

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

Projektrapport 2017 – 2019



Støttet af:

Promilleafgiftsfonden for landbrug

Forord

Nærværende rapport er resultatet af et samarbejde mellem Københavns og Aarhus Universiteter, samt SEGES. SEGES er indehaver af bevillingen og har stået for projektledelsen i samarbejde med Crop Innovation Denmark (CID). Projektet er initieret af Udvalget for Konkurrencedygtig Planteproduktion, der har deltagelse af Bæredygtigt Landbrug, Landbrug & Fødevarer og de danske planteforædlingsfirmaer repræsenteret ved CID. Robusta er støttet af Promilleafgiftsfonden for Landbrug, og arbejdet er udført i årene 2017, 2018 og 2019. Rapporten er den afsluttende rapportering af resultaterne af projektet alle tre år.

Robusta er en del af en stor dansk satsning på forskning i forædling for øget roddybde i landbrugsafgrøderne korn, græs og kartofler. Arbejdet i Robusta er gennemført sideløbende med RadiMax projektet, der er finansieret af Innovationsfonden, og aktiviteterne i Robusta ligger i forlængelse af FAUPE-projektet der gennemførtes i årene 2014 – 2016, ligeledes finansieret af Promilleafgiftsfonden. Det fremgår af rapporten, at Robusta har skabt en række enestående resultater, og været med til at opbygge et rodforskningsanlæg og udvikle metoder, der er helt i verdensklasse. Den fremtidige udnyttelse af disse faciliteter til rodforskning, til gavn for forædling af stresstolerante sorter af korn, græs og kartofler, er sikret gennem bevillinger til to nye projekter, der begge starter i 2020. Det er OptiCrop (Optimerede afgrøder til fremtidens effektive og klimavenlige landbrug) finansieret af Promilleafgiftsfonden og RadiBooster finansieret af Innovationsfonden. Begge projekter har deltagelse af de danske forædlere af korn, græs og kartofler.

Robustas overordnede formål er at sikre danske landmænd adgang til sorter af korn, græs og kartofler, med en bedre udnyttelse af de 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 afdækker den genetiske baggrund for egenskaberne. Projektet skal resultere i ny viden om planters effektive udnyttelse af vand og kvælstof, der kan udnyttes af forædlerne i arbejdet med at forædle nye og bedre sorter, tilpasset de fremtidige vækstbetingelser i et skiftende klima.

Der har løbende gennem projektets gennemførelse været afholdt møder og workshops, hvor resultaterne er præsenteret for de fire danske firmaer der forædler korn, græs og kartofler. Det er Nordic Seed, Sejet Plante-forædling, DLF og Danespo. Det har sikret en effektiv disseminering af projektets resultater, der nu skal implementeres hos planteforædlerne for ultimativt at komme dansk landbrug til gode.

Strukturen af rapporten følger projektet, der bestod af to arbejds pakker: AP1 Fænotypning for rodvækst og rodfunktion og AP2 Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale. AP1 er udført på Københavns Universitet, Højbakkegård i Kristian Thorup-Kristensens forskningsgruppe og AP2 Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale, der er udført på Aarhus Universitet, Flakkebjerg i Torben Asps forskningsgruppe.

December 2019,

Lars Bonde Eriksen, SEGES

Claus Saabye Erichsen, Crop Innovation Denmark

Indhold

Indledning	5
Testimonial fra brugerne/forædlere	6
Sammendrag	7
Arbejdspakke 1. Fænotypning for rodvækst og rodfunktion	7
Arbejdspakke 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale	9
Arbejdspakke 1 – Fænotypning for rodvækst og rodfunktion.....	12
Introduktion	12
Afgrøder forsøgsdesign og metoder i RadiMax anlægget.....	12
Vand og kvælstofeffektivitet.....	12
Vandstress gradient i RadiMax	12
Isotop tracer tilførsel i RadiMax.....	13
Fænotyping – billedanalyse for rodlængdebestemmelse	15
Work flow for billedanalysen	18
Brugertræning.....	20
Drone imaging.....	20
Forslag til optimeringer baseret på 2017-2019 data	21
Data-pipeline.....	21
Optimerede droneflyvninger	22
Eksempel på data ekstraktion og resultater, 2017	23
Data 2018 og 2019	28
Perspektiver.....	28
Markforsøg for N effektivitet.....	29
¹³ C berigelse	29
Udbytte og N optagelse	30
Resultater for Radimax forsøg	33
Vinterhvede 2018 og 2019	33
Græs 2017 og 2019	41
Kartoffelsorter 2018	44
Vårbyg	47
Referencer:	48
Arbejdspakke 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale.....	49
Introduktion	49
Metoder	49
Plantemateriale	49
RNA isolering.....	49

Forberedelse af epiGBS biblioteker og dataanalyse.....	50
Analysér og resultater.....	50
RNAseq analyser	50
Co-expressions analyser med WGCNA	50
Genetiske analyser	52
eQTL analyser	53
Multi-omic prædiktión i byg	54
Epigenetiske analyser	56
Fordeling af metylering i byg- og rajgræs-genomerne	56
Differentielt DNA metylerede områder.....	56
Metylering QTL (methQTL; forholdet mellem genotype og epigenotype) i rajgræs.....	57
Multi-omics prædiktionsmodeller og beregning af forædlingsværdier for rajgræs.....	58
Konklusioner	60
Referencer	60
Publikationsliste.....	61

Indledning

De klimaforandringer vi oplever i øjeblikket, stiller nye krav til de afgrøder der anvendes i planteproduktionen. Samtidigt er Landbruget udfordret af et øget fokus på at produktionen skal ske med mindre påvirkning af klima og miljø. Hertil kommer, at verdens befolkning stiger, uden at det globale landbrugsareal kan udvides. Tilsammen betyder dette, at der er behov for at optimere vores plante-produktion. Udviklingen af nye plantesorter er her et meget vigtigt indsatsområde.

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 i Danmark:

- **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 bliver mildere og fugtigere. Det betyder, at planternes vækstsæson bliver længere.
- **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 ressourceeffektive og som har en større stresstolerance. Udvikling af sorter med bedre rodvækst er et vigtigt bidrag til at opnå afgrøder med større stresstolerance. Udvikling af sorter med dybere rodvækst og med mere effektive rødder - er vigtig for bedre vandudnyttelse i tørre perioder, og for optagelse af dybtliggende N, som ellers er under høj risiko for at tabes ved udvaskning.

Hidtil har direkte forædling for bedre og dybere rodvækst ikke været mulig, fordi der har manglet effektive metoder til at måle rodtæthed og roddybde i jorden, som er anvendelige i et forædlingsprogram. De metoder der findes, er tids- og ressource-krævende, og kun egnede til decideret forskning, der mangler metoder, der gør det muligt at screene et stort antal genotyper (sorter/forædlingskandidater) for rodvækst og -funktion.

RadiMax rodanlægget på Københavns Universitet, er bygget således det er muligt at screene et relativt stort antal genotyper under semi-field forhold, dvs. under forhold der ligner forholdene i marken så meget som muligt. Der kan ikke screenes hele forædlingsprogrammer i RadiMax, men det er muligt at screene et tilstrækkeligt stort antal linjer til, at det i kombination med nye metoder til genomisk forædling er muligt at udnytte viden fra RadiMax til at forædle for øget roddybde og rodeffektivitet. En stor del af arbejdet i Robusta projektet handler om at udvikle og udnytte mulighederne i RadiMax anlægget. Målet har været at gøre det muligt at gennemføre omfattende rodmålinger af høj kvalitet, 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.

Testemonial fra brugerne/forædlere

Alle sejl ind for at løse klimaudfordringerne.

Forædlingsfirmaer såvel som den enkelte landmand har gennem de sidste 10 år oplevet markante effekter af klimaforandringerne. Det gælder alle afgrøder. Derfor har det haft utrolig stor værdi, at der med Robusta er blevet lavet en målrettet indsats for at skubbe forskningen i den rigtige retning. Udfordringerne er enorme, og ét redskab gør det ikke alene. Men Robusta har formået at levere flere resultater og redskaber, som allerede nu bliver omsat i praksis. Her er et par eksempler fra os i forædlingen:

Dybere rødder i hvede (Winnie Füchtbauer, Head of laboratory, Sejet planteforædling):

"Undersøgelser i Robusta har vist, at der er genetiske forskelle imellem hvedesorter både med hensyn til roddybde og rodfunktion, hvilket har givet os grundlaget for fremtidig forædling af tørkeresistente planter med god kvælstofeffektivitet. I arbejdet mod at forbedre hvedens rodudvikling, er det vigtigt at kunne identificere særligt gunstige gener og krydsninger samt udvikle modeller for genomisk selektion. Med data fra Robusta har vi for alvor fået mulighed for at intensivere sortsudviklingen i den retning."

Fremtidens forædling er allerede begyndt og inkluderer kunstig intelligens (Christian Sig Jensen, Head of Biotech, DLF):

"Et af de største bidrag Robusta har ydet til udviklingen af nye afgrøder med dybere rødder er indsatsen omkring automatisk genkendelse af rødder på billeder fra RadiMax anlægget og fra minirhizotronrør i landsforsøgene. Der er tale om billeder med meget stor kompleksitet idet baggrundsdetaljer varierer betydeligt. Fordi Robusta har opnået så overbevisende resultater med kunstig intelligens (AI) er vi nu begyndt at bruge teknologien på andre områder i forædlingen. Helt konkret, bruger vi nu AI til at frasortere multigerm-frø i sukkerroer på baggrund af 3D røntgenfotos. Med AI er præcisionen her gået fra 95% til 99,5%, hvilket giver store besparelser på efterrensning. Samme AI bliver nu skræddersyet til at tælle kimplanter i sukkerroer, og i græsforædlingen arbejdes der hårdt mod at kunne karakterisere enkeltplanter fra dronebilleder med AI. Snart vil termiske dronebilleder af stressede afgrøder, kunne kobles sammen med roddata vi AI. Det bliver det næste store skridt fremad mod robuste afgrøder."

Stærk og fleksibel dansk platform for genom-baseret forædling (Jihad Orabi, Head of Molecular Breeding, Nordic Seed):

"Planteforædling har gennemgået en voldsom udvikling i løbet af de sidste 10 år. Hvor vi før brugte enkelte DNA markører for specifikke egenskaber, producerer vi i dag millioner af datapunkter og sekvenser, der kræver utrolige mængder regnekraft. På Genome.dk er der blevet opbygget et cluster med særligt fokus på planteforædling som faciliterer alt fra sekvensanalyse, download af hele plantegenomer, over ekspressionsanalyse, til genomisk prædiktation. Platformen er uden sidestykke når det gælder, funktionalitet, sikkerhed, support, og videreudvikling og vi har gjort flittigt brug af den siden 2015. I vores forædlingsprogram for rug har vi netop lavet hel-genom analyse på baggrund af RNA sekvenser, hvilket er en forudsætning for det genomiske selektionsprogram vi kører i denne afgrøde. For danske forædlere er det absolut essentielt at have denne nationale cluster-platform."

Sammendrag

Robusta projektet er gennemført i perioden 2017-2019. Projektets formål var at sikre danske landmænd adgang til robuste sorter af korn, græs og kartofler, der er tilpasset fremtidens klima. Udsigten til øgede perioder med tørke stiller krav til afgrødernes rodnet. Derfor har projektets aktiviteter taget udgangspunkt i anvendelsen af et af verdens mest avancerede forskningsanlæg til studier af rodudvikling i landbrugsafgrøder – RadiMax. Projektet har været organiseret i to arbejdsplaner, AP1: Fænotypning for rodvækst og rodfunktion og AP2: Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale. Arbejdsplan 1 er udført på Københavns Universitet og arbejdsplan 2 er udført på Aarhus Universitet, forskningscenter Flakkebjerg.

Arbejdsplan 1. Fænotypning for rodvækst og rodfunktion

Olga Popovic, Tomke Susanne Wacker, Jesper Svendsgaard, Abraham Smith og Kristian Thorup-Kristensen. Københavns Universitet, Institut for Plante- og Miljøvidenskab.

De 5 vigtigste resultater fra arbejdsplan 1:

- 1) **Stor variation i dyb rodvækst:** Dyb rodvækst varierer betydeligt imellem almindelige sorter af de afgrøder vi har testet i RadiMax, hvilket viser at der er en variation vi kan udnytte i forædlingen. Generelt finder vi i hvert fald 20% variation i rodtybde, hvilket hos vinterhvede svarer til ca. 40 cm forskel.
- 2) **Dybe rødder giver mere optagelse af vand og N:** De første med isotoper som sporstoffer viser en god sammenhæng imellem den målte rodvækst og optagelsen af sporstofferne. Optagelsen af ^{15}N placeret i 180 cm dybde under hvede blev optaget i begrænset omfang, og optagelsen var klart relateret til rodtybde. Måling af ^{13}C som påvirkes af tørkestres viste tilsvarende at sorter med dybere rødder havde mindre tørkestres.
- 3) **Effekter i flere arter:** Tilsvarende sortsforskelle er fundet i græsser, kartofler og vårbyg. De har også vist en mindst 20% variation i rodtybde, og isotopstudier har vist at der er en sammenhæng imellem sorter, hvor vi måler dyb rodvækst og deres evne til at optage vand og kvælstof fra dybe jordlag.
- 4) **Tørke, rodvækst og udbytte:** I det tørre år 2018 kunne vi vise en signifikant sammenhæng imellem sorternes rodtybde i RadiMax og deres udbytte i Landsforsøgene. Det giver en stærk indikation på, at vi kan opnå de forbedringer, vi arbejder for i projektet. I de kommende år vil vi udbygge arbejdet med at sammenligne rodvækst målt i RadiMax og udbytte i markforsøg hos både hvede, kartofler og græsser.
- 5) **Effektiv billedanalyse:** Billedanalyse baseret på kunstig intelligens, som gør det muligt at lave en hurtig og præcis rodmåling på de mange tusinde billeder fra RadiMax. Uden den udvikling ville vores rodmålinger i RadiMax være stærkt begrænsede og langsommelige. Den automatiske billedanalyse giver også bedre kvalitet og statistisk sikkerhed, og har gjort det muligt at opnå statistisk sikre resultater hvor den tidligere manuelle rodopgørelse ikke kunne vise forskelle.

Baggrund

Forsøgsarbejdet og udviklingsarbejdet i Robusta projektet handler om at bidrage til forædlingen af mere robuste afgrøder, ved at udvikle afgrøder som er bedre til at udnytte vand og kvælstof fra dybere jordlag. Det vil kunne øge kvælstofudnyttelsen, reducere kvælstofudvaskningen og gøre afgrøderne mere tørketolerante. En stor del af arbejdet er gennemført i RadiMax anlægget, som er udviklet og bygget i projektet RadiMax, som også har gennemført de grundlæggende forsøg i anlægget i samarbejde med planteforædlerne fra Nordic Seed, Sejet, DLF og Danespo. I den del af Robusta arbejdet har vi fokuseret på at udbygge og forbedre de data vi kan få fra forsøgene i RadiMax anlægget. En mindre del af arbejdet er gennemført som markforsøg, for på et mindre antal sorter at studere især N udnyttelse under varierende vækstforhold.

Arbejdet i forbindelse med RadiMax studierne har især handlet om at forbedre mulighederne for at måle afgrødernes vækst og aktivitet. Vi har arbejdet med at udvikle og forbedre metoderne for billedanalyse og isotop tracer teknikker til at kunne bruges på det store antal genotyper der dyrkes i RadiMax.

Billedanalyse til rodmåling

Når vi måler rodvækst på en afgrøde i RadiMax anlægget, opnår vi typisk omkring 30.000 billeder der hurtigt og præcist skal kunne analyseres for rodvækst. Udvikling af neural netværks baseret analyse af rodvækst på de mange billeder har derfor været en vigtig opgave i Robusta, som er lykkedes så godt, at vi nu kan analysere de tusindvis af billeder fra filmning af en afgrøde på under et døgn. Det er et helt afgørende fremskridt fra den manuelle opgørelse vi var nødt til at bruge i starten af projektet. Sammenligninger imellem billedanalyse og manuelle opgørelser viser at den automatiske billedanalyse også giver bedre datakvalitet og større statistisk sikkerhed på analyserne. Med den teknik har vi nu opnået et antal resultater for forskellige afgrøder over årene, hvor vi har kunnet vise statistisk sikre forskelle i dyb rodvækst. I det tørre år 2018 kunne vi vise en signifikant sammenhæng, sådan at de vinterhvedesorter som havde dyb rodvækst i RadiMax forsøget også viste højere udbytte i sortsafprøvningen i Landsforsøgene. Det er et meget lovende resultat, som viser at RadiMax forsøgene giver viden der i praksis kan føre til afgrøder med højere udbytte.

Termografi med billedtagning fra drone

Vi har udviklet billedtagning fra droner til at måle på afgrødens vækst og bladtemperatur. Bladtemperatur er vigtig fordi den viser planternes øjeblikkelige niveau af tørkestress, i form af stigende bladtemperatur. Udviklingen af droneteknikken er foregået i flere projekter, men i Robusta projektet har vi arbejdet specifikt med det termiske kamera, og med at udvikle software og protokol som gør, at vi hurtigt kan komme fra mange billeder taget fra dronen over RadiMax anlægget, til data for bladtemperatur på et større antal målepunkter på hver afgrøderække i RadiMax. Dermed kan vi på få dage fra en overflyvning nå frem til data som kan analyseres statistisk.

Måling af dyb rodaktivitet med isotoper

Vi har udviklet brugen af isotoper til måling af kvælstof og vandudnyttelse i de mange genotyper i RadiMax forsøgene. Kvælstofudnyttelse måles med ^{15}N isotopen, som tilføres med vandingsvandet, vandudnyttelse ved hjælp af tilførsel af deuteriummærket vand ($^2\text{H}_2\text{O}$) og ved hjælp af naturlig berigelse med ^{13}C . Indbygningen af ^{13}C i planterne afhænger af hvor åbne planternes stomata er, og dermed af hvor tørkestressede de er. I de første år lavede vi indledende undersøgelser af værdien af at bruge disse isotoper i anlægget, og for at fastlægge hvordan det bedst gennemføres i praksis, og på baggrund af de resultater er der i 2018 og 2019 gennemført forsøg med ^{15}N og ^{13}C i hele RadiMax anlægget. Resultaterne fra 2018 viser en lovende sammenhæng imellem rodmålinger og isotopmålinger. Det viser dels, at de forskelle i rodvækst vi måler, har en reel betydning for sorternes evne til vand og kvælstof optagelse. Samtidig viser det at isotop resultaterne kan bruges sammen med rodmålingerne til at identificere de genotyper der er mest effektive til at sætte dybe rødder og udnytte vand og N effektivt, så forædlerne kan bruge den information i deres forædling.

Kombination af resultater fra forsøgene

Med kombinationen af rodmålingerne, dronebaserede målinger af afgrøden over jorden og målinger på de forskellige isotoper, forventer vi at kunne øge sikkerheden i de data vi opnår for de forskellige genotyper i RadiMax anlægget. Alle de enkelte metoder er behæftet med en betydelig usikkerhed, men de bidrager alle med information om sorternes evne til dyb rodvækst og funktion. Ved at kombinere den information de giver, forventer vi at kunne opnå en mere sikker bestemmelse af sorternes dybe rodvækst og evne til vand- og kvælstofudnyttelse. Resultaterne for isotopanalyse for 2019 er lige modtaget fra UC Davies, og vil nu indgå i den samlede analyse for forskelle i dyb rodvækst.

Markforsøg til studier af N effektivitet

Markforsøgene har givet flere interessante resultater, men de har også været ramt af flere udfordringer. Planen var at arbejde med vinterhvede, men bevillingstidspunktet gjorde det ikke muligt at etablere vinterhvede til første års forsøg, så i 2017 lavede vi forsøg med vårbygssorter. Selvom sortsforskelle i proteinindhold og N udnyttelse er mindre hos vårbyg, fandt vi i 2017 sikre forskelle i N udnyttelse imellem 8 vårbygssorter, på tværs af 5 forsøgslokaliteter. Vi fandt samtidig, at ved måling af en række enzymaktiviteter (fysiologisk fænotypning) på prøver af faneblade ved blomstring at nogen enzymaktiviteter var tæt knyttet til det senere N indhold i kernerne.

I både 2018 og 2019 har vi dyrket vinterhvede som planlagt. Da 2018 forsøget skulle sås i efteråret 2017, havde vi dog kun meget foreløbige roddata klar fra RadiMax anlægget da vi skulle vælge sorter og etablere forsøgene, så det var først i 2019 at vi helt kunne basere sortsvalget i markforsøgene på RadiMax roddata. I 2018 betød tørken at udbyttelniveauet blev lavt, og flere af forsøgene blev skadet af tørken. Forsøgene i 2019 er vel gennemførte, og resultaterne for både N optagelse og ^{13}C er lige modtaget fra analyse (UC Davies isotoplaboratorie), så resultaterne nu kan analyseres.

I 2019 satte vi minirhizotroner i hvedeforsøgene på de 4 lokaliteter. Desværre viste det sig vanskeligt at bruge det kameraudstyr vi normalt anvender til rodforskningen på KU på de forskellige markforsøg. Udstyret er for kompliceret og sårbart til standard brug på en række marklokaliteter, men vi har opnået en del optagelser som nu er ved at blive analyseret, så vi kan sammenligne resultaterne med de resultater vi har for de samme genotyper fra RadiMax.

Arbejdspakke 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale

Marta Malinowska, Anja Karine Ruud, Istvan Nagy, Mattia Fois og Torben Asp. Aarhus Universitet, Institut for Molekylærbiologi og Genetik - Afgrødegenetik og Bioteknologi

De 5 vigtigste resultater fra arbejdsopgave 2

- 1) **Tørkestressgener er identificeret:** Ved dataanalyse er identificeret gener og genetiske varianter i gener, som spiller en rolle i genotypernes præstation under tørkestress. Denne genetiske information kan bruges i udvælgelsen af nye sorter af forædlerne.

- 2) **Strategi for mere nøjagtig forædling:** Der er udviklet mere nøjagtige modeller, der forklarer den fænotypiske variation, og derigennem øger præcisionen i genomisk selektion for bedre udnyttelse af vand og kvælstof. Modellerne er til gavn for forædlerne i deres arbejde og fremdrift med genomisk selektion. Modellerne er udviklet for
 - a. seks agronomiske egenskaber i byg
 - b. seksten agronomiske egenskaber i rajgræs
- 3) **Udvalgt linjer/sorter med stor forædlingsværdi:** Der er identificeret og udvalgt forædlingsmateriale med den største forædlingsværdi, så forædlingsfirmaerne kan producere fremtidens robuste sorter til gavn for de danske landmænd. Forædlingsværdierne er sendt til firmaerne, så de kan bruge resultaterne til udvikling af nye sorter.
- 4) **Genetisk variation muliggør smartere forædling:** Der er opnået viden om den genetiske variation, hvilket kan bruges til at forbedre analysemodeller til mere nøjagtig prædiktions af forædlingsværdier (GEBV). Information giver ligeledes forædlerne viden om sorternes oprindelse, og informationerne kan bidrage til at forbedre forædlingsprogrammer.
- 5) **Information om rodudvikling opnået:** Der er opnået viden om de biologiske processer, der ligger til grund for planternes rodudvikling og fænotypiske plasticitet. Dette er vigtig information i det videre arbejde mod robuste sorter med god rodudvikling.

Baggrund

I fremtiden vil danske landbrugsafgrøder opleve flere og længere perioder med ekstremt vejr, f.eks. tørke. Det er derfor nødvendigt at identificere planter som er mere robuste for tørkestress, og som effektivt kan udnytte de tilgængelige ressourcer også under pressede forhold. Forædlere benytter allerede genetisk information til at selekttere forædlingsmaterialet, som markør-assisteret selektion (MAS) og genomisk selektion (GS). Men egenskaber knyttet til stresstolerance har oftest en kompleks genetisk baggrund, med mange gener involveret. Dette gør det vanskelig at identificere genetiske markører med tilstrækkelig præcision til at bruge i forædlingen, eller prædikere de bedste forædlingslinjer.

Forholdet mellem fænotype og genotype er komplekst og inkluderer biologiske processer som ikke kan opfanges direkte fra DNA-sekvensen. Et eksempel er epistatiske effekter som skyldes interaktioner mellem alleler ved to eller flere loci. Disse effekter er vanskelige at estimere og bliver normalt ikke inkluderet i genetiske prædiktionsmodeller. Det er derfor meningsfyldt at inkludere flere lag af 'omics' data, som for eksempel gen-ekspression eller DNA-metylering, i prædiktionsmodeller. Disse regulatoriske lag kan forklare interaktioner mellem loci og mellem genotype og miljø, og øge vores evne til at prædikere fænotypisk variation.

I AP2 har vi arbejdet med at integrere genekspressions- og metyleringsdata i relation til genetisk information, og kvalitets- og forædlingsrelaterede egenskaber. Vi har arbejdet med byg (*Hordeum vulgare*) og rajgræs (*Lolium perenne*). Afgrøderne blev dyrket i Radimax-anlægget i 2017, hvor de blev udsat for tørkestress afhængig af hvor i faciliteten de voksede (se tidligere rapporter).

Prædiktions af fænotypisk variation

Vi har udviklet en strategi for mere nøjagtig prædiktions af fænotypisk variation, ved at inkludere direkte information fra genekspressionsdata og DNA-metyleringsdata i Baysian prædiktionsmodeller. Vi har også vist at genetisk variation der forklarer forskelligheder i for eksempel genekspression, kan bruges til at yderligere informere analysemodeller for mere nøjagtig prædiktions af forædlingsværdier (GEBV). I tillæg har vi gennem vores analyser opnået viden om de biologiske processer som ligger til grund for planternes fænotypiske plasticitet.

Nye strategier til planteforædlingen

I bestræbelserne på at udvikle strategier til fuld udnyttelse af omics-datasæt i planteforædling, undersøgte vi metylomet i byg og rajgræs. Vi udviklede WellMeth, en komplet RRBS analyse-pipeline til arter med et referencegenom. Forberedelse af epiGBS bibliotek og principper for barcode design er fra epiGBS pipelinen (van Gurp et al., 2016).

I vores undersøgelse har vi undersøgt DNA metylering for byg linjer og rajgræs populationer og herigennem udviklet en metode til at karakterisere genotype og miljøinteraktioner. Vi har også udviklet en metode til differentiell metyleringsanalyse såvel som methylering QTL-analyser. Eigenetisk variation som er under genetisk kontrol kan bidrage til forbedret selektion i forædlingsprogrammer, medens miljømæssigt påførte epigenetiske variationer vil være i stand til at bidrage til fænotypisk plasticitet. Resultaterne, der er opnået ved hjælp af Bayesian Generalized Linear Regression (BGLR), har fået os til at tro, at en kombination af forskellige typer af omics-datasæt kan forbedre prædiktions af forskellige komplekse egenskaber i byg og rajgræs. Dette kan bruges af forædlingsfirmaerne til at udvikle fremtidens robuste afgrøder.

Arbejdspakke 1 – Fænotypning for rodvækst og rodfunktion

Olga Popovic, Tomke Susanne Wacker, Jesper Svensgaard, Abraham Smith og Kristian Thorup-Kristensen
Københavns Universitet.

Introduktion

Forsøgsarbejdet og udviklingsarbejdet i Robusta projektet handler om at bidrage til forædlingen af mere robuste afgrøder, ved at udvikle afgrøder som er bedre til at udnytte vand og kvælstof fra dybere jordlag. Det vil kunne øge kvælstofudnyttelsen, reducere kvælstofudvaskningen og gøre afgrøderne mere tørketolerante. En stor del af arbejdet er gennemført i RadiMax anlægget, som er udviklet og bygget i projektet RadiMax, som også har gennemført de grundlæggende forsøg i anlægget i samarbejde med planteforædlerne fra Nordic Seed, Sejet, DLF og Danespo. I den del af Robusta arbejdet har vi fokuseret på at udbygge og forbedre de data vi kan få fra forsøgene i RadiMax anlægget. En mindre del af arbejdet er gennemført som markforsøg, for på et mindre antal sorter at studere især N udnyttelse under varierende vækstforhold.

Arbejdet i forbindelse med RadiMax studierne har især handlet om at forbedre mulighederne for at måle afgrødernes vækst og aktivitet. Vi har arbejdet med at udvikle og forbedre metoderne for billedanalyse og isotop tracer teknikker til at kunne bruges på det store antal genotyper der dyrkes i RadiMax.

Afgrøder forsøgsdesign og metoder i RadiMax anlægget

Igennem de 3 års Robusta projekt, er der gennemført forsøg med 4 forskellige afgrøder i RadiMax anlægget, vinterhvede, vårbyg, græsser og kartofler (Tabel 1).

Tabel 1. Afgrøder i RadiMax faciliteten igennem den 3-årige periode (2017-2019) og forsøgsdesign

År	Afgrøde	Bed	Design
2017	Vårbyg	1 og 2	Split design
	Rajgræs	3 og 4	
2018	Vinterhvede	1 og 2	Split design
	Kartoffel	3 og 4	
2019	Vinterhvede	1 og 2	Hel række plots
	Græsser	3 og 4	

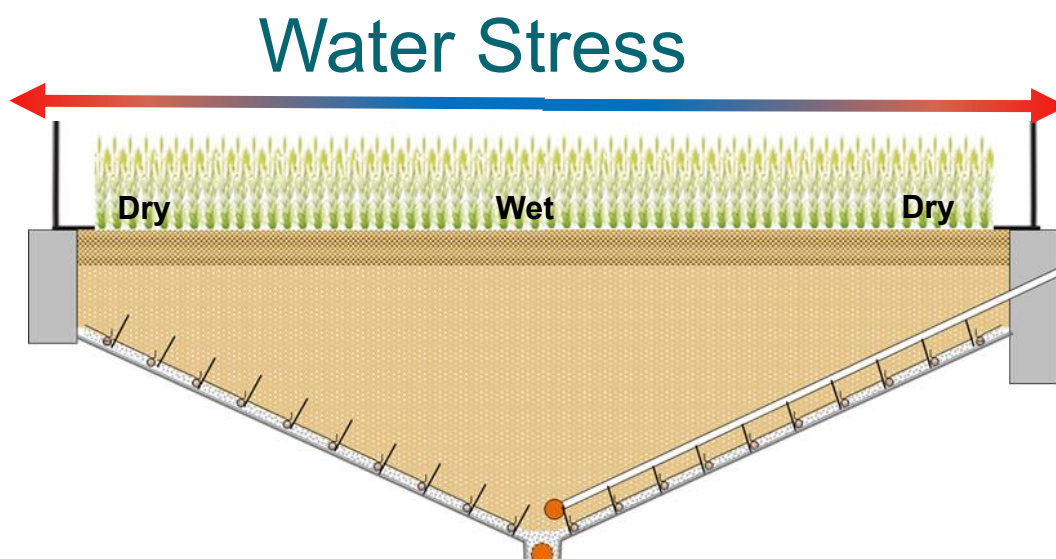
Gennem de første 2 år af projektet (2017 og 2018) blev alle forsøgene gennemført i et split design, hvor der blev dyrket en sort i den ene halvdel af rækken over minirhizotronerne, og en anden sort i den anden halvdel af rækken. Fra 2019 er den samme sort sået igennem hele rækken, for at forenkle så-arbejdet.

Vand og kvælstofeffektivitet

Vandstress gradient i RadiMax

I RadiMax anlægget skabes der en vandstress-gradient med et undervandingssystem i stigende dybde under rækkerne ind imod midten af anlægget, for på den måde at bidrage til screeningen af sorternes evne til dyb rodvækst og vandudnyttelse. Resultaterne fra 2017 og 2018 viste at der i begge år blev opnået en klart signifikant virkning af tørkegradienten på vækst og udbytte, men der blev ikke fundet nogen vekselvirkning med sorterne, og dermed blev der ikke på den måde identificeret genotyper som var bedre til at udnytte vand fra

dybe jordlag end andre. En mulig årsag kan være den måde tørkegradienten blev skabt på. Der blev skabt tørre forhold ved at holde regnen væk med anlæggets mobile overdækning, mens der blev tilført vand i stigende dybde ved hjælp af undervanding. Dermed blev overjorden tørret ud, både i den tørre og den velvandede del af anlægget, og den tørre jord har reduceret planternes adgang til at optage næringsstoffer fra overjorden. I 2019 blev strategien derfor ændret, så afgrøderne fik lov at få regn mens der ikke blev tilført undervanding. Dermed blev der stadig skabt en tørkegradient, men nu omvendt, fordi planterne i midten havde en dybere jordprofil at udnytte vand fra (Figur 1), men uden at overjorden blev så kraftigt udtørret. Græsforsøget blev også vandet ovenfra efter de enkelte slet.



Figur 1. Tørkegradienten som effekt af dybden af Jorden som blev skabt i forsøget i 2019.

Med den omvendte tørkegradient i 2019 blev høststrategien også ændret, i forhold til de to foregående år, så den tørkestressede prøve blev høstet ud imod kanterne af anlægget, mens de bedre vandforsynede prøver blev høstet ind imod midten af anlægget (Figur 2).



Figur 2. Prøvetagning i 2019.

Isotop tracer tilførsel i RadiMax

I alle 3 år blev der lavet forsøg med tilførsel af isotop-tracere (^{15}N and $^2\text{H}_2\text{O}$) for at måle optagelse af vand og kvælstof fra dybe jordlag. ^{15}N tracer blev tilført som $\text{Ca}(^{15}\text{NO}_3)_2$ og deuterium mærket vand ($^2\text{H}_2\text{O}$), opløst i regnvand, og begge tilført igennem drypslanger placeret i bunden af anlægget (Figur 3). I 2017 og nogen af de senere forsøg er isotop tracere tilført til et mindre antal linjer (KU-linjerne), hvor de er tilført i stigende dybde langs minirhizotroenerne. Disse forsøg havde til formål at undersøge om og hvordan vi kunne bruge isotop tracere til at studere dyb rodvækst. Ud fra de forsøg har vi kunnet fastslå mængder af tracer vi skulle bruge. I 2017 var formålet især at teste om vi kunne opnå gode resultater med isotopmærkning, og hvordan, og isotoper blev kun tilført til den mindre del af anlægget hvor der er etableret drypslanger langs med minirhizotroenerne, langs skråningen. Fra 2018 blev ^{15}N tilført med en af slangerne fra undervandingssystemet, sådan at der blev tildelt isotop tracer til alle planterækker, i begge sider af anlægget, i en fast dybde (Tabel 2).



Figur 3. Setup til tilførsel af ^{15}N via drypslange fra undervandingsanlægget, og illustration af fordelingen af den tilførte isotoptracer over hele anlægget i 2018 og 2019.

I 2018 blev ^{15}N tilført til alle linjer i én dybde, mens $^2\text{H}_2\text{O}$ kun blev tilført til 30 linjer hver afgrøde, hvor tilførslen fulgte skråningen i stigende dybde. I 2019 blev ^{15}N og $^2\text{H}_2\text{O}$ tilført samtidig til alle hvedelinjer 180 cm dybde (Tabel 2).

Tabel 2. Tildeling af ^{15}N og $^2\text{H}_2\text{O}$ injektion in 2017, 2018 and 2019.

År	Afgrøde	^{15}N injektion	$^2\text{H}_2\text{O}$ injektion
2017	Vårbyg	Langs skråning	Langs skråning
	Rajgræs	Langs skråning	Langs skråning
2018	Vinterhvede	180 cm	Langs skråning
	Kartoffel	140 cm	Langs skråning
2019	Vinterhvede	180 cm	180 cm
	Græsser	Langs skråning	Langs skråning

Ved tilførslen igennem undervandingssystemet til alle linjer, blev dybden for ^{15}N tilførsel valgt i et forsøg på at tilføre traceren til den dybeste del af rodsystemet. Vi brugte data fra vandsensorer i forskellige dybder i RadiMax, der viser hvor dybt planterne optager vand, sammen med en første analyse af billeder fra rodfilmning for at vide ca. hvor dybt rødderne er nået ned. Samlet set førte det til at vi valgte at tilføre ^{15}N med en drypslange fra undervandingssystemet i ca. 180 cm dybde for hvede og 140 cm for kartoffel (Tabel 2). Ved høst tog vi prøver i et 30 cm langt stykke af hvederækkerne over den drypslange hvor ^{15}N blev tilført, og i kartofler, tog vi prøver fra to planter over tilførselslinjen. Prøverne blev tørret, formalet og sendt til UC Davies isotoplaboratorium for analyse for både ^{15}N og ^{13}C .

Ved de indledende forsøg med tilførsel langs skråningen, blev der tilført vand med isotoptracere igennem tryk-kompenserede drypslanger installeret langs 15 af minirhizotronerne i hvert af de 4 del-anlæg i RadiMax. Det betød at tracerne blev tilført i stigende dybde langs hver af de 15 planterækker, så der ved prøvetagning på flere punkter langs rækken kunne måles på traceroptagelse fra stigende dybde.

Ved tilførsel af deuterium mærket vand $^2\text{H}_2\text{O}$, blev der taget prøver 5 steder langs rækkerne, så der kunne måles optag fra 5 dybder. Ved prøvetagning 3 dage efter tilførsel af tracer, blev der placeret plastikposer over en hvedeplante eller en kartoffelplante til opsamling af transpirationsvand (Figur 4). Efter en time blev poserne taget af, og kondensvand der havde samlet sig i poserne fra planternes transpiration blev opsamlet til analyse. I 2018 blev der yderligere opsamlet transpirationsvand fra 3 hvedelinjer og 3 kartoffellinjer ved dag 0, 1, 4 og 7 efter tilførsel af tracer, for at følge vandtracer optagelsen over tid identificere det bedste tidspunkt for tilførsel. Vandprøverne blev filtreret og analyseret med Water Isotope Analyzer for isotop ratio.

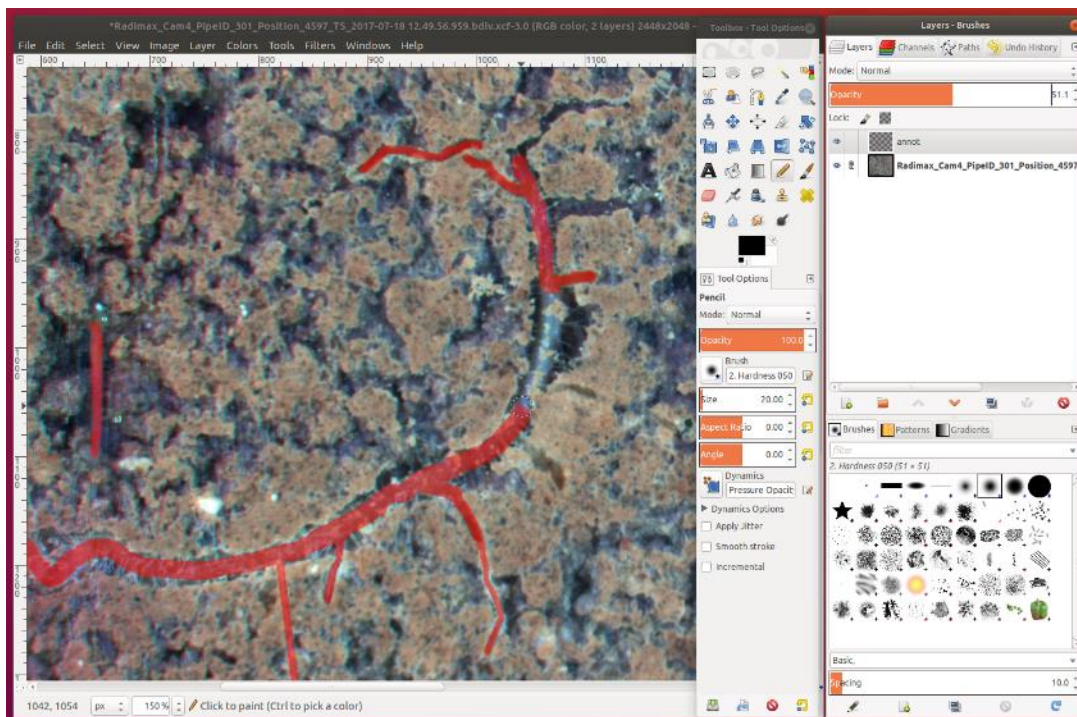


Figur 4. Opsamling af transpirations vand for $^2\text{H}_2\text{O}$ analyse, fra planter med rødder i 5 forskellige dybder, 3 dage efter injektion i 2018.

Fænotyping – billedanalyse for rodlængdebestemmelse

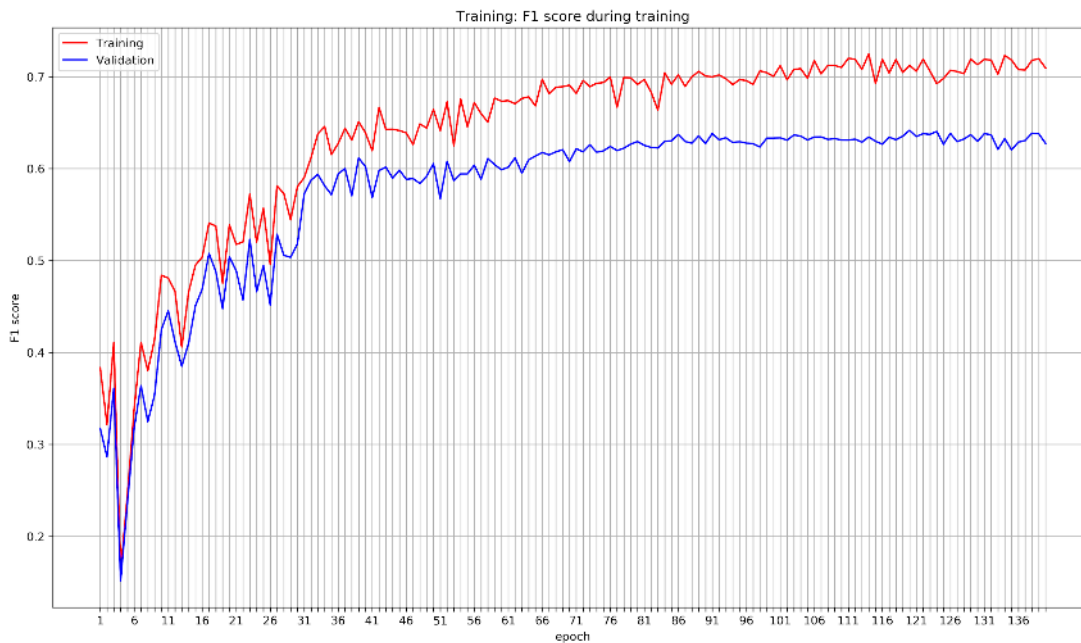
Et "convolutional neural network" (CNN) til billedanalyse blev udviklet for at overkomme specifikke problemer der opstod i analysen af rødder på rodbillederne 2017, samt at få bedre kvalitet af data og gøre processen mere strømlignet. CNN's er en "deep learning" metode der er inspireret af hvordan den Visuelle korteks virker på mennesker. "Deep learning" er lige nu den mest avancerede og komplekse metode til at analysere visuel information.

Et af de første skridt man tager når man skal lave et CNN er, at annotere relevante dele af udvalgte billeder. Disse billeder bliver valgt igennem en proces hvor man bruger scripts til at finde tilfældige billeder, som man bruger i programmet GIMP (Figur 5). Her mærker man så de dele af billedet man er interesseret i at undersøge. Informationen givet i GIMP bliver ved hjælp af scripts overført til CNN'et, hvorefter den kan blive brugt til at træne modellen. På denne måde kan man træne forskellige modeller til analyse af rødder af forskellige afgrødetyper. CNN'et og den måde det bliver trænet på, for brug i Radimax, er baseret på en tidligere beskrevet metode: <https://arxiv.org/abs/1902.11050>

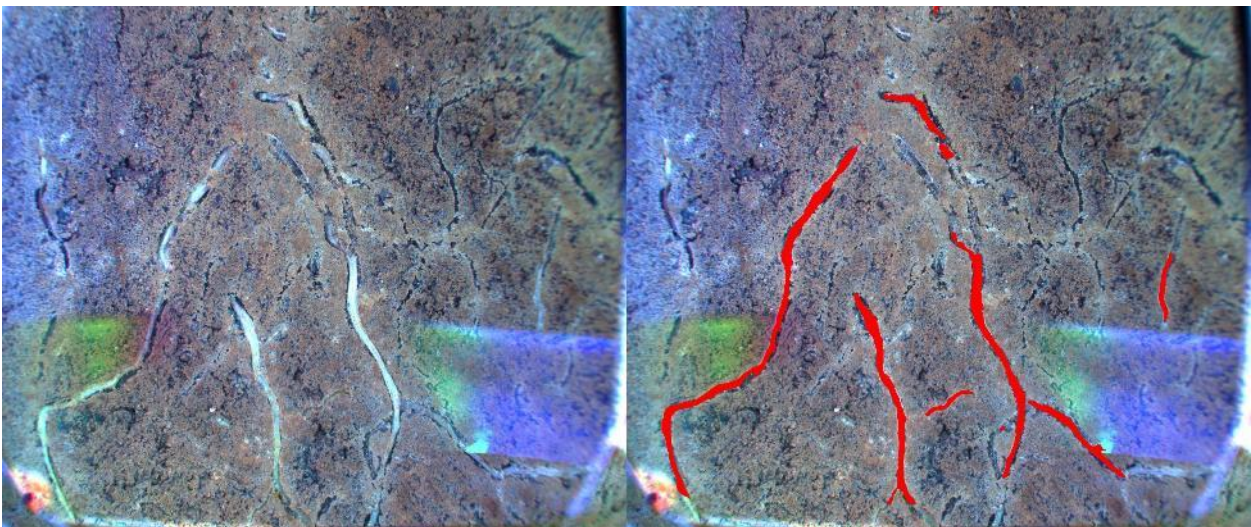


Figur 5. Rodbillede bliver annoteret for relevant information i programmet GIMP hvilket efterfølgende bliver brugt til træning af CNN'et.

Billederne bliver delt op i et trænings- og et validerings-sæt. Træningssættet er det sæt CNN'et lærer af, og valideringssættet bruges til at validere at netværket virker. Når man træner CNN'er kan der opstå det problem der kaldes "overfitting". Dette sker når modellen "husker" træningsbillederne for godt på en måde der gør, at dens ydeevne på andet data, som ikke bliver brugt i træning bliver dårligere. For at forhindre "overfitting", blev der brugt en metode der kaldes "early stopping". Det er her validations sættet kommer ind, da det viser hvor godt modellen virker på validationssættet (Figur 6), så man stopper den videre træning af CNN'et. For flere af modellerne blev der lavet unikke modeller, for at få den bedste ydeevne. Til dette formål blev der brugt en "learning rate schedule" og en så kaldt "hyper-parameter tuning".

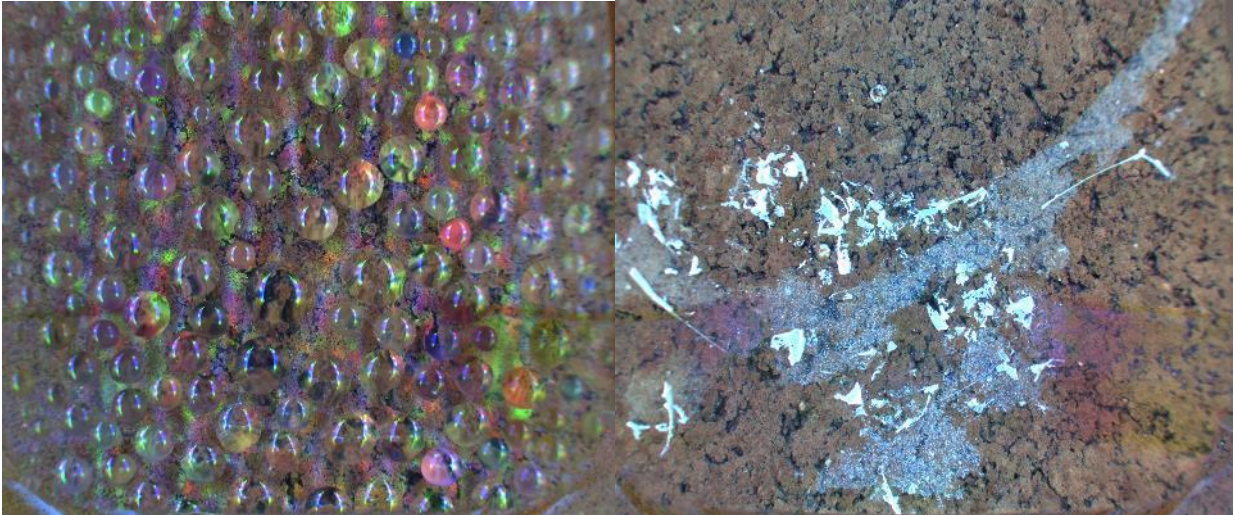


Figur 6. Data der viser den løbende forbedring ved yderligere træning af CNN, og de gradvise fremskridt der sker i løbet af træningen af modellen på Radimax data. X-aksen viser hvor mange træningsforløb af CNN systemet der er lavet, og Y-aksen hvor god sikkerheden i analysen så er blevet. Efter 30-40 træningsforløb er der opnået en høj sikkerhed, og der opnås meget lille forbedring ved at fortsætte træningen.



Figur 7: Genereret billede fra et RadiMax datasæt der viser rødde, og til højre rødde der er identificeret af CNN'et vist i rødt.

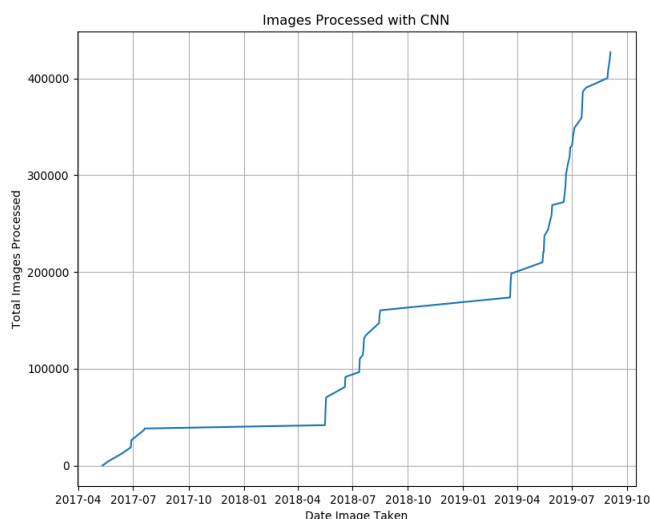
De såkaldte komposit billeder viser hvilket områder (i rødt) som netværket identificerer som rødde. I Figur 7 kan man se sådan et billede opstillet ved siden af det oprindelige billede. Disse billeder er udviklet så forskere der arbejder med RadiMax data kan kontrollere om kvaliteten af analysen er i orden, om der er opstået fejl eller der skal gennemføres yderligere træning af modellen.



Figur 8: Radimax billeder der indeholder dug og plastic, hvilket illustrerer nogle af de problemer der har været med den tidligere brugte analysemetode.

Figur 8 viser eksempler på de udfordringer der findes på nogen af rodbillederne fra RadiMax, som nødvendiggjorde udvikling af den nye CNN baserede metode at analysere rodbilleder på. For at sikre at CNN'et kunne overkomme sådanne billeder blev et "problematisk" sæt af billeder udvalgt, som udelukkende indeholdt udfordrende situationer. Dette har gjort CNN'et stærkere i forhold til at undgå falske positive i analyserne. Også problemer med mørkfarvede græsrødder, som den oprindelige billedanalyse ikke kunne håndtere, kan CNN modellen trænes til at klare.

Work flow for billedanalysen



Figur 9: Den totale mængde af analyserede billeder ved hjælp af CNN'et, som det ses har vi i 2018 og især 2019 været i stand til at analysere flere hundrede tusinde billeder inden for en kort periode.

I analysen af billeder fra RadiMax var det nødvendigt ikke bare at udvikle et billedanalyse-system, som kan identificere rødderne og estimere rodlængde på hvert billede. Der var også brug for at systemet kunne håndtere et meget stort antal billeder. Ved hver filmning i RadiMax får vi typisk imellem 10.000 og 40.000 billeder, så der var brug for at udvikle en protokol til analyse af mange tusinde billeder fra et fjernetværksdrev. Dette

er udviklet, og er blevet til et system som kræver meget lidt manuelt arbejde når et nyt datasæt skal analyseres, siden det meste af processen nu er automatiseret.

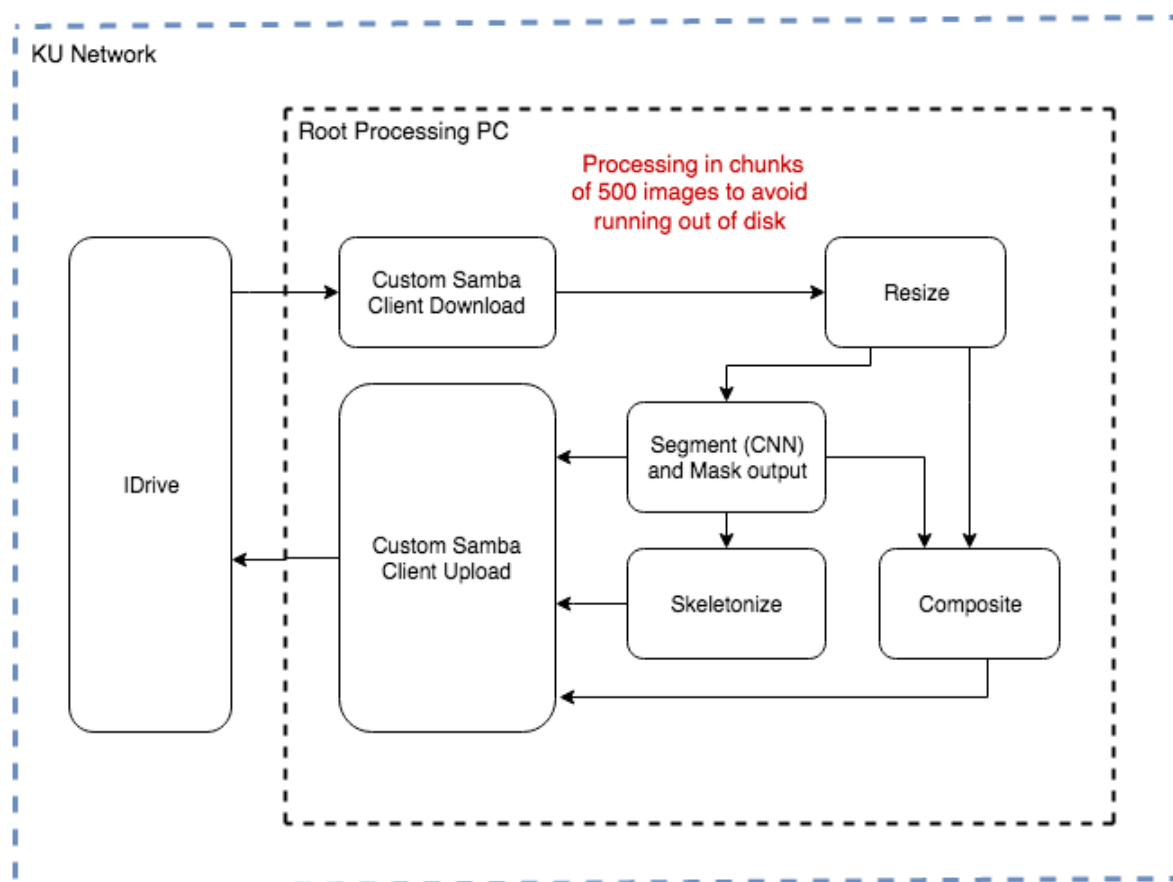
Hele processen foregår i 3 faser:

Fase 1

- Lave en liste af billederne fra I-drevet
- Oprette foldere på I-drevet for analyserede data
- Oprette lokale foldere for midlertidig data.
- Dele billederne op i større grupper til analyse (ca. 500 nu)

Fase 2

Analyse af grupper af rodbilleder (Se system diagrammet, Figur 10)



Figur 10: Illustration af CNN analysen. En række processer interagerer mens billede analysen forgår.

Fase 3

- Udregning af rodlængde fra hver "skeleton"-billede fra hvide pixels, hvilket bliver gemt i en CSV-fil
- Automatisk upload af CSV-filen til I-Drevet
- Email CSV-filen og output-filens beliggenhed til relevant brugeren

De eneste manuelle opgaver i processen er at skrive initialiserings scripts og give besked når data er analyseret. Systemet er også designet til at overkomme forskellige fejl der måtte opstå.

Brugertræning

Baseret på observationer efter at flere RadiMax datasæt blev analyseret, blev det fundet nødvendigt at producere et nyt stykke software. Dette software fjerner behovet for at bruge andre programmer som Photoshop eller GIMP, og hjælper brugere uden tidligere programmerings erfaring til at træne et CNN for et nyt datasæt. Dette program er blevet testet på RadiMax billeder og vil blive brugt når nye modeller for fremtidige RadiMax datasæt skal produceres, hvilket burde give højere nøjagtighed i analysen.

Drone imaging

Til screening af stress på den overjordiske vækst blev droneteknologien afprøvet i 2017, 2018 og 2019. 2017 var opstarts-år for at teste metoden, mens 2018 bød på en række overflyvninger over både kartofler og hvede i slut maj til og med juli. I 2019 blev der lavet en enkelt 26 juni. Her vil blive vist nogle overflyvninger fra hhv. kartofler og hvede i 2018.

Et termisk kamera blev afprøvet, da afgrøders bladtemperatur oftest er sigende for om en plante er tørkestresset. Stiger bladtemperaturen på en sommerdag med høj fordampningspres, er det ofte et tegn på, at planten ikke har adgang til vand, lukker sin transpiration ned, og derved får en øget bladtemperatur (Jones et al., 2009). Dette skulle afprøves som screeningmetode i RadiMax, da det i tidligere forsøg har vist sig som værende en god indikator for præ-symptomatisk tørkestress der er sortsspecifik i afgrøder såsom hvede (Youssef Bayoumi et al., 2015). Dog er bladtemperatur vanskelig at arbejde med under danske forhold pga. få dage med højt transpirationspres på planten grundet lav luftfugtighed og høj lufttemperatur (Jensen et al., 1990), hvilket skulle undersøges nærmere i RadiMax.

Hertil blev også prøvet et multispektralt samt farve kamera til at lave vegetationsindekser, der siger noget om afgrødens grønhed. Dette kan også relateres til afgrødens respons på eksempelvis tørke og hvor sortsspecifik denne er (Sankaran et al., 2015)(Gizaw et al., 2016)

Hypotesen var, at tørkestress kan ses præsymptomatisk i RadiMax via termisk imaging når der er maksimal pres på fordampning i afgrøden, og at den akkumulerede effekt af tørkestress er en god indikator på sorternes tørketolerance i RadiMax, hvilket kan måles via multispektralt- og farvekamera.

Oprindelige setup

Dronen: En DJI Inspire pro blev i 2018 brugt til at flyve med hhv. termisk og multispektralt kamera. I 2019 samt fremadrettet benyttes en Matrice 210 RTK drone hvorpå der kan monteres 2 kameraer, vil være det multispektrale samt termiske kamera. Phantom 4 pro bruges til RGB kameraer. Styret under flyvninger af en ruteplan i styresystemet DJI GS PRO

Termisk kamera: DJI Zenmuse XT, 512*640, 30Hz, 9 mm linse, radiometrisk version der estimerer absolut temperatur. Termisk kamera omkranset af plastikbeskyttelse for vind, inklusiv foliebånd til at forhindre solindstråling på kamera. Herved mindskes uhensigtsmæssig nedkøling fra vind samt opvarmning fra sol.

Multispektralt kamera: Micasense RedEdge M, 5 bånd; blå, grøn, rød, RedEdge og Nærinfrarød, inklusive ovenlys-sensor

RGB kamera: DJI Zenmuse X5S kamera/Phantom 4 pro kamera

Drone- og kamerastyring

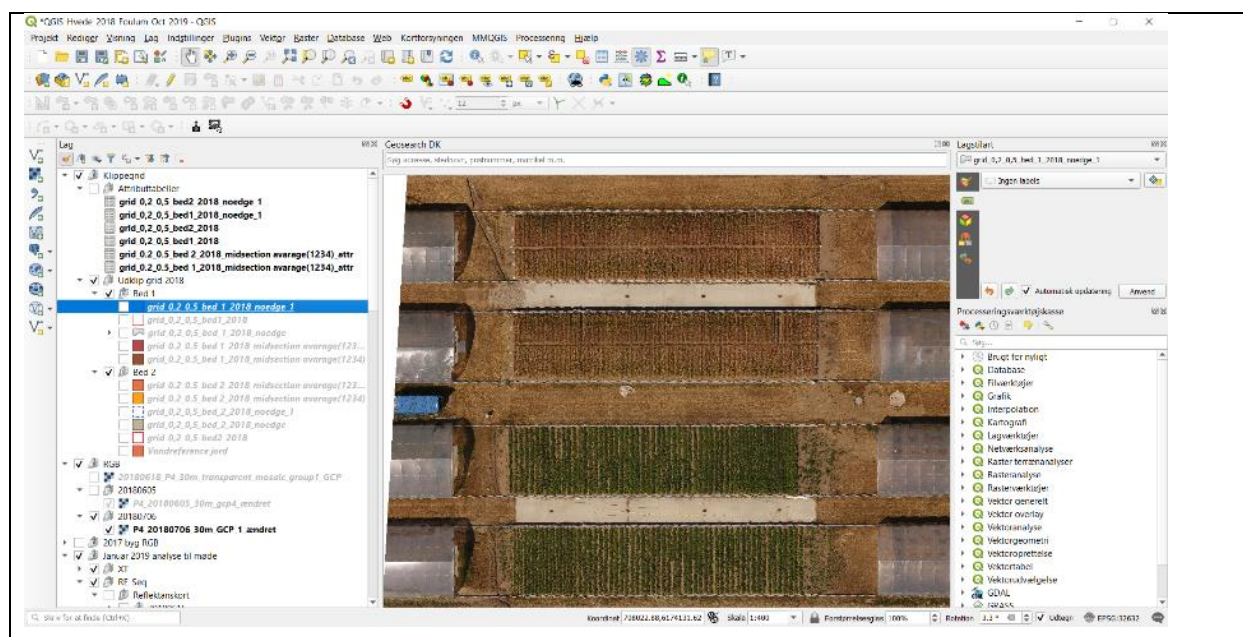
App'en DJI GS pro blev brugt til at styre dronen automatisk under flyvning. Ved at vælge kameratype, flyvehøjde, ønsket billedoverlap (fremadrettet og sideværts), flyveretning og hastighed, bliver dronen fløjet automatisk, således så alle ønskede parametre kan samles i et billede. GS Pro finder automatisk alle dronens oplysninger samt kamera oplysninger fra det termiske kamera ved opkobling til dronen. Ud over at styre dronen med det termiske kamera blev DJI også brugt til RGB dronen (Phantom 4 pro). Det multispektrale kamera blev opsat via en Wi-Fi opkobling, og billedoverlap indstillet så det passede med flyvehøjde.

Generelt blev det termiske kamera fløjet i 20 meters højde, mens det multispektral og farvekamera blev fløjet i 30 meter. For det termiske kamera blev et billedoverlap på 85-90% frontal og sideværts brugt, mens det for farvekamera og multispektralt kamera var på 80%.

Billedanalyse

Programmet Pix4D mapper blev brugt til at lave den fotogrammetriske analyse af billederne fra dronen. Heri bliver billeder stichet sammen til ortomosaikker, og herunder bliver billedede vignettering og evt. pixelforvrængning i billedets yderkant korrigeret som del af programmet avancerede og automatiserede algoritmer.

Det gratis GIS software QGIS (Figur 11) blev brugt til hhv. at lave et grid ned over hver enkelt række til dataudtræk, samt selv den statistiske udtræk af billeddata for hver række.



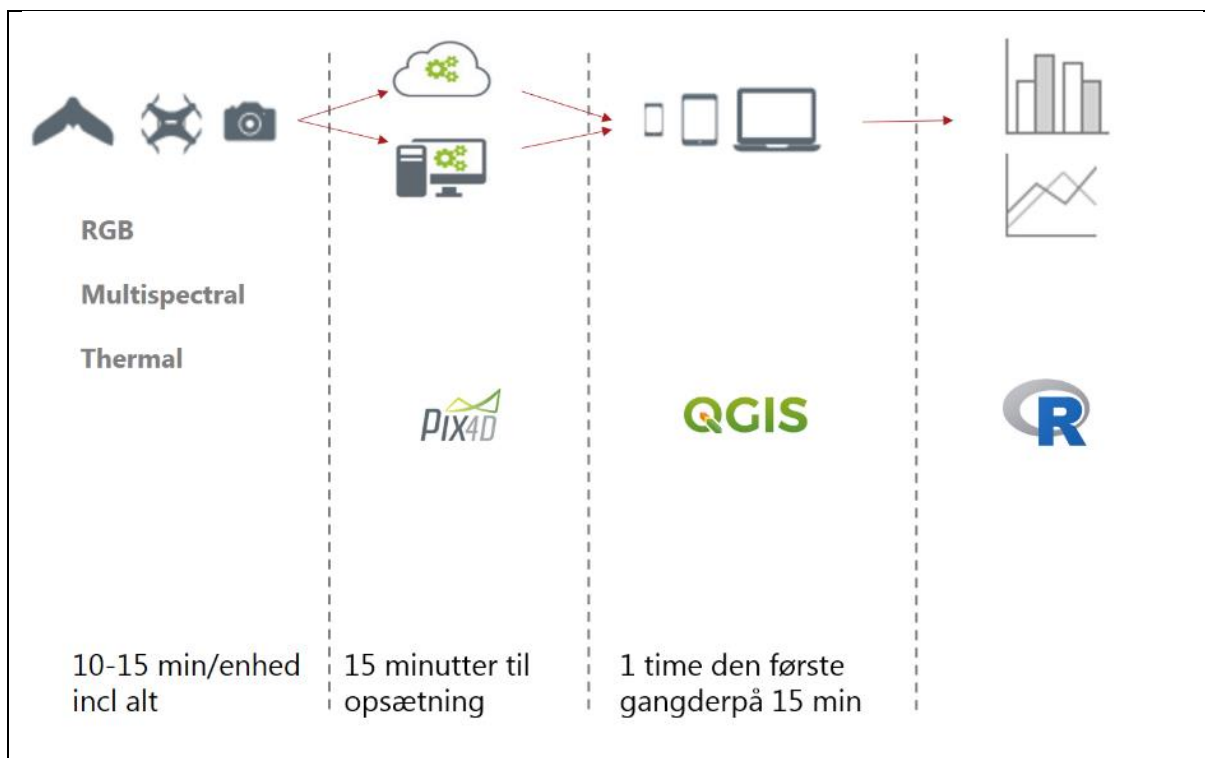
Figur 11. I gratis open-source softwaret QGIS blev de georefererede mosaikker med hhv. termiske, multispektral og RGB format håndteres, og herfra blev data på rækkenniveau ekstraheret til Excel tabeller som kunne analyseres statistisk.

Forslag til optimeringer baseret på 2017-2019 data

Et formål med projektet var **At udvikle imaging baseret metode til analyse af afgrødestress i RadiMax anlægget ved måling på den overjordiske plantevækst**. Baseret på arbejdet i projektperioden, blev der afprøvet forskellige setup på dronen, samt arbejdet med forskellige softwarepakker. Herunder er forslag til de setup man bør arbejde videre med fremadrettet

Data-pipeline

En pipeline der kan håndtere ruteplanlægning med dronen, automatisk flyvning af dronen, automatisk klipning af billeder til ortomosaik (fotogrammetri) samt endelig ekstrahering af målinger for enkeltrækkerne til et Excel format eller lignende (QGIS) er identificeret og kører. Pipeline er vist i Figur 12 herunder inkl. tidsestimater for, hvor lang tid hver proces tager. Når setup er trimmet, vil hver flyvning inkl. databehandling og ekstraktion af data til et Excel format tage omkring 1 time. Dette kræver dog en trænet dronepilot en GIS-kyndig data analytiker, men er derfra ikke en vanskelig proces.



Figur 12. Pipeline fra dronflyvning (tager ca. 15 minutter at forberede dronen og overflyve 1 enhed/grav 1 gang), over sammenklipning/stitching af billeder til en oversigtsmosaik (laves i Pix4D mapper software, tager 15 minutter at sætte op og så kører det automatisk i et par timer) til ekstrahering af data om temperatur eller vegetationsindeks for afgrøderækkerne (QGIS) til statistisk analyse på Excel output fra QGIS.

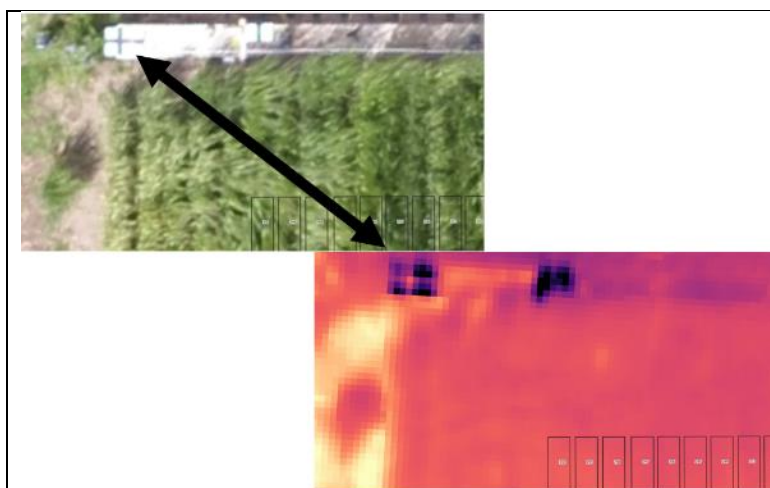
Optimerede dronflyvninger

Fra resultaterne af projektet er der gennemtænkt protokoller for, hvorledes flyvninger bør foretages fremadrettet, for at få de mest reproducerbare resultater fra dronerne. Dette baserer sig bl.a. på nye publikationer om optimal flyvning med termiske kameraer (Kelly et al., 2019), og inkluderer ideer omkring referencepunkter på jorden, kalibrering af kamera, kalibrering af billeder m.v.. Dette har også resulteret i optimering af selve drone-setup, hvor det termiske kamera nu er monteret med beskyttelseskappe for at minimere påvirkning fra vind under flyvning. Se Figur 13 herunder.



Figur 13. 2019 drone setup der kan testes igen i 2020. En matrice 210 drone der kan flyve i 25 minutter med hhv. termisk og multispektralt kamera monteret på samme tid. Termiske kamera omkranset af vindkrave der skal minimere kameranedkøling under flyvning og derved minimere usikkerheder i kameraets estimat for overfladetemperatur.

Deslige anbefales det fremadrettet at benytte en drone med større flyvekapacitet, såsom Matrice 210 brugt i 2019, for at kunne lave gentagne flyvninger hen over radimax indenfor samme korte tidsrum, som også anbefalet af Jones et al. (2009). For at kunne kombinere billeder fra flere flyvninger over kort tid, og evt. flere typer billeder, er det vigtigt at billederne kan lokaliseres meget præcist, og det har vi opnået ved at bruge plader beklædt med sølvfolie samt et kryds lavet med sort gaffer tape. Disse punkter kunne effektivt lokaliseres på både RGB og termiske billeder, se Figur 14 herunder.



Figur 14. Punkter på jorden der er målt op med RTK GPS samt er synlige både i farve- og termisk billede.

Eksempel på data ekstraktion og resultater, 2017

Herunder er vist, hvorledes data blev ekstraheret og analyseret i bygforsøget i 2017. Kort tid efter fremspирring blev der lavet et grid til dataekstraktion for hver enkelt række i de relevante grave med byg (Figur 15). Hver

række blev delt op i delområder, og der blev så udvalgt et delområde for hver række repræsenterende hhv det våde område (ud mod kante af anlæg) og det tørre område (ind mod midten) (Figur 16).



Figur 15: Vårbyg i 2017 efter fremspurring er ideelt til at lave det grid, som efterfølgende skal bruges til at lave række-specifik ekstraktion af data på termisk og multispektrale billeder.

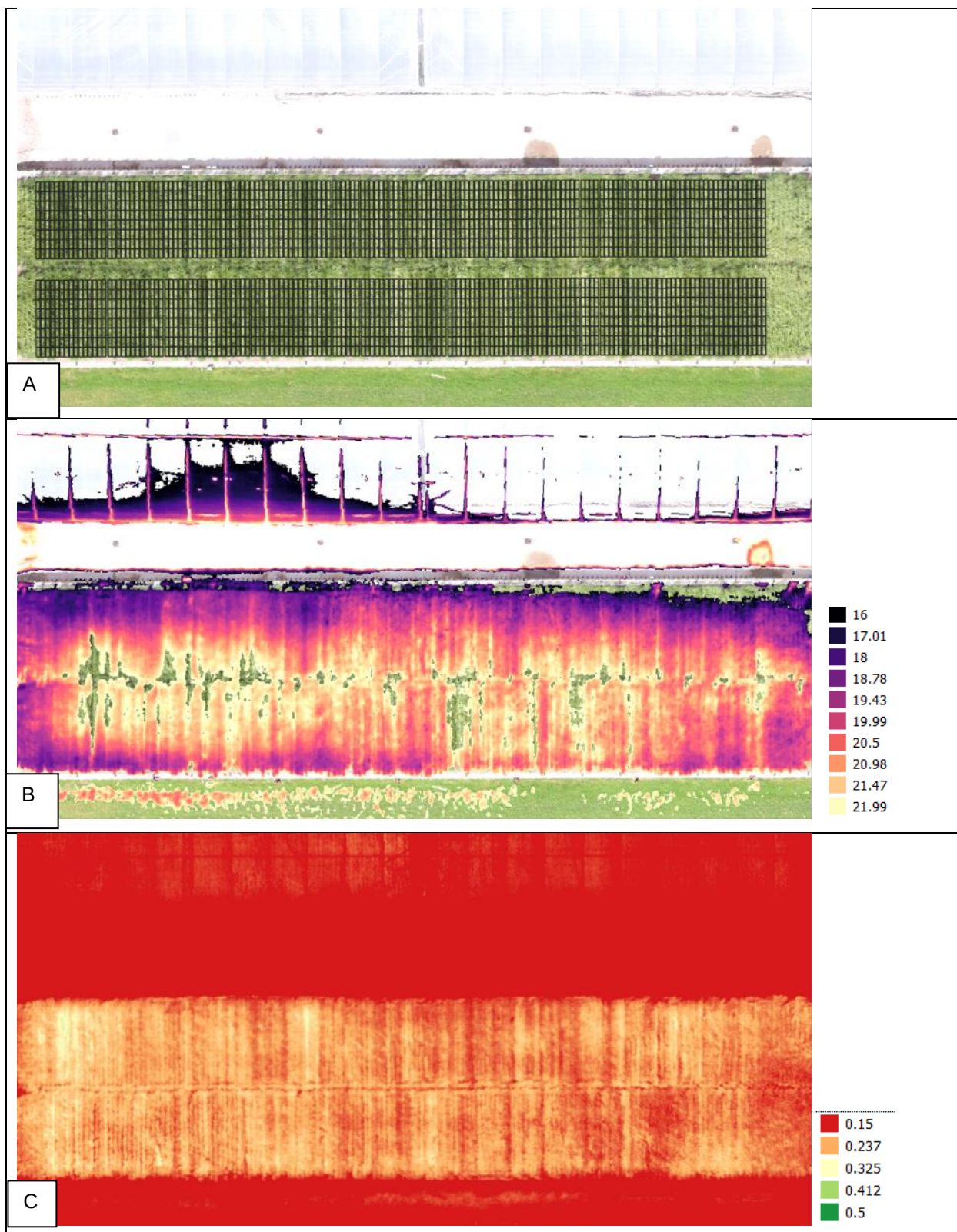


Figur 16: For hver række er der lavet et grid til at hive data ud. Hver række er yderligere delt op i små delområder. I dette forsøg blev der brugt række data fra det våde område hvor planterødder har adgang til vand (blå markering) og det tørre område hvor roddybde forhindrer nogle planter i at nå vand med efterfølgende tørkestress (røde markering).

Den 4. juli blev anlægget overfløjet med hhv. RGB kamera, termisk kamera og multispektralt kamera. RGB mosaikken blev brugt til at sikre, at klippegrid var fornuftigt (Figur 17 A).

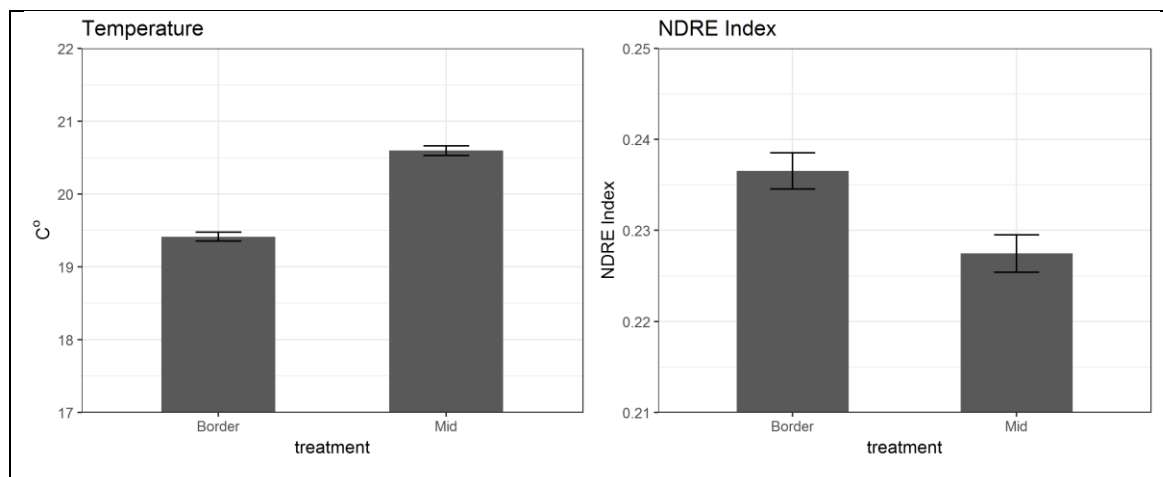
Det multispektrale billede blev brugt til at lave et vækstindeks kaldet NDRE (Normalized Difference RedEdge Index) som er et index fra 0 til 1, hvor indeks nærmer sig 0 ved vissent materiale og bar jord, og nærmer sig 1 jo mere grøn og tæt afgrøden er (Figur 17 C).

Ergo forventes det, at tørkestress i RadiMax vil være målbart termisk med stigende temperatur, samt i NDRE senere i væksten pga. begyndende visning.



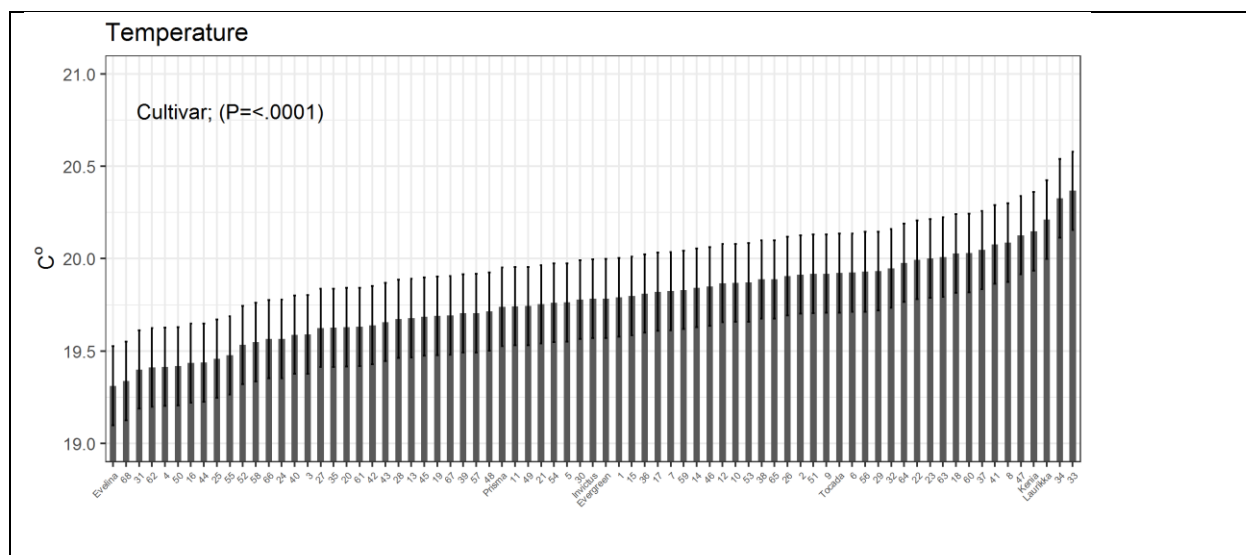
Figur 17: A: RGB mosaik over vårbyg i grav 2 4 juli. B: Termisk mosaik fra 4 juli grav 2. C: Multispektralt NDRE mosaik fra 4 juli i grav 2. Altså repræsenterer A, B og C den samme grav/samme afgrøde på præcist det samme område på samme dag, og kan derfor hver især sige noget om afgrødens status i det våde og tørre område.

Fra flyvningerne 4 juli var det åbenlyst, at der var en effekt både på det termiske billede samt på NDRE. Dette ses af Figur 18 herunder, der viser samlet (statistisk signifikant) forskel på det våde område og det tørre område i grav nummer 2. Resultatet på det termiske vil dog helt sikkert hænge sammen med resultatet på NDRE, da NDRE indikerer biomassen begynder at være påvirket, hvilket nok også medfører at bladene begynder at hænge i det tørre område, hvilket vil påvirke temperatursignalet meget (Figur 18).



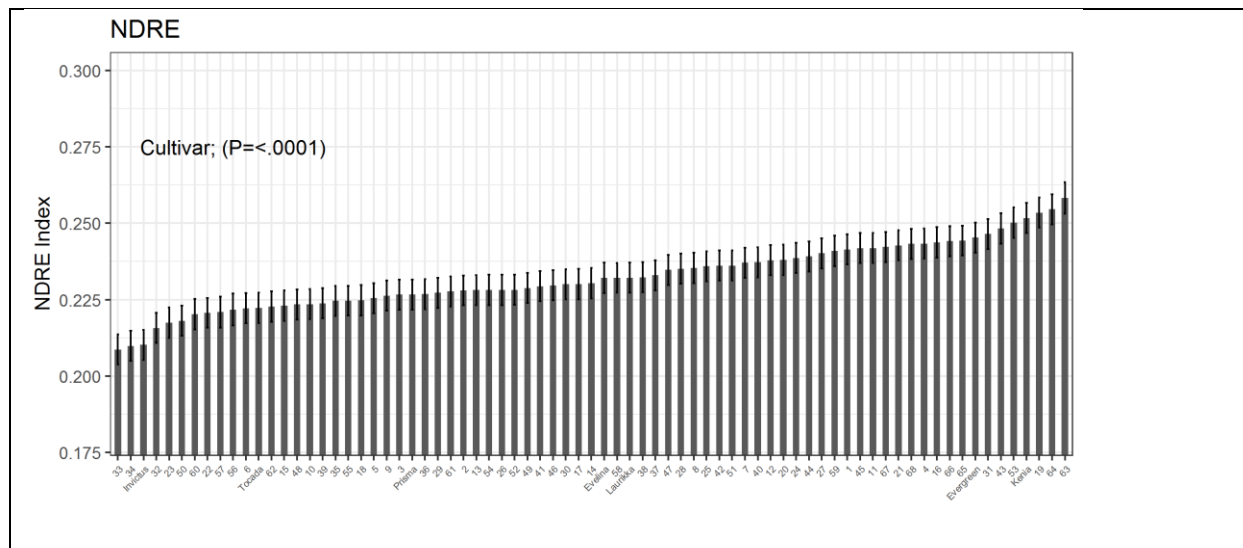
Figur 18: Temperatureffekt på våde område (Border) mod tørre område (Mid) i grav 2, vårbyg. Det tørre område har højere bladtemperatur i snit (øget transpirationsspres) og lavere NDRE (begyndende visning, celleforandringer).

Det var muligt at ranke sorterne med statistisk signifikans efter deres temperatur ind mod det tørre område. Jo højere temperatur, jo mere tørke må det antages. Dog var der lav gentagelighed for sammenhæng mellem sorter og bladtemperatur, ergo er bladtemperatur i dette tilfælde ikke en særlig sortsspecifik egenskab (Figur 19).



Figur 19: Sorterne rangeres efter deres temperatur i det tørre område. Der er en rangering, hvor eks Evelina er den sort der er køligst (formodet mindst tørkestresset) og Laurikka en af dem der er varmest (formodet mest tørkestresset). Dog er der lav gentagelighed på sortsniveau, altså er temperaturen statistisk set ikke særlig sortsspecifik.

På samme måde var det muligt at ranke sorterne efter deres NDRE ind mod det tørre område. Her var der igen signifikante sortsforskelle, og der var en højere sortspecifik sammenhæng til NDRE. Ergo var NDRE på dette tidspunkt, en god indikator for tørke, og en relativt god indikator for en sortsspecifik respons på tørke (Figur 20).



Figur 20: Sorterne rangeres efter deres NDRE i det tørre område. Der er en rangering, hvor eks Invictus er en af de sorter der er mest grøn (formodet mindst tørkestresset, mindst i gang med at visne) og Kenya en af dem der er mindst grøn (formodet mest tørkestresset). Der er bedre gentagelighed på sortsniveau, altså er grønhed statistisk set mere sortsspecifik end temperaturen.

Data 2018 og 2019

Data fra hveden i 2018 og 2019 er pt ved at blive færdiganalyseret ved Århus universitet, i forbindelse med færdiggørelse af Jesper Svendsgaards PhD arbejde. Der er lavet termiske og NDRE målinger fra flere kampagner i juli bliver holdt op mod udbytte og ^{13}C målinger i hveden. Herfra skal det undersøges, hvad den termiske profil kan bruges til. I 2017 blev der kigget udelukkende på bladtemperatur. 2018 data bliver analyseret også ud fra et indeks kaldet Water Deficit Index (Hoffmann et al., 2016), der kobler den termiske profil med NDRE profil fra samme overflyvninger, således så man tager højde for både bladtemperatur, bladvisning/celle forandring samt evt. synlig jord. Det forventes at data kan gå ind i en videnskabelig publikation møntet mod mere forædlingsorienterede tidsskrifter. Vi har flest dronebilleder og data fra 2018, hvor de tørre vækstforhold gav store forskelle i bladtemperatur og gode betingelser med skyfri dage som er vigtige for optimal billedtagning, mens der i 2019 var langt færre dage der muliggjorde flyvning og god billedanalyse for tørkestres i afgrøderne.

Perspektiver

Mange studier har vist, at termiske data fra en drone er en glimrende metode til at studere tørkestress før synlige symptomer når der screenes for nye sorter (Sagan et al., 2019), men at det også er en flygtig metode, hvorfor man skal finde ud af at normalisere målingerne for at inddrage de temperaturflukse der opstår i det miljø man er i over den tid det tager at få billederne i hus (Prashar et al., 2013). RadiMax er yderligere vanskelig at arbejde i, pga. temperaturpåvirkninger fra faciliteten selv (betongange der opvarmes o.lign) samt den indflydelse faciliteten har på luftregulerende miljøeffekter (e.g. vindturbulens pga. teltene som påvirker overfladetemperatur). Vegetationsindeks er mere uafhængige af dette, men er samtidig også først rigtig gode til at beskrive tørke når denne begynder at begrænse plantens vækst og starte nedvisning. Dog er det sandsynligvis så simpelt, at de sorter der påvirkes af tørkestress, også vil have et andet vækstforløb fra skridning til modning, som kunne måles over flere strategiske flyvninger i perioden med multispektralt kamera, og derpå beskrives via arealet under sorternes vækstkurver (Gizaw et al., 2016). Dette bør undersøges nærmere i kommende

forsøg, og her bør man også undersøge det termiske kamera nøjere, i forhold til om man kan normalisere data i forhold til miljøpåvirkning under flyvning.

Markforsøg for N effektivitet

Markforsøg med sorter af byg (2017) og vinterhvede (2018 og 2019) er gennemført på et antal lokaliteter i Danmark, for at studere N udnyttelse, og for at sammenholde data fra RadiMax forsøgene med målinger under rigtige markforhold på forskellige jordtyper. I 2017 blev 8 sorter af vårbyg dyrket på 5 forskellige lokaliteter. I 2018 og 2019 blev henholdsvis 7 og 8 sorter af vinterhvede dyrket på 4 lokaliteter hvert år. Ønsket var at vælge sorter ud fra resultaterne i RadiMax, men det kunne først i fuldt omfang lade sig gøre for 2019 forsøget, ved anlæggelse af bygforsøg i foråret 2017 og vinterhvedeforsøg i september 2017 havde vi kun ganske foreløbige RadiMax roddata til rådighed for valg af sorter. På hver lokalitet blev sorterne dyrket i 4 gentagelser i et fuldt randomiseret blokforsøg. På KU blev sorterne dyrket ved 2 kvælstofniveauer, normal og lav N, hvor lav N var 40 kg N/ha under normal N for vårbyg i 2017 og 50 kg N/ha under normal N for vinterhvede i de to følgende år.

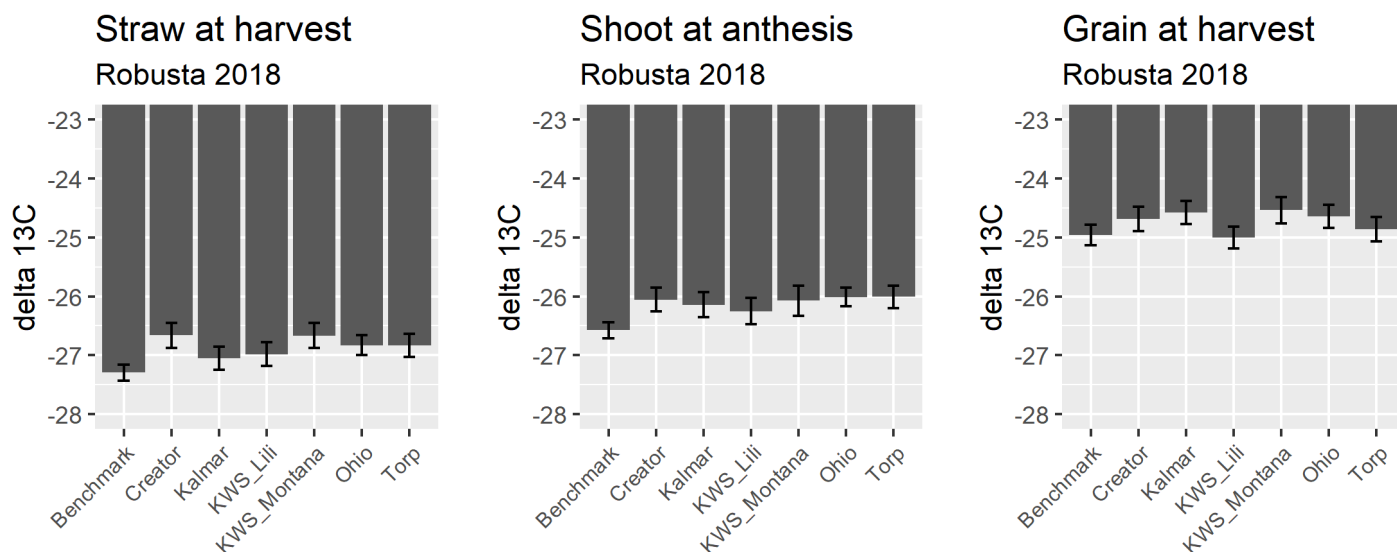
Der blev taget biomasseprøver ved blomstring (stadie 65), ved fysiologisk modenhed (stadie 85) og ved høst. Prøverne blev tørret, formalet og analyseret for N indhold og naturlig ^{13}C berigelse. Ved høst blev kerneproteinindhold bestemt med NIR. For byg i 2017 blev der analyseret en række enzymaktiviteter (fysiologisk fænotypning) på prøver af faneblad ved blomstring, og på faneblad og kerner midt under kernefyldning. Fysiologisk fænotypning blev i mindre omfang gennemført i vinterhvede i 2018, men på grund af de meget tørre forhold var det svært at få velegnede og ensartede prøver. I 2019 blev der etableret minirhizotruer i forsøgene for måling af rodvækst. Resultater med N effektivitet af sorter af vårbyg dyrket i 2017 er tidligere afleveret.

Hvedeforsøgene i 2018 blev stærkt påvirket af tørken, det reducerede udbyttet, men også kvaliteten af forsøgene. Det betyder dog samtidig at vækstforholdene i marken i betydeligt omfang lignede dem i den tørre del af RadiMax forsøgene, og giver mulighed for at sammenligne resultaterne derfra med markresultaterne. I 2019 var der væsentlig højere nedbør, og markresultater fra 2019 vil derfor i højere grad være sammenlignelige med den velvandede del af RadiMax forsøgene. Prøver fra 2019 afventer dog stadig analyse for N og ^{13}C , så det er primært resultater fra 2018 der afleveres her.

^{13}C berigelse

Sammenligning af ^{13}C berigelse på forskellige tidspunkter og udviklingsstadier (Figur 21) viser tydeligt de tørkestressede dyrkningsforhold i 2018. Mens målingerne viser grundlæggende sortsforskelle i ^{13}C berigelse, er det også tydeligt at de reagerer forskelligt på tørken, som bliver stærkere over tid. Som omtalt under RadiMax forsøgene med hvede, kan ^{13}C i halmen betragtes som en måling på betingelserne i den tidlige del af væksten, mens der endnu kun var moderat tørkestress, mens C i kernen er fikseret senere under alvorlig tørkestress. Forskellen i tørkestress i de to dele af vækstperioden ses tydeligt i forskellene på ^{13}C i halm og kerne. Denne konklusion styrkes af resultater fra vårbyg i 2017, hvor der var en periode med forsommertørke, mens resten af sommeren havde høj nedbør, i resultaterne fra de forsøg var det ^{13}C i halmen der viste tørkestress, mens ^{13}C i kernerne ikke gjorde.

Forskellene imellem sorterne i markforsøgene forventes sammen med tilsvarende data fra RadiMax forsøget at give et værdifuldt bidrag til at forstå sorternes evne til at udnytte vand under tørkestress. Yderligere data for ^{13}C og rodvækst er på vej fra markforsøgene i 2019, som vil bidrage til analysen, også selvom der ikke i 2019 har været alvorlig tørkestress.



Figur 21: Gennemsnit og SE af delta ^{13}C værdier over 4 lokaliteter for skud ved blomstring, og kerne og halm ved høst.

G x E interaktionen er signifikant for de fleste undersøgte egenskaber (Tabel 3), men især delta ^{13}C , N indhold i halm og N høst indeks (NHI) viser tydelig interaktion, og dermed at sorterne reagerede forskelligt på vækstmiljøet. Når alle data, også fra 2019 er på plads, vil vi fortsætte analyserne af sortsforskelle og vekselvirkninger, og deres sammenhæng med resultater fra RadiMax forsøgene.

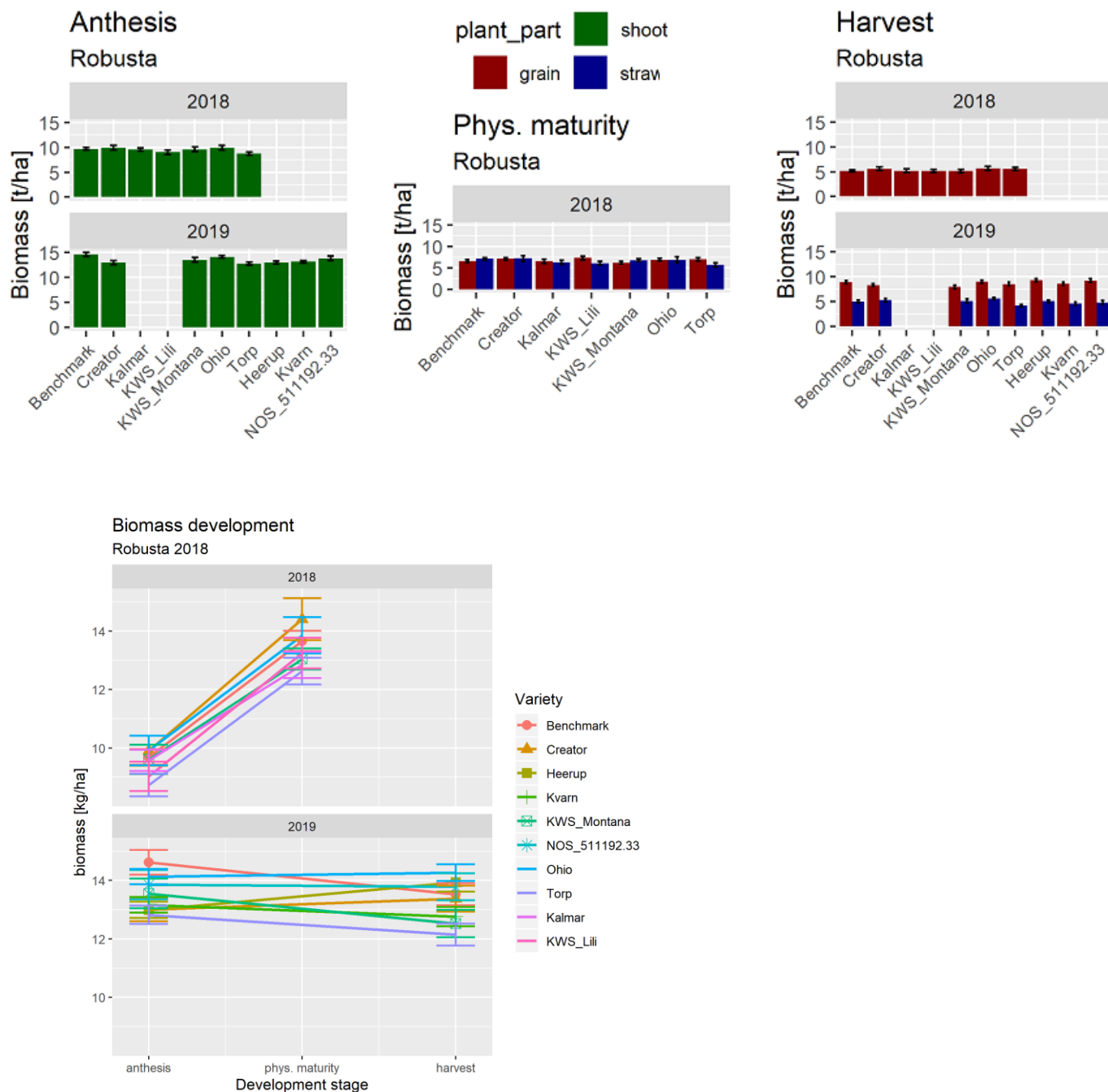
Tabel 3: Variansanalyse med sort * lokalitet vekselvirkning for en række egenskaber målt på udstationerede vinterhvedeforsøg fra 2018.

Trait	F-værdi, sort	F-værdi, sted	F-værdi, inter- aktion	p-værdi, model	
Blomstring d ^{13}C	6.91	16.97	2.25	0.001	**
Halm d ^{13}C	12.07	40.53	1.77	0.015	*
Kerne d ^{13}C	2.84	23.21	1.61	0.023	*
Halmudbytte	1.89	10.28	1.37	0.06	.
Kerneudbytte	1.70	2.23	1.77	0.01	*
N ved blomstring[kg/ha]	1.02	22.85	1.26	0.108	ns
N, modenhed [kg/ha]	1.88	16.04	1.48	0.040	*
Halm N [kg/ha]	0.75	15.82	1.86	0.01	**
Kerne N [kg/ha]	1.95	1.48	1.68	0.02	*
Høstindeks (HI)	1.86	2.55	1.59	0.023	*
N høstindeks (NHI)	1.01	6.06	1.81	0.009	**

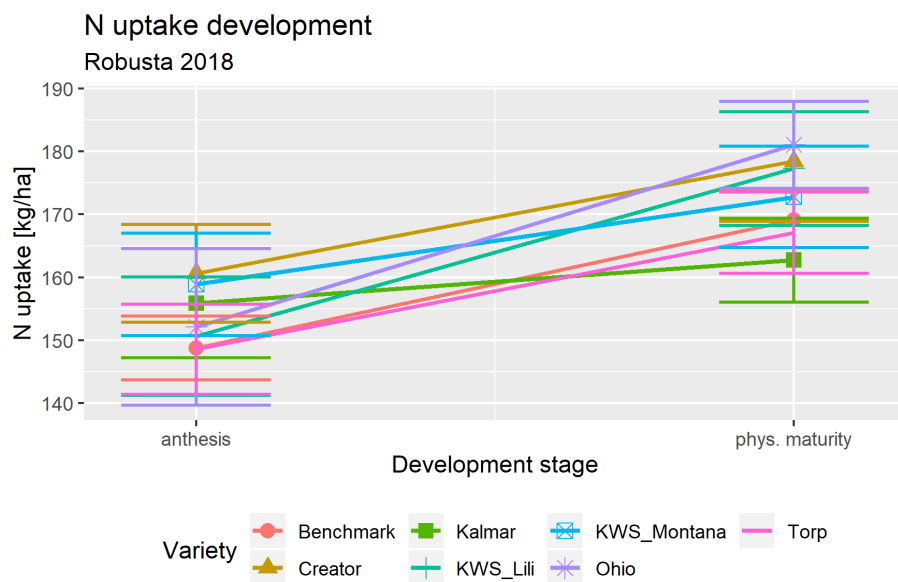
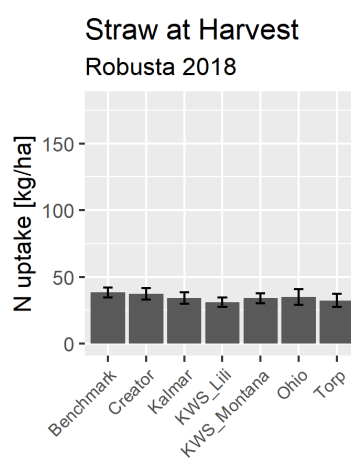
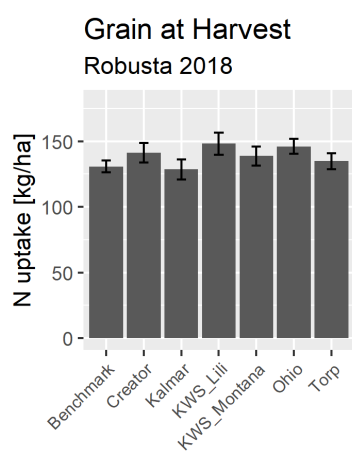
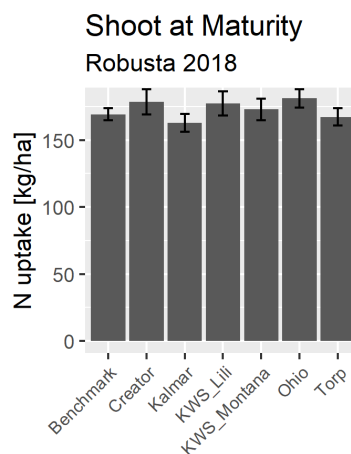
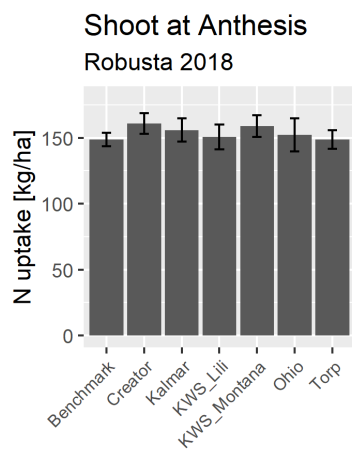
Udbytte og N optagelse

Udbyttet i 2018 blev klart reduceret af tørken (Figur 22). Der var klar forskel både på sorterne biomassetilvækst frem til blomstring, og på deres evne til at fortsætte biomasseproduktionen og N optagelse i perioden

fra blomstring til modenhed (Figur 23 og 24). Især i den sidste periode forventes dyb rodvækst at spille en vigtig rolle for afgrødens vand og N forsyning.

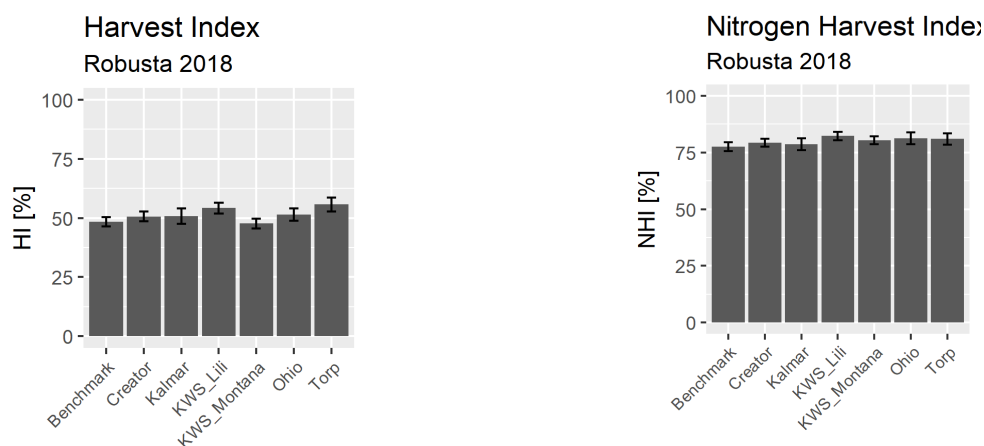


Figur 22: Tilvækst af biomasse for vinterhvedesorter fra blomstring til modenhed i 2018 og 2019. Tallene er gennemsnit af alle lokaliteter.



Figur 23. Kvælstofoptagelse i hvedesorter i 2018, målt ved blomstring og i halm og kerne ved modenhed. Gennemsnit over alle lokaliteter.

Vi antager at dyb rodvækst fremmer den samlede kvælstofoptagelse, og måske især kvælstofoptagelsen i den sene periode efter blomstring. Vi kan forvente effekter som illustreret i Figur 23, hvor Ohio har en høj kvælstofoptagelse efter blomstring (ca. 25 kg N/ha) og en høj samlet N optagelse, mens Kalmar har en lav optagelse efter blomstring (ca. 8 kg N/ha) og en lav samlet optagelse. Analysedata for N og ^{13}C er, som planlagt kun lige modtaget fra laboratoriet, og vil blive sammenholdt med i analyse af hvordan sortsforskelle i total N optagelse og N optagelse under kernefyldningsfasen efter blomstring hænger sammen med de roddata fra markforsøgene og fra RadiMax.



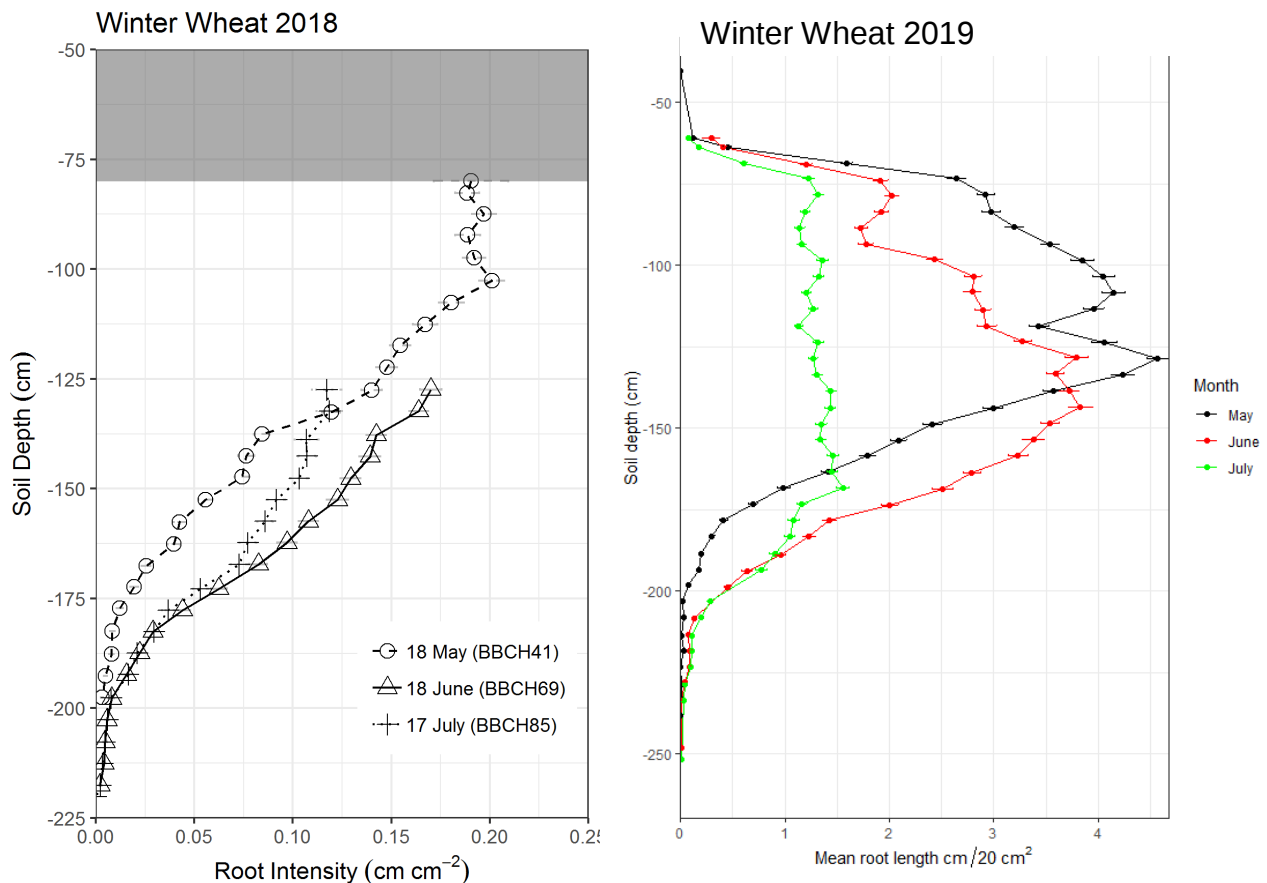
Figur 24: Gennemsnitligt høstindeks (HI) og kvælstofhøstindeks (NHI) for vinterhvedesorter i 2018, gennemsnit over alle lokaliteter.

Resultater for Radimax forsøg

Vinterhvede 2018 og 2019

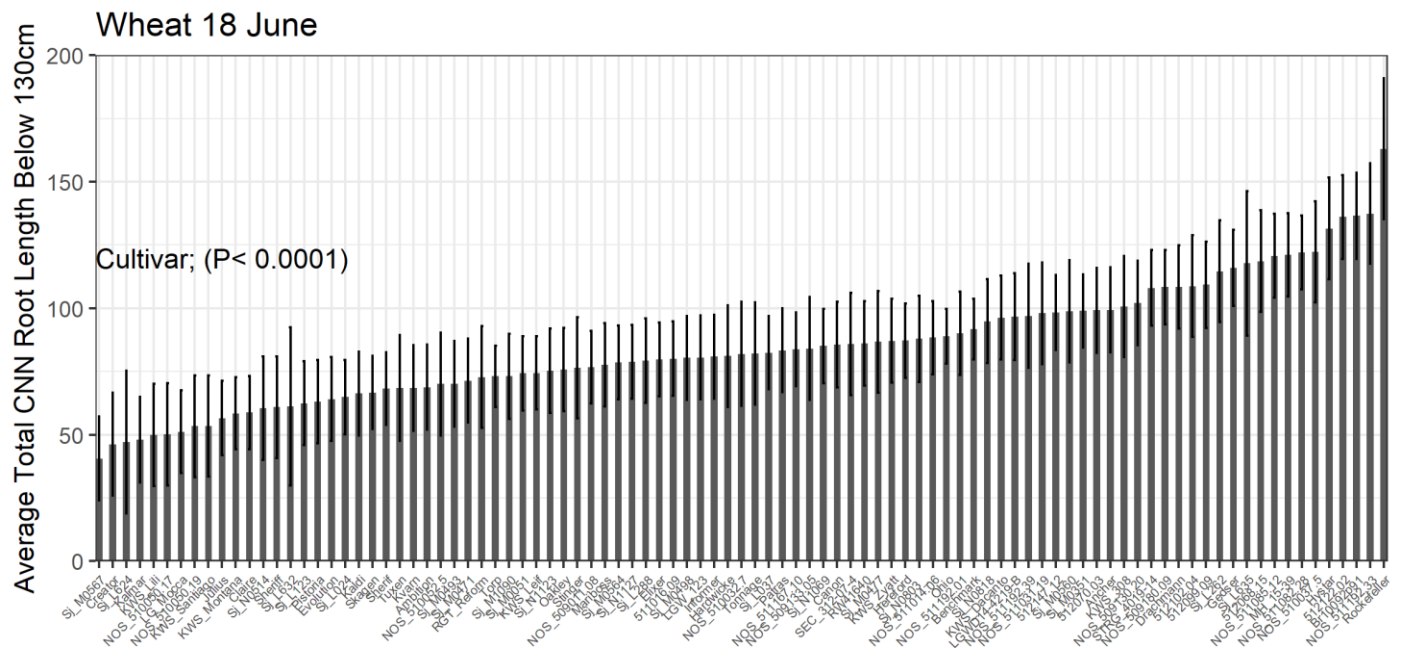
Rod fænotyper

Rodvækst af vinterhvede blev filmet 3 gange i hver sæson, i maj, ved blomstring i juni og under kernefyldning i juli. Rodintensitet på billederne blev analyseret med CNN metoden (se afsnit 2.3). Rodintensiteten i maj var høj ned til ca. 125 cm dybde. Efter maj faldt rodtætheden i de øvre jordlag, mens der stadig var tilvækst af rødder i dybere jordlag især mellem 150 og 200 cm dybde, men også med lidt rodvækst under 2 meters dybde. Den total rodedybde var lidt større i 2019 end i 2018 (Figur 25).

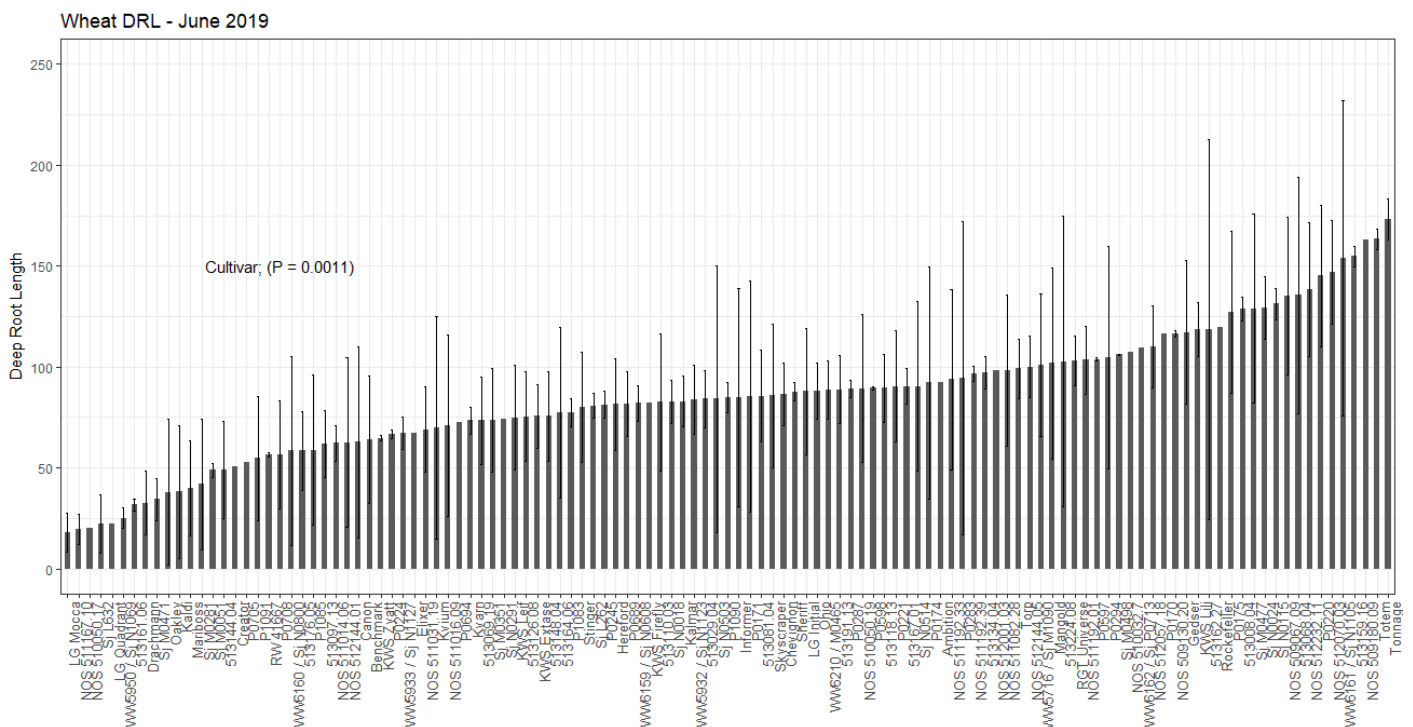


Figur 25: Gennemsnitlig rodprofil for hvede på tre udviklingsstadier 2018 (Svane 2019, Ph.d. afhandling), og 2019.

Dyb rodvækst blev opgjort som samlet rodlængde under en bestemt dybde. Denne dybde blev på de enkelte måledatoer bestemt ud fra den gennemsnitlige rodprofil af alle sorterne, og repræsenterer den del af rodzonen hvor rodintensiteten er klart faldende med dybden. For vinterhvede var det i mange tilfælde 130 eller 145 cm. Figur 26 viser gennemsnitlig total rodlængde i den dybe del af rodprofilen opgjort i juni i henholdsvis 2018 og 2019. I begge år fandt vi en klart signifikant sorteffekt. I 2019 blev det signifikante resultat endda opnået med kun 2 forsøgsgentagelser, for at få flest muligt sorter med i studiet.



T

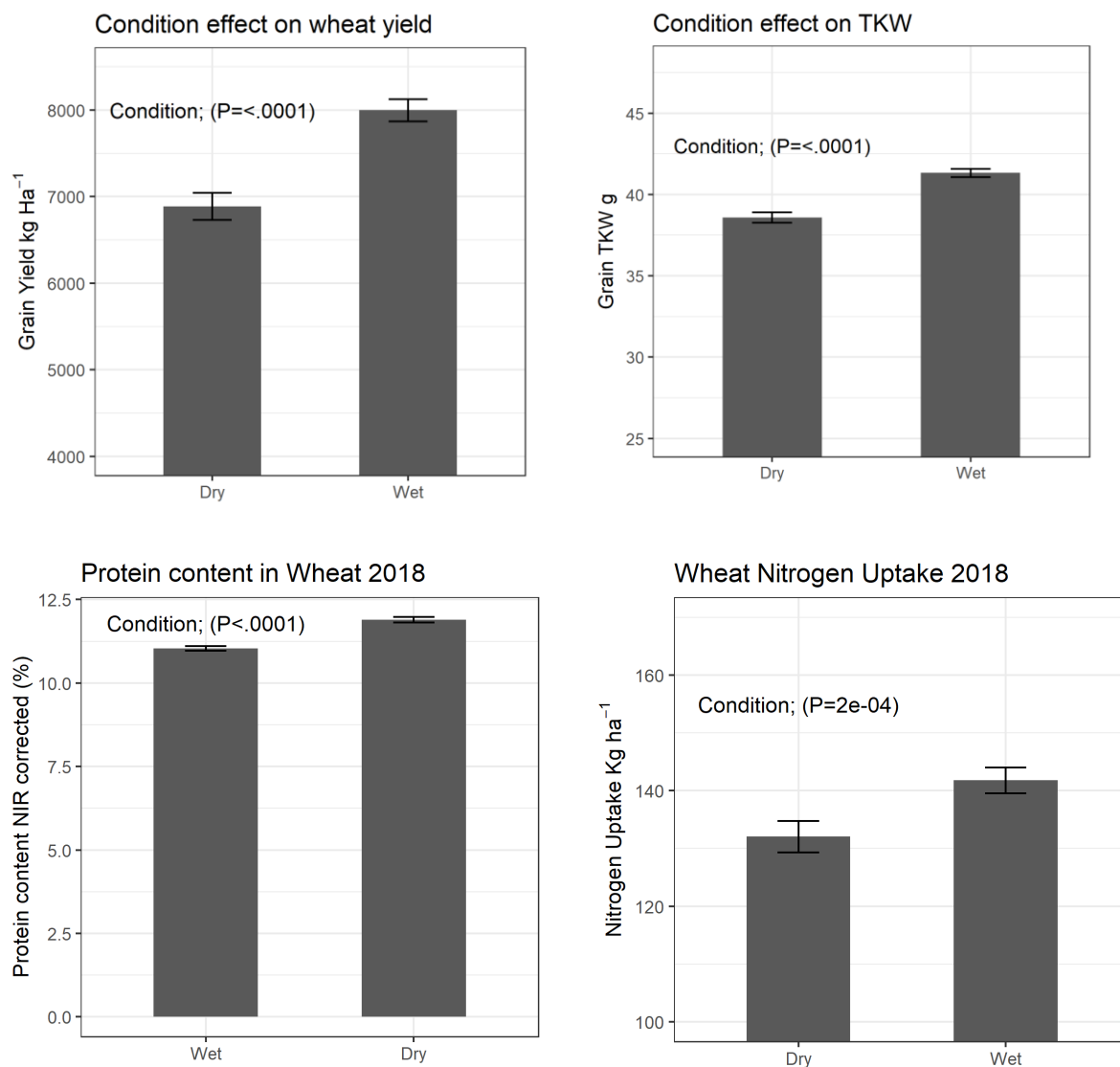


Figur 26. Dyb rodintensitet under 130 cm (2018) og 145 cm (2019) for genotyper af vinterhvede dyrket i RadiMax forsøgene.

Biomasse og udbytte

Selvom der var en klart signifikant virkning af tørkegradienten i RadiMax (Figur 27), fandt vi ikke nogen signifikant interaktion imellem genotyper og tørkegradient i 2018. Vekselvirkninger er generelt svære at måle, men manglen på signifikans kan også skyldes måden tørkegradienten skabes på i RadiMax. Regn holdes væk med

mobile telte, mens der tilføres vand med et undervandingssystem i stigende dybde langs rækkerne, så der er velvandet ved kanterne, mens der er vandingen tilføres i stor dybde i midten af anlægget. Derved bliver der stor forskel i vandforsyning fra dybe jordlag, men de øverste jordlag tørres helt ud, både i den vandstressede og "velvandede" del af rækken. Det har fået os til at ændre strategi for tørkegradient i forsøget i 2019 (se afsnit 2.2.1). I 2019 lod vi afgrøderne få regn, og brugte ikke undervandingsanlægget. Derved blev tørkegradienten vendt om, der er bedst vandforsyning i midten, hvor planterne kan udnytte vand fra et dybt jordlag, mens de bliver mere tørkestressede i midten, hvor det jordlag de kan udnytte er under 100 cm dybt.

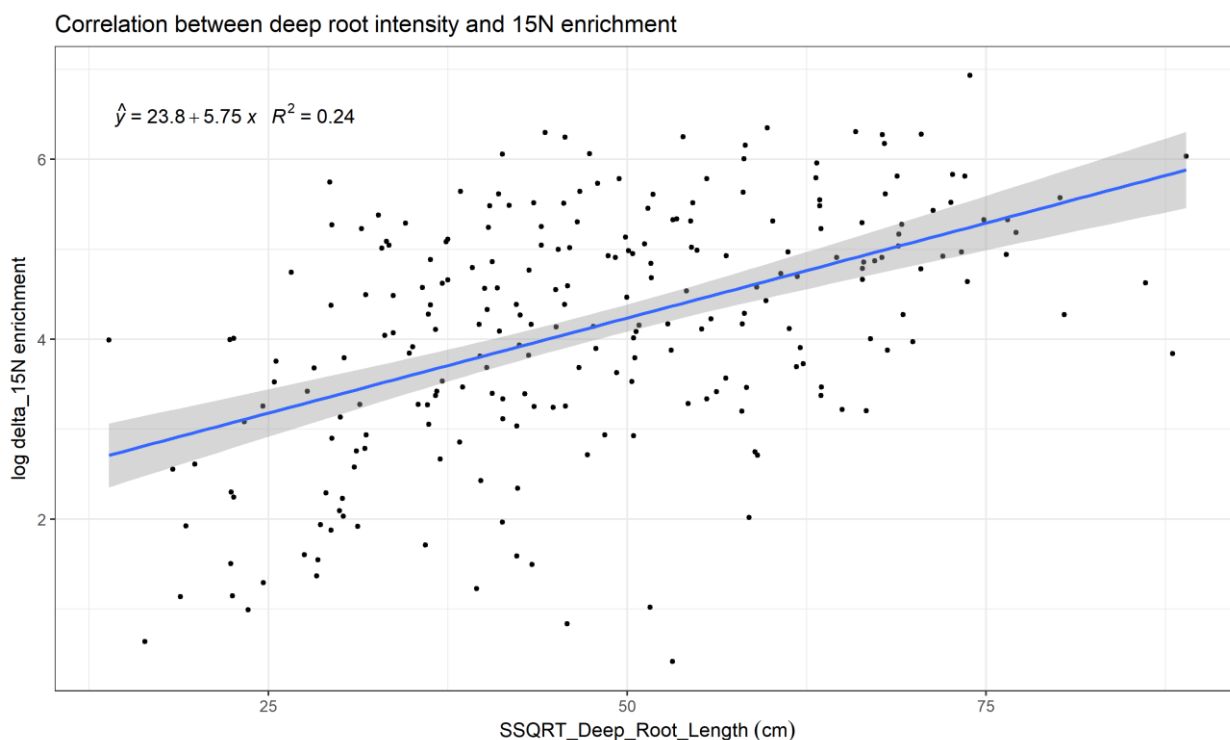


Figur 27. Effekt af tørkegradient på udbytte, tusindkornsvægt, proteinindhold og kvælstofoptagelse i vinterhvede i 2018 (gennemsnit af alle genotyper).

Isotopstudier i vinterhvede 2018

¹⁵N optagelse

Målingerne af ¹⁵N optagelse hvor ¹⁵N var injiceret i ca. 180 cm dybde viste en klar korrelation til rodmålingerne (Figur 28), især ved sammenligning på række niveau med alle målte værdier ($p < 0.001$), men også på genotype niveau ($p = 0.008$, Tabel 4). Den bedste korrelation blev fundet når rodmålingerne blev transformeret ved at summere kvadratroden til de målte rodlængder per billede, da denne transformation reducerer den tilfældige variabilitet i roddata. Det samme blev fundet for ¹³C data (se senere).

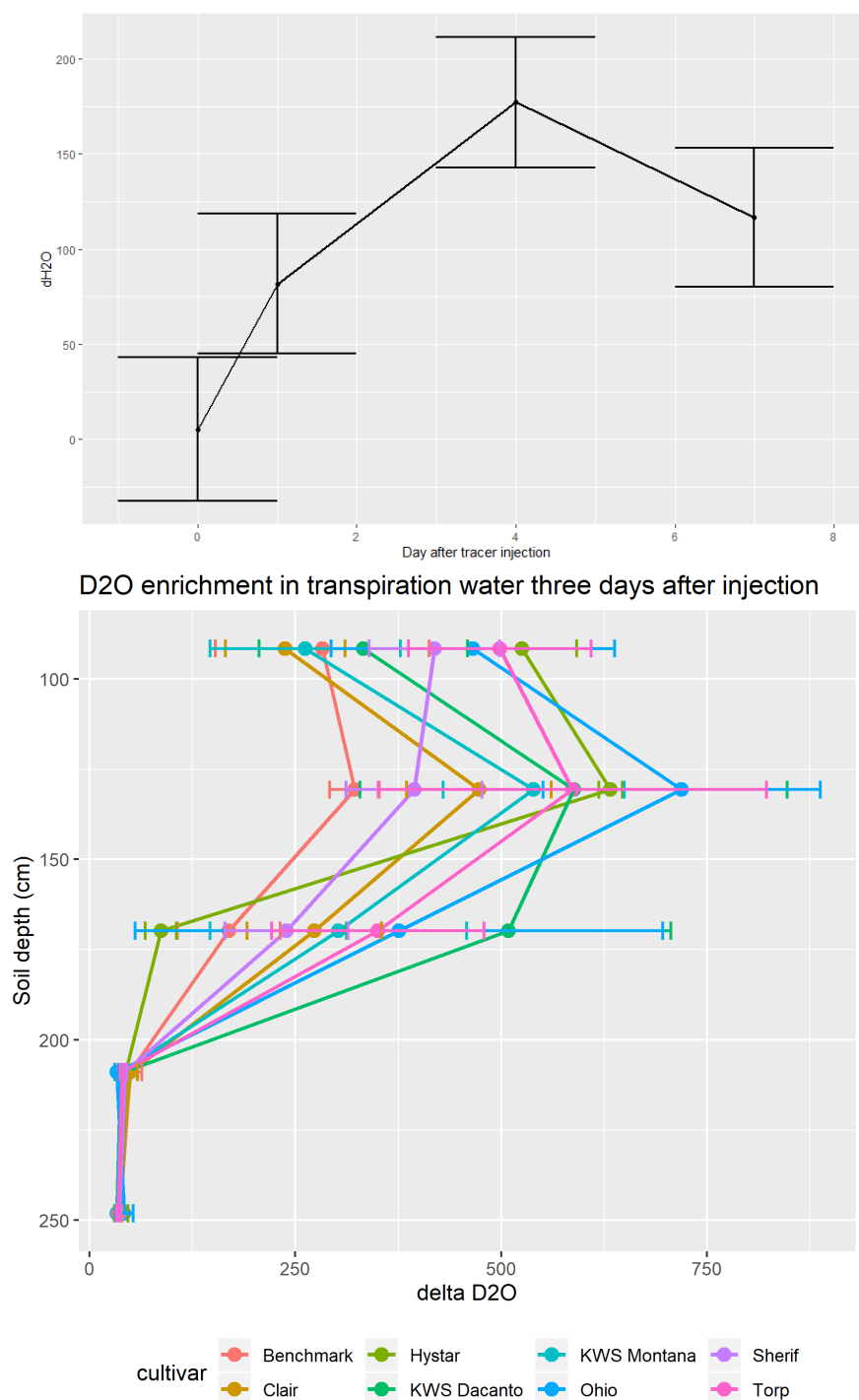


Figur 28. Lineær korrelation imellem dyb rodvækst for hvede i juni 2018 og ¹⁵N berigelse i prøver på 10 aks taget over 30 cm af hvederækken over injektionspunktet.

Tabel 4. Lineær korrelation imellem ¹⁵N berigelse af aksprøver og andre rod og udbytte egenskaber i 2018.

Egenskab	Level	p-værdi		R2
DRL _{below_130cm}	Række	> 0.001	***	0.199
DRL _{ssqrtbelow_130cm}	Række	> 0.001	***	0.244
DRL _{injection_area}	Række	> 0.001	***	0.121
DRL _{ssqrtinjection_area}	Række	> 0.001	***	0.067
DRL _{below_130cm}	Genotype	0.024	*	0.073
DRL _{ssqrtbelow_130cm}	Genotype	0.008	**	0.100
Kerne N _{isotope_sample}	Række	> 0.001	***	0.056
Udbytte	Genotype	0.011	*	0.091
Kerne protein	Genotype	0.088	*	0.097
N optagelse	Genotype	0.013	*	0.087

Vand med deuterium (^2H) i stedet for brint blev brugt til at måle optagelse af vand fra forskellige dybder i hyde



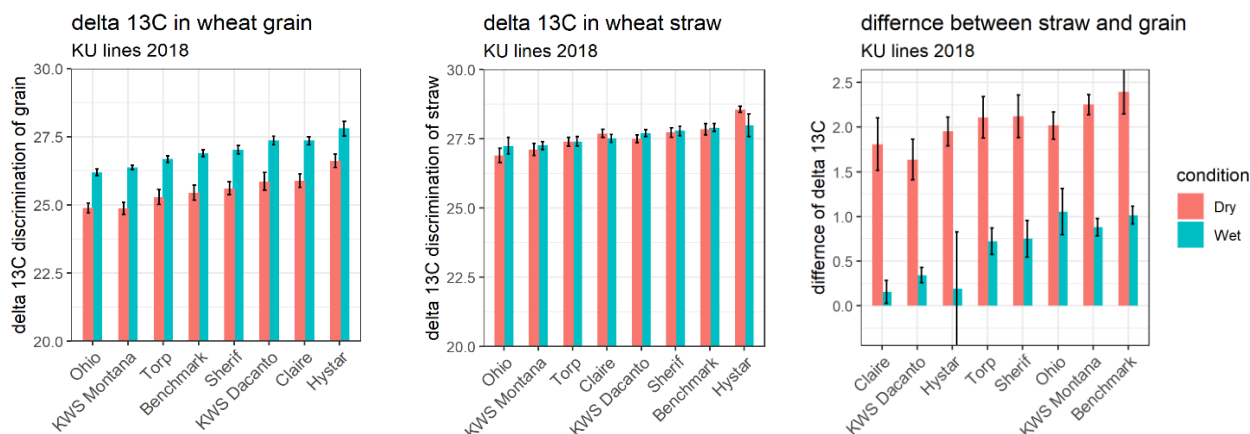
Figur 30. Måling af deuterium berigelse i transpirationsvand efter tilførsel af deuterium beriget vand i stigende dybde under hvede i 2018. Udvikling i deuterium berigelse i transpirationsvand i dagene efter injektion, hvor optagelsen kan måles allerede efter et døgn, men toppe 3-4 dage efter tilførsel (a), og berigelse i 8 sorter afhængig af hvor dybt isotopmærket vand blev tilført, målt 3 dage efter injektion (b).

^{13}C berigelse

Tørkestressgradienten i RadiMax viste en stærk effekt på den naturlige ^{13}C berigelse i vinterhvede i 2018 (Figur 31). Berigelsen blev kraftigt påvirket af tørkegradienten i kernerne, men ikke i halmen.

Resultatet viser at der var mindre tørkestres i den tidlige vækst hvor halmen blev dannet, end senere under kernefyldningen, og at der endnu ikke var nogen tørkegradient af betydning i forsøget da halmen blev dannet, mens der var en kraftig gradient da kernerne blev dannet. Der blev fundet signifikante sammenhænge imellem ^{13}C berigelse og målt rodvækst, hvilket viser at måling af ^{13}C berigelse har potentiale som indirekte mål for rodvækst og vandudnyttelse i RadiMax anlægget for hvede. Der var gode sammenhænge ved sammenligning imellem alle rækker i anlægget, men mindre klar sammenhæng på sortsniveau. Sammenhængene var ikke så sikre som for ^{15}N (se senere), måske fordi den naturlige berigelse trods alt giver små forskelle i forhold til ^{15}N hvor vi aktivt tilfører tracer. En anden årsag kan være at ^{15}N metoden med dyb placering giver direkte mål for rodaktivitet i den dybde hvor ^{15}N tilføres, i modsætning til ^{13}C der måler på tørkestress generelt, og ikke specifikt på optagelse af vand fra dybe jordlag. Isotopdata for forsøgene fra 2019 er lige modtaget fra laboratoriet og indgår i den videre analyse af rod, ^{15}N og ^{13}C data, og deres sammenhæng. Formålet er både at få estimater på hvad forskellene i dyb rodvækst betyder for dyb optagelse af vand og N, men også at bruge isotopmålingerne direkte i den genetiske analyse og forædling for sorter med effektiv dyb rodvækst, på lige fod med selve rod-målingerne.

Resultaterne af ^{13}C analyser viser en kompleks egenskab, der er resultatet af en række egenskaber. Det er især stomata åbningsgrad som via gasudvekslingen påvirker den naturlige berigelse, og det giver sammenhængen til tørkestress. Men der er også andre forskelle imellem sorterne som påvirker gasudvekslingen igennem stomata, og dermed den naturlige ^{13}C berigelse også uden vandstress. Vi antager at ^{13}C berigelsen af halmen ligger tæt på sorternes naturlige niveau uden vandstress, sådan at forskellen imellem ^{13}C berigelse i halm og kerne (Figur 31c) kan give et mere reelt billede af tørkestress end målingerne på ^{13}C i kerne i sig selv.



Figur 31. Tørkestress effekt på naturlig ^{13}C berigelse (delta ^{13}C) i 8 sorter af vinterhvede i 2018, i kerne (a), halm (b) og differencen imellem ^{13}C i kerne og halm (c).

Tabel 5: Lineær korrelation imellem ^{13}C berigelse, roddata og udbytte. Med korrelation på rækkeniveau finder vi klare korrelationer imellem dyb rodvækst og ^{13}C , på sorts niveau viser data også en signifikant korrelation, men med en mindre R^2 .

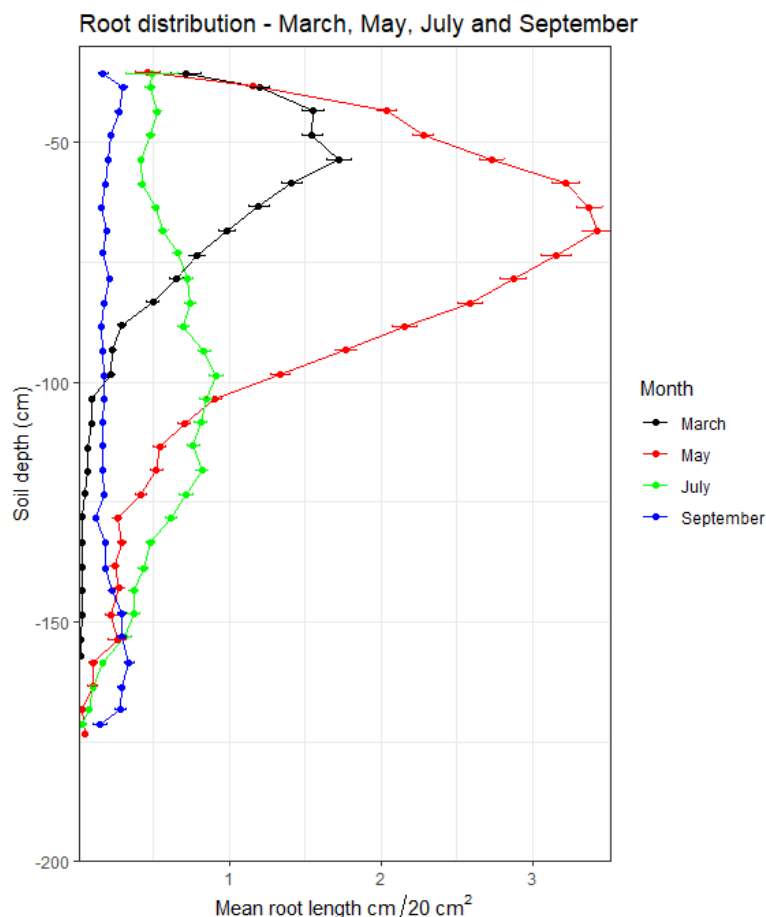
Trait	Level	p-value		R ²
DRL _{below_130cm}	Række	> 0.001	***	0.205
DRL _{ssqrtbelow_130cm}	Række	> 0.001	***	0.249
DRL _{injection_area}	Række	> 0.001	***	0.122
DRL _{ssqrtinjection_area}	Række	> 0.001	***	0.136
DRL _{below_130cm}	Genotype	0.059	.	0.051
DRL _{ssqrtbelow_130cm}	Genotype	0.026	*	0.072
Grain Yield	Genotype	0.132		0.070

Græs 2017 og 2019

Rod fænotyping

I RadiMax, har vi dyrket græs i bed 3 og 4 i 2017 og igen i 2019. Den første måling af rodvækst i rajgræs fra 2017 indikerede stor variation imellem de forskellige sorter. De metoder der blive brugt i 2017 have flere udfordringer, bl.a. med at adskille rødder fra den kalkholdige jord, og at identificere rødder når de blev ældre og mere mørkefarvede. Siden da er billedanalyse blevet stærkt forbedret, hvilket har gjort det muligt at analysere et stort antal rodbilleder.

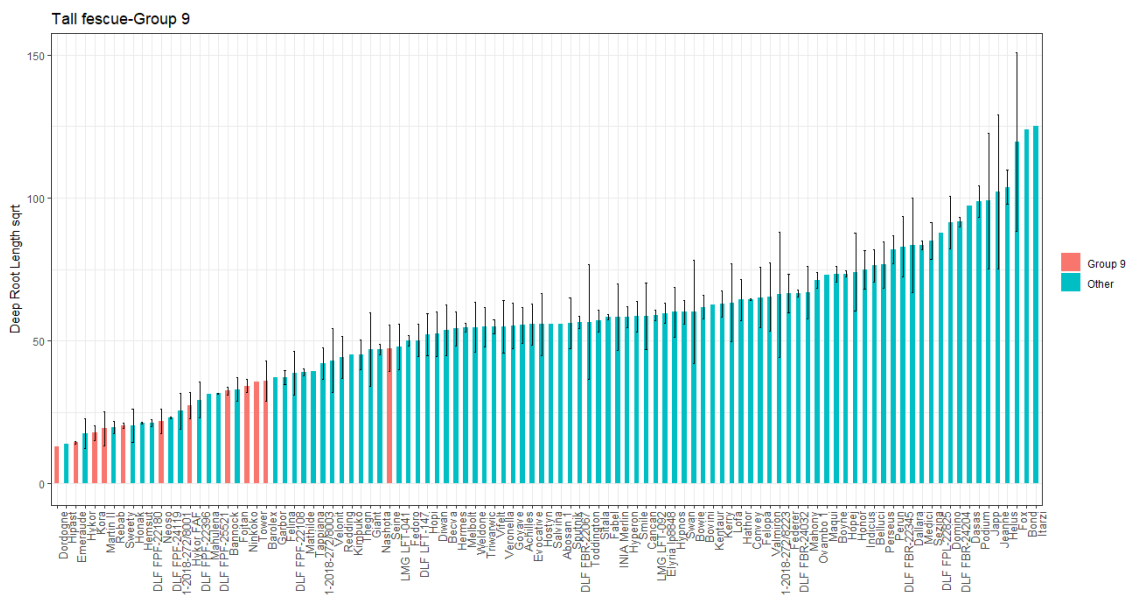
Roddata for græs fra 2019 er en sammensætning af 4 forskellige billedtagninger over vækstsæsonen, som er analyseret ved hjælp af den nye CNN-metode beskrevet tidligere.



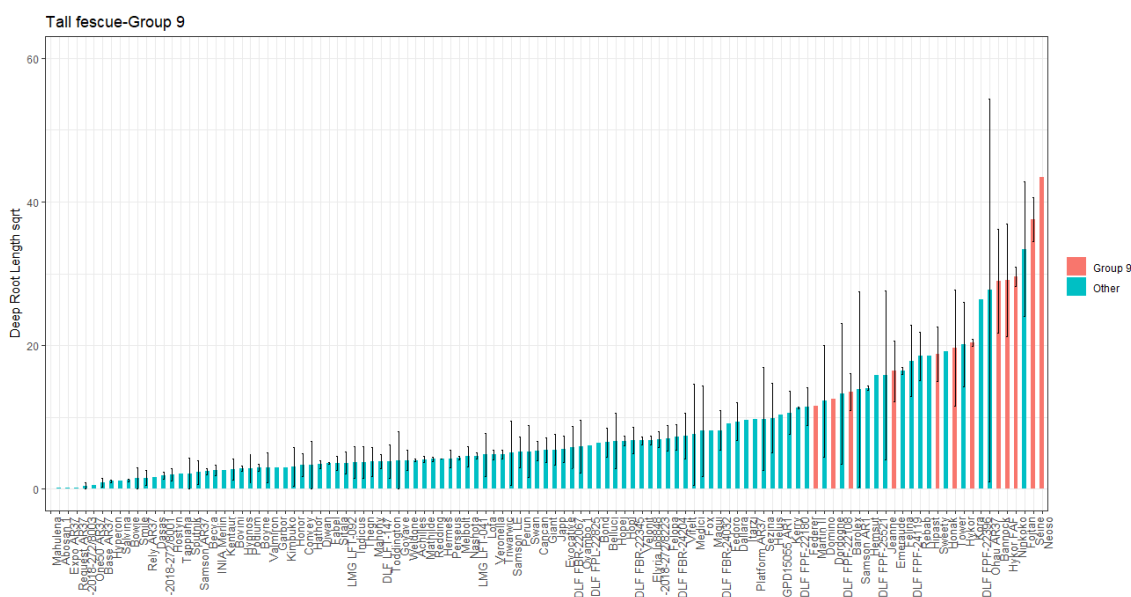
Figur 32. Rodprofiler for græs over vækstsæsonen 2019.

Rødderne voksede dybere ned fra marts til maj, og var også tilstede i de senere optagelser. Den samlede mængde rødder var dog faldende, da rodlængden i de øvre jordlag var faldende over sæsonen, mens der stadig var en tilvækst af rødder i de dybeste jordlag (Figur 32). Dette er sandsynligvis forårsaget af klipping af græsset i den periode, hvilket kan have fået rødder til at dø, eller ændre udseende så de bliver sværere at identificere (Figur 32).

Græsforsøget i 2019 omfattede ni forskellige grupper, baseret på de forskellige græsarter der indgik. Hver gruppe er blevet analyseret separat. Den totale længde af dybe rødder varierede meget imellem de forskellige arter og sorter, både i maj og september. De forskellige grupper ændrede også rækkefølge mht. dyb rodlængde fra maj til september, som vist med eksempel fra strandsvingel i Figur 33 og 34.



Figur 33. Den totale rodlængde af dybe rødder fra strandsvingel i maj sammenlignet med de andre grupper.



Figur 34. Den totale rodlængde af de dybe rødder fra strandsvingel i september sammenlignet med de andre grupper.

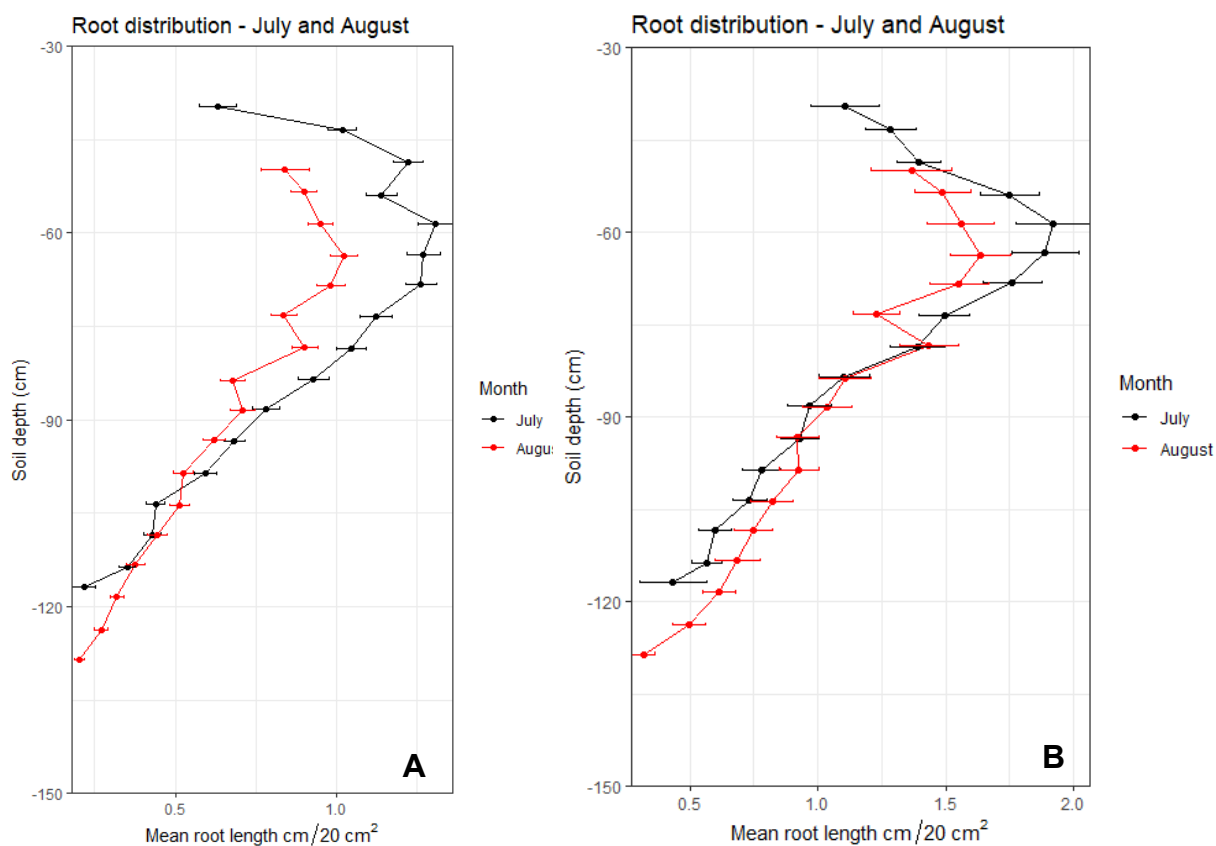
Tidligere forskning har vist at forskellige klippe-strategier kan have forskellig virkning på rodudvikling og rod-funktionalitet. Derfor blev 3 forskellige klippestrategier testet i KU-delen af eksperimentet. For at undersøge forskellen i optagelses aktivitet af rødderne, blev de stabile isotoper ^{15}N og $^2\text{H}_2\text{O}$ injiceret som tracere i jorden med undervandingssystemet, og resultaterne fra disse analyser er lige modtaget og indgår i den videre analyse.. Bed 4 vil i 2020 fortsætte med det samme eksperiment, for at måle rodudvikling på flerårige græsser.

Kartoffelsorter 2018

Kartoffeleksperimentet blev udført i 2018 i RadiMax anlæggets bed 3 og 4. Der har tidligere været kartoffel (2016) i bed 4, men ikke i bed 3. Undervandingssystemet blev sat i gang midten af juni med de 3 første vandings linjer, som vandede ned til 120 cm dybde. Pga. den ekstreme tørke i 2018 blev de næste 4 vandings linjer også åbnet, med en uges mellemrum. Forsøget var delt op i to dele, kartoflerne fra forædlerne blev plantet med 75 cm rækkeafstand, hvilket svarer til at de voksede over 3 minirhizotroner hver. I dette del af forsøget voksede hver sort direkte over et centralt rør, med et rør på hver side som supplerede det midterste rør. Kartoffelsorterne fra KU havde et andet design. KU linjerne udgjorde kun 7 forskellige sorter, der blev plantet med 50 cm mellemrum, hvorved de voksede i midten mellem 2 minirhizotroner. Pga. den begrænsede plads valgte Danespo at deres genotyper kun blev testet med en gentagelse.

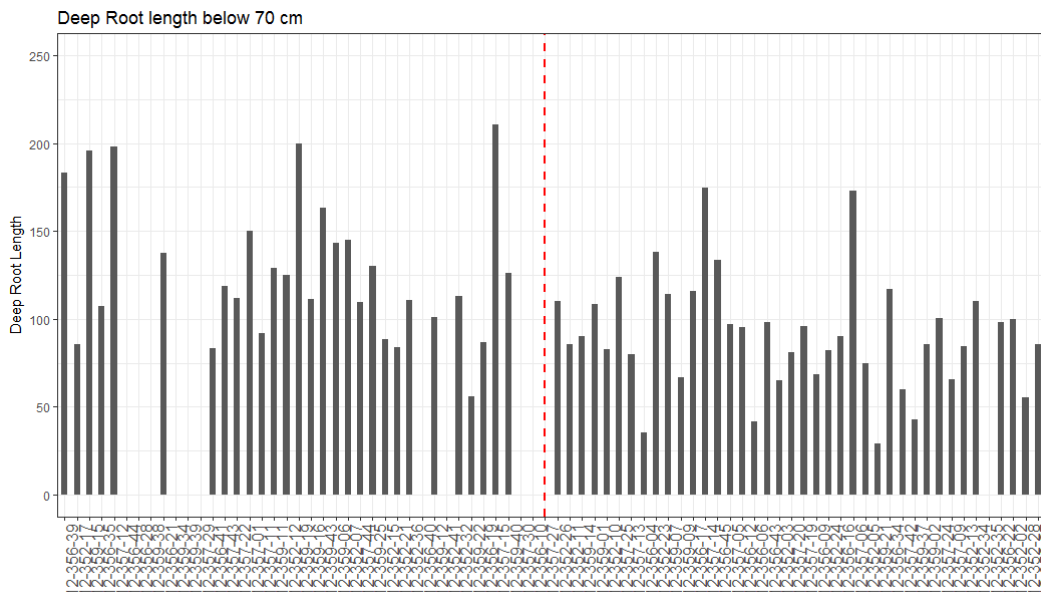
Rod fænotyping

I 2018 blev der taget billeder af kartoffelrødderne 2 gange, i juli og august. Det er tydeligt at der var et fald i den gennemsnitlige rodlængde fra juli til august. Grunden til det er sandsynligvis kombinationen af en meget tør jordprofil som gjorde det svært for CNN'et at opfange rødderne, og at mange af rødderne skrumper og skifter farve, så de bliver sværere at observere når de bliver ældre (Figur 35).

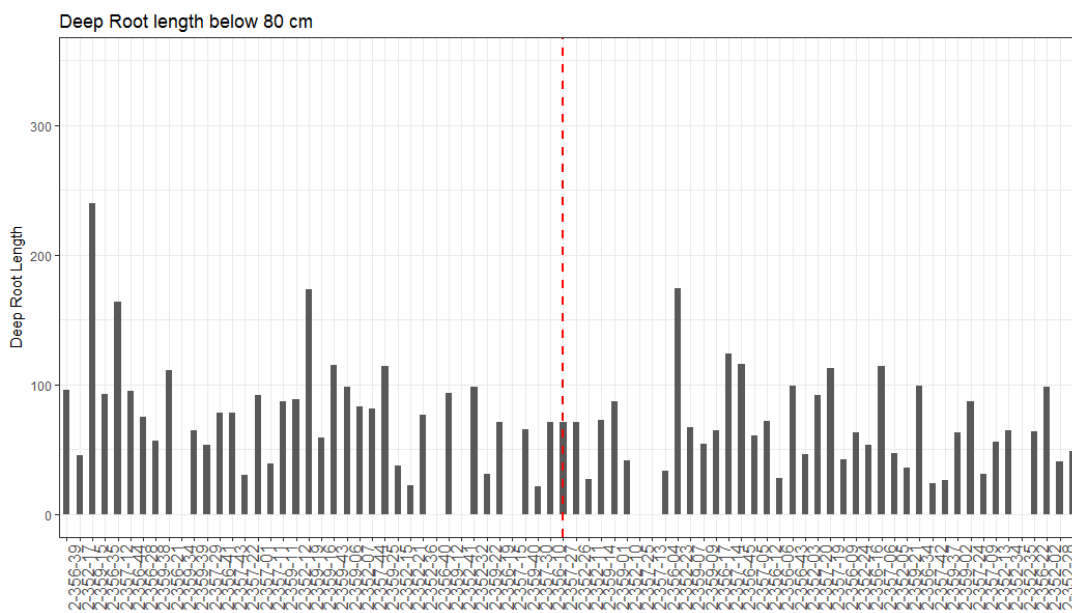


Figur 35. Rodfordelingen i forædler-sorter (A) og KU-sorter (B).

Rodfordelingen viste at den maksimale rod dybde steg fra 110 cm i juli til 140 cm i august, for både forædler-sortene og KU-sorterne. I de øvre jordlag blev der observeret flere rødder i juli end i august, men det var omvendt for de dybere rødder. Den gennemsnitlige dybe rodlængde (DRL) blev udregnet uden at tage højde for rumlig variation i anlægget, der skal tage højde for at jordforholdene kan variere igennem de to bede. Dette kunne ikke analyseres på samme måde som i hvede, da der kun var én gentagelse. Det blev dog observeret at der generelt var flere dybe rødder i bed 3 end i bed 4, i begge billedtagninger (figur 36 og 37).



Figur 36. Rodlængde (cm) i dybt jordinterval (70-120 cm) i juli. Den røde linje adskiller data fra de to bed.



Figur 37. Rodlængde (cm) i dybt jordinterval (80-130 cm) i juli. Den røde linje adskiller data fra de to bed.

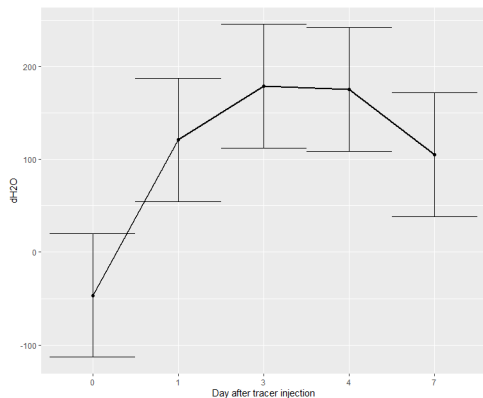
I både forædlerlinjer og KU sorterne var der en klar tendens til lavere udbytte hvor sorterne var udsat for stærk tørkestres end hvor de kunne nå undervandingen så de ikke blev udsat for så hård tørkestres.

Isotop tilførsel

Den stabile isotop ^{15}N er blevet tilført på langs af bedene i 140 cm dybde, ved hjælp af undervandingssystemet. $^2\text{H}_2\text{O}$ blev kun injiceret til KU sorterne.

Transpiration af $^2\text{H}_2\text{O}$

Indledende resultater indikerer øget optagelse af $^2\text{H}_2\text{O}$ over tid, og at det toppes den 3-4 dag, stort set som i hvede (Figur 38).



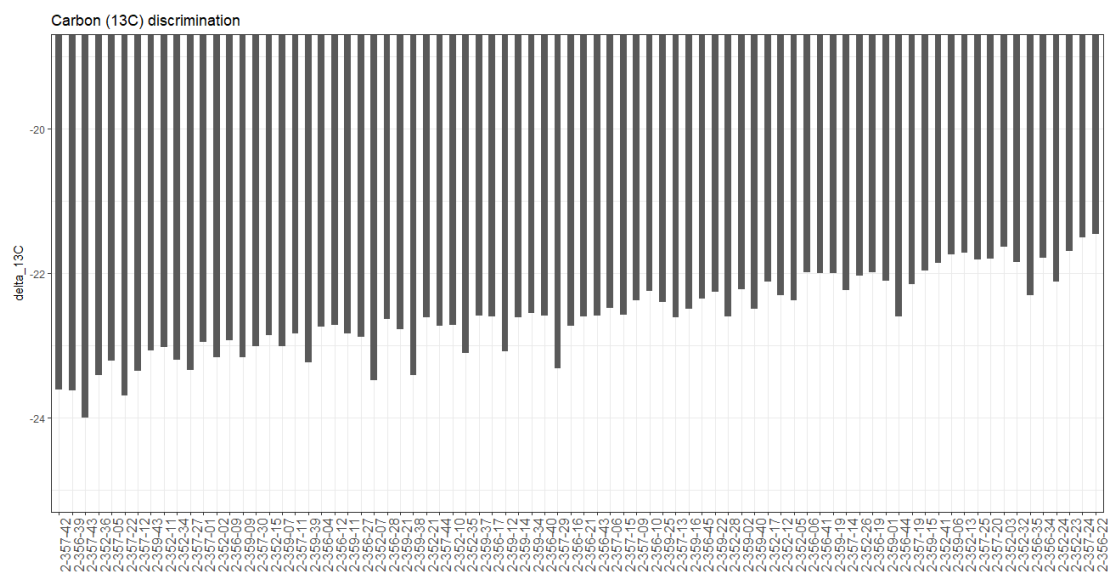
Figur 38: tidslinje for optagelse af $^2\text{H}_2\text{O}$ fra dag 0 til 7 efter injektion.

Indledende data viser at nogle genotyper optog vand ved 140 cm's dybde (Figur 39), men at det ikke var alle der var i stand til det. Ligesom i vinterhvede var variationen for høj til at kunne måle statistisk signifikante forskelle i vandoptag, sorterne imellem.



Figur 39: $^2\text{H}_2\text{O}$ optagelse 3 dage efter injektion i 5 forskellige dybder under de 7 forskellige KU-sorter.

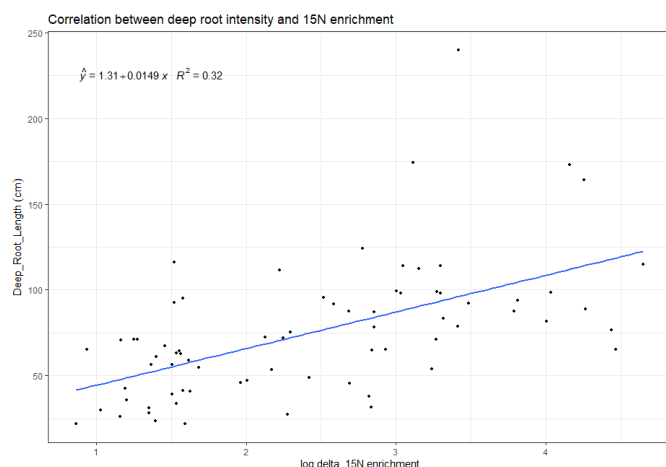
I modsætning til observationerne fra vinterhvede i 2018 blev der ikke fundet nogen tydelig korrelation mellem dyb rodlængde og ^{13}C . Rumlig variation havde ikke den store indflydelse på ^{13}C , men der var en lille forskel i ^{13}C sorterne imellem (Figur 40). Dette indikerer at det ikke er den dybe rodlængde ikke er den afgørende faktor i ^{13}C forskellighed sorterne imellem.



Figur 40. forskel i gennemsnit af $\delta^{13}\text{C}$ værdier sorterne imellem ved høst.

^{15}N optagelse

^{15}N berigelse blev bestemt på tørrede og kværnede prøver af kartofler fra de to planter der voksede over den isotopfyldte vandingslinje. ^{15}N optagelsen var det der var bedst korreleret med den samlede dybe rodlængde, opgjort som summeret kvadratrods af rodlængde på de enkelte billeder (Figur 41).



Figur 41. Lineær korrelation mellem dyb rodlængde i juni og ^{15}N i kartoffelknolde ved høst, efter tilførsel af ^{15}N i ca. 130 cm dybde under kartofler i juni 2018

Vårbyg

Vårbyg blev dyrket i RadiMax i 2017 og i 2016 før Robusta projektets start. Arbejdet med Byg er allerede blevet afrapporteret i tidligere statusrapporter for Robusta og de er publiceret i videnskabelige artikler, hvorfor det ikke vil blive diskuteret yderligere i denne rapport. En videre forklaring af rodfænenotype arbejde, isotop data- og billedeanalyse kan findes i de følgende udgivelser:

Rodphenotype data er blevet forklaret i detaljer i udgivelsen Svane et. al (2019a).

Isotopdata er blevet fremstillet i Chen et al. (2019).

Billedanalyse metoderne fra arbejdet før den CNN baserede billedanalyse blev udviklet kan findes i udgivelsen Svane et al. (2019b).

Referencer:

- Chen, S., Svane, S.F., Thorup-Kristensen, K., 2019. Testing deep placement of a ^{15}N tracer as a method for in situ deep root phenotyping of wheat, barley and ryegrass. *Plant Methods* 15, 148, doi:10.1186/s13007-019-0533-6.
- Gizaw, S.A., Garland-Campbell, K., Carter, A.H., 2016. Evaluation of agronomic traits and spectral reflectance in Pacific Northwest winter wheat under rain-fed and irrigated conditions. *F. Crop. Res.* 196, 168–179. doi:10.1016/J.FCR.2016.06.018
- Hoffmann, H., Jensen, R., Thomsen, A., Nieto, H., Rasmussen, J., Friberg, 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
- Jensen, H.E., Svendsen, H., Jensen, S.E., Mogensen, V.O., 1990. Canopy-air temperature of crops grown under different irrigation regimes in a temperate humid climate. *Irrig. Sci.* 11, 181–188. doi:10.1007/BF00189456
- Jones, H.G., Serraj, R., Loveys, B.R., Xiong, L., Wheaton, A., Price, A.H., 2009. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct. Plant Biol.* 36, 978. doi:10.1071/FP09123
- Kelly, J., Kljun, N., Olsson, P.-O., Mihai, L., Liljeblad, B., Weslien, P., Klemedtsson, L., Eklundh, L., Kelly, J., Kljun, N., Olsson, P.-O., Mihai, L., Liljeblad, B., Weslien, P., Klemedtsson, L., Eklundh, L., 2019. Challenges and Best Practices for Deriving Temperature Data from an Uncalibrated UAV Thermal Infrared Camera. *Remote Sens.* 11, 567. doi:10.3390/rs11050567
- Prashar, A., Yildiz, J., McNicol, J.W., Bryan, G.J., Jones, H.G., 2013. Infra-red Thermography for High Throughput Field Phenotyping in *Solanum tuberosum*. *PLoS One* 8, e65816. doi:10.1371/journal.pone.0065816
- Sagan, V., Maimaitijiang, M., Sidike, P., Eblimit, K., Peterson, K., Hartling, S., Esposito, F., Khanal, K., Newcomb, M., Pauli, D., Ward, R., Fritschi, F., Shakoor, N., Mockler, T., Sagan, V., Maimaitijiang, M., Sidike, P., Eblimit, K., Peterson, K.T., Hartling, S., Esposito, F., Khanal, K., Newcomb, M., Pauli, D., Ward, R., Fritschi, F., Shakoor, N., Mockler, T., 2019. UAV-Based High Resolution Thermal Imaging for Vegetation Monitoring, and Plant Phenotyping Using ICI 8640 P, FLIR Vue Pro R 640, and thermoMap Cameras. *Remote Sens.* 11, 330. doi:10.3390/rs11030330
- Sankaran, S., Khot, L.R., Carter, A.H., 2015. Field-based crop phenotyping: Multispectral aerial imaging for evaluation of winter wheat emergence and spring stand. *Comput. Electron. Agric.* 118, 372–379. doi:10.1016/J.COMPAG.2015.09.001
- Svane, S.F., Jensen, C.S., Kristensen, K.T., 2019a. Construction of a large-scale semi-field facility to study genotypic differences in deep root growth and resources acquisition. *Plant Methods* 15, 26, doi:10.1186/s13007-019-0409-9.
- Svane, S.F., Dam, E.B., Carstensen, J.M. et al. 2019b. A multispectral camera system for automated minirhizotron image analysis. *Plant Soil* 441, 657–672, doi:10.1007/s11104-019-04132-8
- Youssef Bayoumi, T., Atta Mahmoud, S., Sabry Hamada Yousef, M., Abed El Gawad Emam, M., 2015. Detecting drought tolerance in wheat genotypes using high-throughput phenotyping Techniques 17–20.

Arbejdspakke 2. Dataintegration og selektion af forædlingsmateriale

Marta Malinowska, Anja Karine Ruud, Istvan Nagy, Mattia Fois og Torben Asp. Aarhus Universitet, Institut for Molekylærbiologi og Genetik - Afgrødeggenetik og Bioteknologi

Introduktion

I fremtiden vil danske afgrøder opleve alvorligere perioder med ekstremt vejr, f.eks. tørke. Det er derfor nødvendigt at identificere planter som er mere robuste for tørkestress, og som effektivt kan udnytte de tilgængelige ressourcer også under pressede forhold. Forædlere benytter allerede genetisk information til at selekttere forædlingsmaterialet, som f.eks. markør-assisteret selektion (MAS) og genomisk selektion (GS). Men egenskaber knyttet til forædling og stresstolerance har oftest en kompleks genetisk baggrund, med mange gener involveret. Dette gør det vanskelig at identificere genetiske markører med tilstrækkelig præcision til at bruge i forædlingen, eller prædikere de bedste forædlingslinjer.

Forholdet mellem fænotype og genotype er komplekst og inkluderer biologiske processer som ikke kan opfanges direkte fra DNA-sekvensen. Et eksempel er epistatiske effekter som skyldes interaktioner mellem alleler ved to eller flere loci. Disse effekter er dermed vanskelige at estimere og bliver normalt ikke inkluderet i genetiske prædiktionsmodeller. Det er derfor meningsfyldt at inkludere flere lag af 'omics' data, som for eksempel genekspression eller DNA-metylering, i prædiktionsmodeller. Disse regulatoriske lag kan forklare interaktioner mellem loci og mellem genotype og miljø, og med det øge vores evne til at prædikere fænotypisk variation. Fænotypisk prædiktation kan være nyttig for at afgøre en sorts kommercielle værdi (Cossa et al. 2017).

De seneste teknologiske fremskridt inden for DNA/RNA sekventeringsteknologier har fremmet udviklingen af metoder til hurtig analyse på DNA-, RNA-, og DNA-metyleringsniveau. DNA-metylering indgår i reguleringen af planters udviklingsprocesser og respons på biotiske og abiotiske miljøpåvirkninger (Cubas et al., 1999; Le et al., 2014; Manning et al., 2006). DNA-metylering er et komplekst samspil mellem genetisk kontrol, miljømæssige påvirkninger eller stokastisk epigenetisk variation. Arvelige epigenetiske varianter kan være under naturlig selektion og bidrage til tilpasning af genetisk variation. (Richards et al., 2017). Ydermere menes DNA-metyleringens reversibilitet at være en kilde til fænotypisk plasticitet, og kan i et dynamisk miljø være fordelagtig for overlevelse og/eller reproduktion (Springer, 2013). På nuværende tidspunkt vides det ikke, hvorvidt epigenetisk variation kan udnyttes i prædiktionsmodeller og forbedre den fænotypiske diversitet, hvilket vil give nye muligheder for at forbedre afgrøden ved hjælp af planteforædling (Gallusci et al., 2017; Springer & Schmitz, 2017). Dette var udgangspunktet inden vi startede Robusta-projektet.

I AP2 har vi arbejdet med at integrere genekspressions- og metyleringsdata i relation til genetisk information, og kvalitets- og forædlingsrelaterede egenskaber. Vi har arbejdet med byg (*Hordeum vulgare*) og rajgræs (*Lolium perenne*). Afgrøderne blev dyrket i Radimax-anlægget i 2017, hvor de blev udsat for tørkestress afhængig af hvor i faciliteten de voksede (se tidligere rapporter).

Metoder

Plantemateriale

DNA blev isoleret fra 75 vårbyglinier og 269 rajgræspopulationer indsamlet fra Radimax faciliteten (AP1) i 2017. Laboratoriearbejdet og plantematerialet er tidligere beskrevet i rapporten fra 2018.

RNA isolering

RNA blev isoleret fra 75 vårbyg linier og 269 rajgræs populationer indsamlet fra Radimax faciliteten (AP1) i 2017. For hver linje/population blev der isoleret RNA fra kontrol og tørkestressede planter. Vi har brugt en standard protokol for ekstrahering af RNA (Sigma Spectrum™ Plant Total RNA).

Forberedelse af epiGBS biblioteker og dataanalyse

DNA blev isoleret og anvendt til at fremstille epiGBS biblioteker. epiGBS metoden kombinerer genotypebestemmelse ved hjælp af sekventering med bisulfitkonversion for at tilvejebringe metylomiske og genomiske data. Metoden anvender to restriktionszymer til at fragmentere genomisk DNA, som efterfølgende liggeres til adaptore, som er kompatible med Illumina sekventeringsteknologi. Efter ligering til adaptore pooler prøverne, DNA fragmenterne selekteres efter størrelse, behandles med bisulfit og amplificeres ved hjælp af PCR. Sekventerede data blev analyseret med WellMeth pipelinen (Malinowska et al., unpublished).

Analyser og resultater

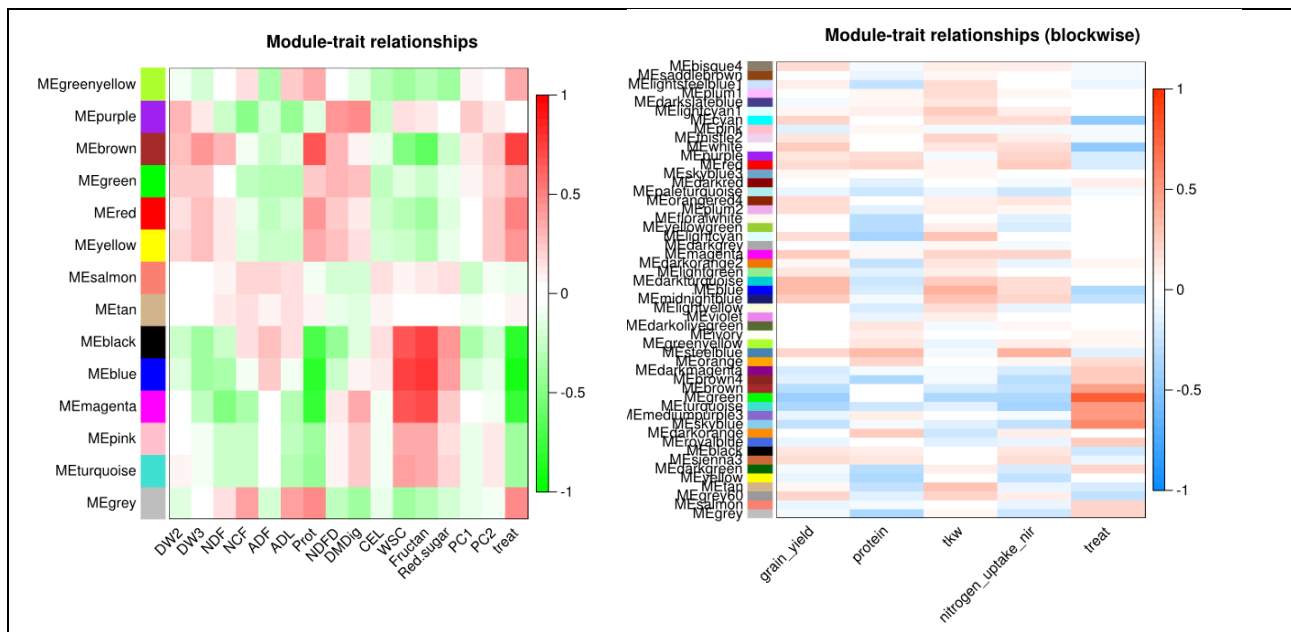
I det følgende beskrives resultaterne generelt for både byg og rajgræs, og fremstiller resultaterne som eksempler og for at illustrere vores strategier, end en fuldstændig oversigt over alle resultater fra projektet, da det vil være for omfattende i denne rapport. En komplet oversigt over alle resultaterne kan ses i Appendiks 1 og 2 for henholdsvis rajgræs og byg.

RNAseq analyser

RNA-transkripterne blev kortlagt mod de respektive referancegenom for byg og rajgræs, og kvantificering af de enkelte transkripter blev udført med HISAT og STRINGTIE, og KALLISTO. Efterfølgende blev de kvantificerede data brugt til at udføre differentiell genekspressionssanalyse (DE-analyse, fra engelsk differential expression) baseret på planternes respons på tørke versus kontrol. Disse analyser blev gjort i R med DESeq2 og Sleuth. Nogle af disse analyser er beskrevet i rapporten for 2018, derfor beskrives ikke DE analyse her. I øvrigt blev genekspressionsdataene brugt i flere analyser, som beskrevet i det følgende.

Co-expressions analyser med WGCNA

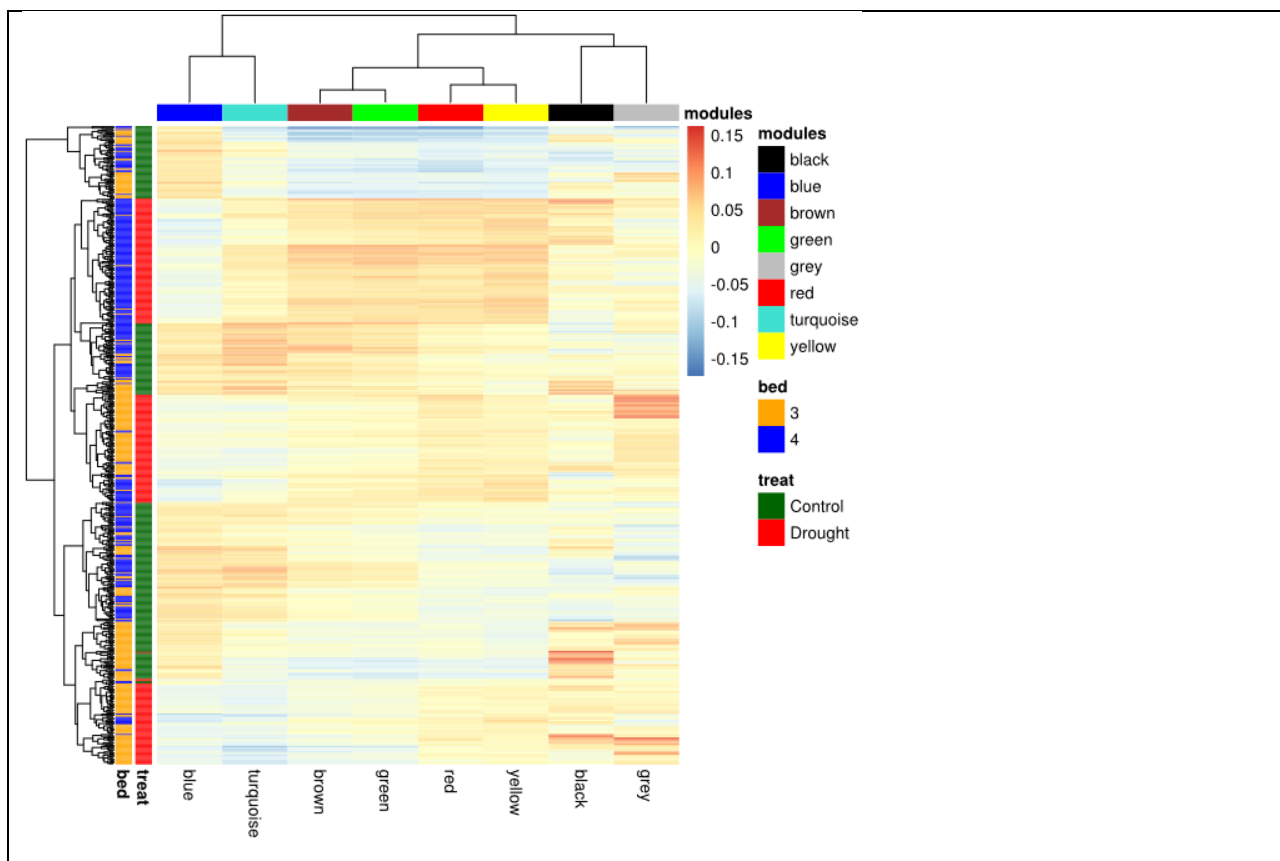
Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) blev udført i R. Dette er en alternativ måde at analysere normaliserede genekspressionsdata på. Her er fokus rettet på at identificere netværk (moduler) af gener som har lignende op- og nedreguleringsmønstre under forskellige behandlinger, vækststadier eller lignende. Netværkene kan så korreleres med fænotyper, som i vores forsøg vil være fænotyper knyttet til rodudvikling eller forædling (Figur 1). Ofte kan man finde biologisk meningsfulde sammenhænge mellem gener inden for et modul og den fænotypiske variation.



Figur 1. Eksempler på modul-fænotype-korrelation baseret på analyse af næsten 600 RNA-prøver fra rajgræs (venstre) og byg (højre) i 2017. Modulerne på y-aksen repræsenterer eigengen-værdier fra co-expressionsanalysene. På x-aksen er de forskellige fænotyper. Røde felter i figuren betyder en stærk positiv korrelation mellem fænotypiske værdier og eigengen for en modul. Modsat viser grønne ruder negativ korrelation.

Effekten af tørke var meget stærkere i forsøget med rajgræs, noget som genspejles i genekspressionen i rajgræs end i byg, og påvirker blandt andet antallet af moduler (Figur 1). Dette skyldes at tørken vil være den stærkeste biologiske driver bag mønstrene af genekspression, noget vi kan se af Figur 2, hvor det fremgår at de individuelle prøver først og fremmest er grupperet efter hvorvidt de er indsamlet fra tørke/kontrol.

Genetiske varianter i de gener vi identificerer både fra DE og WGCNA kan bruges i genomisk prædiktionsanalyse. I klassisk DE analyse, kan vi identificere gener som er signifikant differentielt udtrykt mellem behandlinger, men vi detekterer ikke interaktionerne mellem disse, heller ikke nødvendigvis gener som er vigtige i reguleringen, men ikke udtrykkes 'forskelligt nok' til at blive identificeret af analysemetoden.

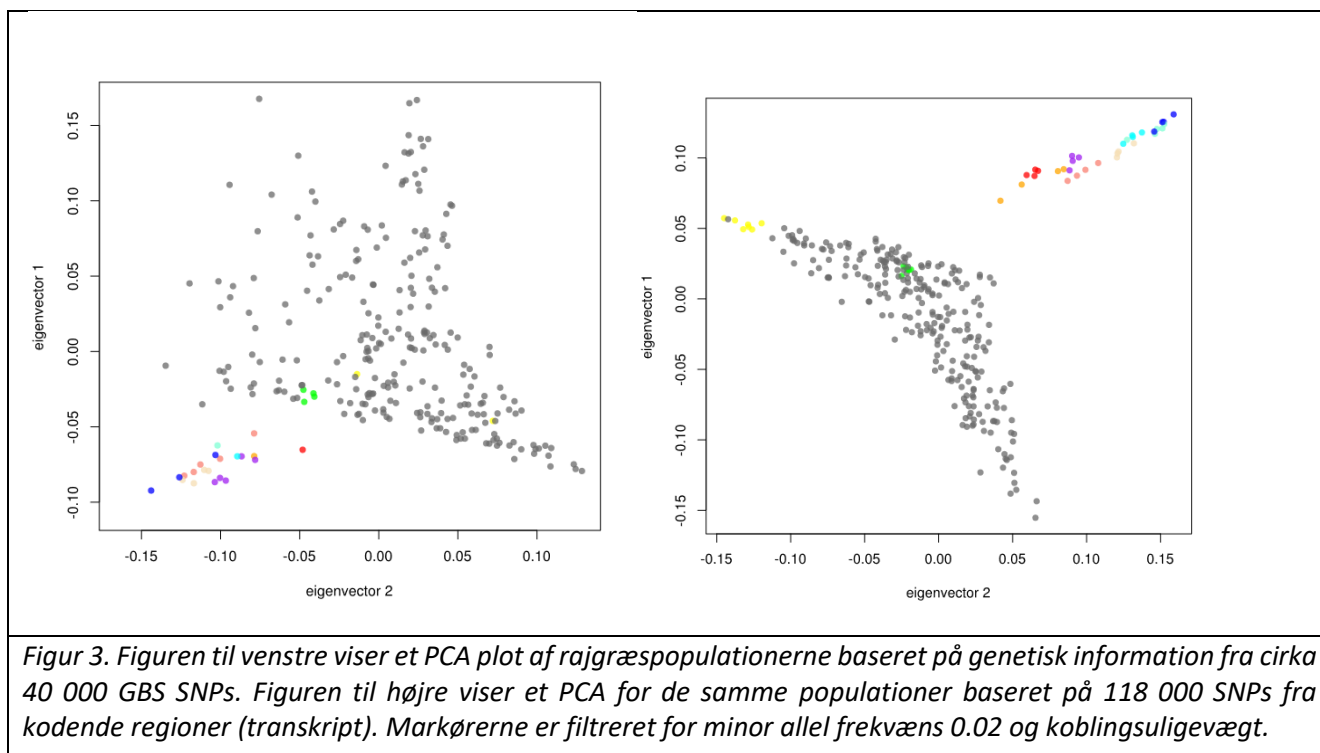


Figur 2. Prøve (sample)-eigegen-matrix som viser korrelationen mellem de individuelle prøver og modul-eigegen. På x-aksen er modulerne, på y-aksen er de individuelle prøver. Som vi kan se af den grønne og røde markering langs y-aksen er prøvene grupperet efter om de var udsat for tilstrækkelig vanding, eller tørke, men bed havde også en betydning.

I WGCNA kan vi opfange hele, biologisk meningsfyldte pathways og undersøge direkte hvorledes de korrelerer til fænotyper. Det er derfor rimeligt at antage, at SNPs fra et sæt gener fra en WGCNA-modul er stærkt korreleret til en agronomisk vigtig fænotype, hvilket kan være interessante at bruge i genomisk prædiktation.

Genetiske analyser

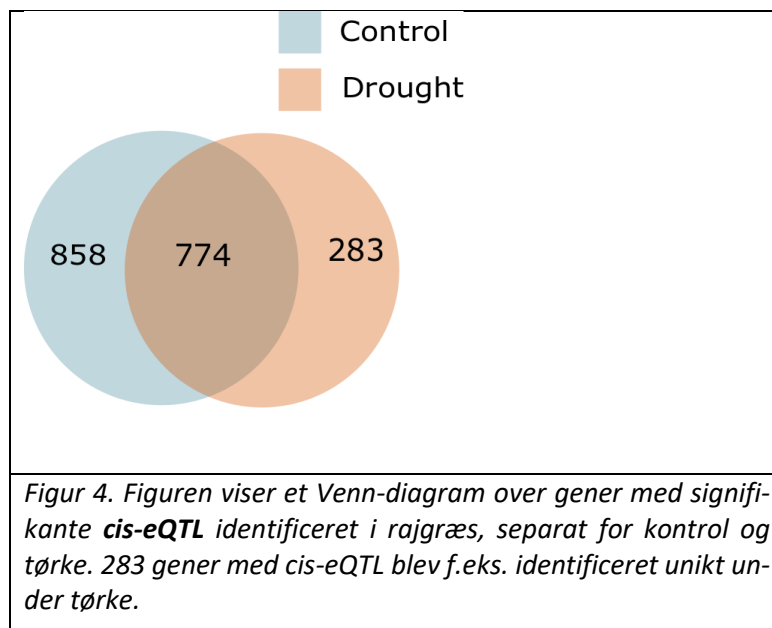
Et overordnet mål for projektet er at udvikle strategier for genetisk forædling og brug af multi-omics-data i forædlingen. Vi er derfor specielt interesserede i genetisk funderet variation (SNPs) som kan forklare forskelligheder på de øvrige omics-niveauer (genekspression, DNA-metylering) mellem stress-tolerante og -sensitive genotyper. Vi har arbejdet med SNPs fra Genotyping-By-Sequencing (GBS) (rajræs), transkriptomet og kommercielle SNP chips (for byg) som nævnt i rapporten fra 2018.



Som det fremgår af Figur 3, giver SNPs fra GBS og RNA forskelligartet information. Fra RNA vil alle genetiske varianter findes inde i transkriberet DNA (mRNA). Fra GBS forventes en fordeling af varianter udenfor kodende regioner, for eksempel i repetetive regioner, og inde i gener. En Mantel-test viste en R-værdi (korrelationskoefficient) på 0.72 mellem kinship-matricer for de samme genotyper genereret fra hhv. GBS og RNA-markører i rajgræs. Dette indikerer en signifikant positiv korrelation, men også at der er forskelligheder.

eQTL analyser

Da genome-wide associationsstudier (GWAS) og QTL-kortlægning kan bruges til at identificere genetiske markører tæt forbundet med fænotypisk variation for egenskaber som protein-indhold, højde og så videre, kan eQTL-analyse identificere SNPs som er signifikant forbundet til forskelle i genekspressionen. Analysen blev udført i MatrixEQTL i R. Eftersom effekten af tørke var meget lav i byg, præsenteres her kun resultater fra rajgræs som et eksempel på hvorledes analysen kan bruges. I analysen skelner man mellem *trans*- og *cis*-eQTL. *Trans* betyder at den genetiske variant sidder udenfor ('langt fra') genet hvis udtryk det påvirker. *Cis* betyder at den genetiske variant sidder inde i genet (mRNA) eller i et forhåndsdefineret vindue omkring genet.



SNP data fra GBS blev benyttet i analysen, da transkriptom-baserede SNPs kun befinder sig indeni exons (transkriberet RNA). Genekspressionsdataene blev opdelt i kontrol og tørke og analyseret separat. Derefter blev overlappet mellem dem analyseret. 283 gener med signifikante *cis-eQTL* blev observeret kun under tørke (Figur 4), og af disse var omkring 100 også blandt de tidligere identificerede DE gener (se projektrapporten for 2018). Det er rimelig at antage at blandt disse genetiske varianter er flere af kausal betydning for hvorledes en genotype takler tørkestress. De vil derfor også være relevante at inkludere disse i prædiktionsmodeller.

Multi-omic prædiktions i byg

Som nævnt indledningsvis, kompliceres forædling og genomisk prædiktions for forbedret stress-tolerance og næringsoptag af at disse egenskaber er kontrolleret af mange gener, hvert med små effekter. Desuden er genotype x miljø (GxE) interaktionerne ofte store, og reducerer muligheden for nøjagtig registrering og tolkning af fænotyperne. Omic-data som genekspressionsdata kan tilbyde ekstra lag af information om hvorledes planten reagerer på miljøet, og er således med til at forklare GxE interaktioner. Ud over det, bidrager de også til at forklare genetiske interaktioner som epistatiske effekter. Li et al. (2019) introducerede begrebet “omics-augmented broad sense heritability”, hvor ikke kun additive genetiske effekter er regnet med, men også effekterne af downstream regulering ved at man inkluderer omics-information. Nogle resultater fra vores multi-omics prædiktions er beskrevet i rapporten fra 2018. I løbet af vinteren 2019 har vi herudover leveret genetisk estimerede forædlingsværdier (GEBVs) til de involverede planteforædlere.

Tabel 1 Forklaret varians og prædiktionsnøjagtighed (CV, for cross-validation) for udbytte (grain yield) i byg.								
Model	TRT	Line	SNP	MET	GE	Model	Residual error	CV
Line	0.09	0.29	NA	NA	NA	0.39	0.61	0.54
Line + SNP	0.09	0.1	0.22	NA	NA	0.40	0.61	0.58
SNP	0.09	NA	0.29	NA	NA	0.39	0.61	0.57
Line +MET	0.14	0.29	NA	0.18	NA	0.62	0.39	0.52
MET	0.14	NA	NA	0.35	NA	0.49	0.53	0.35
Line+GE	0.10	0.25	NA	NA	0.28	0.68	0.34	0.58
GE	0.09	NA	NA	NA	0.50	0.63	0.38	0.48
Line + SNP + MET	0.13	0.15	0.22	0.14	NA	0.65	0.34	0.57
Line + SNP + GE	0.12	0.13	0.20	NA	0.68	0.72	0.30	0.61
Line + SNP + MET + GE	0.12	0.13	0.19	0.11	0.16	0.72	0.30	0.60
Genomic heritability: 0.28								

Tabel 1 viser et eksempel på modeller for genomisk og multi-omic prædiktio n i byg, for egenskaben grain yield (udbytte). Det er en trend at en større fænotypisk varians kan forklares når gene kspressionsdata (GE) inklude res i modellen, og at prædiktionsnøjagtigheden (CV) også forøges.

Vi har gennem dataanalyserne beskrevet ovenfor, identificeret gener og genetiske varianter i gener, som spil ler en rolle i genotypernes præstation under tørkestress. I de genomiske og multi-omics-analyser beskrevet ovenfor har alle genetiske markører den samme effekt. Man kan også vælge at give nogle markører en større effekt, hvis de er kendt fra for eksempel QTL-analyse. Men disse markører vil ofte være få i antal og ikke nødvendigvis findes i den aktuelle forædlingspopulation. Ved at analysere transkriptomdata, kan vi identificere langt flere sammenhænge og gener, og levere mere omfattende lister over de tilknyttede markører eller geno miske regioner, der spiller væsentlige roller 1) under specifikke miljøforhold og 2) i de agronomiske egenskaber vi er interesseret i. Disse regioner eller markører kan så gives en vægt i modellen. Hensigten er at denne information (DNA markører) skal kunne overføres til analyser af forædlingsmateriale, hvor man ikke har udført transkriptomanalyse, og forbedre prædiktio nen af forædlingsværdier (GEBV).

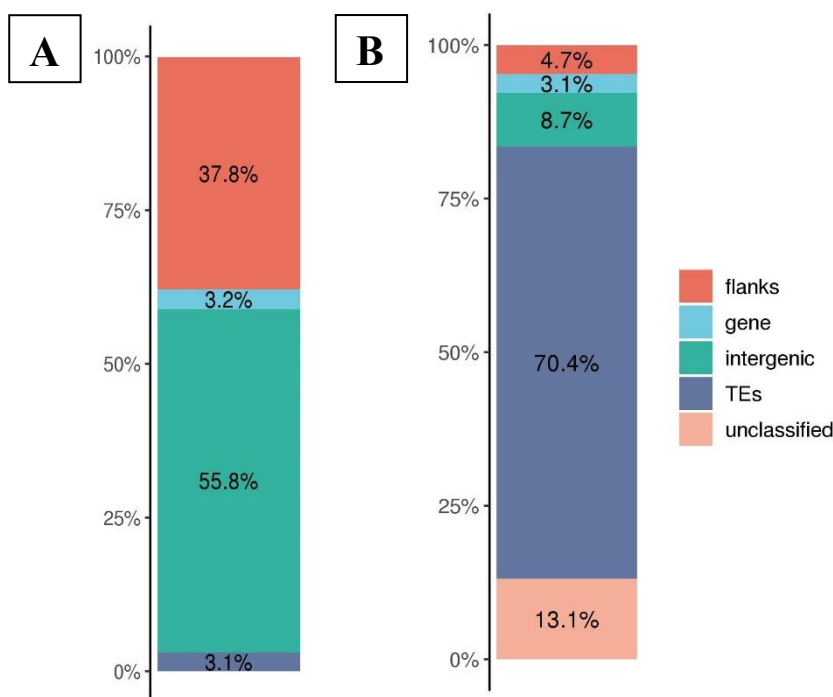
Hvis man tester disse markører i det samme plantemateriale hvor man identificerede dem, risikerer en at se en falsk positiv korrelation. Derfor udførte PhD student Pernille Bjarup Hansen et separat rod-forsøg, med andre genotyper end de som blev undersøgt i Robusta-projektet. Hun identificerede næsten 600 SNPs i gener i et modul signifikant korreleret til rodvækst (intensitet og vækstrate) ved hjælp af WGCNA, som beskrevet ovenfor). Disse SNPs er efterfølgende blevet brugt til at informere prædiktionsmodellerne i rajgræs. Foreløbige resultater indikerer, at dette kan forbedre prædiktionsnøjagtigheden og forklare yderligere varians. Vi har også data fra separate forsøg i byg.

Epigenetiske analyser

Vi udførte global DNA metyleringsanalyse af byglinjerne og rajgræspopulationerne. Vi identificerede 3.7M unikke DNA metylerede loci i byg og 4.6M i rajgræs. Analysen viste, at 1.6M metylerede loci var konstant DNA metyleret i 90% af de 146 byglinjer og 0.01M (0,2%) i 600 rajgræspopulationer. Ud af de cytosiner, der i alt blev identificeret i analysen, var 65% og 60% fuldt DNA metyleret i henholdsvis byg og rajgræs. I begge arter var CHH den dominerende type DNA metylering.

Fordeling af metylering i byg- og rajgræs-genomerne

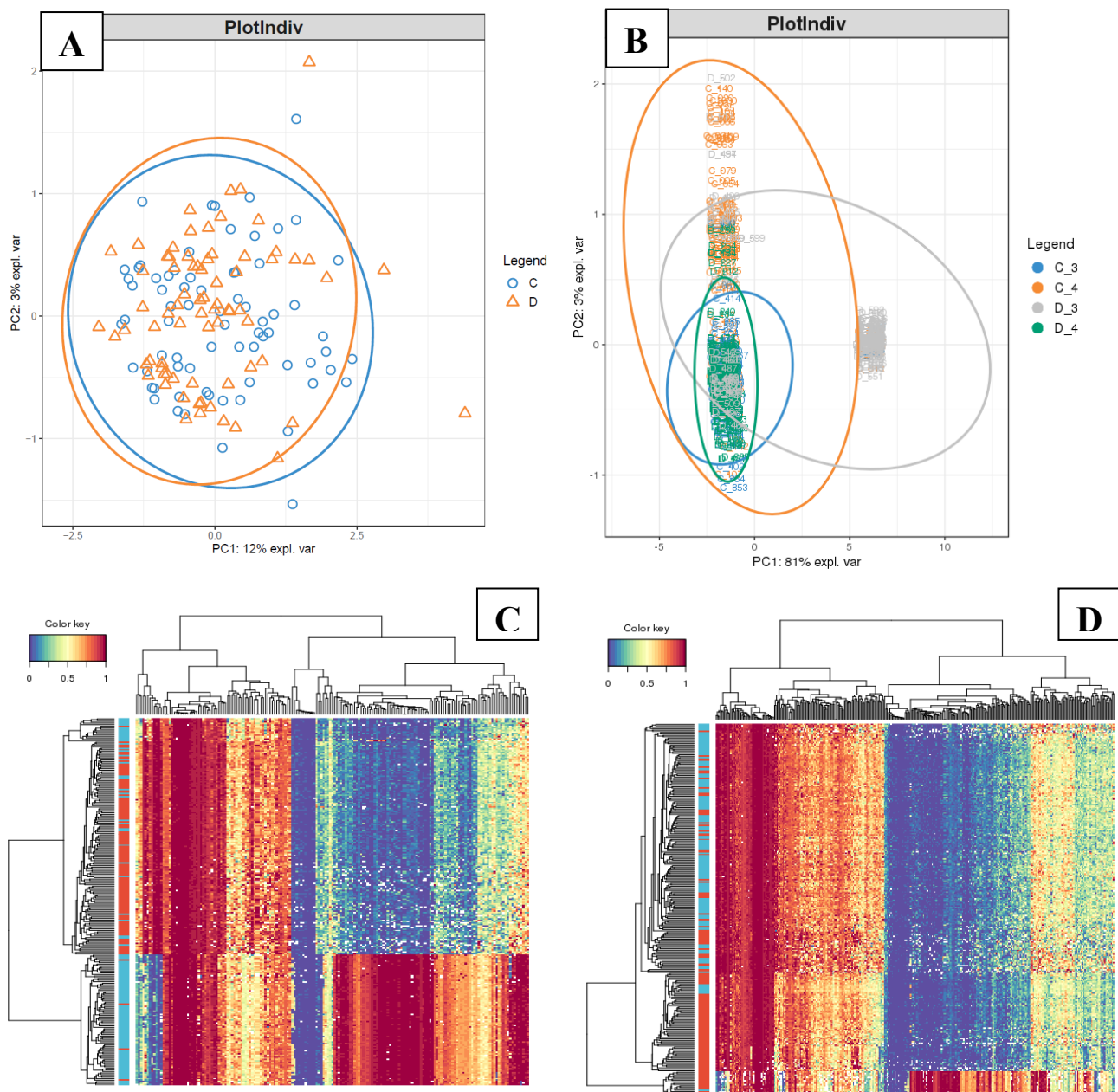
Fordelingen af DNA-metylering var relativt ens langs kromosomerne for begge arter (Figur 5). Analyse af de metylerede områder viste, at 70% af områderne i byg var i repetitivt DNA mens det kun var 3% i rajgræs. Ca. 3% af de metylerede cytosiner, der blev identificeret i begge arter, var i lokaliseret i gener (inklusive intron, exon og UTR'er), som umiddelbart afspejler størrelsesforholdet på gen-området i byggenomet (Wicker, 2017). Over 13% af de metylerede områder i byg og 90% i rajgræs var placeret i flankerende regioner specificeret som 5kb før og 2kb efter generne og i de såkaldte intergeniske regioner, medens det i byg var over 90%.



Figur 5. DNA metylering i rajgræs og byg. (A) rajgræs og (B) vårbyg.

Differentielt DNA metylerede områder

Differentiel DNA metyleringsanalyse blev udført for hver linje/population for at sammenligne ændringerne i metyleringsmønstrene under kontrol og tørkestress. Differentielt metylerede regioner (DMR) blev identificeret i begge arter. DMR'er, der blev identificeret i >50% af prøverne, blev klassificeret som "konsistente". Konsistente DMR'er udgjorde over 88% i byg og 33% i rajgræs. Principle Component Analyser (PCA) blev udført ved hjælp af gennemsnitlig metylering i DMR'er og viste ingen effekt af behandling (kontrol vs tørkestress) på byg metylomet (Figur 6A). En lignende analyse for rajgræs viste clustering i henhold til behandling (kontrol vs tørkestress) og RadiMax-grav (der er fire grave i RadiMax-faciliteten). Clustering i rajgræsprøverne (Figur 6B) indikerer, at det lokale miljø (både behandling (kontrol vs tørkestress) og RadiMax-grav) havde stor indflydelse på metyleringsniveauet.



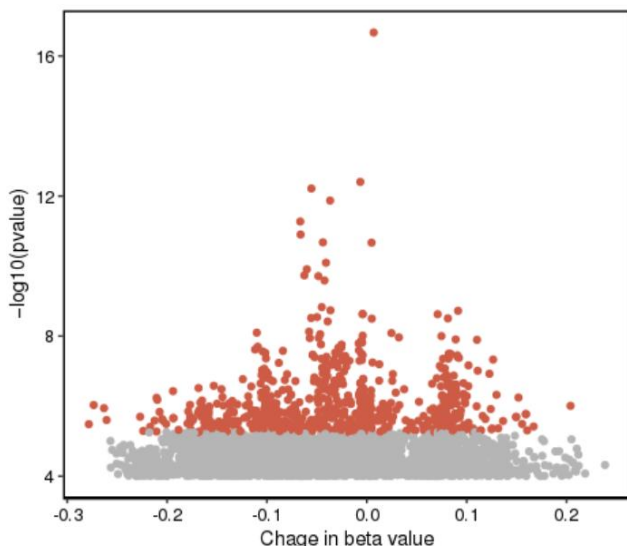
Figur 6. Metyleringsforskelle mellem planter dyrket i velvandede områder i RadiMax-faciliteten og områder med tørkestress. PCA viser første og anden komponenter baseret på gennemsnitsmetylering af DMR'er, der er identificeret i alle linjer i (A) byg og (B) rajgræs. Heatmap viser clustering i rajgræspopulationer baseret på metyleringsniveau i (C) RadiMax-grav 3 og (D) RadiMax-grav 4.

I rajgræs viste analyse af metylering på DMR-niveau en klar adskillelse mellem kontrolplanter og planter udsat for tørke (Figur 6B, C & D). For planter dyrket i Radiax-grav 3 kunne det ses, at over 140 DMR (hvoraf 17% lå i gener og promotorer) viste en stigende grad af metylering som følge af den påførte tørkestress.

Metylering QTL (methQTL; forholdet mellem genotype og epigenotype) i rajgræs.

Epigenom-wide associationsstudier (EWAS) blev udført for at undersøge sammenhængen mellem gener og metylering. Metylerings QTL (methQTL) blev identificeret ved at korrelere Single Nucleotide Polymorphism (SNP) data med CpG metylering fra de samme prøver. Resultatet af analysen viste en statistisk signifikant association mellem genetiske markører placeret i et specifikt genomisk område og spektret af heterogene metyleringsstadier i DMR'erne på tværs af rajgræs-populationerne. De identificerede loci bidrog til over 10%

variation i gennemsnitsmetyleringen. Den observerede methQTL, der kontrollerer metyleringsniveauet i udvalgte DMR'er, antyder, at epigenetisk variation i almindelig rajgræs ikke kun er under miljømæssig (Figur 2 C og D), men også under genetisk kontrol (Figur 7).



Figur 7. Vulkan plot der viser associationer af SNP'er med DNA metyleringsniveauet (DMR) i 528 planter. X-aksen viser forskellen i beta-værdi; Y-aksen viser $-\log_{10}(P)$. Rød svarer til et FDR niveau på 0.05.

Multi-omics prædiktionsmodeller og beregning af forældningsværdier for rajgræs

Modellering af komplekse egenskaber som tørkerespons under mark- eller semifield-forhold er problematisk på grund af genotype-miljøinteraktioner. Epigenetiske- og transkriptom-analyser giver værdifuld viden om, hvordan genotyperne responderer på deres miljø. Multi-omics modellering blev udført for alle kombinationer af omics-data (DNA variation, epigenetisk variation, og transkriptionel variation). Generelt forklarede modellerne, der omfattede flere forskellige omics-data, mere af den fænotypiske variation. Afhængig af egenskaben beskrev modellerne mellem 72 til 91% af den fænotypiske variation for overjordiske egenskaber og op til 64% for maksimal roddybde. Prædiktionsnøjagtighederne lå fra 0,32 for maksimal roddybde til 0,9 for proteinindhold.

SNP, ekspressions- og metylerings-data blev brugt til at prædiktere kvalitetsegenskaber i rajgræs ved hjælp af Bayesian regressionsanalyser. Ti prædiktionsmodeller blev testet for tolv overjordiske egenskaber (som f.eks. tørvægt, nedbrydeligt tørstof eller proteinindhold) og to underjordiske egenskaber (maksimal rodlængde og rodlængde under 110 cm). Den mest komplekse model bestod af behandling (kontrol vs tørkestress), linje/population og data fra tre typer af omics-data: genekspression, DNA-metylering, og DNA markører. For 12 overjordiske egenskaber forklarede den mest komplekse model størstedelen af variansen (min. 0,86 for tørvægt og 0,86 for proteinindhold). For de fleste egenskaber (Tabel 2) beskrev genekspressionsdataene størstedelen af den fænotypiske variation (f.eks. 0,55 for egenskaben reducerede sukre). Arvbarheden for alle egenskaberne var mellem 0,44 for reduceret sukre og 0,68 for cellulose.

Tabel 2. Prædiktionsnøjagtighed i ti modeller for egenskaben udbytte (tørvægt ved det tredje slæt). TRT – treatment (behandling), SNP – Single Nucleotide Polymorphism, met – DNA methylation profile, ge – gene expression, Model – andel af den fænotypiske variation forklaret ved hjælp af modellen, CV – modellens prædiktionsnøjagtighed (5-fold krydsvalidering).

Model	TRT	line	snp	met	ge	Model	Residual	CV
M1	0.18	0.51	-	-	-	0.69	0.31	0.41
M2	0.18	0.22	0.29	-	-	0.69	0.31	0.68
M3	0.18	-	0.50	-	-	0.68	0.32	0.69
M4	0.17	0.52	-	0.08	-	0.76	0.25	0.68
M5	0.15	-	-	0.21	-	0.38	0.63	0.69
M6	0.40	0.35	-	-	0.30	0.83	0.17	0.45
M7	0.54	-	-	-	0.69	0.76	0.24	0.75
M8	0.17	0.21	0.31	0.07	-	0.76	0.25	0.71
M9	0.34	0.17	0.21	-	0.24	0.82	0.18	0.69
M10	0.33	0.17	0.22	0.04	0.23	0.84	0.16	0.75

Multi-omics modellen for rodlængde under 110 cm forklarede op til 0,71 af variansen, men med en nøjagtighed på 0,43. Modellen med den højeste prædiktionsnøjagtighed (CV = 0,46) bestod af SNP og genekspressionsdata og forklarede 0,56 af variansen. Arveligheden for denne rodegenskab blev estimeret ved hjælp af varianskomponenter og var på 0.31.

Forædlingsværdier for rajgræs

Forædlingsværdier blev beregnet ved hjælp af BGLR R pakken. Både GEBV (Genomic Estimated Breeding Values) og OEBV (Omics Estimated Breeding Values) værdier blev sendt til forædlingsfirmaet for 12 overjordiske og seks underjordiske fænotyper (Tabel 3).

Tabel 3. Prædiktionsnøjagtighed for GEBV og OEBS estimerede forædlingsværdier samt arvelighed for rajgræs rodegenskaber. Model – andel af varians forklaret ved hjælp af modellen, CV – prædiktionsnøjagtighed for modellen.

Trait	GEBV			OEBV			Heritability
	Model	Residual	CV	Model	Residual	CV	
length_below_110cm_3	0.33	0.68	0.32	0.64	0.38	0.41	0.31
length_below_60cm_1	0.30	0.71	0.19	0.50	0.53	0.20	0.36
length_below_60cm_2	0.31	0.71	0.20	0.49	0.54	0.20	0.36
max_root_depth_1	0.25	0.79	-0.08	0.46	0.59	0.19	0.28
max_root_depth_2	0.26	0.78	-0.02	0.47	0.57	0.17	0.30
max_root_depth_3	0.26	0.77	0.08	0.50	0.53	0.09	0.33

Generelt var rodfænotyper med værdier mellem 0,28 og 0,36 lavere end dem for overjordiske egenskaber. Arvelighed beregnet for overjordiske værdier (separat for kontrol og tørkestressede planter) var mellem 0,43

for proteinindhold under tørke til 0,68 for syredetergentfibre, neutral detergentfiber og fordøjelighed af cellulase i cellevægge af planter dyrket under velvandede forhold.

Konklusioner

Vi har udviklet en strategi for mere nøjagtig prædiktation af fænotypisk variation, ved at inkludere information fra genekspressionsdata og DNA-metyleringsdata i Bayesian prædiktionsmodeller. Vi har også vist at genetisk variation der forklarer forskelligheder i for eksempel genekspression, kan bruges til at yderligere informere analysemodeller for mere nøjagtig prædiktation af forædlingsværdier (GEBV). I tillæg har vi gennem vores analyser opnået viden om de biologiske processer, som ligger til grund for planternes fænotypiske plasticitet.

Det er klart, at downstream multi-omics data kan være informativt og kan forklare interaktioner som ikke forklares af genomiske markører alene. Selv om det er relativt kostbart og arbejdskrævende at udføre store forsøg med indsamling, ekstrahering og sekvensering af forskellige omics-data og efterfølgende dataanalyser, vil faldende priser for sekvensering gøre det meget overkommeligt. Informationen man når frem til, kan inkluderes som vægtlagte SNPs eller features/genomiske regioner i prædiktionsmodeller også for forædlingsmateriale som ikke har været en del af forsøget.

I bestræbelserne på at udvikle strategier til fuld udnyttelse af omics-datasæt i planteforædling, undersøgte vi metylomet i byg og rajgræs. Vi udviklede WellMeth, en komplet RRBS analyse-pipeline til arter med et referencegenom. Forberedelse af epiGBS bibliotek og principper for barcode design er fra epiGBS pipelinen (van Gurp et al., 2016).

I vores undersøgelse har vi undersøgt DNA metylering for byg linjer og rajgræs populationer og herigennem udviklet en metode til at karakterisere genotype og miljøinteraktioner. Vi har også udviklet en metode til differentiell metyleringsanalyse såvel som metylering QTL analyser. Eigenetisk variation som er under genetisk kontrol kan bidrage til forbedret selektion i forædlingsprogrammer, medens miljømæssigt påførte epigenetiske variationer vil være i stand til at bidrage til fænotypisk plasticitet. Resultaterne, der er opnået i AP2 viser, at en kombination af forskellige typer af omics-datasæt kan forbedre prædiktation af forskellige komplekse egenskaber i byg og rajgræs. Dette er især vigtigt for forædlingsmateriale screenet i RadiMax faciliteten, hvor omkostningerne per screenet linje er høje, og hvor antallet af linjer som kan screenes er begrænset af facilitetens størrelse.

Generelt set kan AP2 resultaterne bruges at forædlingsfirmaerne til at udvikle fremtidens robuste afgrøder.

Referencer

- Cubas, P., Vincent, C., Coen, E., Centre, J. I., Lane, C., & Nr, N. (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in π oral symmetry, 157–161.
- Crossa J, Pérez-Rodríguez P, Cuevas J, Montesinos-López O, Jarquín D, de los Campos G, Burgueño J, González-Camacho JM, Pérez-Elizalde S, Beyene Y, Dreisigacker S, Singh R, Zhang X, Gowda M, Roorkiwal M, Rutkoski J, Varshney RK (2017) Genomic Selection in Plant Breed-ing: Methods, Models, and Perspectives. *Trends in Plant Science* 22:961-975
- Gallusci, P., Dai, Z., Génard, M., Gauffretau, A., Leblanc-fourrier, N., Richard-molard, C., ... Brunel-muguet, S. (2017). Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. *Trends in Plant Science*, 22(7), 610–623. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.009>
- Garg, R., Narayana Chevala, V., Shankar, R., & Jain, M. (2015). Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. *Scientific Reports*, 5(July), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep14922>
- Le, T., Schumann, U., Smith, N. A., Tiwari, S., Chi, P., Au, K., ... Wang, M. (2014). DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in Arabidopsis, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0458-3>
- Li Z, Gao N, Martini JWR, Simianer H (2019) Integrating Gene Expression Data Into Genomic Prediction. *Front Genet* 10:126-126
- Lin, Z., Cogan, N. O. I., Pembleton, L. W., Spangenberg, G. C., Forster, J. W., Hayes, B. J., & Daetwyler, H.

- D. (2016). Genetic Gain and Inbreeding from Genomic Selection in a Simulated Commercial Breeding Program for Perennial Ryegrass, 1–12. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.06.0046>
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., ... Seymour, G. B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening, 38(8), 948–952. <https://doi.org/10.1038/ng1841>
- Niederhuth, C. E., Bewick, A. J., Ji, L., Alabady, M. S., Kim, K. Do, Li, Q., ... Schmitz, R. J. (2016). Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Genome Biology*, 17(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1059-0>
- Richards, C. L., Alonso, C., Becker, C., Bossdorf, O., Bucher, E., Colomé-Tatché, M., ... Verhoeven, K. J. F. (2017). Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecology Letters*, 20(12), 1576–1590. <https://doi.org/10.1111/ele.12858>
- Springer, N. M. (2013). Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics*, 29(4), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.009>
- Springer, N. M., & Schmitz, R. J. (2017). Exploiting induced and natural epigenetic variation for crop improvement. *Nature Reviews Genetics*, 18(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.45>
- West, P. T., Li, Q., Ji, L., Eichten, S. R., Song, J., Vaughn, M. W., ... Springer, N. M. (2014). Genomic distribution of H3K9me2 and DNA methylation in a maize genome. *PloS One*, 9(8), e105267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105267>
- Ya-lan, Y., Rong, Z., & Kui, L. (2017). Future livestock breeding : Precision breeding based on multi- omics information and population personalization. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12), 2784–2791. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61780-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61780-5)
- Zakrzewski, F., Schubert, V., Viehoveer, P., Minoche, A. E., Dohm, J., Himmelbauer, H., ... Schmidt, T. (2014). The CHH motif in sugar beet satellite DNA : a modulator for cytosine methylation. *The Plant Journal*, 78, 937–950. <https://doi.org/10.1111/tpj.12519>

Publikationsliste

- EGF-Eucarpia Joint meeting. Zürich, Switzerland. Oral presentation, 2019
- Plant Biology Europe. Copenhagen, Denmark. Poster, 2018
- Malinowska, M., Nagy, I., Svane S. F., Wagemaker, CAM., Eriksen, B., Krusell, L., Eriksen, L.B., Jahoor, A., Jensen, J.D., Van Gurp, T.P., Jensen, C.S., Thorup-Kristensen, K., Asp T. (2018) Barley breeding; taking epigenetic processes into account. Poster session presented at Plant Biology Europe 2018, Copenhagen, Denmark.
- M. Malinowska, I. Nagy, AK. Ruud, SF. Svane, C. Wagemaker, P. Bjarup Hansen, B. Eriksen, L. Krusell, A. Jahoor, J. Jensen, CS. Jensen, D. Fe, I. Lenk, M. Greve, LB. Eriksen, K. Thorup-Kristensen, T. Asp (2019) Epigenetics of drought responses in spring barley and perennial ryegrass, Invited Speaker at The Plant and Animal Genome XXVII Conference (PAG) 2019, San Diego, USA.
- M. Malinowska, I. Nagy, C. Wagemaker, AK. Ruud, SF. Svane, B. Eriksen, L. Krusell, A. Jahoor, J. Jensen, CS. Jensen, LB. Eriksen, K. Thorup-Kristensen, T. Asp. Cytosine methylation landscape of the spring barley (manuscript in-preparation)
- Plant and Animal Genome Conference. San Diego, USA. Oral presentation, 2020