

Tolerans i korn mot övervattning. Projnr: H0936071

Nils-Ove Bertholdsson

Bakgrund

Enligt flertalet scenarier kommer nederbörden liksom risken för översvämningar att öka i norra hemisfären genom framtida klimatförändringar. Det ställer större krav på grödornas tolerans mot för mycket vatten. Redan idag är efter torka, känsligheten för vattenmättade jordar det som ger störst skördebortfall internationellt sett och förmodligen så även i Sverige. Av våra stråsådesgrödor är det korn som är speciellt känslig. I korn beräknas vattenmättade jordar reducera avkastningen med 20 procent och mer beroende på utvecklingsstadium när stressen inträffar och hur länge den varar. Inom genuset *Hordeum* är diversiteten dock stor, där till exempel den vilda släktingen *H. marimum* är mycket tolerant. Både odlat korn och *H. marimum* kan bilda aerenchymceller, men det odlade kornet saknar en barriär för ROL (radiära O₂ förluster), som är en viktig egenskap hos många toleranta arter. Andra egenskaper som förknippas med tolerans är en metabolisk adaptation så att energiproduktionen kan bibehållas, samt en upplagring av kolhydrater för fermentering vid låg syretillgång. Mekanismer som betingar tolerans mot övervattning kan vara betingade av fenologi, morfologi och anatomi, näring, metabolism inkl. anaerobic kolhydratmetabolism och anoxia tolerans, samt återhämtning och undvikande av post-anoxiska skador. Studier i korn visar att nedärvning är komplex, men att heritabilitet ändå är hög och kontrolleras av additiva gener. Selektionen kan antingen göras med hjälp av DNA markörer eller någon icke-destruktiv selektionsmetod. I en undersökning med kornsorter fann man att klorofyllhalten kunde vara en fenotypisk markör för övervattning och SSR (simple sequence repeat) primers användes för att screena polymorfism mellan föräldrar och mellan toleranta och känsliga genotyper. En PCR markör kunde identifieras som förklarade ca 30 % av den fenotypiska variationen i klorofyllhalt. I en annan undersökning var procent gulnade blad (klorosis) en fenotypisk markör. Bildandet av kloros är dock ett långt framskridet tecken på stress som tar tid att utbilda och det kan därför vara svårt att använda för selektion och screening. Ett alternativ är att mäta fluorescens från stressade plantor. Redan innan det finns några synliga tecken på att plantan inte mår bra är det möjligt att mäta denna och förutsäga en framtida celldöd. Det gäller inte enbart vid övervattning utan alla typer av stress som påverkar elektronflödet mellan PSI och PSII. Ett överskott av elektroner avges då som fluorescens, vilket leder till lägre fotosyntes, men även nedbrytning av klorofyll och celldöd. Klorofyllfluorescens är ett kraftfullt verktyg vid screening av abiotisk stress och det finns ett stort antal publikationer i ämnet, men endast ett fåtal där man gjort screening för övervattning. Exempel på där fluorescens används är lucerne, citrus, ris och vete. Själva mätningarna skadar inte plantan och görs på någon sekund. Det är därför möjligt att göra urval på ett stort antal plantor på kort tid, vilket är nödvändigt för en bra selektionsmetod.

I tidigare projekt har en hydrokulturmetod utarbetats som tillåter att man på en liten yta odlar upp småplantor. Genom att sluta lufta näringslösningen uppnås effekter som liknar dem i vattenmättad jord. Målsättningen har därför varit att undersöka om hydrokulturmetoden är användbar för att screening av tolerans mot övervattning, samt att undersöka befintlig variation i förädlingsmaterial, fenotypning av en lämplig markörpopulation och om möjligt hitta genetiska markörer användbara vid förädling av nya toleranta sorter. Två tänkbara indirekta selektionkriterier studerades- rottillväxt och fluorescens. I en förberedande studie om 12 sorter konstaterades en stor variation i planttillväxt med och utan vattenmättad jord. Detta material plus två nyare sorter användes nu som ett referensmaterial under

metodutvecklingsfasen för att fastställa viktiga parametrar och för att avgöra om rottillväxt eller fluorescens var mest lämpad som indirekt selektionskriterie

Målsättningen med projektet har därför varit:

- En ny eller anpassad metod för screening av tolerans mot övervattning i korn.
- Nya genkällor för tolerans mot övervattning och troligen även andra typer av abiotisk stress.
- En karakteriserad markörpopulation avseende övervattningsstress
- Genotypning av markörpopulationen (tillägg efter första årets delrapport)
- QTL analys (tillägg efter första årets delrapport)
- Ökad förståelse bland rådgivare, agronomer, förädlare och lantbrukare för egenskapen övervattningsstress

Projektet var ursprungligen tänkt som ett doktorandprojekt men pga avslag på andra anslag som skulle täcka delar av projektledarens lön var det inte möjligt att fullfölja planen att genomföra projektet som ett doktorandförsök. En ansökan om ändring gjordes och beviljades.

Material

I de förberedande studier användes 12 då aktuella kornsorter som visade sig ha en stor variation i tolerans för övervattning. Tio av dessa (två av sorterna var det inte möjligt att finna utsäde) plus två nu aktuella sorter användes genomgående som material under metodutvecklingen, här efter kallat referensmaterial. Bland sorterna fanns Henni (tolerant) och Cecilia (känslig). Eftersom Henni var mycket tolerant gjordes i ett tidigt skede korsningar mellan Henni och den relativt nya sorten Gustav, för att kunna göra selektioner i ett tidigt skede i projektet. Eftersom projekttiden var för kort för att ta fram en markörpopulation mellan Henni och Cecilia, vilket varit det optimala, testades först föräldrarna till 14 befintliga DH-populationer och då föräldrarna till MP12 (Psaknon x SLUdt1398xMona⁴) segregerade i vattenmättnadstolerans (WLT) valdes denna population för markörstudierna. För studier av förädlingsmaterial erhöles linjer LSWs Norrlandfilial totalt ca 30 linjer.

Resultat

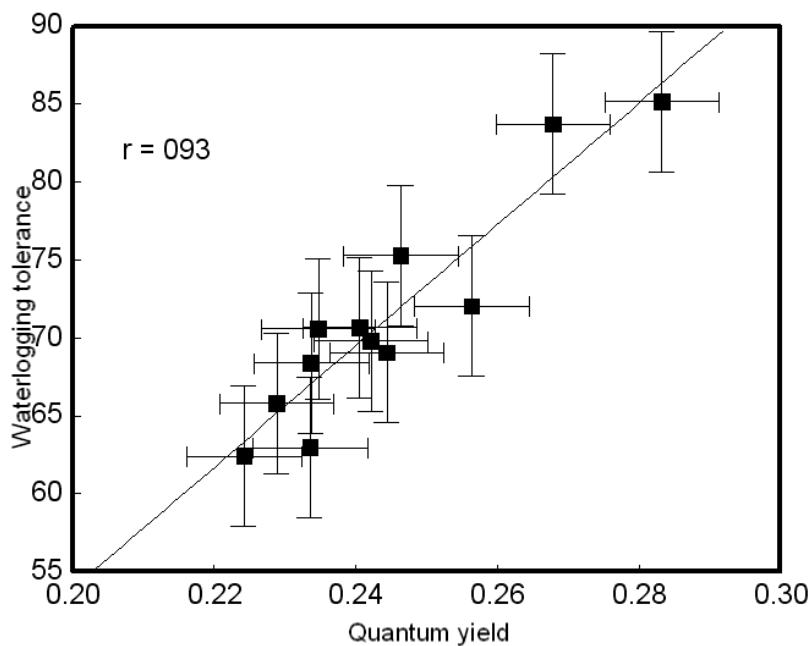
Metodutveckling

Bestämning av vattenmättnadstolerans (WLT): I inledande försök odlades referensmaterialet i lådor med jord och med sex plantor från varje sort i en och samma låda och i fyra lådor per behandling. Behandlingar var normal vattning och övervattning 1-2 veckor efter sådd. På stressade och ostressade plantor gjordes flera serier med fluorescensmätningar, samt bestämningar av tillväxtnedläggning pga övervattning. Odling och mätningar gjordes i växthus. Då resultaten mellan försöksomgångar varierade för mycket övergick vi till att odla i biotronen. Till en början i lådor, men då en risk förelåg att konkurrens mellan sorterna skulle kunna påverka resultatet övergick vi till odling i 20 cm höga cylinderkrukor med 10 cm diameter. Ett index (WLT) beräknat som kvoten mellan skottvikten för stressade och ostressade plantor för referensmaterialet användes därefter som ett mått för sorternas känslighet för övervattning (Bertholdsson. 2013).

Studier av rottillväxt i syrestressade hydrokulturer: Redan i förstudien kunde ett samband mellan rottillväxt i oluftad näringslösning och vattenstress konstateras. Referensmaterialet har därför utnyttjas i en serie hydrokulturförsök för att optimera olika faktorer för att ge en så hög korrelation som möjligt till referensmaterialets WLT. Både den relativa rottillväxten dvs den längsta frörotens längd utan och med luftning av näringslösningen och frörotens längd i oluftad näringslösning korrelerade till WLT, dvs $r=0.57$ och $r=0.63$ ($p>0.05$) för relativa rotlängden och $r=0.79$ och $r=0.82$ ($p>0.001$) för absoluta rotlängden för två jämförbara testomgångar. Det något starkare sambandet för rotlängd och vattenstresstolerans visar att det

inte är nödvändigt att ha med kontrolledet, något som är viktigt om metoden skall användas för selektion av klyvande populationer.

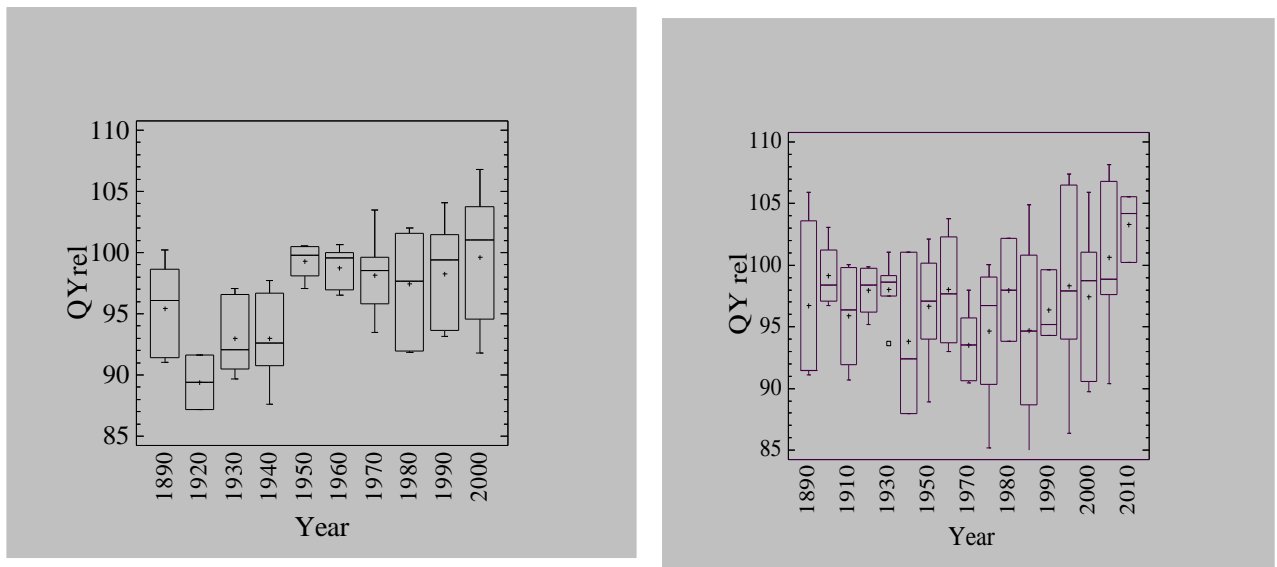
Studier av fluorescens: De inledande försöken under de första månaderna av projektet (se lägesrapport 1) visade att det borde gå att använda klorofyllfluorescens från stressade blad som ett mått på WLT. Försöken visade även att det var viktigt att mätningarna gjordes under särskilda och kontrollerade betingelser. I flera försök var korrelationen mellan fluorescens (quantum yield, QY) hos stressade plantor och relativa tillväxten med och utan vattenstress (WLT) svag och i vissa fall tom starkt negativ. Efter en rad försök i en klimatkammare, först i jord och sedan i hydrokultur, där flera parametrar varierades kunde ett slutgiltigt protokoll fastläggas som resulterade i en fluorescens som korrelerar väl med referensmaterialets WLT. Faktorer som visade sig vara speciellt viktiga är att mätningarna görs redan efter 4-7 dagars stress och att mätningarna görs vid en högre ljusintensitet (tilläggslys från intern lampa) än den plantan odlades vid. För att minska försöksfelet är det även viktigt att alla blad som mäts belysts på samma sätt innan mätningen. Det åstadkoms genom att klippa av bladet och lägga det rättvänt på en vagn i samma höjd som resten av plantorna. Redan efter 3 minuter uppnås ett stabilt värde som varar i minst 30 minuter. Enskilda mätningar av 12 plantor per sort genomförda på detta sätt gav en korrelation till WLT på mellan 0.76 till 0.82. Med fler plantor (medelvärde av tre omgångar med något varierande stressperiod) var korrelationen mycket hög ($r = 0.93$, $p < 0.001$, Figur 1). Metoden är mycket snabb och tillåter att många plantor mäts under kort tid och liten odlingsyta.



Figur 1. Fluorescens (quantum yield, QY) från oluftad hydrokultur och planttillväxten med och utan vattenstress. Medelvärde från 3 bestämningar (3 x 12 plantor) av QY och 2 bestämningar av vattenstresstolerans (WLT) (2 x 4 x 5 plantor).

Screening av nordiska kornsorter

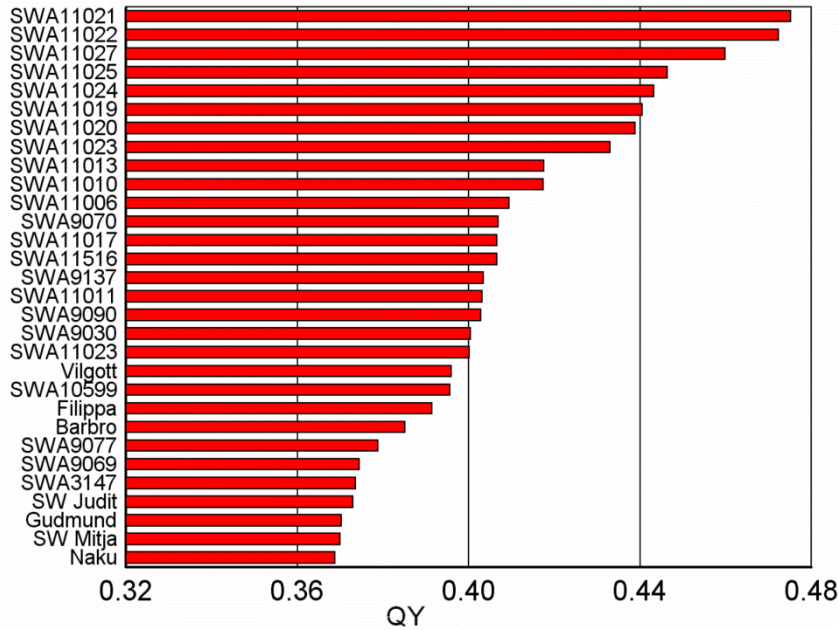
Vattentolerans hos ett genbanksmaterial med 2- och 6-radskorn. Med fluorescensmetoden har screening gjorts av ett nordiskt kornmaterial bestående av 178 kornsorter, allt från lantsorter fram till sorter som godkändes fram till 2008. Materialet omfattar såväl 2-rads korn som 6-rads korn. Resultaten finns publicerade i Bertholdsson (2013) och här ges en kort sammanfattning. Det finns en entydig trend med ökad fluorescens, dvs vattentolerans, i och med introduktionen av nya kornsorter i alla nordiska länder under de senaste 50 åren (Figur 2). Anledningen till detta är troligtvis att det inte finns något motsatsförhållande mellan vattentolerans och avkastning. Då nederbörden redan ökat p.g.a. klimatförändringar, i exempelvis södra Norge har nederbörden ökat med 50%, har en anpassning till detta skett i och med en förädling på högre avkastning.



Figur 2. Fluorescens (QYrel, Henni=100) för kornsorter förädlade i Norge och Finland (vänster) och Sverige och Danmark (höger).

Screening av förädlingsmaterial

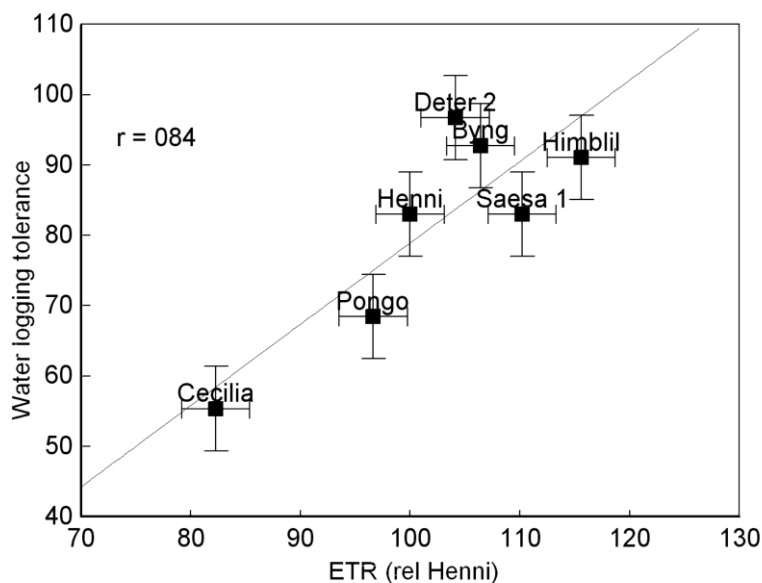
I norra Sverige är det redan idag ofta mycket blött på våren efter snösmältning och tolerans mot vattenmättade jordar är viktig och med klimatförändringar förväntas problemen öka. För att utröna vilken tolerans förädlingsmaterialet för norra Sverige har testades 29 sorter/linjer från LSWs Norrlandsfilial. Alla sorter och många av förädlingslinjerna visade på en låg grad av tolerans (Figur 3). Intressant var dock att flera nya linjer uppvisade en tolerans som var högre än den toleranta sorten Henni.



Figur 3. Skillnader i fluorescens (quantum yield, QY) för förädlingslinjer och sorter för den norrländska marknaden från LSW.

Studie av främmande toleranta kornsorter

De enligt litteraturen toleranta sorterna Deter 2, Byng och Himbli var även toleranta med de metoder som används i detta projekt. Sorterna var något mer toleranta än Henni både i tillväxtstudierna i cylinderkruka och avseende fluorescens (Figur 3). Saesa 1 skall vara känslig, men dock inte så känsliga som de svenska sorterna Cecilia och Pongo. Anledning till denna avvikelse kan möjligen bero på att studierna av tolerans gjordes på småplantor medan Saesa's känslighet möjligtvis gäller fröskörd. Fler studier behövs för att klargöra vari skillnaderna består.



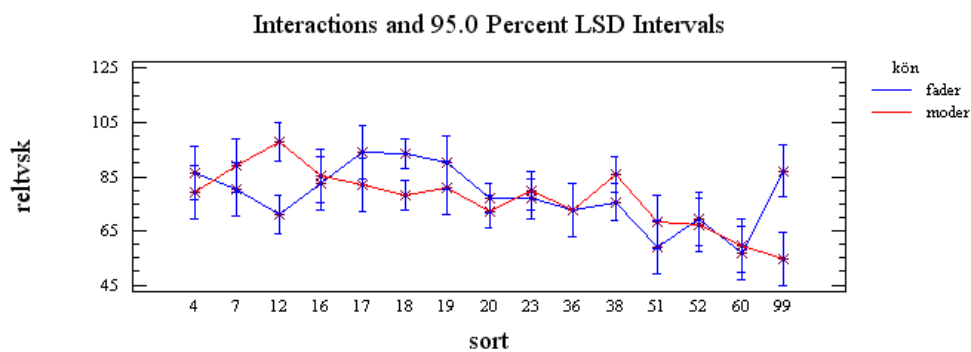
Figur 3. Samband mellan tillväxten med och utan övervattning (water logging tolerans) och relativa elektron transport hastighet (ETRrel) hos syrestressade plantor hos olika sorter av korn. Deter 2, Byng och Himbli har hög "water logging tolerans" och Saesa 1 låg enligt litteraturuppgifter. Henni och Cecilia är två extremer i det svenska sortimentet.

Framtagning av pre-breeding material

Korsningar har gjorts med den i förstudien mest toleranta sorten Henni och den aktuella marknadssorter Gustav. Upprepade urval baserat på fluorescens har gjorts i F2 och F3. Sextio linjer (F3) med hög fluorescens även under vattenmättnadsstress finns nu tillgängliga för vidareförädling.

Screening av markörföräldrar

Efter att ha testat föräldrarna till 14 potentiella markörpopulationer kvarstod MP12 som mest intressant där fadern SLUdt1398xMona⁴ hämmas i tillväxt med 30 % och modern Psaknon och mycket lite (1.9 %). Skillnaderna avseende fluorescens var 15 % (Figur 4).



Figur 4. Skillnader i relativ tillväxt (stress/kontroll x 100, WLT) för föräldrapar till 14 markörpopulationer efter 21 dagar med vattenstress. Par nummer 99 är Cecilia och Henni, men det finns ingen DH-population för detta par.

Fenotypning av markörpopulation

Ett fåtal frö från 140 linjer av DH-populationen Psaknon x SLUdt1398xMona⁴ erhöles från LSW och efter en uppförökning i två omgångar (fick göras om p.g.a. av sterilitet hos en del linjer) gjordes en fenotypning av linjerna enligt den utarbetade metodiken. Större delen av linjerna testades i två omgångar, i vissa fall även en tredje. Fluorescensen för de testade linjerna var i stort normalfördelade med ett min-värde på 0.281 och max-värde på 0.506. Föräldrarnas värden var 0.4317 och 0.378. Henni som är tolerant har värdet 0.44.

Genotypning av markörpopulation

Ett dubbelprov för DNA extraktion togs för varje linje plus föräldrar. DNA extrakten sändes sedan till James Hotton Institut Skottland för genotypning med 384 SNP markörer speciellt utvalda för att täcka korngenet.

QTL analys

Genotypningen gjordes våren 2013 och någon slutlig analys och publicering av QTL analysen har ännu inte gjorts. Detta kommer att ske med medel från Einar och Inga Nilssons Stiftelse.. Preliminära resultat visar dock att det finns flera intressanta QTLs. Av de ursprungliga 384 SNP-markörerna var det 194 som segregerade mellan föräldrarna. Fem QTL identifierades med LOD scores mellan 3.08 och 11.94. Dessa förklarade mellan 6 och 29 % av variansen i QY och totalt 73 %.

Diskussion

Tolerans mot vattenmättade jordar blir allt viktigare i svensk kornodling. Anledningen är att korn är mycket känslig för denna stress och att problemen förväntas öka pga mer nederbörd och minskade investeringar i täckdikningen. I Asien och flera andra delar av jorden är sedan tidigare problemen med vattenstress stora och urval har gjorts främst i fält på tillväxt och avkastning under stress, samt studier av nekrosförekomst på bladen. Avsikten med innevarande projekt har varit att under kontrollerade odlingsbetingelser i vattenkultur hitta en lämplig karaktär för att indirekt selektera för WLT. Två intressanta karaktärer var rottillväxt och klorofyllfluorescens (QY). Rottillväxten påverkas direkt om plantan tvingas växa i vattenmättad jord, liksom fotosyntesen och därmed klorofyllfluorescensen. I undersökningen korrelerade bägge karaktärerna med WLT i jord, men då förändringar i fluorescens är betydligt enklare att registrera valdes denna karaktär efter ingående studier ut som mest lämpad att bygga en selektionsmetod på. Metoden användes därefter för att (1) undersöka ett stort sortmaterial, (2) studier av förädlingsmaterial för Norrland, (3) selektioner i klyvande population och (4) studier av lämplig markörpopulation och (5) fenotypning av en markörpopulation. Resultaten från sortstudierna visar på en stor variation men även att förädlingen av nya sorter gradvis lett till en ökad tolerans. Anledningen till detta är att det redan idag är viktigt med bra tolerans för hög avkastning, vilket framgår av att WLT och QY korrelerar med avkastningen i de officiella försöken ($r=0.73$ respektive $r=0.84$, $N=10$).

Även om den utvecklade metoden uppfyller kraven för en selektionsmetod och skulle kunna användas för att hitta lämpliga korsningsföräldrar eller för selektion i klyvande populationer, passar denna typ av metoder inte riktigt in i ett förädlingsprogram. Urvalen bör helst göras på fältet eller med DNA markörer i laboratoriet. Det senare är särskilt viktigt eftersom vattenstress liksom andra abiotiska stress har stor miljöpåverkan och är därför svåra att selektera i fält. Av den anledningen var ett av delmålen att använda metoden till att karaktärisera en DH-population avseende antingen rottillväxt eller QY och med hjälp av SNP markörer hitta QTL som skulle kunna användas i förädlingen. Under senaste åren har flera QTL-studier publicerats där en fenotypning gjorts avseende WLT eller nekrosutbildning. I den kommande analysen av funna QTL kommer dessa undersökningar användas för verifikation och andra jämförande studier. Det finns även tre undersökningar där fluorescens används i QTL studier avseende tork, salt och köldstress. Även dessa bör kunna ge svar på frågan hur olika stress hänger ihop. Preliminära studier av referensmaterialet i visar att sorterna reagerar i stort lika på vatten- och torkstress, dvs sorter som är vattentoleranta även är torktoleranta och *vice versa*.

Publikationer

Resultaten från metodutvecklingen är publicerad i Bertholdsson (2013). Resultaten från markörstudierna kommer att publiceras när den slutliga analysen av markördata gjorts och resultaten jämförts med liknande undersökningar där fenotypning gjorts av andra egenskaper som påverkas av vattenmättnadsstress. Det finns även tre studier där fluorescens används men för fenotypning av tork-salt och köldstressade plantor. När detta gjorts kommer en populärvetenskaplig publikation ske i Sveriges Utsädesförenings Tidskrift. De två sistnämnda publikationerna har tyvärr fördröjts av att uppförökning och genotypning av markörpopulationen tog längre tid än beräknat. Genotypningen och efterföljande analyser bekostas dessutom delvis av Einar och Inga Nilsson Stiftelse eftersom detta arbete inte ingick i den ursprungliga ansökan.

Bertholdsson, N.-O. 2013. Screening for waterlogging tolerance in Nordic barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) using chlorophyll fluorescence on hydroponically-grown plants. *Agronomy*, 3, 376-390. <http://www.mdpi.com/2073-4395/3/2/376>

Bertholdsson, N.-O (2012). Use of leaf fluorescence and hydroponics for screening of waterlogging tolerance in barley. *Proceedings of ESA12 Congress Helsinki, Finland on 20-24 August 2012*. (Invited). <http://www.esa12.fi/Abstracts.pdf>

Bertholdsson, N.-O (2013). Studies of waterlogging tolerance in Nordic barley cultivars (*Hordeum vulgare*, L.) using chlorophyll fluorescence on hydroponically grown plants. *Abstracts of oral presentations and posters of the European Plant Genetic Resources Conference 2013, NordGen, SLU, Alnarp, Sweden* (poster)

Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)

Den utvecklade metoden att använda hydrokulturer och klorofyllfluorescens (Mini-PAM, stressmeter) för studier av vattenstress under kontrollerade och standardiserade förhållanden är unik och bör kunna användas av näringen för urval av föräldrar, linjer och enskilda plantor. Resultaten från undersökningen visar att det är mycket viktigt att allt standardiseras innan och under mätningen. Om detta görs kan god repeterbarhet uppnås. Många tillämpningar av klorofyllfluorescensmätningar görs idag i fält under mycket varierande förhållanden och varierande resultat och är därmed svårtolkade.

Undersökningen visar på stor variation både i befintligt sortmaterial och i förädlingsmaterial. Resultaten visar att det är bland nya sorter och linjer där det finns högst tolerans. Det är därmed ingen anledning att leta bland äldre genbanksmaterial.

I undersökningen har flera intressanta QTL hittas som kan kopplas till vattenstress men också troligen till andra typer av stress som påverkar fotosyntesen och i förlängningen även då till avkastningen.

Genotypdata med SNP markörer är av stort intresse i förädlingen när väl nya selektionsmetoder som GWS (genome wide selection) börjar tillämpas, liksom nya metoder som är under utveckling där även information om QTL är viktig.

Resultatförmedling till näringen

Kornförädlare på Lantmännen SW Seed (LSW) har fortlöpande informerats om projektet.

Förädlingslinjer från Norrlandsavdelningen (Lännäs) har erhållits och screenats för vattenmättnadstolerans.

Morten Lillemo har erhållit resultat från norska kornsorter inför start av fältförsök i Norge

Förädlare på Boreal i Finland har fått resultat från finska sorter

Kornförädlaren på LSW, Svalöv har erbjudits 60 linjer (F3) ur en korsning mellan Henni (tolerant) x Gustav (känslig) för vidareförädling av andra agronomiska egenskaper. Linjerna valts efter att ha genomgått selektion för vattenmättnadstolerans både i F2 och F3. LSW har även fått en av sina markörpopulationer genotypad med 384 SNP markörer och förutom identifierade QTL för fluorescens under vattenstress kan genotypningen användas för liknande QTL studier av andra egenskaper.