

# Vidareutveckling av Svensk hösthavre

## Slutredovisning (H0633164)

Olof Olsson  
CropTailor AB

### Sammanfattning

Den långsiktiga målsättningen med detta projekt var att utveckla en skandinavisk hösthavre. I Sverige odlas havre endast som vårgröda. En havre som klarar vintern skulle öka utbytet och säkra möjligheterna att tillförlitligt utnyttja havrens avkastningspotential och positiva växtföljseffekter.

I praktiken innebär hösthavre en gröda som överlever vintern på åkern utan att förlora sin vigör. För att klara detta måste den vara tolerant mot ett antal olika stressfaktorer samtidigt, där förutom kyla och frost även starkt ljus, vattendränkning eller torka, patogenangrepp etc. är viktiga paramentrar.

För att få fram en hösthavre arbetade vi därför efter flera parallella linjer;

- a) välja ut havrelinjer från diverse internationella förädlingsprogram som överlever den svenska vintern i fält och jämföra dessa biokemiskt och molekylärt med svensk vårhavre
- b) ta reda på mycket mer om mekanismerna än vad som hittills är känt bakom hur växter rent generellt hanterar abiotisk stress genom att utnyttja modellsystemet Arabidopsis
- c) identifiera linjer i havre TILLING-populationen där kritiska gener involverade i köldstressresponsen har muterats

Detta arbete har hittills lett till att vi har identifierat ett 20-tal linjer med mycket god vinterhärdighet. Från dessa har vi valt ut och karakteriserat två ”modelllinjer” från vilka vi kan identifiera molekylära skillnader jämfört med två vårhavrelinjer. Detta kan dels ge oss en förståelse till varför dessa är mer härdiga än vårhavresorterna, dels öppnar det möjligheten att ta fram de nödvändiga molekylära markörerna som behövs vid en ihopkorsning av hösthavrelinjer med odlingsbara sorter. I detta arbete har så här långt således vi byggt upp hela den erforderliga basen för att kunna ta fram sådana markörer. Vid en fortsättning av det här projektet tror vi att prototypen för en svensk hösthavre bara ligger 3-5 år bort.

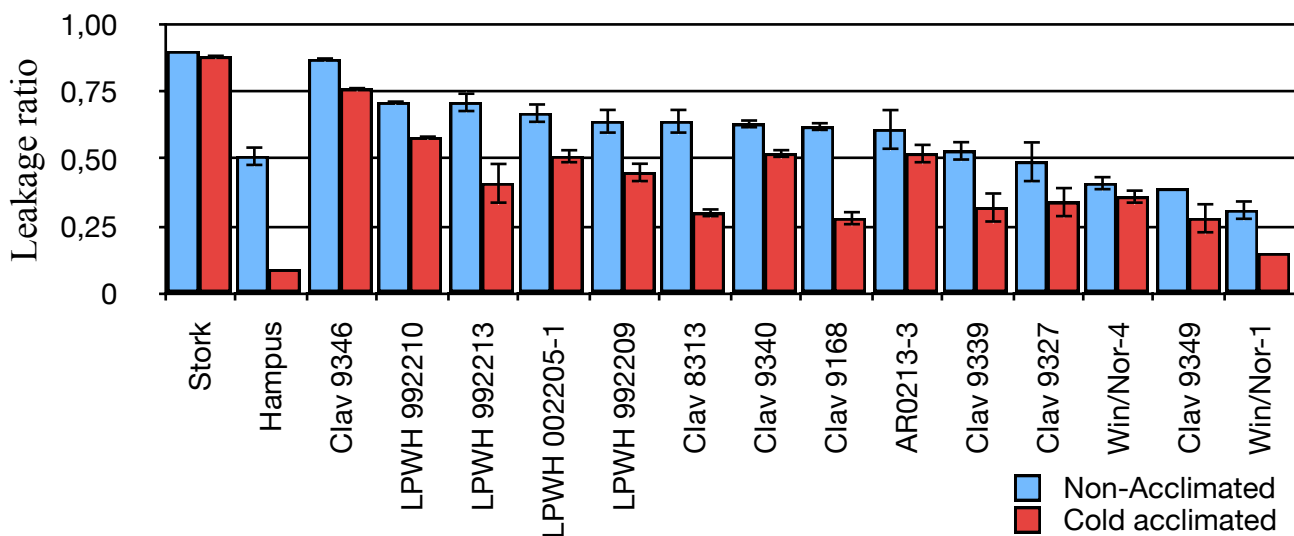
### Resultat

I början av projektperioden inledde vi ett fältodlingsprogram där vi från diverse internationella köldhärdighetsförädlingsprogram valde ut ca 300 av världens köldhärdigaste havre och testade dessas vinteröverlevnad på fält i Skåne och Västergötland. Förutom Svenska linjer testade vi havre från Tyska, Amerikanska, Ryska och Engelska hösthavreförädlingsprogram. Efter flera års upprepade selektioner fick vi fram ett 20-tal havrelinjer som uppvisade mycket bättre vinterhärdighet än existerande kommersiella vårsorter (Tabell 1), (Bräutigam et al, 2006; Chawade et al, 2010a).

För att skilja ut hur stor del tolerans mot kyla och frost spelar i vinteröverlevnad och hur del andra stressfaktorer gjorde vi en biokemisk test på 14 ”vintersorter” valda från tabell 1. Vi valde då både sorter som överlevde vintern bäst och sorter som uppvisade bäst odlingsegenskaper efter vinteröverlevnad i fält. Vi använde oss då av en s.k. ”electrolytic leakage assay” (EL). Detta är det väletablerade sättet i branschen att mäta frosthärdighet. Principen är att man fryser ned blad under kontrollerade former antingen före eller efter det att plantan köldacklimatiserats. De växtceller som inte klarar frysprocessen spricker och släpper då ut elektrolyter, som kan mätas i en konduktivimeter. Ju mer läckage desto mindre härdig planta. I testen inkluderade vi också två

	Origin	Cultivar	Winter survival (%)				Agronomic value (1-9)				
			2004	2005	2006	2007	2004	2005	2006	2007	
Control	Sweden	Stork (spring oat)	0	0	0	0					
	Poland	Fidelio (triticale)		90	90	100		9	9	9	
	Sweden	Hampus (barley)	90				9				
Phase Ia	Phase II	Germany	LPWH 992210	60	60	30	90	7	7	7	7
		Germany	LPWH 992213	20	70	40	90	3	7	5	7
		Germany	LPWH 002205-1	30	60	50	90	5	7	8	8
		Germany	LPWH 992209	60	70	40	90	7	7	7	8
		USA	Clav 9340	30	60	40	90	7	5	5	5
		USA	Clav 9349	50	70	40	90	7	7	2	3
		USA	Clav 9346	40	50			7	5		
		USA	Clav 8313	30	60			5	3		
		USA	Clav 9168	60	70			5	5		
		USA	AR0213-3	30	50			5	5		
	USA	Clav 9339	30	60			3	5			
	USA	Clav 9327	20	60			3	5			
	USA	Win/Nor-4	50	50			3	4			
	USA	Win/Nor-1	50	40			3	3			
	Phase Ib	USA	Win/Nor-10b			25	90			6	4
		USA	AR0213-10			25	90			5	4
		USA	AR0213-12			35	90			5	4
USA		AR0336-3			45	90			5	4	
N/A		NC01-3497			25	90			5	3	
N/A		NC01-3981			35	90			5	4	
N/A		NC01-4365			40	90			6	5	

kontroller, en vårhavresort (Stork) och en höstkornsort (Hampus). Som framgår av figur 1 så är som väntat Stork minst hårdig enligt denna analys och Hampus mest hårdig. Det framgår också att flera havresorter är nästan lika hårdiga som Hampus. Vidare syns det tydliga skillnader mellan acklimatiserade (rött) och oacklimatiserade plantor (blått) där de acklimatiserade som väntat är



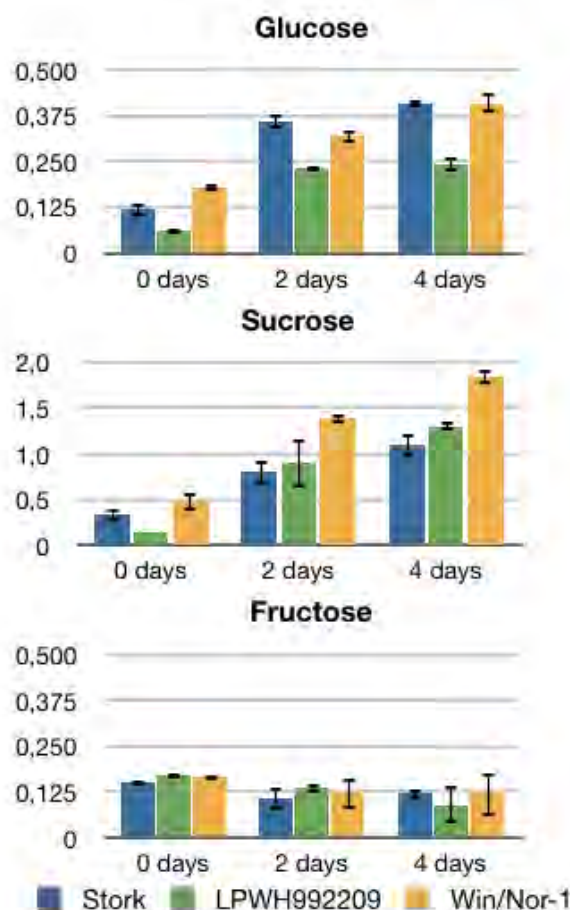
**Figure 1: Elektrolytläckage för olika havresorter selekterade på fält**  
Blått, icke acklimatiserat; rött, acklimatiserat vid 4°C under 4 dagar

hårdigare. Detta innebär att dessa havreplantor både kan registrera och reagera på köldstress på ett effektivare sätt vilket innebär att den stora delen av den inneboende anpassning som behövs för att en vårsort skall kunna fungera som en höstsor redan finns hos plantan.

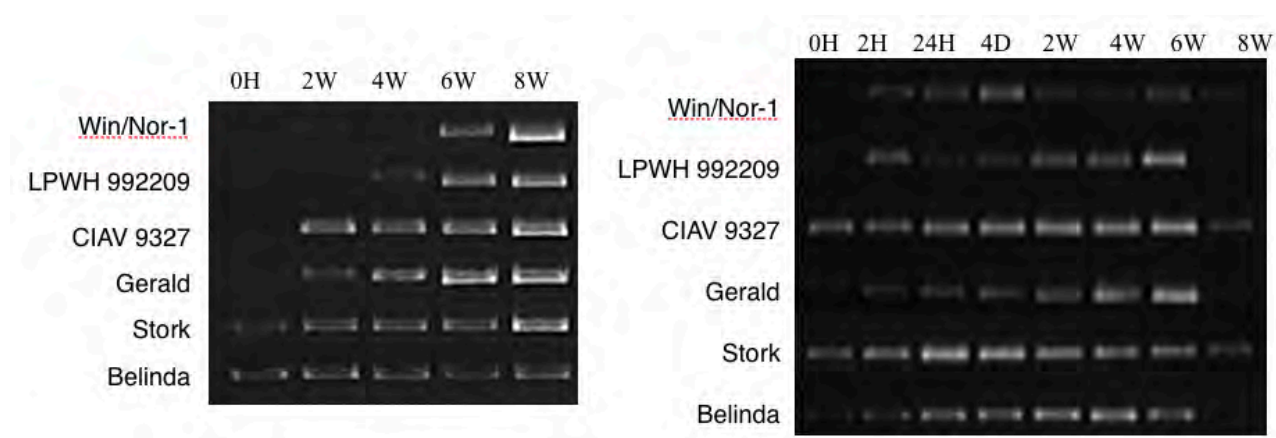
Vi undersökte därefter mängden av enskilda sockerarter i den hårdigaste sorten och jämförde denna med en intermediär och en vårsort. Det är känt från litteraturen att sukrossyntes induceras under köldstress. Som framgår av figur 2 induceras sukros under köldacklimatisering i alla sorter, men induktionen är mycket högre i den hårdiga Win/Nor sorten. Sukros är således en mycket bra markör för vinterhårdighet.

Vi testade också om det går att identifiera enskilda gener som uttrycks olika i de hårdigare sorterna jämfört med vårsorterna Stork och Belinda. Vi odlade därför unga plantor (14 dagar gamla) från de 20 hårdigaste linjerna från fältstudierna under standardiserade förhållanden i klimatkammare, utsatte växterna för köldstress (+4°C) i ett intervall från 30 min till 40 dagar och isolerade blad under olika tidpunkter efter stressinitieringen.

Vi gjorde en RT-PCR analys på alla linjerna där RNA isolerades från alla de olika tidpunkternas köldinkubering. Vi använde sedan primerpar från två olika kända köldinducerade gener, en sen gen som är kopplad till vernaliseringsprocessen och en som tillhör en gengrupp av köldinducerade gener (COR; COLD Regulated) som antas koda för olika cellskyddande funktioner. Detta försök visar att VRN1 genen definitivt skulle kunna användas som en markör för köldhårdiga linjer medan COR genuttrycket är med svårtolkat.



**Figur 2.** Analys av lösligt socker i olika havresorter före och efter köldacklimatisering



**Figur 3. Genuttryck i valda vår och höstsorter**

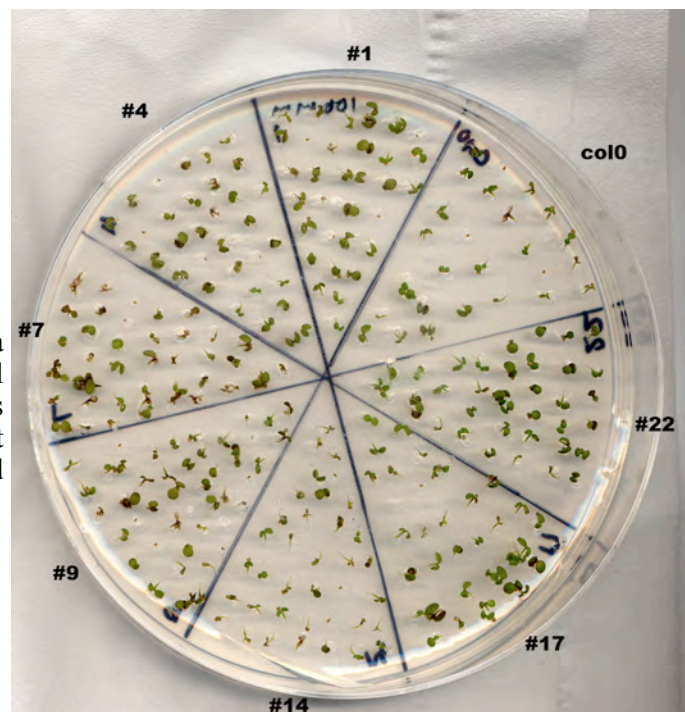
RT-PCR experiment utförda på *AsVRN1* genen (vänster) and *AsCOR410* genen (höger) för havrekultivarer köldacklimatiserade under olika tidsperioder. H, timmar; D, dagar och W, veckor.

Slutsatsen av detta är således att det är möjligt att identifiera gener vars uttryck är direkt kopplat till vinterhärdighet. Vi kommer att identifiera mycket fler sådana gener i framtida experiment (se ny SLF ansökan av Olof Olsson, CropTailor)

Ett annat sätt att komma ut de gener som unikt uttrycks under köldacklimatiseringen är att isolera mRNA från köldinducerade plantor och sekvensera dessa i stor skala. Vi sekvenserade tidigare ca 10000 ESTar från köldinducerad havre och analyserade dessa med diverse bioinformatiska metoder (Bräutigam et al, 2005; Lindlöf et al, 2007). Senare gjorde vi mer djupgående analyser av dessa sekvenser, delvis med hjälp av nyutvecklade bioinformatiska metoder, för att få fram ytterligare genkandidater, som vi sedan kan bekräfta eller avfärda i biologiska experiment (Lindlöf et al, 2008, 2009). Vi gjorde också en bioinformatisk analys över köldreglerings-vägarna i *Arabidopsis*. Genom att utnyttja det faktum att hela DNA sekvensen är känd hos denna växt och att det finns publika data från en mängd olika microarray-experiment från köldstressad *Arabidopsis*, kunde vi via en ny statistisk metod identifiera ett antal hittills okända transkriptionsfaktorer som verkar ha en viktig roll i processen (Chawade et al, 2007).

#### Figur 4. Exempel på assay för salttolerans.

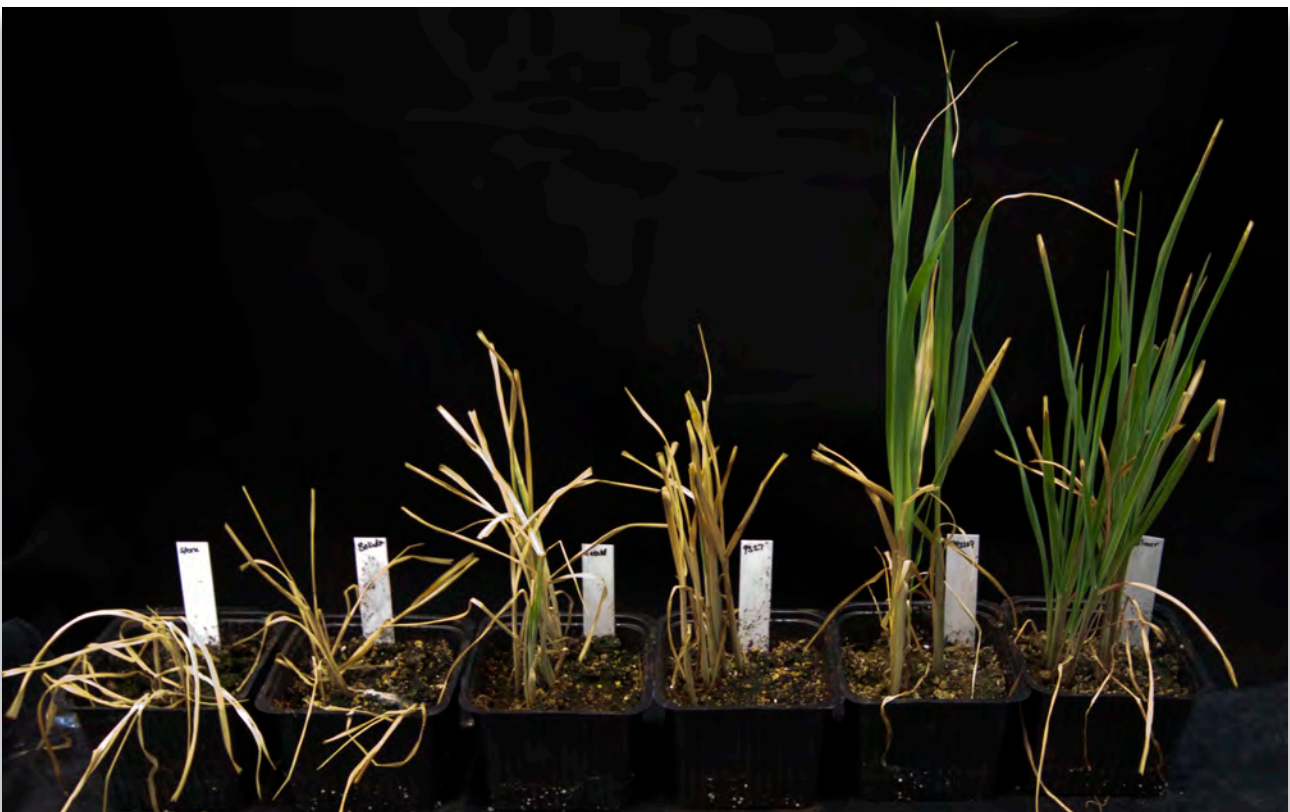
Frön från *Arabidopsis* wt (Col0) och olika mutanter groddes på MS medium med olika NaCl koncentrationer. I detta fall visar en typisk respons på ett medium med 100mM NaCl. Numren runt plattan indikerar de olika mutanterna. Omuterad *Arabidopsis* col0 ligger vid position klockan 2.



För att koppla ihop de bioinformatiska resultaten med biologisk funktion, har vi under det senaste året också prioriterat studier som syftar till att experimentellt testa några av de gener som i den bioinformatiska analysen utkristaliserat sig som speciellt viktiga stressgener. Eftersom stressrespons hos växter är en fundamental process som utvecklats tidigt i evolutionen är det flesta ingående generna mycket konserverade mellan olika växtsystem. Dessa gener kan därför visa sig ha en mycket viktig roll också i havre. Vi gjorde en serie olika experiment för att verifiera om någon/några av de gener vi identifierat *in silico* skulle kunna vara användbara som måltavlor för mutagenes i havre. I dessa experiment utnyttjade vi återigen det faktum att alla *Arabidopsis* gener är sekvenserade och att det finns mutanter (T-DNA insertioner) att tillgå i samtliga. Med hjälp av vår bioinformatiska modell valde vi ut 100 och beställde hem *Arabidopsis* frön från det internationella *Arabidopsis* konsortiet ([www.arabidopsis.com](http://www.arabidopsis.com)) på plantor som är muterade i motsvarande gener. Ingen av dessa har tidigare kopplats ihop med köldstress. Rent strukturellt liknar ett flertal av dem transkriptionsfaktorer, andra associerar till signaltransduktion och några har en helt okänd funktion.

Genom att odla upp mutanterna under olycka stressförhållanden kunde vi karakterisera dessa med avseende på deras stresstålighet mot kyla, torka, salt och värme. Ett typiskt experiment visas i figur 4.

Under våren 2010 fick vi tillgång till avancerade klimatkammare som kan kylas ner med stor precision till  $-15^{\circ}\text{C}$ . Vi arbetade då ut en frystest för både havre och *Arabidopsis*. Vi testade därefter om vi kunde se skillnader i ren frosthårdighet mellan de olika havrelinjerna vi selekterade i fält och mellan de olika *Arabidopsis*-mutanterna. Havre testen gjordes på kronorna (den vävnad som förenar blad och rot) som vi först frös vid  $-12^{\circ}\text{C}$  under 2.5 timmar. Därefter tinades och planterades kronorna i jord och fick växa under optimala förhållanden. Efter 3 veckor kunde klara skillnader ses i hur de olika linjerna klarade denna omilda behandling. Som framgår av figur 5 så överlevde under vårsorterna Stork och Belinda. Den engelska hösthavresorten Gerald och den intermediära sorten CIAV 9327 klarade sig något bättre medan LPWH 992209 och WIN/NOR-1 klarade sig bäst. Denna

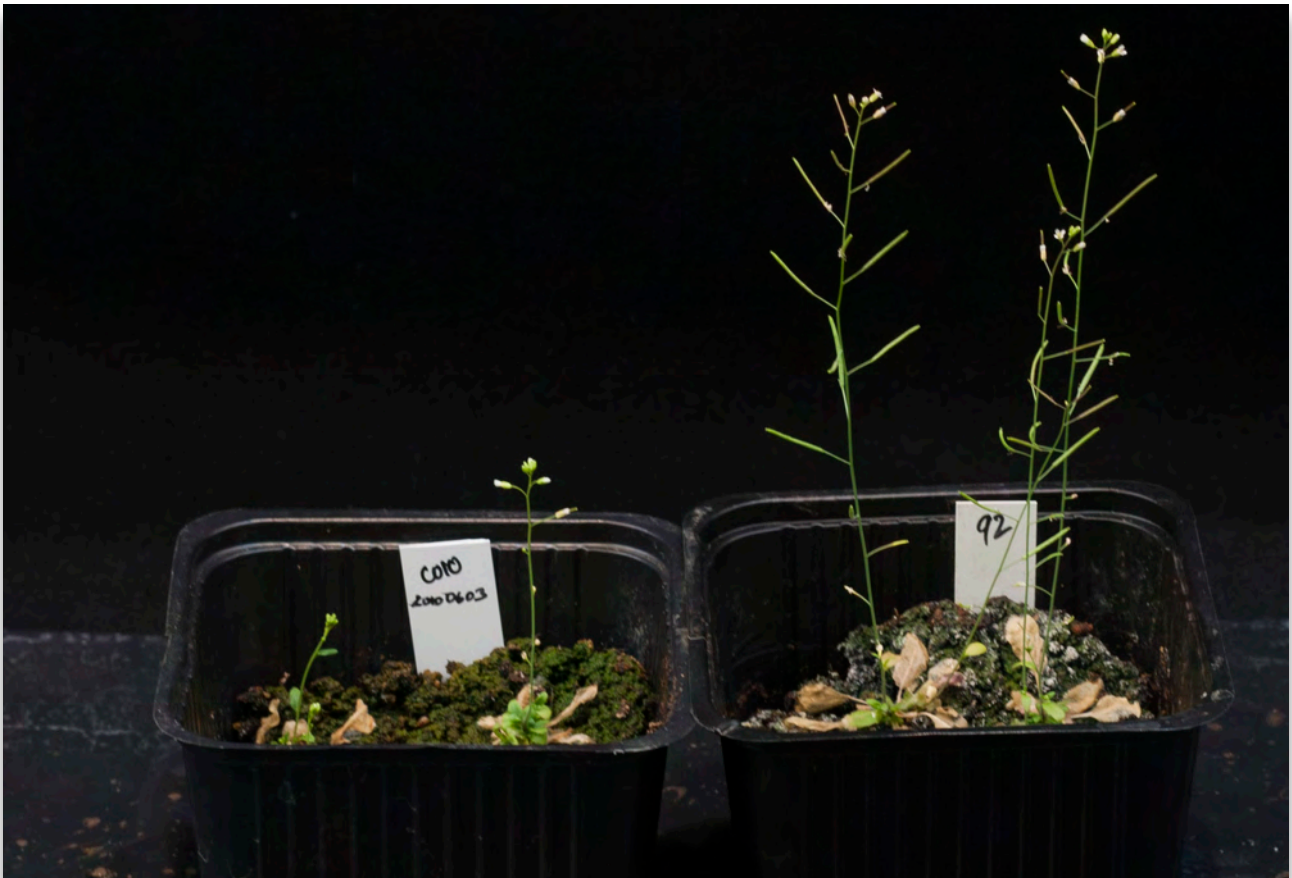


**Figur 5. Frystest på havrekronor**

Havreplantorna köldacklimatiserades i 2 dagar vid  $+4^{\circ}\text{C}$ . Kronornadissekerades därefter försiktigt ut och inkuberades vid  $-12^{\circ}\text{C}$  under 2.5 timmar. De fick därefter tina under 12 timmar vid  $+4^{\circ}\text{C}$  och planterades därefter i jord. Bilden är tagen efter 3 veckors återhämtning vid normala odlingsförhållanden. Från vänster till höger: Stork, Belinda, Gerald, CIAV 9327, LPWH 992209, WIN/NOR-1

test är således väldigt utslagsgivande och korrelerar bra till de övriga tester vi gjorde. Detta öppnar nu vägar för att också testa köldhärdighet i TILLING-populationen.

Vi karakteriserade också några av de muterade *Arabidopsis* linjerna för deras köldhärdighet. Det visade sig då att flera av mutantlinjerna uppvisade en ökad eller minskad köldtålighet jämfört med icke muterad *Arabidopsis*. Ett exempel på en sådan test kan ses i figur 6. Vi har identifierat 5 olika gener som, när de muteras, ger en ökad köldhärdighet. Eftersom stressrespons hos växter är en fundamental process som utvecklats tidigt i evolutionen är det flesta ingående generna mycket konserverade mellan olika växtsystem. Dessa gener kan därför visa sig ha en mycket viktig roll



**Figur 6. Köldtest på Arabidopsis**

Överst exempel på köldstressad Arabidopsis Col0 (vänster) och en *Arabidopsis* muterad i en *BHLH* transkriptionsfaktorgen (höger). Växterna köldacklimatiserades under 4 dagar vid +4°C. De inkuberades därefter vid -8°C under 60 min, fick återhämta sig vid +4°C under 12 timmar. Därefter odlades de under optimala förhållanden under tre veckor.

också i havre. Vi kommer nu att identifiera mutationer i motsvarande havregener i vår TILLING-population och testa dessa i de olika härdighetsmetoderna som vi satt upp.

## Diskussion

Vinterhärdighet är en komplex egenskap där tolerans mot ett flertal olika stressfaktorer måste finnas hos de grödor som skall fungera som höstgrödor. I dessa studier har vi identifierat havrelinjer med intermediär och mycket god köldhärdighet. Dessa plantor utgör nu en unik modell för att ta fram nya markörer för vinterhärdighet i havre genom att helt enkelt göra en noggrann molekylär analys av skillnader i transkriptions- och metabolitprofil i dessa plantor under köldacklimatisering.

Vi har dessutom, genom att utnyttja publika resurser tillgängliga via *Arabidopsis* konsortiet ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), tagit fram antal nya genkandidater med potentiellt intressanta funktioner i medieringen av stresstolerans hos växter.

Slutligen har vi även tagit fram en unik TILLING-population för havre (Chawade et al, 2010). Denna population uppgår f.n. till 2600 olika mutationslinjer. Varje linje innehåller ca 4 miljoner mutationer. Detta innebär att i hela populationen finns det ca 150 mutationer i varje gen. Med hjälp av denna population kan vi nu identifiera mutationer vilken gen som helst. Eftersom vi också har sekvenserat drygt 500 000 ESTar (expressed sequence tags) från Belindahavre, har vi den omuterade sekvensen för de flesta av havrens uttryckta gener. Detta gör att vi nu kan screena

TILLING-populationen efter linjer som är muterade i någon av de gener vi har identifierat som viktiga i köldhårdighetsprocessen. Tack vare de olika metoder vi utvecklat för att testa köldhårdighet, blir nästa steg nu att identifiera och testa mutantlinjer.

Vi är därför nu redo att inleda rutinmässiga screeningar efter mutationer i alla de gener som vi tror har betydelse för köldhårdighet i havre.

### **Egna uppsatser på detta projekt i peer reviewade internationella tidskrifter**

- Brautigam, M., Lindlöf, A., Zakhrabetkova, S., Gharti-Chhetri, G., Olsson, B. and Olsson, O. 2005. Generation and analysis of 9792 EST sequences from cold acclimated oat, *Avena sativa*. *BMC Plant Biology* 2005, 5:18
- Bräutigam, M., Chawade, A., Gharti-Chhetri, G., Lindlöf, A., Jonsson, A., Jonsson, R., Olsson, B. and Olsson, O. (2006). Development of Swedish winter oat with gene technology and molecular breeding. *J. Seed Science* 116, 1-2, 23-35.
- Chawade, A., Bräutigam, B., Lindlöf, A., Olsson, O. and Olsson, B. (2007). Novel cold acclimation pathways in *Arabidopsis thaliana* identified by a combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. *BMC Genomics* 8:304
- Chawade, A., Sikora, P., Bräutigam, M., Larsson, M., Vivekanand, V., All Nakash, M., Chen, T. and Olsson, O. (2010) Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and  $\beta$ -glucan biosynthesis genes *BMC Plant Biology*, 10:86
- Lindlöf A., Bräutigam, M., Chawade, A., Gharti-Chhetri, G., Olsson, B. and Olsson, O. (2009) *In silico* analysis of promoter regions from cold-induced CBFs in rice (*Oryza sativa* L.) and *Arabidopsis thaliana* reveals the importance of combinatorial control. *Bioinformatics* 25, 1345-1348
- Lindlöf A., Bräutigam M., Chawade A., Olsson O. and Olsson B. (2008) Evaluation of combining several statistical methods with a flexible cut-off for identifying differentially expressed genes in pairwise comparison of EST sets. *Biology and Bioinformatics Insights* 2: 215-237
- Lindlöf, A., Bräutigam, B., Chawade, A., Olsson, B. and Olsson, O. (2007) Identification of Cold-Induced Genes in Cereal Crops and *Arabidopsis* Through Comparative Analysis of Multiple EST Sets. *S. Hochreiter and R. Wagner (Eds.): BIRD, LNBI 4414*, pp. 48–65, 2007.
- Tinker, T.A., Kilian, A., Wight, C.P., Rines, H. R., Bjørnstad, Å., Howarth, C.J., Jannink, J-L., Anderson, J.M., Rossnagel, B.G., Stuthman, D.D., Sorrells, M.E., Scoles, G.J., Eckstein, P.E., Ohm, H.W., Jackson, E.M., Tuvevsson, S., Kolb, F.L., Molnar, S.J., Olsson, O., Carson, M.L., Ceplitis, A., Bonman, J.M., Federizzi, L.C., Langdon, T. (2009) New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization. *BMC Genomics*, 10:39

### **Annan resultatförmedling**

Resultat från detta projekt har, förutom publikationerna ovan, presenterats i posterform på olika internationella konferenser och i muntlig form för nationella och internationella samarbetspartners och vid internationella konferenser och symposier. Mer populärvetenskapliga versioner av resultaten har presenteras vid förädlarmöten och vid Svenska, Nordiska och Europeiska Havreföreningarnas sammankomster.