

Framtagning av foderhavre med ökad smältbarhet.

Slutrapport september, 2009

Syfte

Projektet långsiktiga målsättning var att ta fram en foderhavre med en ökad smältbarhet.

Bakgrund

Havre har goda foderegenskaper med hög fetthalt och bra aminosyrasammansättning. En nackdel med havrefoder jämfört med korn är att fröskalet är ligninrikt och därmed svårsmält för djuren. Hos havre förloras därför ca 20% av den teoretiskt tillgängliga energimängden och havre med ett mer lättsmält fröskal skulle ge ett bättre foder. Ett sätt att på sikt säkerställa stora volymer av havre skulle kunna vara att utveckla speciella fodersorter med förstärkta funktionella egenskaper. I dag används ca 700 kton till foder i Sverige, dvs. betydligt mycket mer än vad som används inom livsmedelsnäringen. En lågligninhavre med bibehållen avkastning skulle därför ge betydliga effekter på både konkurrenskraft och förädlingsvärde. Under 2002 offentliggjordes en Kanadensisk marknadssort (AC Assiniboia) som har ett skal med ett mycket lågt innehåll av lignin (Thompson et al., 2002). En biokemisk analys visade att skalet hos AC Assiniboia innehöll 1,3 % ADL (acid detergent lignin) medan övriga kanadensiska marknadssorter hade ett innehåll på mellan 5,4-7,7 %. Försök i kor visade att Assiniboias skal hade nästa dubbelt så hög smältbarhet som övriga sorter vilket visar att det de facto finns ett samband mellan låg ligninhalt och smältbarhet, och att det totala fodervärdet ökar markant om ligninhalten sänks. Vissa studier på nedärvningen för lågt lignininnehåll samt kopplingen till andra kvalitetsegenskaper som skalfärg, protein- och fetthalt samt kärnhalt gjordes också (Williams et al, 2002). Detta visade sig att i Assiniboia är det endast en gen (linkage group) som styr det låga lignininnehållet. Sortens avkastning, kärn kvalitet och sjukdomsresistens avvek därmed inte noterbart från övriga marknadssorter i Kanada. Sorten har också provats i observationsparceller i Landskrona under 2003 och 2004. Dessa försök visade dock att den inte går så bra i Sverige p.g.a. dålig stråstyrka och en lägre avkastning. Den är därför inte aktuell för kommersiell odling i Sverige. Försöken indikerar dock att själva konceptet, dvs. en lågligninhavre är realistiskt och önskvärt. Det är dock väldigt svårt att identifiera sådana mutationer med enbart klassisk förädling.

Med hjälp av en TILLING-population, med sammanlagt flera miljarder mutationer skulle det däremot, genom att screena direkt efter mutationer i ligninbiosyntesgener vara möjligt att identifiera nya lågligninlinjer. Detta är precis vad som skett i detta projekt.

Uppnådda resultat

En TILLING-population för havre är utvecklad och molekylärt karakteriserad (Chawade et al, 2009). Efter titrering av optimala EMS förhållanden fann vi att en EMS koncentration där ca 70% av plantorna dog utgjorde en optimal balans mellan toxicitet och mutationsfrekvens. Vi sådde därefter ut ca 8000 EMS behandlade frön och fick från dessa en M1 population på 2800 plantor. Dessa fick gå i blom och 2750 M2 frön (1 frö från varje planta) skördades. Dessa såddes ut på nytt och från denna muterade, segregrande M2 population gjorde vi ca 2800 olika DNA preparationer, dvs. en DNA prepp per planta. Vi dokumenterade också synliga (fenotypiska) mutationer såsom t.ex. klorofyllförändringar och förändringar i morfologi och tillväxt i den segregrande M2 populationen. Frekvensen synliga fenotyper var ca 5%, vilket indikerade en hög mutationsfrekvens. För att bestämma denna mer exakt på DNA nivå, isolerade vi DNA från blad från M2 populationen från samtliga 2650 överlevande events. Den genomsnittliga mutationsfrekvensen fördelat över hela

genomet beräknade vi med en s.k. RAPD assay till ca 1 mutation per ca 22000 bp. Vi följde upp detta genom att helt enkelt PCR amplifiera två gener från ett antal inindividuella events från mutationspopulationen och DNA sekvensera dessa. På det ca 500 000 bp vi analyserade hittade vi då 16 mutationer, dvs 1 mutant per ca 30 000 bp. Detta motsvara ca 10 miljoner mutationer per genom. Eftersom populationen är så pass stor som ca 2500 events innebär detta att varje havregen är muterad mer än 100 gånger. Vi har därmed en unik möjlighet att kunna identifiera mutationer i vilken gen som helst, dvs i teorin kan vi modifiera vilken egenskap som helst i havre. Vi kan således ta fram nya havresorter utan att behöva använda GM- teknik.

Slutligen har vi skördat alla frön från M2 plantorna vilka ger upphov till en M3 TILLING-population av 2470 olika s.k. mutationsevent. Vi fick ut mellan 5 och ca 100 från varje event. Vi kommer nu, i samarbete med Svalöf Weibull att dra upp även en M4 population och M5 population, som kommer att deponeras på NordGen.

Därefter skulle vi, via diverse korsningar, introducera denna egenskap till en odlingsbar sort. En förutsättning för att lyckas med denna målsättning var att ta fram en TILLING-population för havre. En sådan population, i kombination med molekylära selektionsmetoder, skulle öppna vägen för att identifiera mutationer på ett mycket effektivare och precisare sätt än genom traditionell förädling. När väl en TILLING-population har tagits fram måste denna emellertid kunna screenas på ett effektivt sätt. Speciellt när det gäller havre, som är hexaploid och har ett stort och komplext genom, är detta inte trivialt och ett flertal ytterligare parametrar måste uppfyllas. Dels måste mutationsfrekvensen i populationen vara så hög att det finns en realistisk chans att hitta de önskade mutationerna. Detta innebär att vi behövde sätta upp metoder för att kunna mäta mutationsfrekvensen i populationen. Dels behövde vi ta fram en stor mängd omutrade havresekvenser för de gener som vi vill hitta mutationer. Dels behövde vi utveckla bioinformatiska metoder för att kunna analysera så stora sekvensdata som det blev fråga om här och slutligen behövde vi utveckla en effektiv screeningmetod. Återigen, eftersom havregenet är exceptionellt stort ställer speciella krav på mutationsidentifieringen.

Name	Genotype	Ploidy
P1	Clav 9053 AV98ID CD8024	AA
P2	A. abyssinica KVL1363	AABB
P3	A. barbata KVL 1369	AABB
P4	A. strigrosa Purhavre KV 1991	AA
P5	Clav2520 AV86ID 26-389	AA
P6	PI 573533 Av05CA WIR5255	AA
P7	A. strigrosa purhavre NGB1991	AA
P8	A. barbata KVL 1368	AABB
P9	Clav 9025 AV86ID CD4482	AA
P10	A. brevis KVL1372	AA
P11	Clav 4746 AV86ID WIR 5201/1	AA
P12	Clav 3436 AV86IDSD 4266	AA
P13	A. abyssinica KVL1362	AABB
P14	PI 299112AV00ID-3	AA
P15	A. brevis KVL 1371	AA
P16	A. strigrosa HA-71-87	AA
P17	Clav 9050 AV01IDSD CD8018	CC
P18	Clav 1994 AV94ID CI1994	AA
P19	Clav 9007 AV84ID CD1002	AA
P20	Belinda	AACCDD

Tabell 1. Havresorter med olika genomkombinationer som användes i detta projekt.

Det går naturligtvis också att screena TILLING-populationen biokemiskt eller på proteinnivå. För att detta skall vara praktiskt tillämpligt krävs det att målproteinet eller aktiviteten enkelt kan mätas så att många olika mutanter kan testas. När det gäller lignin, så finns det enkla reaktioner beskrivna som specifikt färgar lignifierat material. Ett exempel på en sådan färg är fosfoglucenol. Vi testade därför denna färgreaktion på ca 300 olika frön (300 mutationsevents) från vår Tillingpopulation med hopp att kunna identifiera frön som färgade annorlunda än wt Belinda. Detta resulterade i att vi kunde identifiera frön som färgade både mindre och mer intensivt än Belinda wt (figure 3).

Vi identifierade de plantor varifrån de olikfärgade fröna härstammade och färgade fler frön från dessa plantor. Det stod då helt klart att vi har identifierat minst två mutanter som uppvisar mindre infärgning än både Belinda och den kanadensiska lågligninlinjen Assiboinia. För att försäkra oss om att detta är en nedärvd egenskap och att vi inte hade förväxlat något event i det 2800 individer stora biblioteket, självkorsade vi dessa mutantlinjer och analyserade frön från dessa i M4 generationen. Som framgår av figur 3D så finns låglignin fenotypen kvar.



Figur 3. Ligninfärgning av Belinda wt och av Tillingmutanter.

A. Ca 300 olika frön från Tillingpopulationen. B. Belinda wt (vänster), Assiboinia (Kanadensisk lågligninvariant) och två Tillingmutanter (höger). C. Belinda wt (vänster) och tre Tillingmutanter (höger). D. Belinda wt (nederst) och en Tillingmutationslinje från M4 generationen (överst).

Med hjälp av DNA preparationerna från M2 generationen beräknade vi även den genetiska mutationsfrekvensen i populationen. För att kunna göra en genetisk assay krävs det specifika primrar för den gen man vill identifiera mutationer i. Vi har därför klonat och sekvenserat tre olika havregener som kodar för enzymer involverade i ligninbiosyntesen, nämligen phenylalanine-

ammonia-lyase (PAL), caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) och caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT). Vi har sekvenserat motsvarande gener från olika havre med olika genomkombinationer (se tabell 1), för att på så vis kunna ta fram primrar inte bara specifika för en viss gen utan också för ett visst genom. Vi har också jämfört havreligninbiosyntesgenerna med motsvarande gener från andra växter i en fylogenetisk analys.

Eftersom vår Tillingpopulationen nu är färdig att börja screena för mutationer i specifika gener och eftersom vi har tillräckliga sekvensdata på de viktigaste havreligninbiosyntesgenerna, blir nästa steg att designa specifika primers för dessa gener och därefter identifiera de individer i Tillingpopulationen som har specifika mutationer i dessa gener. Vi håller just nu på att optimera assayen för att göra detta.

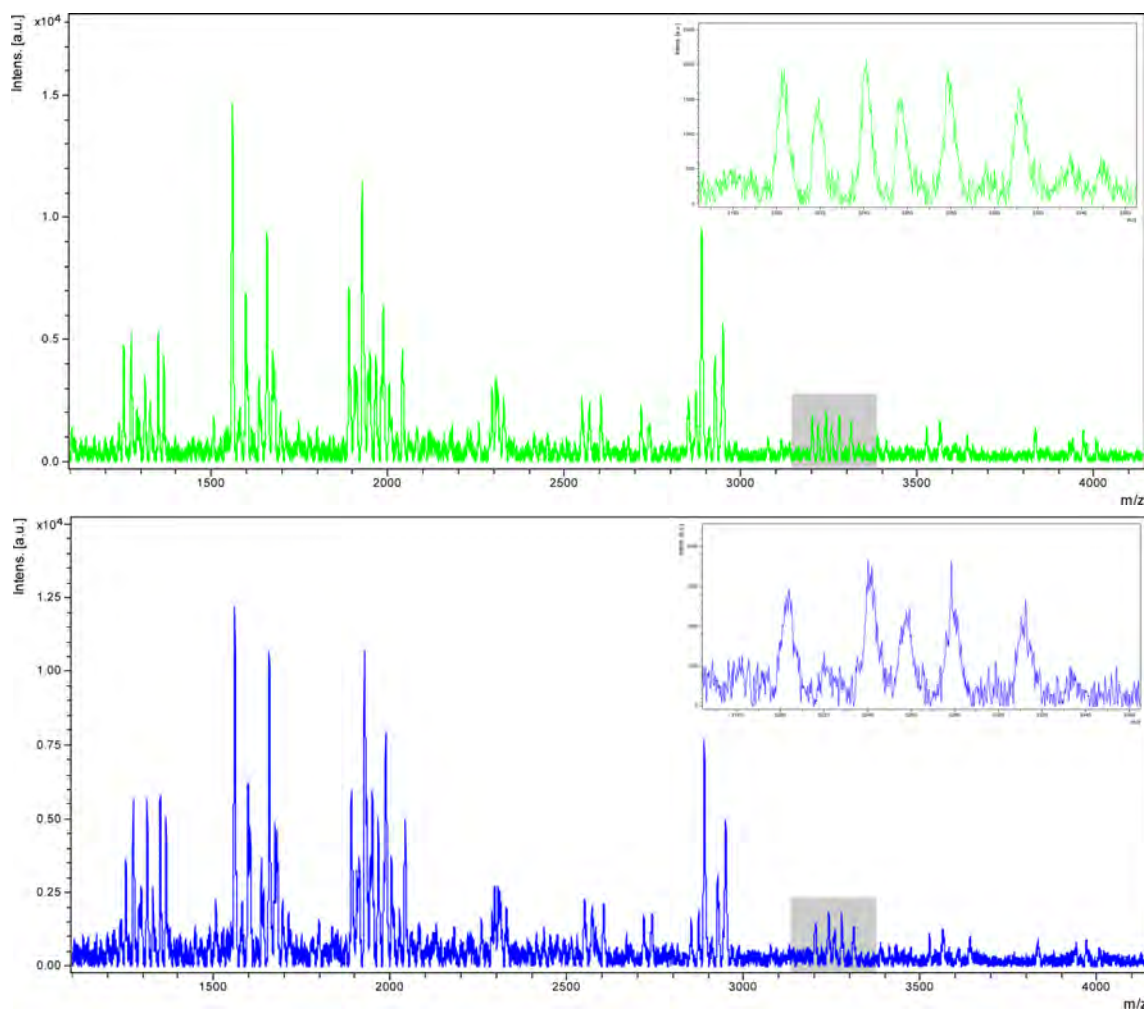


Figure 5. Identification of single nucleotide differences in the *AsCsIF6* gene by MALDI-TOF. Grey box indicates magnified region.

Amplified PCR fragments were transcribed, cleaved at every Uracil-residue and separated according to size. X-axis indicate the MW of each fragment in Daltons (Da) and the Y-axis denotes intensity in Arbitrary Units (a.u.). The disappearance of an expected peak (red arrow) indicates the appearance of a new cleavage site in the fragment, i.e the introduction of a new Uracil residue.

Diskussion

Vi har redan nu uppnått ett flertal av de uppsatta delmålen för detta projekt. Vi har utvecklat en Tillingpopulaton för havre, vi har isolerat DNA från 2800 olika mutationshändelser, vi har biokemiskt screenat delar av denna population för ligninmutationer och vi har identifierat ett flertal

linjer som färgar in den ligninspecifika fosfoglucenolfärgen svagare än Belinda wt. Vidare har vi klonat och DNA sekvenserat tre olika gener som kodar för ligninbiosyntes reglerande enzymer från ett flertal olika havregenom.

Den avslutande delen av detta projekt kommer nu att fokusera på att molekylärt karakterisera de biokemiska mutationerna, ta fram homozygota plantor för denna mutation, utveckla en molekylär markör för mutationen och därefter återkorsa denna till Belinda wt. I mån av tid kommer vi också inleda mer avancerade ligninanalyser av fröskal från plantorna med de identifierade mutationerna. När vi fått fram tillräckligt med material kommer också smältförsök i rumenvätska att inledas.