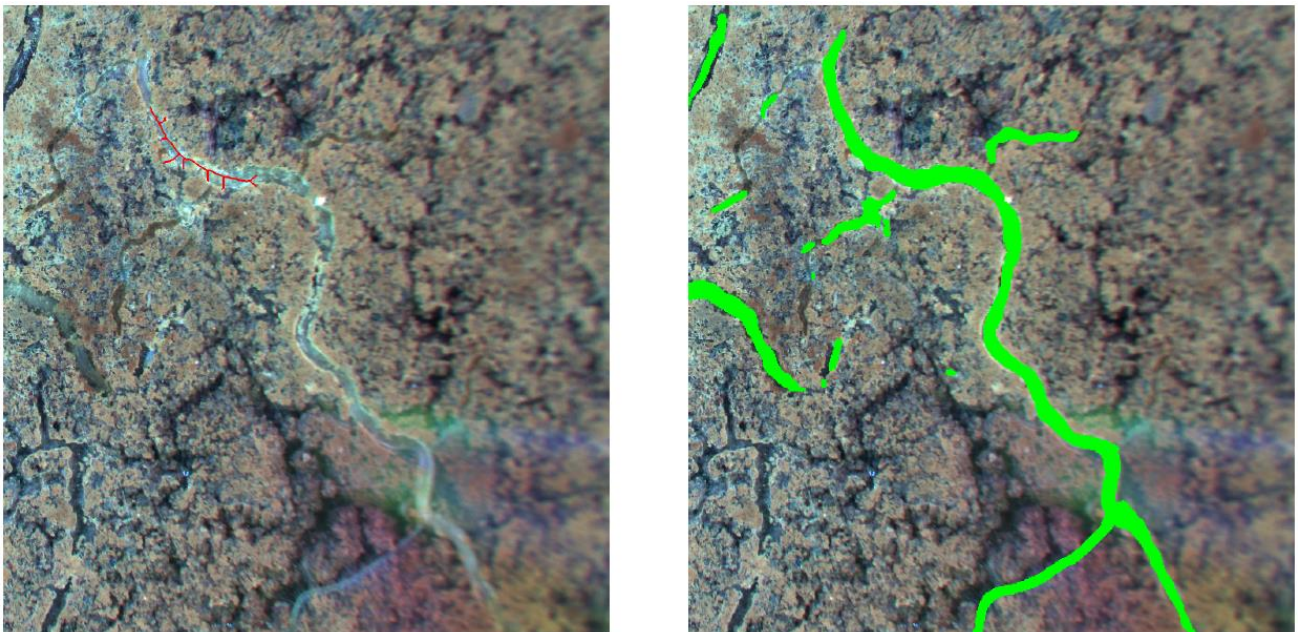
I de senere år er der sket en revolution indenfor billedanalyse ved brug af kraftfulde algoritmer også kendt som Neurale Netværk, en gruppe af algoritmer som oftest benævnes som Deep Learning eller kunstig intelligens. Revolutionen er drevet af den teknologiske udvikling indenfor grafik bearbejdningenheder (GPU). Tidligere var algoritmerne begrænset af beregningskraften, i dag er den begrænsende faktor typisk kvaliteten af træningsdata.



Figur 1.4.4. Unge levende rødder har i de fleste tilfælde en høj reflektants (TV). Ved studier i græs blev det dog observeret af denne forskel forsvandt efter første slæt (TH).

Gennem samarbejde med Camilla Ruø Rasmussen (PLEN) har master studerende i datalogi Abraham George Smith programmeret et neuralt netværk mere præcist et Convolutional neural network (CNN), til at genfinde rødder. Systemet var udviklet til et traditionelt farvekamera til brug fritstående gennemsigtige plantekasser. Det blev derfor forsøgt at lave samme analyse til at fremhæve rødder af rajgræs med svag forskel i reflektants mellem andre komponenter i billedet. I første omgang blev analysen lavet ved brug af de tre bølgelængder som gav den bedste fremhævnings af rødder. Herved kunne der dannes et såkaldt pseudo-RGB billede, som

minder om et farvebillede men med en forbedret kontrast mellem levende rod og baggrund. I forsøget blev rodstrukturer fra 120 billeder fra med blege rajgræs rødder farvelagt manuelt og brugt til at træne systemet. Herefter blev modellen testet på data som ikke var brugt i træningen. Systemet gav en forbløffende god fremhævnings af rødder og ofte blev strukturer fremhævet som fremstod "usynlige" ved første øjekast (Figur 1.4.5). Derudover var problemerne med falske positive stort set væk og dug, kalk samt andre "parasitter" blev stort set ikke detekteret. Systemet kræver en lidt længere trænings-tid, men det forventes at der relativt hurtigt kan laves en række generelle modeller som kan bruges med stor præcision. En sidegevinst ved analysen var at når først modellen er trænet, er selve analysetiden væsentlig kortere end den traditionelle metode, da beregningerne kan udføres ved brug af et moderne kraftfuldt grafikkort. Systemet er simpelt da der i teorien kun indgår et skridt i analysen. Brugen af neurale netværk stiller dog meget store krav til at personen der træner systemet. Det er nødvendigt at de rigtige strukturer bliver farvelagt under træningsfasen. Det kan derfor være problematisk i tilfælde hvor døde rødder ikke kan skelnes fra levende. Det er dog observeret at gamle rødder forsvinder relativt hurtigt eller ændrer form og farve. Disse farveforskelle fremhæves af det multispektrale kamera. Derudover kan billederne sammenlignes over tid, så man altid kan genfinde rodstrukturer fra tidligere eksperimenter under træningsfasen af modellen, eller i den efterfølgende dataanalyse.



Figur 1.4.5. Resultat efter træning af "CNN" model til at fremhæve rajgræsrødder med begrænset reflektants. I eksemplet er rødderne fremhævet ved brug af de tre mest informative bølgelængder til at genererer et pseudo-RGB billede. Efter 6 timers træning var det muligt for modellen at fremhæve stort set alle synlige strukturer med stor præcision (TH). Den traditionelle billedanalyse var kun i stand til at fremhæve et lille stykke af de "blege" rødder i billedet (TV).

Referencer:

Dörge, T., Carstensen, J. M., & Frisvad, J. C. (2000). Direct identification of pure *Penicillium* species using

image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2), 121–133. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00142-1)

Frangi, A. F., Niessen, W. J., Vincken, K. L., & Viergever, M. A. (1998). Multiscale vessel enhancement filtering (pp. 130–137). Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0056195>

Nakaji, T., Noguchi, K., & Oguma, H. (2007). Classification of rhizosphere components using visible–near infrared spectral images. *Plant and Soil*, 310(1–2), 245–261. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9478-z>

Rasmussen, I. S., Dresbøll, D. B., & Thorup-Kristensen, K. (2015). Winter wheat cultivars and nitrogen (N) fertilization—Effects on root growth, N uptake efficiency and N use efficiency. *European Journal of Agronomy*, 68, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.04.003>

Svensgaard, J., Roitsch, T., & Christensen, S. (2014). Development of a Mobile Multispectral Imaging Platform for Precise Field Phenotyping. *Agronomy*, 4(3), 322–336. <https://doi.org/10.3390/agronomy4030322>

1.4.4. Fænotyping af overjordiske plantedele i RadiMax

Jesper Svensgaard

Hovedaktiviteterne i 2018 har været at udvikle og effektivisere billedanalysen af dronebillederne, så billeder taget i marken nu hurtigt kan omsættes til data der kan anvendes i statistisk analyse, og at gennemføre omfattende droneflyvning og billedtagning af både hvede og kartoffelafgrøderne i RadiMax forsøget.

Generelt

I 2018 blev hhv. hvedeforsøget og kartoffelforsøget overfløjet adskillige gange hen over sommeren. Tørken i 2018 gav gode muligheder for at undersøge systemernes egnethed til at inducere en tørkegradient. Lav luftfugtighed, høj lufttemperatur, høj solindstråling og stor fordampning satte planterne under maksimal tørkestress. Et omfattende datasæt er blevet samlet og underlægger nu analyse.

Metode

Der blev fløjet med hhv. et termisk kamera, farvekamera og et multispektralt kamera over hveden og kartoflerne (se specifikationer herpå i tabel 1 herunder)

Tabel 1: Specifikationer på flyvninger, udstyr og estimerede resultater. NDRE: Normalized Difference RedEdge Index. NDVI: Normalized Difference Vegetation Index. nExG: Normalized Excess Green Index.

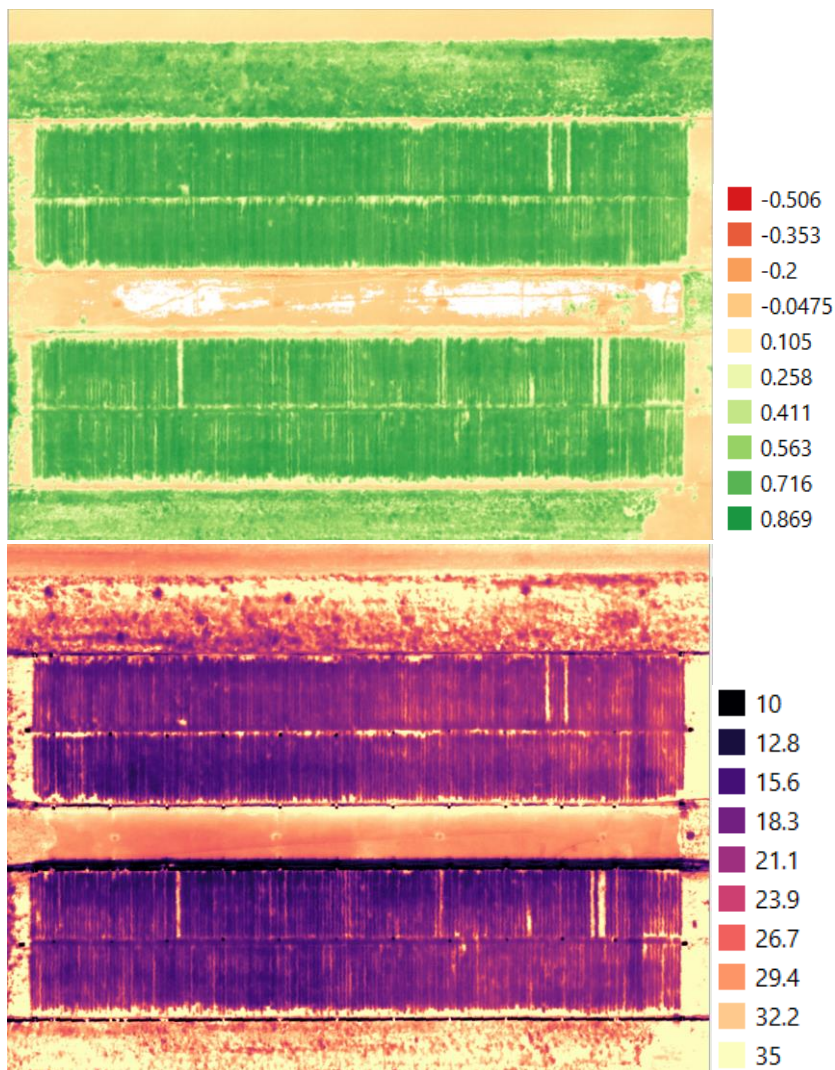
Kamera/drone	Specifikationer flyvning	Analyse og resultater
Termisk kamera: <i>DJI Zenmuse XTR</i> , 512*640. Montere på Inspire 1 pro drone	Der blev fløjet i maj, juni og juli. Normalt før og efter middag. Flyvning i 20 meters højde (4 pixel/cm) med 85-90 % billedoverlap. Fløjet med <i>GS Pro</i> styreapp	Bladtemperatur (hvede og kartofler) med segmentering for baggrundstemperatur. Billeder sammensat i <i>Pix4D Mapper</i> , data ekstraheret i <i>QGIS</i>

Multispektral kamera: <i>Mica-Sense RedEdge M</i> , 5 kanaler (R, G, B, RE, NIR). Monteret på Inspire 1 pro drone	Der blev fløjet så vidt muligt samme dage som termisk. Flyvning i 30 meters højde (2 cm/pixel) med 75 % overlap. Fløjet med <i>Atlas Flight</i> styreapp	NDRE (NIR-RE/NIR+RE) og NDVI (NIR-R/NIR+R) vegetationsindeks estimeret. Billeder sammensat i <i>Pix4D Mapper</i> , data ekstraheret i <i>QGIS</i>
Farvekamera: <i>DJI Phantom 3 pro</i> og <i>DJI Phantom 4 pro</i> .	Flyvning flere gange hen over sæson. Flyvning i 30 meters højde med 75 % overlap. Fløjet med <i>GS Pro</i> og <i>Pix4D Capture</i> styreapp	nExG (2*G-R-B/G+R+B) vegetationsindeks estimeret. 3D overfladekort estimeret. Billeder sammensat i <i>Pix4D Mapper</i> , data ekstraheret i <i>QGIS</i>

Tre gængse vegetationsindekser (NDRE: Normalized Difference RedEdge Index. NDVI: Normalized Difference Vegetation Index. nExG: Normalized Excess Green Index) blev beregnet fra hhv. det multispektrale kamera og farvekamera (tabel 1), med mål om at vurdere sortsforskelle i tørkerespons via ændringer i grønheden af vegetationen i anlægget. De termiske billeder skal visualisere opvarmning af bladoverfladen ved begyndende tørkestress (Prashar and Jones, 2014).

Billeder blev sammensat til georefererede mosaikker i programmet Pix4D mapper via standardopsætninger. Der blev brugt Ground Control Points (GCP) i form af stedfaste kendetegn på jorden målt op med præcisionsgps. Ud fra de mange billeder taget fra dronerne, kunne der produceres sammensatte billeder (mosaikker) som dermed kunne lægges præcist over hinanden, og data ekstraheres med et og samme grid. Figur 1 viser hhv. farvemosaik, termisk mosaik og NDVI mosaik af hvede per 5 juni 2018.



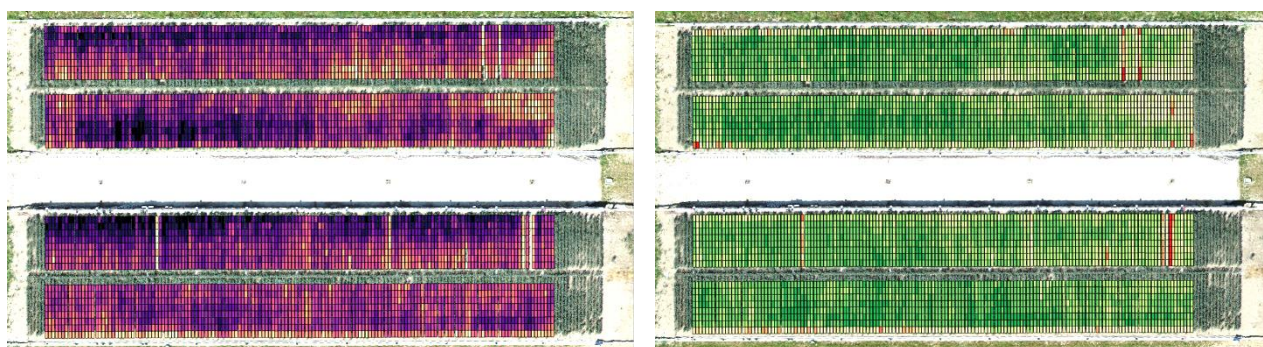


Figur 1. Øverst: Farvebilleder i 30 meters højde sat sammen til mosaik. Midterst: Multispektrale billeder fra 30 meters højde sammensat til moasik og afbilledet som NDVI indeks (skale -1 til 1). Nederst: Termiske billeder fra 20 meters højde tager kl 13.30 sat sammen til mosaik (skale i temperatur C°).

Figur 2 herunder illustrerer ekstraktionsproceduren af data i mosaikkerne foretaget i QGIS. Det er muligt at ekstrahere data i forskellige grids, afhængigt af hvad der er mest hensigtsmæssigt. I hveden blev der lavet et grid, hvor hver række blev delt op i 20cm brede * 50 cm lange delgrids. Således blev en række fra kant til midte delt op i 8 delområder, hvor hhv. gennemsnitstemperatur og gennemsnits vegetationsindeks blev estimeret for hvert felt. Figur 3 illustrerer hvordan det samlede grid ser ud, når der er ekstraheret en gennemsnitstemperatur hhv. gennemsnits vegetationsindeks hen over rækkerne 27 juni.



*Figur 2: Udklipningsskabelon/ekstraktionsgrid (gult grid) i QGIS til ekstrahering af data. Hver afgrøderække dækket af 8 stk 20cm*50 cm delgrids. Herved udtrækkes gennemsnitsværdi for termisk hhv vegetationsindeks fra 8 delområder per række/sort. Samme grid bruges for alle mosaikker da præcise Ground Control Points tillader præcist tilpasning af mosaik til ekstraktionsgrid.*



Figur 3: Udtrukne gennemsnitsværdier for temperatur kl 13.30 (venstre) og vegetationsindekset NDRE (højre) i hveden per 27 juni.

De ekstraherede data blev analyseret i en statistisk model der inddrager de mange spatiale effekter og støj-kilder der er i RadiMax. Ydermere blev der inkluderet sortsgenetik i modellen således den genetiske heritabilitet (genetisk arvelighed på målingen) (Araus et al., 2018) kunne estimeres – analyserne blev foretaget ved Aarhus Universitet af Just Jensen. I første omgang blev der inkluderet data fra hveden som vist i tabel 2

Tabel 2: Data til analyse fra hveden i 2018. Hhv ud fra dato, tidspunkt på dagen for flyvning (termisk) og estimerede værdier/resultater i billederne.

Dato	Kamera (tidspunkt på dag)	Estimeret resultat
5 juni	XT (kl 13.30)	Bladtemperatur, jord segmenteret væk
7 juni	RedEdge M (14.00)	NDRE indeks
15 juni	XT (kl 11.30 og 13.30) RedEdge M(kl. 14.30)	Bladtemperatur, jord segmenteret væk NDRE indeks
27 juni	XT (kl 10.30 og 13.30) RedEdge M (kl. 14.00)	Bladtemperatur, jord segmenteret væk NDRE indeks
3 juli	RedEdge M (kl. 13.00)	NDRE indeks
6 juli	Phantom 4 pro (kl 14.00)	nExG

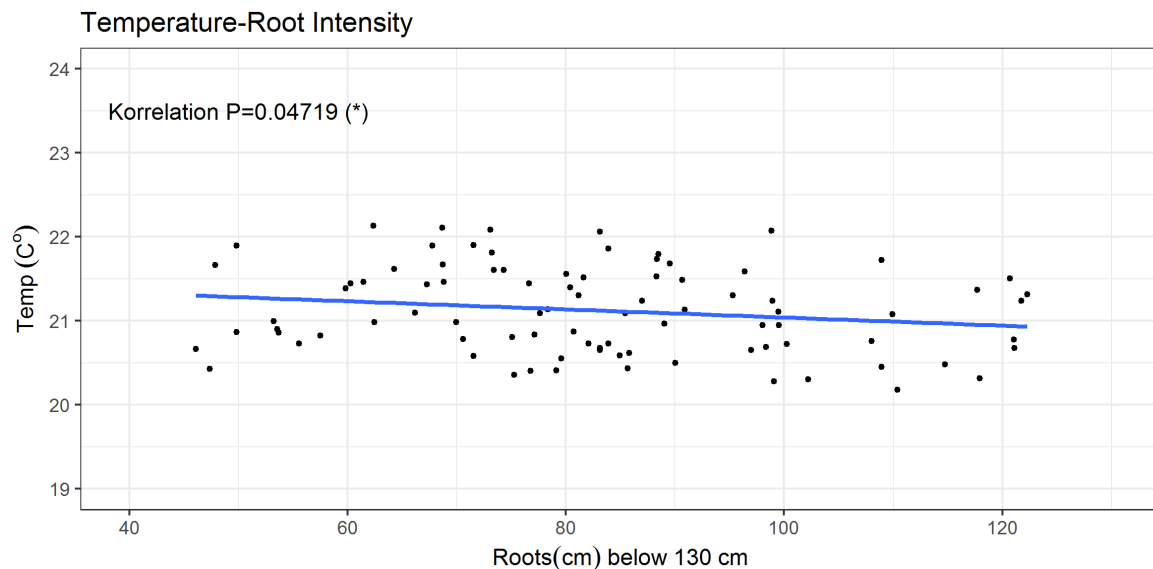
Resultater

Generelt er der nu en effektiv pipeline etableret for flyvninger og dataekstraktion i RadiMax. Det er muligt at lave højt-opløselige mosaikker både termisk og multispektralt, og det er muligt at ekstrahere gennemsnitsværdier for målingerne på række niveau samt i segmenter inden for rækkerne. Derfor vil dronen være et effektivt værktøj til phenotyping i RadiMax. Pt arbejdes der med en effektiv måde at få dronedata videre ind i den statistiske model og koblet til bl.a. roddata, N15/C13 data og biomassedata.

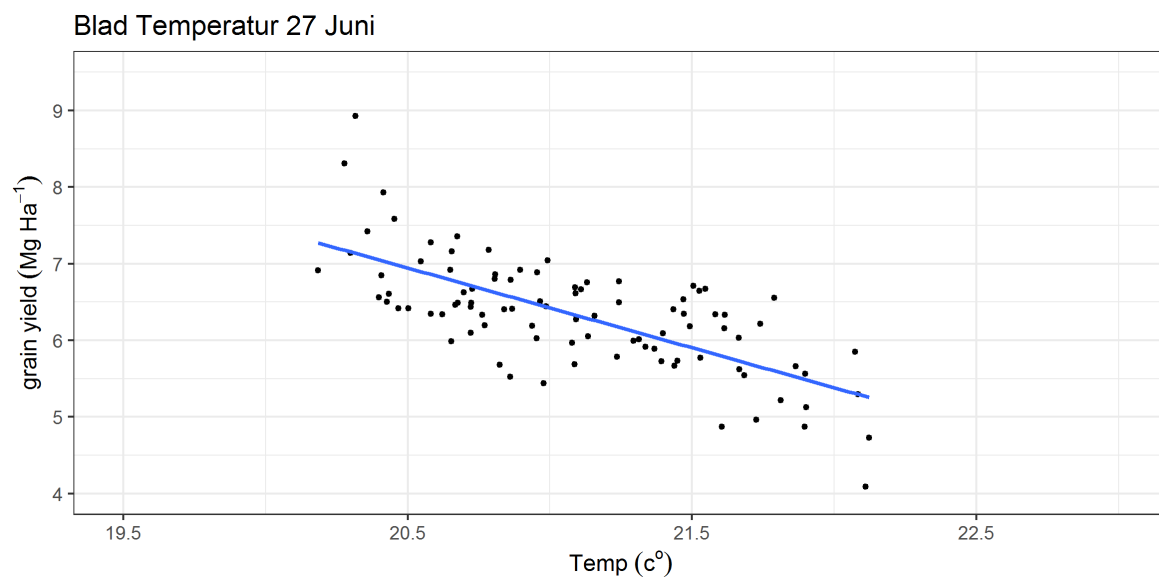
Hvede

Generelt ser det ud til, at termiske billeder fra drone er et brugbart værktøj til at screene for tørkestress. Der ses behandlingseffekter i RadiMax hen over gradienten i undervanding, som ikke er synlige på vegetationsindekset i de første flyvninger.

En statistisk analyse er gennemført af termiske data fra d 27 juni kl 13.30. Planterne var så småt var begyndt at modne ind mod midten af anlægget alt efter sort, så den termiske profil ikke kun blev påvirket af temperaturgradient som følge af vandstress, men også af begyndende afmodning i visse rækker. Resultaterne viste en signifikant effekt af behandling hen over undervandingsgradient. Der blev fundet en svag men dog signifikant sammenhæng mellem roddybde (målt 18. juni) og bladtemperatur (figur 4). Der var en stærkere og signifikant sammenhæng mellem bladtemperatur og høstet kerneudbytte (figur 5). Inddragelse af vegetationsindeks forventes and kunne styrke denne analyse.



Figur 4: Korrelation mellem bladtemperatur d. 27 juni 13.30 (x-akse) og rodintensitet under 130 cm dybde 18 juni (y-akse.).

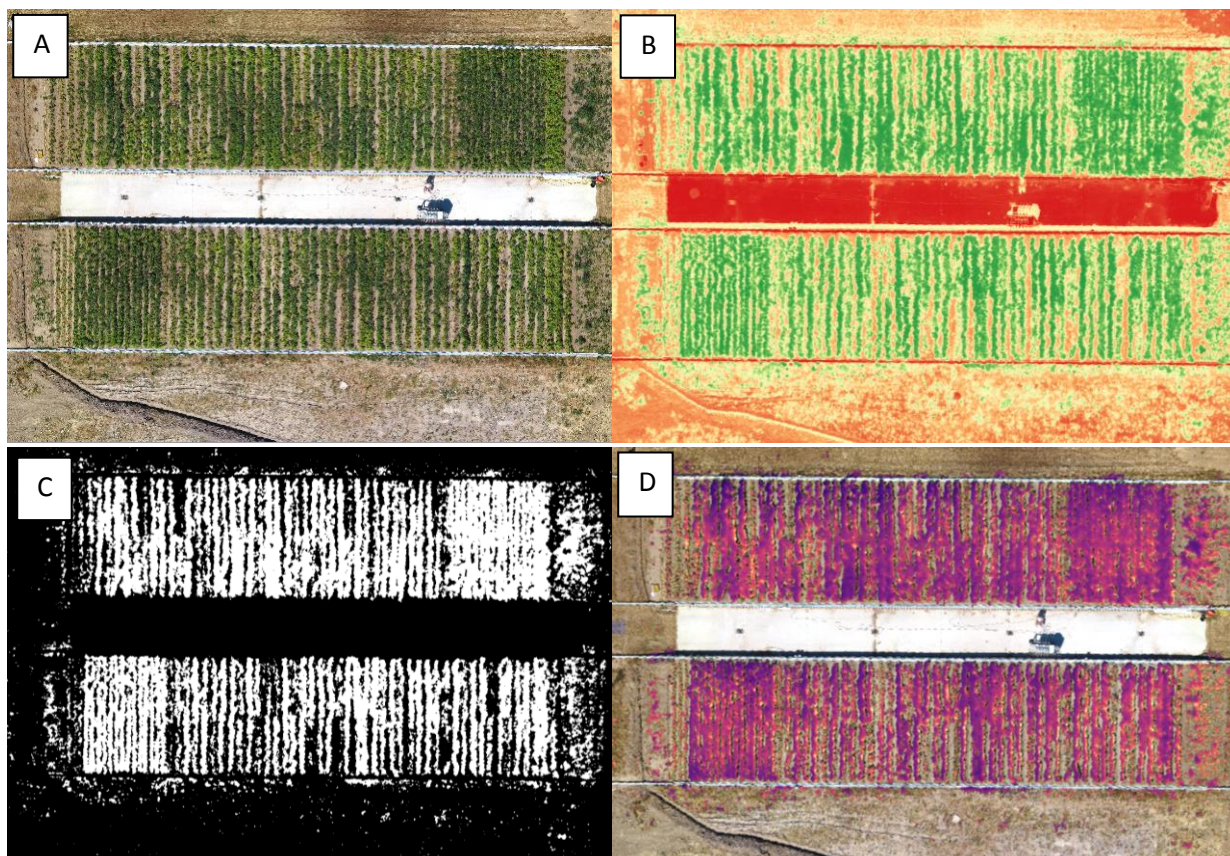


Figur 5: Korrelation mellem bladtemperatur d. 27 juni 13.30 (x-akse) og høstet kerneudbytte ved modenhed (y-akse.)

Generelt viste den genetiske heritabilitet og prædiktionssevne sig fornuftig for vegetationsindekset NDRE ved alle flyvninger og lav for NDVI ved de første flyvninger. Årsagen hertil er, at NDVI er i mætning når afgrøden dækker jorden helt, og først giver respons igen ved nedvisning. NDRE er derimod et indeks, der er følsomt også i de sene vækststadier af afgrøden. For de termiske data var heritabiliteten generelt lav, og der er betydelig målestøj, der skal håndteres. Ydermere var heritabiliteten bedst ved flyvningerne over middag.

Kartofler

Data for flyvninger i kartoflerne er samlet sammen og skal nu undergå analyse. Der foreligger 5 flyvninger over kartoflerne hen over juli måned med hhv. XT kamera og RedEdge M kamera. Som for hveden ses der en behandlingseffekt på den termiske profil. Figur 6 herunder illustrerer nogle af de billedbehandlingsmæssige processer der skal gennemføres, fra segmentering mellem plantemateriale og jord på billederne til ekstrahe- ring af hhv. termiske og multispektrale indeks.



Figur 6: Hhv. farve-, multispektrale (NDVI)- og termiske mosaikker af kartofler i juli måned. A: Mosaik fra farvebilleder i 30 meters højde. B: NDVI mosaik fra multispektrale billeder i 30 meters. C: Binært billeder af plantemateriale (hvide pixels) segmenteret fra Jorden (sorte pixels) via NDVI kort. D: Termisk mosaik fra billeder i 20 meters højde og segmenteret via binært kort, således så temperature kun afspejler plantemateriale og ikke baggrundsjord.

Kartoffeldata vil blive opgjort i første halvdel af 2019 og roddata, målinger på planterne samt dronedata vil blive sammenholdt.

Kommende analyser

For både hveden og kartoflerne skal der analyseres på flere tidspunkter, eftersom der er lavet en lang række flyvninger. Data kan ekstraheres nu, så næste skridt er at få kørt de rette statistiske modeller. Ydermere foreligger der en vigtig opgave i at sammenholde dronedata ikke kun mod roddata og biomassehøst, men også målinger på ^{15}N , $^2\text{H}_2\text{O}$, ^{13}C med mere, som direkte kan anvendes til at validere dronedata og forstå deres biologiske betydning.

Foruden analyse af de direkte målinger, så skal især indekset Water Deficit Index (WDI) (Hoffmann et al., 2016) undersøges nærmere, da dette indeks kombinerer hhv. termisk profil med vegetationsindeks, og dermed kobler vegetationens grønhed og dække med bladtemperaturen.

En udfordring i udnyttelse af potentialet i de termiske billeder vedbliver at være at skelne mellem termisk respons fra bladene og den termiske baggrundsstøj fra jorden – det såkaldte *Mixed Pixel* problem (Jones and Sirault, 2014). Segmenteringsmuligheder skal undersøges nærmere. I kartoflerne udnyttes tillige vegetation som skabelon for at skære jorden væk i de termiske billeder (figur 6)

Referencer

- Araus, J.L., Kefauver, S.C., Zaman-Allah, M., Olsen, M.S., Cairns, J.E., 2018. Translating High-Throughput Phenotyping into Genetic Gain. *Trends Plant Sci.* 23, 451–466. doi:10.1016/J.TPLANTS.2018.02.001
- Hoffmann, H., Jensen, R., Thomsen, A., Nieto, H., Rasmussen, J., Friborg, T., 2016. Crop water stress maps for an entire growing season from visible and thermal UAV imagery. *Biogeosciences* 13, 6545–6563. doi:10.5194/bg-13-6545-2016
- Jones, H., Sirault, X., 2014. Scaling of Thermal Images at Different Spatial Resolution: The Mixed Pixel Problem. *Agronomy* 4, 380–396. doi:10.3390/agronomy4030380
- Prashar, A., Jones, H., 2014. Infra-Red Thermography as a High-Throughput Tool for Field Phenotyping. *Agronomy* 4, 397–417. doi:10.3390/agronomy4030397

Arbejdspakke 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale

Torben Asp, Marta Malinowska, Anja Karine Ruud, Istvan Nagy, Mattia Fois og Stephan Hentrup.

Arbejdspakke 2 udføres af Aarhus Universitet. I arbejds pakken integreres fænotypiske data fra arbejds pakke 1 med forskellige typer af OMICS-data, med henblik på at selekttere for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet i græsser, byg, hvede og kartofler. OMICS er teknologiske metoder til at analysere biologiske systemer. Fælles for teknologierne er, at de er systematiske, avancerede og grundige metoder til at forklare den fænotypiske variation i planter på flere niveauer. Ved at anvende teknologierne i kombination udvikles mere præcise prædiktionsmodeller til at forklare den fænotypiske variation, således at man mere præcist ved hjælp af genomisk selektion, kan selekttere for vand- og kvælstofudnyttelseseffektivitet i nyt forædlingsmateriale.

Plantemateriale

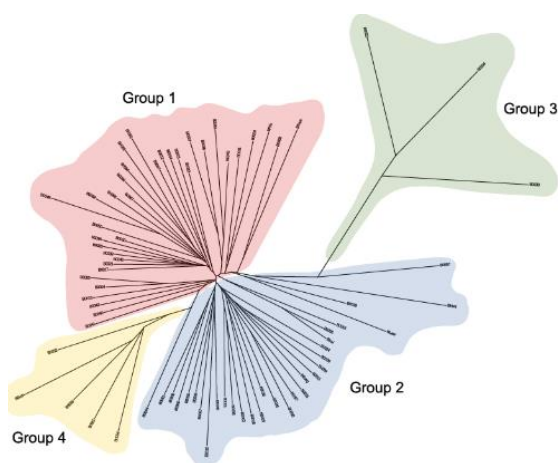
RadiMax-enheden på Københavns Universitet (KU) er en state-of-the-art fænotypningsplatform til undersøgelse af roddybde og tørkestress. Der blev indsamlet bladprøver fra kontrol- og tørkestressede rajgræs og vårbygplanter, dyrket i RadiMax-enheden i 2017.

Vårbyg

Transkriptomanalyse

RNA fra 150 bladprøver af byg blev ekstraheret og sendt til sekventering i oktober 2017, og data fra RNA-sekventeringen ankom i slutningen af januar 2018. Data blev analyseret fra februar frem til data for RNA-sekventeringen af rajgræs ankom i begyndelsen af juni, 2018.

SNP identifikation



Figur 1. Dendrogram baseret på alle SNP'er i transkriptomet. De 75 genotyper samlede sig i fire grupper, baseret på genetisk diversitet.

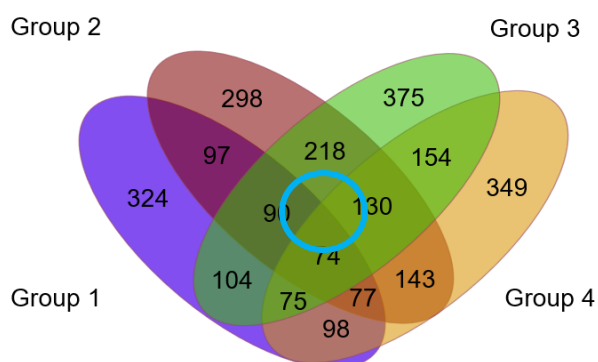
Transkriptomsekvenserne blev alignet til bygreferen-
cegenomet, og ca. 130.000 SNP'er blev identificeret i transkriptomet ved en minor allele frequency (MAF) på $> 0,02$. Da disse SNP'er placeret inden for udtrykte områder i genomet, er de højst sandsynligt kausale, dvs.

genetiske varianter der forklarer ændringer i fænotype. De 75 genotyper samlede sig i fire grupper baseret på genetisk diversitet (Figur 1).

Linjerne fra Nordic Seed og Sejet blev også genotypebestemt med 9 K og 50 K iSelect SNP-chips. Mere end 80 % af de SNP'er, der blev identificeret med disse chips, blev også identificeret ud fra de transkriptom-baserede SNP'er. Da linjerne fra de to forædlingsvirksomheder blev genotypebestemt med forskellige chips (hvilket kun resulterede i overlap ved det mindste markørsæt), var de transkriptom-baserede SNP'er nyttige til at frembringe det mest omfattende sæt af SNP-markører.

Differentiel genekspressionsanalyse

Differentiel genekspressionsanalyse blev udført ved at gruppere forædlingsmaterialet i de fire klynger, der blev identificeret tidligere (Figur 1). Med denne metode blev mere end 800 gener identificeret som differentielt udtrykt (DE) mellem tørke- og kontrolbehandlinger.



Figur 2. Venn diagram viser DE gener, der er unikke eller fælles mellem de fire grupper af byggenotyper. 74 gener var differentielt udtrykt i alle grupper, og der blev identificeret 274 SNP'er (MAF 0.01).

74 gener var differentielt udtrykt i alle de fire grupper (Figur 2). Effekter af SNP'er inden for de differentielt udtrykte gener blev undersøgt med SNPEff. SNPEff analysen viste at 65,8 % af SNP'erne inden for DE-generne var missense, 2,7 % nonsense og 31,5 % silent varianter, hvilket giver et samlet missense/silent forhold på 2,1 %. Funktionel annotering af generne er også blevet udført.

Epigenetik

Epigenetiske variation er af afgørende betydning for planters udvikling og vækst, herunder celleregulering, differentiering og kontrol af transposable elementer. DNA metylering er kilde til fænotypisk plasticitet som reaktion på miljømæssige påvirkninger. Når genetisk diversitet inden for arter er lav, kan den epigenetiske variation blive en betydningsfuld resource til optimering af planters ydeevne i forbindelse med planteforædling.

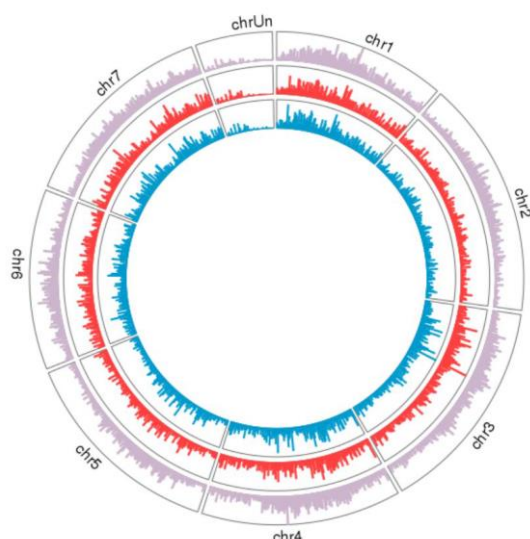
Fremstilling af epiGBS biblioteker og dataanalyse

DNA blev isoleret og anvendt til konstruktion af epiGBS-biblioteker. EpiGBS-metoden kombinerer genotypebestemmelse ved brug af sekventering med bisulfit-konvertering til at frembringe epigenetiske og genomiske

data. Resultatet kan herefter blive underkastet komparative analyser af DNA-metylering og genetisk variation.

DNA-metylering ved cytosin residues

epiGBS biblioteker (bestående af 148 bygprøver) blev forberedt og sendt til sekventering i oktober 2017. Rådata blev modtaget i slutningen af 2017.

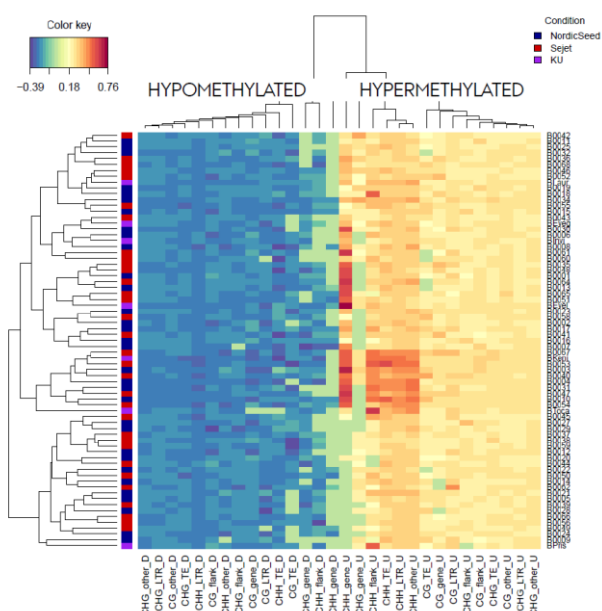


Figur 3. Oversigt over metyleringssmønstre (bins 5×10^6) for cv. "Kenia". Pink – metylering ved cytosin i CHH-kontekst, rød – CHG-kontekst, blå – CG-kontekst.

I planter foregår DNA-metylation ved cytosin residues. CG og CHG er symmetriske og CHH er asymmetrisk (hvor H=A, T eller C). For at sammenfatte metylationsniveau'er på hver plads blev betaværdien beregnet. En betaværdi beregnes som andelen af sekvenser med metylering (resultater med et C på denne position) af et samlet antal sekvenser, der dækker denne position (resultater med et C eller T på denne position). I byg svingede størstedelen af CG-konteksten omkring 100 % metylering, mens de fleste cytosiner i CHH-konteksten viste et lavt (tæt på nul) niveau af metylering.

For at identificere hvilke områder af genomet, der var metyleret, blev resultater med identificerede metyle-rede loci identificeret i byggenomet. Afhængig af konteksten lå mellem 2 og 6 % af de identificerede positioner inden for gener (inkl. exoner, introner og UTR'er), 3-7 % blev kortlagt i regioner med maks. 500bp til det nærmeste gen. Op til 47 % metylering i CHH-konteksten og omkring 25 % (CG og CHG) forgik inden for long terminal repeats (LTR), som er repetitive DNA-sekvenser, der gentages hundred- eller tusindvis af gange. 2-5 % af de metyle-rede loci blev identificeret i forskellige typer af ikke-kodende DNA (Helitroner, Satellit, LINE, SSR).

Den differentielle metylationsanalyse på enkeltlinjeniveau viste et antal hyper- og hypometylerede positioner. Figur 4 viser byglinjer med en stigning i metylationsniveau i CHH-konteksten. Næsten 17000 unikke positioner med differentielt metyleret cytosin forekom inden i og/eller nær ved (500bp) 407 unikke gener.



Figur 4. Differentielle metyleringsloci for hver kontekst. Farverne angiver den gennemsnitlige forskel mellem kontrol og tørkeprøve for hver linje. Blå til gul: hypometylation; gul til rød: hypermetylation.

For at forbinde områder med differentielt metyleret cytosin og differentielt udtrykte gener (DEG) blev posi-

tionererne for 74 gener, der var identificeret som fælles for alle prøver, sammenlignet med metyleringsdataene. Hypermetylation blev identificeret i UTR3' af ét DE-gen.

Variant calling gjorde det muligt at identificere 7014 SNP'er (filtreret med en minor allele frequency på 2 %). Visuel undersøgelse af PCA for SNP-data (figuren er ikke medtaget) viser en gruppering af prøverne baseret på firma/organisation, hvor de første to hovedkomponenter forklarer 63,2 % af variationen.

Multi-OMICS prædiktionsmodeller

Prædiktion af komplekse egenskaber som f.eks. tørkerespons under mark eller semi-field forhold er udfordrende på grund af vekselvirkningen mellem genotype og miljø. Epigenetisk- og transkriptom-data giver værdifuld information om, hvordan genotyperne reagerer på deres miljø. Multi-OMICS prædiktion blev udført for alle kombinationer af OMICS-data (SNP'er, epigenom, transkriptom). Generelt set forklarede de modeller, der omfattede flere typer af OMICS-data end modeller for enkelt-OMICS-data. Afhængigt af egenskab beskrev modellerne op til mellem 72 og 91 % af den fænotypiske varians for overjordiske egenskaber og op til 64 % for maksimal roddybde. Nøjagtigheden af prædiktionen gik fra 0,32 for maksimal roddybde til 0,9 for proteinindhold.

Almindelig rajgræs

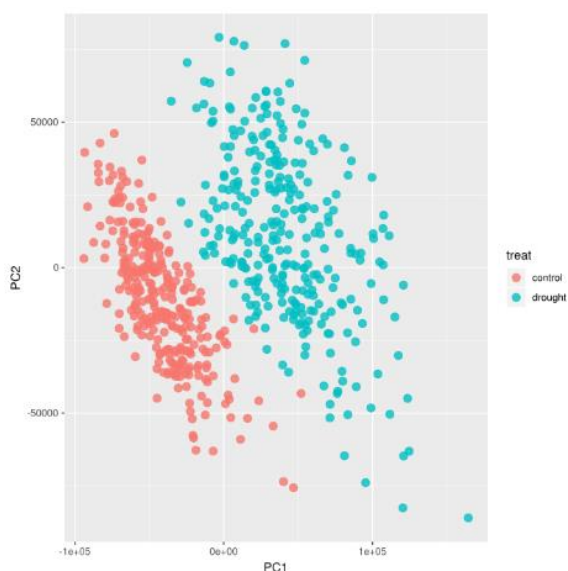
Transkriptomanalyse

Almindelig rajgræs (*Lolium perenne* L.) er den vigtigste foder- og plænegræsart i tempererede klimaer. Tørke er en faktor, der er hæmmende for væksten for de tempererede græsser, der skal være i stand til at overleve og komme sig efter en periode med langvarig tørke.

263 forskellige *L. perenne* F2-familier og kommercielle sorter blev dyrket i RadiMax-enheden. Der blev taget prøver af bladvæv på tidspunktet lige før tredje slæt til brug for DNA- og RNA-ekstraktion.

RNA blev ekstraheret fra begyndelsen af januar til slutningen af februar 2018 og sendt til sekventering hos i begyndelsen af marts. Data fra RNA-Seq ankom i begyndelsen af juni 2018, og analyserne begyndte omgående. RNA-Seq sekvenserne blev alignet til rajgræsreferencegenomet. Normaliserede transkript counts blev beregnet i KALLISTO og anvendt til differentiell ekspressionsanalyse i Sleuth og gen co-ekspressionsanalyse.

Differentiell genekspressionsanalyse



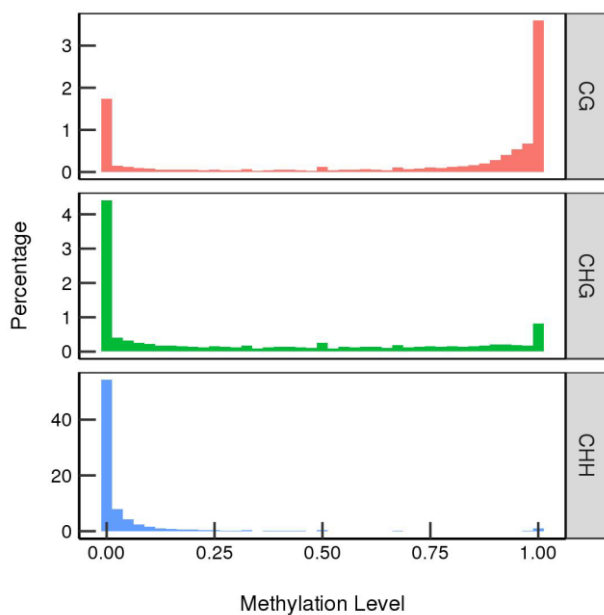
Figur 5. PCA der viser adskillelsen af prøver baseret på behandlingseffekt (tørke og kontrol). Rød er kontrolplanter; turkis er tørkestressede planter.

En differentiell genekspressionsanalyse viste en tydelig effekt af behandlingen (Figur 5), og vi identificerede ca. 400 op- og 400 nedregulerede gener baseret på en FDR < 0.01 og beta 2 (svarende til en 4-foldig ændring).

DNA-metylation ved cytosin residues

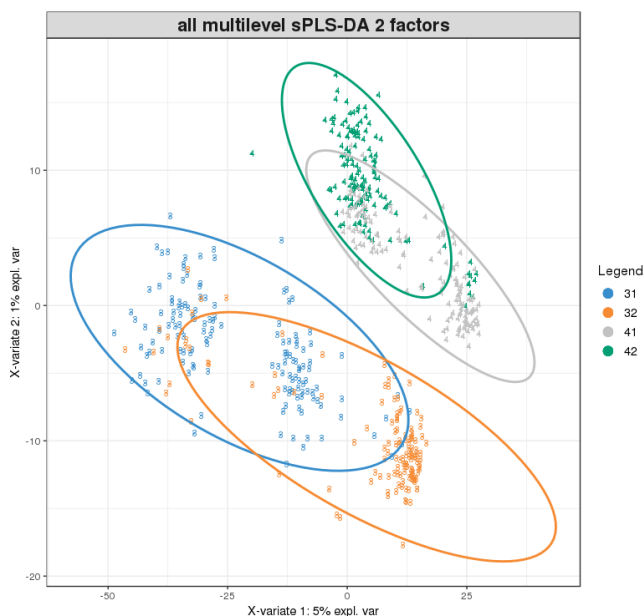
De 300 rajgræspopulationer blev analyseret for forskelle i DNA-metylationsmønstre. DNA blev isoleret fra 600 rajgræsprøver i det sene efterår i 2017. Fire epiGBS-biblioteker blev forberedt i foråret 2018. Rådata blev modtaget i september 2018.

Størstedelen af de unikt metylerede positioner forekom i forbindelse med CHH og viste et lavt metyleringsniveau (Figur 6). Ca. 1 % af de identificerede cytosiner i forbindelse med CHG og 4 % i forbindelse med GC var stærkt metylerede (tæt på eller 100 %).



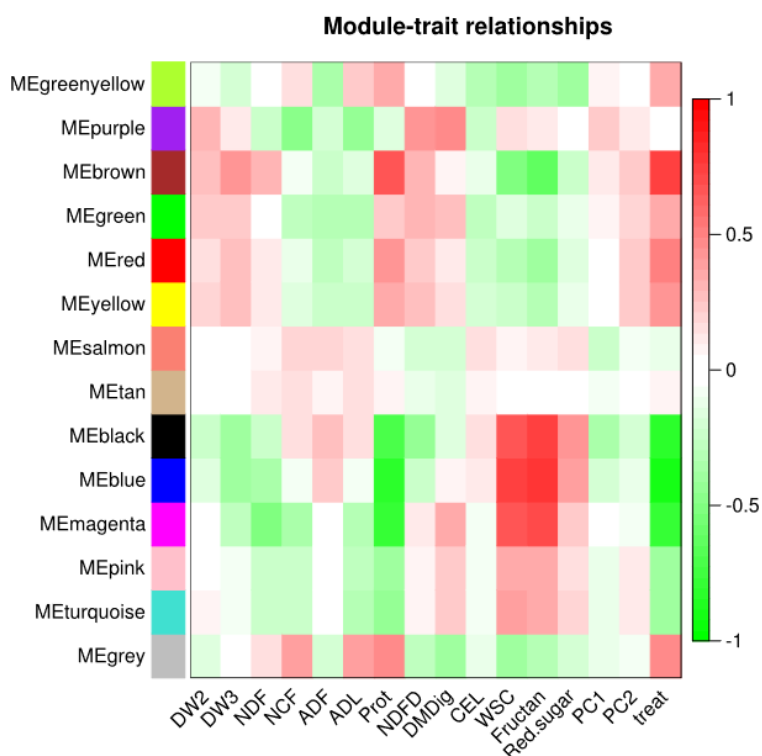
Figur 6. Kontekstafhængig andel af metyleringsniveau (betaværdi).

En 'Multilevel Sparse Partial Least Squares Discriminant'-analyse viste at en gruppering, der var baseret på behandling såvel som på den RadiMax enhed, planterne var blevet dyrket i (Figur 7), hvilket antyder, at metylering er sket som en reaktion på miljøet.



Figur 7. 'Multilevel Sparse Partial Least Squares Discriminant'-analyse muliggør udvælgelse af de mest prædiktive egenskaber i data, som hjælper med til at klassificere prøverne. 31: bed 3 – kontrol; 32: bed 3 – tørke; 41: bed 4 – kontrol; 42: bed 4 – tørke.

2-3 % af de metylerede positioner fandtes i de genflankerende områder, 9-13 % inden for generne. Hypo- og hypermetylerede loci blev identificeret inden i gener og genflankerende områder. Den største stigning (såvel som fald) i metylering forekom i de genflankerende regioner.



Figur 8. Heatmap der viser modul-forbindelser (venstre side/y-akse)-egenskaber (x-akse) for overjordiske egenskaber. Positive korrelationer vises med rød farve, negative korrelationer med grøn farve. Det grå modul indeholder gener, der ikke er knyttet til et co-ekspressionsmodul.

Gen-coekspressionsnetværk kan bruges til at forbinde gener med biologiske processer, og identificere forbindelserne mellem gen netværk, der er 'co-expressed' (repræsenteret ved moduler) og fænotyper. Vi brugte de normaliserede geneekspressionsdata til en vægtet gen co-ekspressionsnetværksanalyse, og generne grupperede sig i 13 moduler. Forbindelserne mellem moduler og de overjordiske fænotyper blev undersøgt (Figur 8). Desuden blev korrelationen mellem individuelle egenskaber og gener inden i moduler, der væsentlig grad var knyttet til interessante egenskaber, undersøgt. Denne metode kan identificere forbindelsen mellem agronomisk interessante egenskaber og biologisk funktion. Denne information kan implementeres i prædiktionsmodeller, hvor der lægges forskellig vægt på loci, afhængigt af viden om deres virkninger.

Prædiktionsmodeller

Genomisk-, genekspressions- og metyleringsdata blev brugt til at prædikere kvalitetsegenskaber i rajgræs ved hjælp af 'multi-layered Bayesian' regressionsanalyser. For tolv overjordiske egenskaber, f.eks. tørvægt, indhold af fordøjeligt tørstof eller protein, og to underjordiske egenskaber (maksimal rodlængde og rodlængde ved dybde under 110 cm målt midt i juli), blev der afprøvet ti prædiktionsmodeller. Den mest komplekse model bestod af behandling (tørke eller kontrol), population og tre OMICS-data: genekspressionsdata fra RNA-seq data, metyleringsdata og SNP-data. Konsekvent for alle 12 overjordiske egenskaber forklarede den mest komplekse model størstedelen af den fænotypiske varians (min. 0,86 for tørvægt og

0,86 for proteinindhold). For de fleste egenskaber (Tabel 1) forklarede genekspressionsprofilerne størstedelen af den fænotypiske varians (op til 0,55 for reducerende sukker). Estimeret arvelighed var lavest for reduceret sukker (0,44) og – med 0,68 – højest for cellulose.

Model	TRT	Line	SNP	MET	DE	Model	Residual	CV
M1	0,18	0,51	-	-	-	0,69	0,31	0,68
M2	0,18	0,22	0,29	-	-	0,69	0,31	0,68
M3	0,18	-	0,50	-	-	0,68	0,32	0,68
M4	0,19	0,54	-	0,09	-	0,78	0,23	0,69
M5	0,17	-	-	0,16	-	0,34	0,68	0,42
M6	0,38	0,35	-	-	0,30	0,83	0,17	0,71
M7	0,44	-	-	-	0,65	0,76	0,24	0,69
M8	0,19	0,22	0,31	0,08	-	0,77	0,24	0,69
M9	0,36	0,18	0,21	-	0,26	0,83	0,17	0,76
M10	0,38	0,18	0,22	0,05	0,25	0,86	0,15	0,75

Tabel 1. Prædiktionsnøjagtighed for ti modeller for tørvægt (3. slæt). TRT – behandling, SNP – enkelt nukleotidpolymorfisme, MET – DNA-metyleringsprofil, DE – genekspressionsprofil, Model – andel af varians forklaret ved modellen, CV – modellens prædiktionsnøjagtighed.

Multi-OMICS model for rodlængde ved dybde under 100 cm målt midt i juli forklarede ca. 0,71 af variansen, og med en nøjagtighed på 0,43. Modellen med den højeste prædiktionsnøjagtighed (CV = 0,46) bestod kun af genekspressionsprofilen og forklarede 0,56 af variansen. Arvelighed af dette rodtegenskab blev estimeret og var på 0,31.

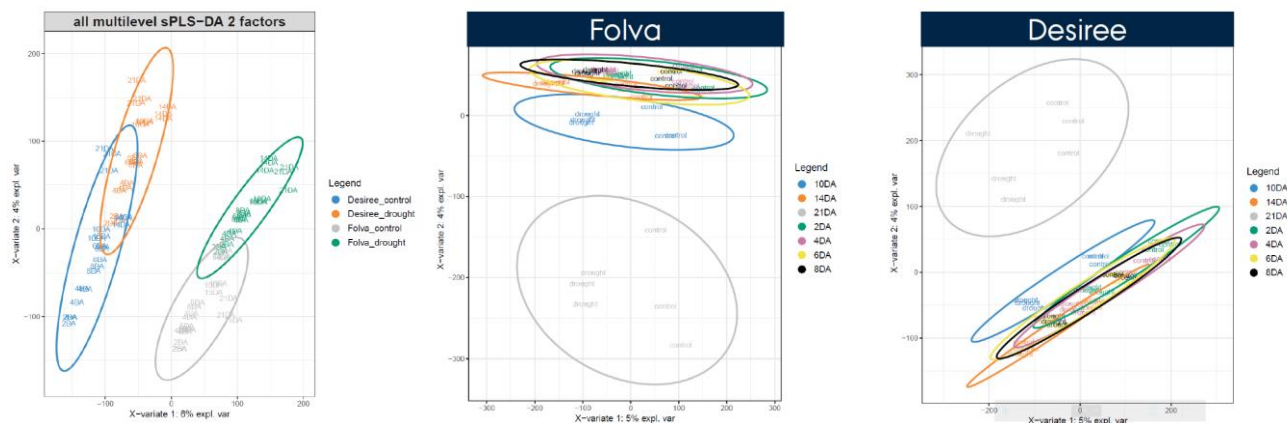
Kartoffel

DNA-metylation ved cytosin residues

Et pottetørsøg blev udført i juni 2017 i et drivhus under kontrollerede forhold med to sorter: Folva og Desiree. Planter på blomstringsstadiet blev udsat for tørkestress i 21 dage (ingen vandtilførsel). Småblade blev indsamlet i tre gentagelser for hver sort på otte tidspunkter i løbet af eksperimentet.

EpiGBS-biblioteker blev forberedt i maj 2018, og sekvensdata blev modtaget i september 2018.

Samlet set for alle prøverne blev der identificeret 300k metylerede positioner, svarende til 0,04 % af hele genomet. 78 % af det var i CHH-kontekst. Ca. 3 % af de metylerede positioner var i de genflankerende områder og op til 7.5 % i generne. Metylerede positioner blev identificeret i 500 gener.



Figur 9. Sammenligning af prøver visende opdeling mellem sorter, behandlinger og høsttidspunkt (tidlig til sen tørke).

En diskriminantanalyse viser fire klynger af linjer baseret på sort og behandling såvel som høsttidspunkt (Figur 9).

Signifikante forskelle i metylering blev identificeret, ikke blot mellem sorter og behandlinger men også over tid med de største forskelle mellem eksperimentets begyndelse og slutning for både kontrolplanter og planter udsat for tørke. Et antal positioner, der var signifikant forskellige med hensyn til deres reaktion på det stress, de blev udsat for, fandtes i 240 gener. Tilsvarende var der 262 gener med forskelle i metylering, da sorterne blev sammenlignet.