

Framtagning av foderhavre med ökad smältbarhet.

Slutredovisning (20120927)

1. Långsiktig målsättning

Att identifiera och karakterisera havremutantlinjer med låga ligninhalter i fröskalet och att utveckla dessa till odlingsbara sorter.

2. Sammanfattning

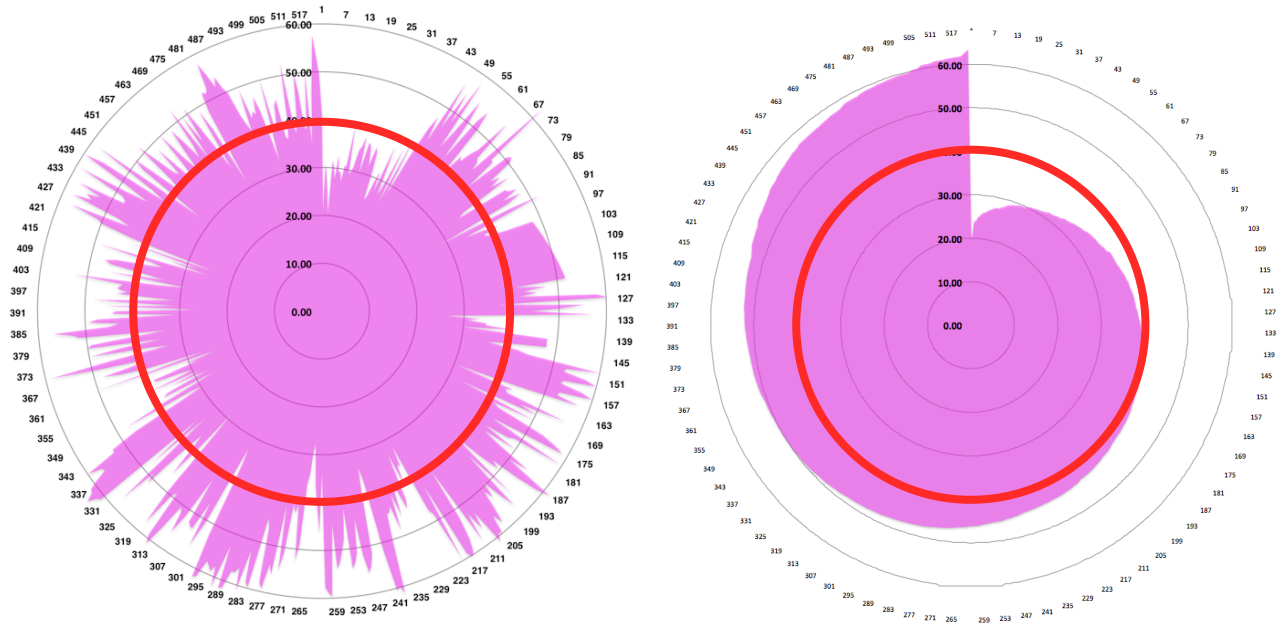
Vi utvecklade en s.k TILLING-population från havre, dvs en population där varje linje innehåller ett mycket stort antal mutationer (> 1 miljon). Detta för att radikalt öka variationen i populationen. Genom att utveckla en ligninfärgassay för frön testade vi hur stor variationen var i populationen med avseende på skallignin. Vi färgade frön från ca 500 linjer och identifierade ett 20-tal som avvek genom att fosfo-glucero-färgning antingen blev starkare eller svagare. Vi utvecklade då en kvantitativ miniassay för ligninanalys och screenade därefter igenom ytterligare 500 mutantlinjer med den kvantitativa assayen. Vi hittade ett flertal linjer med antingen högre eller lägre ligninhalter. Som kontroll använde vi Belinda havre, eftersom själva TILLING-population var gjord från Belinda. Halterna i hela frön varierade från 20 till 63 mg/g att jämföra med Belinda som hade 41.04 ± 1.3 mg/g. Som jämförelse mätte vi också ligninhalten i Assiniboia, en kanadensisk lågligninlinje, och visade att denna innehöll 20.84 ± 1.5 mg/g. För att studera om själva ligninstrukturen också hade förändrats i linjer med högre eller lägre halter satte vi upp metoder för kvalitativ ligninanalys. Vi valde att gå vidare med Belinda, Assiniboia, och 4 linjer från TILLING-population, två med de högsta- och två med de lägsta ligninhalterna. Vi renade fram större mängder av rent ligninpulver från hela frön från dessa linjer och analyserade detta med UV spektroskopi, FT-IR och XRD teknologi. Vi kunde då visa flera av mutanterna uppvisade strukturella skillnader att ligninpolymererna var olika jämfört med Belinda och Assiniboia. Skillnaderna var av en sådan art att de indikerade att även smältbarheten i ligninerna hade påverkats. Vi testade därför två lågligninlinjer med EFOS metoden, som används vid foderutvärderingar i Danmark, och visade att ligninet lågligninlinjerna var mer lättsmält än Belinda. Vi har således nu tagit fram ett väldigt bra utgångsmaterial för en utveckling av odlingsbara lågligninsorter genom inkorsning av egenskapen från valda lågligninlinjer.

3. Uppnådda resultat

3.1 Screening av TILLING-populationen för ligninmutanter

Vi utvecklade en unik TILLING-population för havre (Chawade et al, 2010) där varje linje innehåller ca 1 miljon punktmutationer. Vi utvecklade därefter en kvantitativ ligninassay som bygger på den s.k. acetyl-bromid metoden (Iiyama and Wallis, 1988). Vi modifierade denna så att den fungerade på mindre mängder prov. Från varje testad linje isolerade vi 10 frön (kärna + skal). Dessa vägdes, maldes och löstes upp i perklorsyra, varefter acetyl-bromid i koncentrerad ättiksyra tillsattes och det hela inkuberades vid 70° C under 15-20 min. Denna behandling smälter ner ligninet och fria OH-grupper komplexbinder med bromid. Komplexen kan kvantifieras genom mätning vid 280 nm.

Vi analyserade 517 slumpmässigt valda linjer med denna metod och såg en stor variation i materialet (figur 1). Det allra högsta värdena 63.44 och 62.8 mg/g hittade vi i linjerna CT1849 respektive CT827 och de lägsta i linjerna CT836 och CT1960 som hade 20.31 respektive 23.58 mg/g lignin. Det skiljer således ca 300% mellan den lägsta och högsta linjen!



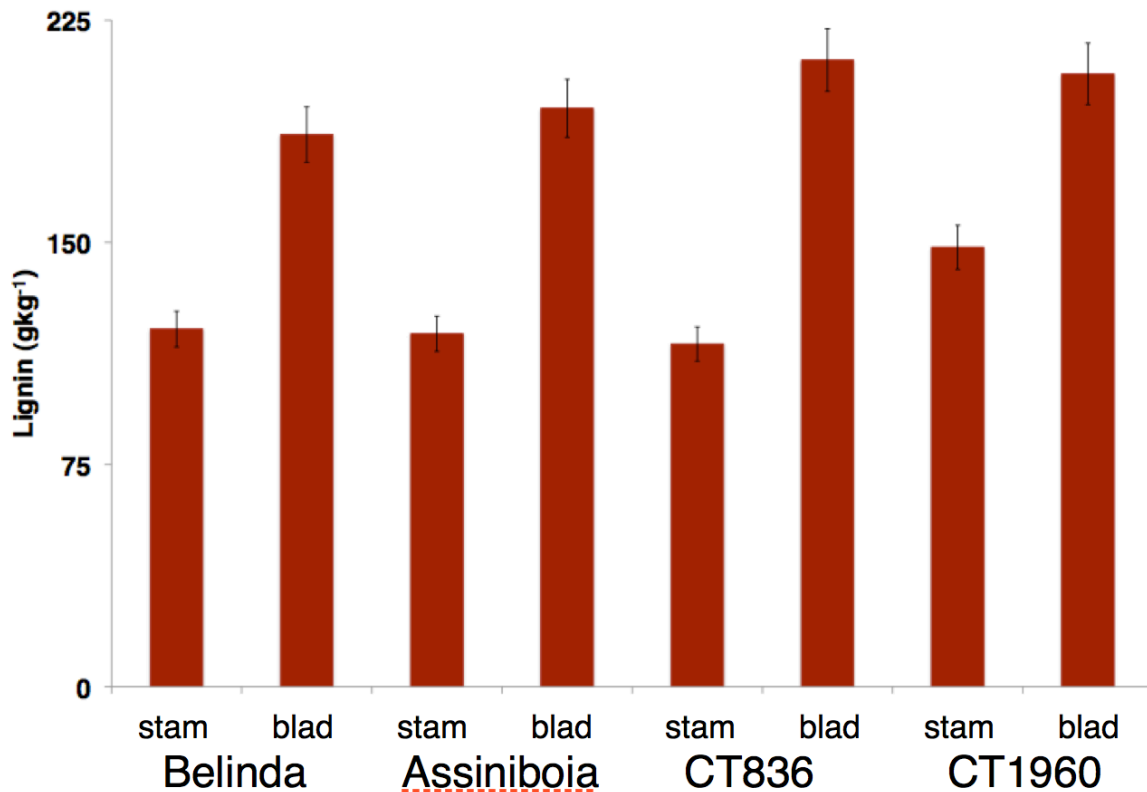
Figur 1. Screening av TILLING-populationen med kvantitativ ligninanalys

A. Sluppmässiga mätningar som visar den stora variationen i TILLING-populationen.

B. Linjer uppordnade efter stigande ligninhalter.

Röd ring visar en ligninhalt på 40 mg/g, dvs normalvärdet för Birgitta. Maxvärdet är 63,44 mg/g och minimivärdet 20,31 mg/g

Vi mätte också ligninhalten i stam och blad hos de linjer med lägst halter, och det visade sig då att ligninhalterna var normala i dessa vävnader (figur 2). Dessa linjer verkar således vara odlingsbara, vilket också bekräftas av ett klimatkammarförsök där mutant och Belinda växte sida vid sida under



Figur 2. Ligninhalt (g/kg) i stam och blad hos Belinda, Assiniboia och två lågligninlinjer



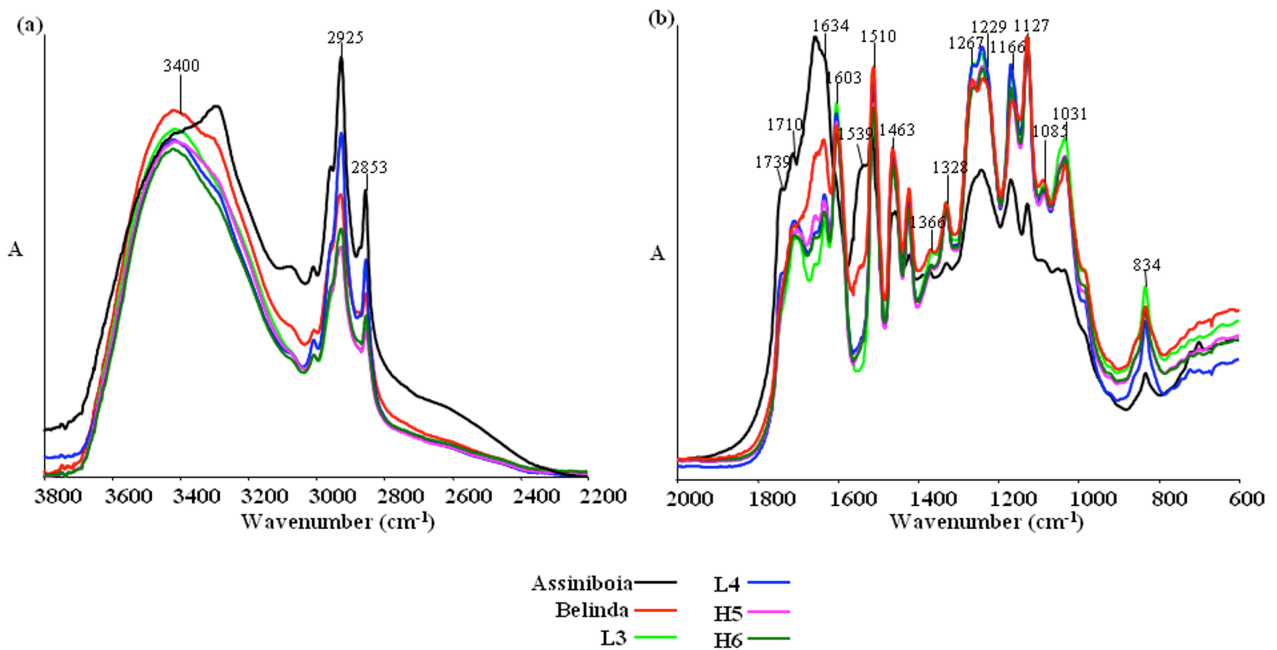
Figur 3. Fenotyp hos Belinda och lågligninmutant (CT836).

Belinda till vänster och CT836 till höger på bilden

kontrollerade former. Det gick då inte att se någon skillnad i fenotyp mellan dessa (figur 3).

3.2 Utveckling av en kvalitativ ligninanalys

För att kunna karakterisera ligninkvaliteten mer i detalj i de mest extrema mutantlinjerna satte vi upp flera olika kvalitativa metoder för ligninanalys (El Mansouri and Salvado, 2007). Efter diverse studier och praktiska tester fastnade vi för tre olika metoder, nämligen UV-spectralanalys, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) och X-ray Crystallography (XRD). Dessa metoder ger olika, kompletterande information om icke-konjugated fenolgrupper, sammansättning av sinapyl, koniferyl och p-koumaryl alkohol grupper, andra konjugeringar, grad av polymerisering etc (se tabell 1 för information om hur man kan tolka FTIR spektra, dvs vilka våglängder som motsvarar vilka kemiska grupper). Sammantaget visade XRD, UV och FTIR mätningarna dels att ligninet vi isolerat var av god kvalitet, dels att det var stora strukturella skillnader på de olika linjerna (figur 4) och slutligen att ligninet i vissa av linjerna uppvisade sådana strukturella förändringar att de kan förväntas vara mer mer åtkomliga för digererande enzymer än Belindaligninerna (Vivekand et al, 2012; Hartley, 1972).



Figur 4. Fourier Transform Infrared (FTIR) spektra på Belinda, Assiniboia valda ligninmutanter
 Speciellt informativa våglängder är indikerade i figuren (a) 3800-2200 cm^{-1} , (b) 2000-600 cm^{-1} . L3 = CT836; L4 = CT1960; H5 = CT827; H6=CT1849

Tabell 1 Tolkning av FT-IR spectra för lignin

Peak location (cm^{-1})	Assignments of IR absorption bands*
3412-3460	O-H stretching
3000 – 2842	C-H stretch in methyl and methylene group
1738 – 1709	C=O stretch in unconjugated ketone, carbonyl, and ester groups
1675 – 1655	C=O stretching in comjugated p-subst. Aryl ketones
1593 – 1605	Aromatic skeleton vibrations plus C=O stretching
1505 – 1515	Aromatic skeleton vibrations
1460 – 1470	C-H deformations (asym in -CH ₃ and -CH ₂ -)
1422 – 1430	Aromatic skeleton vibrations combined with C-H in plane deformations
1365 – 1370	Aliphatic C-H stretching in CH ₃ and phenolic OH
1325 – 1330	Condensed S and G ring
1266 – 1270	G ring plus C+O stretching
1221 – 1230	C-C + C-O + C=O stretching (G)
1166	Typical for HGS lignins; C=O in ester groups (conj.)
1125 – 1128	Typical of S unit; also secondary alcohol & C=O
1086	C-O deformation in sec. alcohol & aliphatic ether
1030 – 1035	Aromatic C-H in- plane deformation (G, S) plus C-O deform. in primary alcohols plus C-H stretching (unconjugated)
966 – 990	-HC=CH- out of plane deformation
915 – 925	C-H out of plane (aromatic ring)
853 – 858	C-H out of plane (G units)
834 – 835	C-H out of plane (S units)
817 – 832	C-H out of plane (G units)

3.2 Smältbarhetsstudier

För att bekräfta de biofysikaliska försöken satte vi upp en assay för att mer direkt testa smältbarheten hos de testade ligninerna *in vitro*. Det finns en rad olika metoder publicerade för att fastställa smältbarhet både *in situ* och *in vitro* (Cherney & Cherney, 2003). *In situ* bestämning av

smältbarheten för foder är kanske den metod som är mest relevant sedd ut ett praktiskt foderperspektiv. Metoden är dock komplicerad, dyr svår att standardisera och kräver inkubering av fodret i fistulerade kor (De Boever et al., 2002; Spanghero et al., 2003). Diverse alternativa metoder för bestämning av smältbarhet i *in vitro* baserade metoder där bl.a. en inkubering i vomvätska ingår har därför utvecklats (Tilley och Terry; 1963). Det olösliga material som därefter blir kvar samlas upp genom filtrering, torkas och vägs. Smältbarheten bestäms genom subtraktion av mängden olösliga fibrer från den ursprungliga mängden organiskt material varefter det procentuella värdet räknas ut. Problemet med denna metod är att vomvätskans kvalitet varierar från djur till djur vilket försvårar standardisering (Spanghero et al., 2003). I Danmark utvecklades en metod som går under beteckningen EFOS (enzymfordöjligt organisk stof) metoden (Weisbjerg och Hvelplund 1993) där vomvätskan ersattes med en mer definierad enzymblandning vilket ger en större reproducerbarhet. Eftersom EFOS metoden ger en signifikant korrelation mellan nedbrytningshastigheten av ”non digestible fibers” (NDF) *in situ* och smältbarheten av organiskt stoff *in vitro* används den numera som standard vid foderutvärderingar i Danmark (Weisbjerg, 2004). Vi valde därför här att använda denna metod för att bestämma smältbarheten av kärnor från två av de låg-lignin linjer vi identifierade i TILLING populationen. Våra resultat visade att våra två lågligninlinjer CT830 och CT836 gav något högre restvärden (Non Digestible Fiber, NDF) och därför inte hade en lika bra smältbarhet som Assiniboia, men att de var bättre än Belinda (se Tabell 1). Smältbarheten hos Assiniboia är känd sedan tidigare (Thomsen et al, 2000). Vid en visuell inspektion av de olösliga fiberrester som fanns kvar efter den enzymatiska behandlingen fanns det tydliga strukturella skillnader mellan fiberresterna från de olika linjerna. Fibererna från Assiniboia var korta och finfördelade medan CT830, CT836 och Belinda efterlämnade grövre och längre fiberrester. Dessa strukturella skillnader påverkar troligtvis både smältbarhetsförlopp och nedbrytningshastighet.

Linje	Ligninhalt mg/g	Mängd prov	NDF (ts)	Smältbarhet %
Belinda	41,0	500 mg	47,8	90,44
Assiniboia	20,8	500 mg	20,7	95,86
CT836	20,3	500 mg	29,1	94,18
CT830	24,1	500 mg	37,1	92,58

Tabell 1. Ligninhalt i valda linjer, mängd organiskt material, andelen (räknat på torr vikt) ouplösligt organiskt material (NDF) som återstår efter en enzymatisk behandling i enlighet med EFOS metoden och slutligen smältbarheten i % efter det att kompensation för fuktigheten i proverna gjorts.

4. Diskussion

Den övergripande målsättning med detta projekt identifiera och karakterisera havremutantlinjer med låga ligninhalter i fröskalet för att på detta sätt få fram det genetiska utgångsmaterial som behövs för att utveckla odlingsbara lågligninsorter som producerar kärnor med en högre smältbarhet än nuvarande sorter. Eftersom den variation som finns i existerande förädlingslinjer är ganska begränsad utvecklade vi en mutationspopulation för havre, där varje linje i populationen bär på mer än en miljon olika mutationer. Genom att utveckla en kvantitativ ligninassay kunde vi genom att screena oskalade kärnor från över 500 olika linjer för lignininnehåll identifiera linjer med både högra och lägre ligninhalter. Genom att isolera rent lignin från de linjer med de högsta- och lägsta ligninhalterna kunde vi testa ligninkvaliteten med hjälp av tre olika metoder, röntgen, UV-ljus och

FTIR. Dessa försök visade att i både hög- och lågligninlinerna var även själva ligninstrukturen modifierad. I flera fall på ett sett som tydde på att vissa grupper var steriskt mer exponerade, dvs skulle kunna vara mer öppna för ett enzymatiskt angrepp. Preliminära smältförsök indikerade också att så var fallet.

Vi har nu således ett antal olika linjer som skulle kunna vara av intresse att förädla vidare på och som kanske så småningom skulle kunna leda till en utveckling av nya havrelinjer för foder.

5. Egna publikationer

Arbetet med att utveckla och karakterisera havre TILLING-populationen är nu publicerat. Vi har dessutom ett inskickat manuskript som beskriver identifieringen och karakteriseringen av ligninlinjerna och som förhoppningsvis kommer att publiceras under 2012.

6. 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 svenska, nordiska och internationella havreföreningarnas sammankomster.

6. Referenser

- 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 β -glucan biosynthesis genes *BMC Plant Biology*, 10:86
- Cherney, J. H. & Cherney, D. J. R. 2003. Assessing silage quality. In: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. De Boever, J. L., Vanacker, J. M. & De Brabander, D. L. 2002. Rumen degradation characteristics of nutrients in maize silages and evaluation of laboratory measurements and NIRS as predictors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101:73-86.
- H. (Ed.) *Silage Science and Technology*. pp. 141-198. *AGRONOMY* 42. ASA, CSSA and SSSA, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- El Mansouri, N.E. and Salvado, J. (2007). Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins. *Ind Crops Prod* 26(2):116–124.
- Hartley, R.D. (1972). p-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility. *J. Sci. Food Agric.*, 23:1347-1354.
- Iiyama, K. and Wallis, F.A. (1988). An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci Technol.* 22:271-280.
- Mertens, D.R. 2002. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative study *J. of AOAC* 85, 1217-1240
- Spanghero, M., Boccalon, S., Gracco, L. & Gruber, L. 2003. NDF degradability of hays measured in situ and in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104:201-208.
- Tilley, J. M. A. & Terry, R. A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-111.
- Thompson, R. K., Mustafa, A. F., McKinnon, J. J., Maenz, D., and Rosnagel, B. 2000. Genotypic differences in chemical composition and ruminal degradability in oat hulls. *Can. J. Anim. Sci* 80:377-379
- Vivekanand, V., Chawade, A., Larsson, M., Larsson, A. and Olsson, O (2012) Identification and qualitative characterization of high and low lignin lines from an oat TILLING population. Submitted to *Food Chemistry*
- Weisbjerg, M. & Hvelplund, T. 1993. Bestemmelse af nettoenergiindhold (FEK) i foder til kvæg. *Statens Husdyrbrugsforsøg, Forskningsrapport nr 3.*
- Weisbjerg, M. R. 2004. Cellvæggenes fordøjelighed i kornsorter til helsæd. Intern rapport nr. 191, januari. Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, Danmarks JordbrugsForskning