

**Hösthavre – en framtidsgröda i Sverige**

Olof Olsson, Rickard Jonsson, Gokarna Gharti-Chherti, Marcus Bräutigam, Aakash Chawade och Anders Jonsson.  
Göteborgs Universitet, Svalöf Weibull AB och Svenska Lantmännen

**Sammanfattning**

I Sverige odlas havre endast som vårgröda. En havre som klarar vintern skulle öka utbytet och säkra möjligheterna att tillfullo både utnyttja havrens avkastningspotential och dess positiva växtföljdseffekter. Den långsiktiga målsättningen med detta projekt är därför att ta fram en svensk hösthavre. För att åstadkomma detta har vi i olika projekt bedrivit forskning efter olika parallella linjer såsom a) selektion i fält efter mer härdiga havresorter b) isolering, sekvensering och karakterisering av köldinducerade havregener c) bioinformatisk analys av promotorsekvenser i Arabidopsis genom och publika mikroarraydata på köldinducerad Arabidopsis och upprättande av ett gennätverk för de viktigaste reglerna i köldacklimatiseringsprocessen samt d) utarbetande av ett regenererings- och transformationssystem för vinterhärdig havre samt utvecklandet av ett system för en identifiering av mutationer i på förhand bestämda havresekvenser. Detta projekt har finansierat delar av alla 4 punkterna, framför allt a) och d).

Efter 4 års selektion i fält av speciellt vinterhärdiga havresorter och via diverse korsningar från dessa har vi fått fram ett 20-tal linjer som uppvisar mycket större härdighet än existerande vårsorter och med i huvudsak bibehållet odlingsvärde. Från 10000 EST sekvenser har vi definierat ca 400 gener i havre som induceras under köldacklimatiseringen. Från gennätverksstudier har vi definierat nya relationer mellan olika transkriptionsfaktorer som ingår i köldregleringen och identifierat ett flertal gener som är potentiellt användbara markörer i förädling för hösthavre. Slutligen har vi från en vinterhärdig havrelinje utarbetat ett protokoll för regenerering av nya plantor via s.k. microtilling, dvs. induktion i vävnadsodling av multipla skott från kallas genererad från mogna embryon.

För att komma vidare och få fram en odlingsbar hösthavre krävs nu en vidareutveckling av nuvarande förädlingsmetoder där dels precisionen i genvariationen ökas genom riktad mutagenes och genteknisk modifiering och dels att en mer aktiv, markörbaserad selektion utarbetas för att identifiera de bästa korsningskombinationerna och de bästa individuella plantorna.

**Introduktion**

Målsättningen med detta projekt var att utreda möjligheterna att etablera en ”ny” gröda, hösthavre, i Syd- och Mellansverige. För att kunna åstadkomma detta krävs en ökad förståelse av de bakomliggande biologiska mekanismerna för köldacklimatisering och vinterhärdighet, en identifiering av tänkbara genkällor för ökad vinterhärdighet i tillgängligt material samt en utveckling av metoder för en riktad mutagenes av på förhand definierade gener i havre.

I England finns idag en hösthavre som klarar det engelska klimatet och odlingen av hösthavren har ökat under de senaste 20 åren. Under de senaste fem åren har sortmaterialet förbättrats så mycket att över 80% av havren nu sås på hösten. Detta har lett till att havreskördarna ökat från ca 4,5 ton/ha för tio år sedan till 6 ton/ha (Green 1999). Vårhavre odlas numera huvudsakligen i Skottland. I Sverige skulle en höstsådd havre ge högre skörd än vårsådd havre, högre skörd i efterföljande vete samt öppna för ökad höstoljeväxtodling i Mellansverige.

Tillgång till hösthavre skulle kunna öka intäkterna med minst 250 milj/år netto! (tabell 1). En högre avkastning i havre skulle också öppna för ökad användning i foder, speciellt om den kan kombineras med förbättrat fodervärde och stärka konkurrensförmågan vid export till Nordamerika liksom vid förändringar av villkoren för havreodling inom EU.

De transnationella företagens fokus på de ”stora” grödorna, majs, sojaböner, ris har också lett till att konkurrenskraften hos speciellt den mellansvenska växtföljden har försvagats. Vi tvingas alltmer mot monokulturer av vete med de problem som det innebär. En hög avkastande tidigt mognade havre vore därför mycket intressant. En lantbrukare med 100 ha skulle försiktigt räknat öka sitt netto med ca 100.000 kr/ år (tabell 1) vid odling av en sådan, tidig havre. Om man antar att 30% av dagens havreareal skulle ingå i en sådan växtföljd, dvs. totalt ca 250.000 ha, skulle detta ge ett nettotillskott på ca 250 milj kr till svenskt växtodling. Detta kan jämföras med bruttointäkten för havreexporten till USA som är ca 200-300 miljoner kronor per år.

Vi har testat det begränsade engelska och tyska sortmaterialet för vinterhärdighet under Sydsvenska och Mellansvenska förhållanden. Det har då visat sig att dessa sorter har mycket svårt att klara våra vintrar. Syftet med detta projekt var att bredda denna inventering genom att testa alla vinterhärdiga linjer av odlad hexaploid havre från hela världen samt att undersöka möjligheterna att ytterligare förbättra denna egenskap genom en utveckling av existerande förädlingsmetoder.

**Tabell 1.** Beräkning av lantbruksföretagarens slutanvändarnytta av att odla hösthavre. Antagandet är en 5-årig växtföljd (h-havre, h-vete, h-havre, h-oljeväxt, h-vete) vilken har jämförts med dagens monokulturliknande stråsådesintensiva odling utan oljeväxter i växtföljden. Skördeökningarna är försiktigt bedömda utifrån växtföljdsförsök etc.

<b>Kundnytta med hösthavre</b>	<b>Vinst/ha under 5 år (kr)</b>
Skördeökning i <i>höst-havre</i> jmf vårhavre ca 1500 kg/ha	300
Skördeökning i <i>höst-vete</i> efter havre ca 500 kg/ha	100
Skördeökning i <i>höst-havre</i> jmf. Vårhavre ca 1500 kg/ha	300
Skördeökning i <i>höst-oljeväxter</i> jmf våt-oljeväxt ca 1000 kg frö a 1.80	360
Skördeökning i <i>höst-vete</i> efter h-oljeväxter 1000 kg a 1 kr	200
-Avgår för ökad växtförädlareavgift 2årx50kr/ha på 5 år (20 kr/ha)	- 20
<b>Summa</b>	<b>1240</b>

Vinterhärdighet hos växter är ett komplext fenomen som består av flera olika fysiologiska komponenter. För att kunna överleva vintern måste grödan först och främst kunna klara låga temperaturer (under 0°C). Därefter under tidig vår, när grödan går ur sin vintervila, måste den dessutom kunna klara tillfällig nattfrost samt den ljusstress som uppstår då plantorna utsätts för den starka vårsolen i kombination med låga temperaturer. Grödan måste också kunna växa och utvecklas under icke-optimala temperaturer under 10°C (”chilling tolerance”), samt klara den torkstress som följer av ett sämre vattenupptag då det fortfarande finns tjäle i marken.

Ett flertal fysiologiska och biokemiska mekanismer har utvecklats hos växter för att de skall anpassa sig till denna stress. Om man utsätter en planta för temperaturer strax ovanför fryspunkten svarar denna med att upp- eller nedreglera ett flertal olika gener.

Dessa i sin tur aktiverar eller represserar hundratals andra gener och genfamiljer. Sammantaget leder denne omreglering av kritiska gener till en bättre tillväxt vid låga temperaturer samt ett ökat skydd mot frost. Exempel på cellulära anpassningar som sker är aktivering av nya transkriptionsfaktorer och signaltransduktionsvägar, förändringar i primär metabolism, osmotiska justeringar, strukturella förändringar fr.a. i cellmembranen, olika typer av degraderings och reparationsmekanismer, nedbrytning av toxiner, ökad tolerans mot fotoinhibition, inaktivering av oxidativa produkter som t.ex. fria syreradikaler och induktion av ett flertal proteiner med helt eller delvis okända aktiviteter.

Eftersom växter hela tiden för ett flertal olika stress, både biotiska (mikroorganismer, parasiter, insekter) och abiotiska (temperaturskillnader, ljus, salt etc.) överlappar många stressresponser med varandra, tex. torka, kyla och saltstress, vilket ytterligare komplicerar analyserna av dessa. Detta leder ofta till att en köldhärdig planta också tål mer stress i form av t.ex. torka. Ett skäl till att det är så svårt att förädla för en ökad köldhärdighet är just det faktum att så många olika gener och processer är inblandade. (Thomashow 1999).

Ett fåtal försök med vinterhärdig havre har gjorts i Sverige (B. Mattsson, SW pers. kommunikation). Emellertid finns det inga systematiska försök gjorda där målsättningen har varit att ta reda på exakt när och varför plantorna dör. Frös de ihjäl under själva vintern eller dog de av uttorkning eller av för starkt solljus under tidig vår? Vilken del på plantan är mest kritisk för överlevnad? Många plantor överlever, men förlorar i vigör, dvs. de tappar sina odlingsegenskaper. Vad beror detta på? För att kunna hitta nya markörer för förädling och för att, i ett senare skede, precisionsmutera eller med hjälp av genteknik ta fram transgen havre med en ökad frosthärdighet, inledde vi ett arbete att systematiskt klassificera alla de 100-tals gener som är inblandade i köldresponser.

För att inte den klassiska förädlingen skall ohjälpligt efter krävs tillgången till effektiva markörer för mer precis selektion. Vi behöver bygga upp kunskap om havregenomet, dess genstruktur och funktion. Att sekvensera alla kromosomer i havre på samma sätt som gjorts för människa och ris m.fl. organismer skulle bli oralistiskt dyrt på grund av det mycket stora havregenomet. Det mest ekonomiska och tidseffektiva sätt att lära sig mer om havregener är därför genom EST-sekvensering. Under de senaste fem åren har vi byggt upp världens största EST-sekvensdatabas för havre. Där finns ca 15000 sekvenser, motsvarande ca 3500 unika gener. Ingen vet hur många gener som totalt finns i havre men en god gissning, baserat på risgenomet som är helt sekvenserat, är ca 30000. Vår havredatabas är därför, trots att den är störst i världen, fortfarande rätt liten. Vår databas är överrepresenterad när det gäller köldrelaterade gener, vilket är till en stor fördel när det gäller hösthavreprojektet.

Efterhand som vår kunskap om havregenernas funktion ökar, ökar också behovet av ett biologiskt testsystem där biologisk funktion hos individuella gener kan testas. Vi har tidigare utvecklat ett transformationssystem som är unikt i världen för en havre genotyp (Belinda). Med ökand kunskap av regleregner som styr köldacklimatisering kommer vi att kunna utnyttja detta protokoll för att på transgen väg uppreglera kritiska köldgener och testa om vi på detta sätt kan ta fram plantor med en högre vinterhärdighet.

## **Målsättning**

Målsättningen i detta projekt var att undersöka förutsättningarna att utveckla en vinterhärdig havre för syd och mellansvenska förhållanden

Detta skedde genom

- att testa befintligt material i fältförsök i Skåne och Västergötland
- att under köldstress isolera mRNA från olika havre sorter
- att utarbeta ett regenereringssystem för den hårdigaste havresort vi kunde identifiera
- öka förståelsen av de gener som aktivas vid havrens svar på temperaturstress

Målet var inte bara att hitta hårdiga linjer för traditionell korsning utan att också korsa vidare från de bästa av dessa. Vi ville också definiera mekanismer som ger ökad hårdighet samt att försöka identifiera de nyckelgener som ger denna hårdighet. Målet var också att så mycket som möjligt försöka bevara praktiska odlingsegenskaper hos de köldtoleranta linjerna.

## Resultat och Diskussion

### Fälttestning och förädling av vinterhårdighet

Säsongen 2003/2003 såddes totalt 200 observationsparceller på Weibullsholm inkluderande 65 linjer från den amerikanska genbanken, 50 linjer från Vavilov-institutet, i St Petersburg, 19 linjer som ingick i ett amerikanskt sortiment för vinterhårdighetsprovning samt fyra tyska hösthavresorter från Lochow-Petkus. Vårhavre samt höstkorn (Hampus) användes som mätarsorter i försöket. Sortimentet ovan representerar troligen den bästa vinterhårdighet som för närvarande finns att tillgå i odlad hexaploid havre. De tyska hösthavresorterna såddes också i fyra upprepningar på Bjertorp, Västergötland. Väderdata samlades kontinuerligt in från närbelägna väderstationer.

I december grävdes tre plantor av varje accession upp och planterades i växthus. Detta för att säkerställa fröskörd av samtliga linjer. Bedömning av bestockning, vippgång och planthöjd gjordes på detta växthusmaterial. Den 15:e januari bedömdes vitaliteten i fält och plantor togs in av de mest vitala linjerna. Detta upprepades den 17 mars när vinterpåfrestningarna i stort var avklarade detta år. Endast en planta! från en linje var vid liv efter den sista provtagningen. Linjen såg vitalare ut under hela vintern och klarade sig betydligt bättre än t.ex. de tyska marknadssorterna. Av de tyska hösthavresorterna på Bjertorp i Västergötland klarade ingen vintern.

Säsongen 2003/2004 såddes totalt 316 observationsparceller på Weibullsholm inkluderande delvis samma material som provades under den första säsongen men även nya accessioner från de amerikanska och ryska genbankerna. De tyska marknadssorterna Wistar och Winnipeg såddes även i avkastningsparceller, med höstkorn som mätarsort. Under vintern samlades bladprover in från hösthavre resp. från vårhavre. Provtagning utfördes dels med jämna intervall under vintern, dels vid kraftiga temperatursvängningar. Observationsparceller såddes på Bjertorp.

Hösthavresorterna Wistar, Winnipeg, LPSH 992209 och LPSH 992210 såddes tillsammans med höstkorn i avkastningsparceller (16m<sup>2</sup>) i Landskrona. Avsikten var att få en grov uppskattning av avkastningspotentialen. Under vintern korsades avkomman från den överlevande plantan från försöket 2002 med de tyska sorterna Winnipeg och Wistar. Syftet är att kombinera vinterhårdighetsegenskaper från olika genbakgrunder.

Övervintringen 03/04 var generellt betydligt bättre än under föregående säsong. Detta innebar att flera av de hösthavresorter som provades för andra året nu klarade sig betydligt bättre. T.ex. övervintrade de tyska sorterna lika bra som den bästa förädlingslinjen från Pennsylvania. Bland materialet fanns även en hel del nya accessioner från de amerikanska och ryska genbankerna. En

hel del av detta material klarade vintern medan många av accessionerna som var klassificerade som vintertyper visade sig vara utan vinterhärdighet. Dessa typer är troligen anpassade för kort dagslängd och odlas vintertid i varmare klimat t.ex. i södra USA eller i Australien. Vårhavren överlevde för övrigt inte heller vintern. Observationsparcellerna graderades med avseende på övervintring och agronomisk potential. Från försöket skördades 21 sorter i totalt 38 obsparceller.

Resultaten av avkastningsförsöket visade att höstkornet avkastade ca 11 kg per parcell medan hösthavren gav ca 9 kg per parcell. Detta resultat ger en fingervisning om de tyska sorterna redan har en ganska god avkastningspotential.

Höstkornet skördades under relativt goda förhållanden. Noteras skall att tyvärr var hösthavren ännu inte mogen när höstkornet togs in och fick skördas senare. Vädret hade då blivit sämre och havreparcellerna fick stå mogna under en alltför lång tid.

Säsongen 2004/2005 såddes de 21 överlevande sorterna från årets skörd ut i nya observationsparceller tillsammans med vårhavre och denna gång med rågvete som mätare. Rågvete har en tidighet som stämmer bättre än höstkornets. Sorterna såddes med tre upprepningar och totalt 91 parceller. Samma försök såddes i Svalöv och på Bjertorp i Västergötland. Övervintringen i Svalöv varierade mellan 20 och 80%. På Bjertorp var påfrestningarna större och övervintringen stannade vid ca 20%. De två korsningarna odlades som F1 i växthus under vintern och våren och såddes som F2 tillsammans med observationsparcellerna. De mest intressanta hösthavrelinjerna samt de två F2-populationerna skördades. Havresorterna såddes med och utan ogräsbekämpning (Cougar). Ett avkastningsförsök gjordes på icke ogräsbekämpade rutor och resultaten nedan är från dessa. Hösthavren var som befarat känslig för Cougar och avkastningen i dessa led var endast ca 3 kg (Tabell 2).

**Tabell 2.** Resultat från orienterande avkastningsförsök i Landskrona 2004.  
Rutskördar (16m<sup>2</sup>) med och utan Cougar-behandling

Sort	Skörd kg/16m <sup>2</sup>	Skörd med Cougar
Pontus		11,1
Wistar	6,1	2,1
Wistar	6,4	
Winnipeg	7,1	2,5
Winnipeg	8,7	
LPH 992209	8,9	4,6
LPH 992210	9,2	4,8

Säsongen 2005/2006. Utanför projektet såddes skördat material från försöket 2005 för att under ett fjärde år studera övervintringsförmågan. Även under detta år övervintrade de mest vinterhärdiga sorterna. Detta år till ca 50%. Man kan dock konstatera att hösthavren detta mycket speciella år skulle ha hävdats sig väl i en jämförelse med vårsådd vårhavre. Även med reducerat bestånd skulle hösthavrens avkastning legat i nivå med eller över vårhavrens och med ca två veckors tidigare mognad skulle hösthavren ha kunnat skördas innan regnandet i Svalöv började. De två korsningpopulationerna (F3) skördades återigen i bulk.

Säsongen 2006/2007. Återigen utanför projektet såddes korsningspopulationerna och ytterligare några linjer ut i observationsparceller. Totalt såddes 25 sorter i fyra upprepningar.

Sammanfattning. Inom projektet har ett mycket stort sortiment av hösthavre-accessioner provats under svenska förhållanden. Accessionerna har erhållits från den amerikanska genbanken, från Vavilov-institutet i St Petersburg samt från ett amerikanskt hösthavreprojekt som syftar till att utvärdera nya förädlingslinjer av hösthavre. Sortimentet representerade den bästa vinterhärdighet som fanns att tillgå i världen av odlad hexaploid havre.

Graden av utvintring hos de mest vinterhärdiga linjerna har varierat stort mellan åren från nära fullständig utvintring 2003 till nära fullständig övervintring 2005. Både under 2004 och 2006 var övervintringen ca 50%. Mycket stora skillnader i vinterhärdighet mellan accessionerna har konstaterats. Under samtliga år har vårhavren fullständigt försvunnit. Från tabell 2 framgår det att vårhavre (Stork) fullständigt utvintrat under samtliga år. Vi kan också se att de tyska sorterna haft en genomgående hög övervintring och också haft höga värden för agronomisk potential. Den linje som klarade sig bäst under den hårda vintern 2003 var dock PI 555736. Hypotesen är att den senare linjen har bättre frosthärdighet. Rangordningen av de olika linjerna varierar mellan åren. Detta kan naturligtvis bero på slumpmässig variation men det kan också bero på att vintrarna varit olika och att de olika linjerna är olika anpassade. I det senare fallet finns det därför fortfarande en viss förutsättning för konventionell förädling (helst tillsammans med markörbaserad selektion) där olika härdighetstyper kan kombineras.

Slutsatsen efter 4 års försök är att både i tyskt och amerikanskt hösthavrematerial finns linjer som har bättre vinterhärdighet än vi tidigare trott, men också att ingen av de provade linjerna har tillräckligt bra härdighet för att kunna fungera i praktisk odling. Under de sista två åren har vi även testat diverse korsningar mellan de mest härdiga linjerna och de idag mest odlingsvärda tyska sorterna. Det är ännu för tidigt att säga om de två korsningspopulationerna kommer att resultera i förbättrad vinterhärdighet. Realistiskt sätt så tror vi inte, trots dessa positiva resultat, att det går att komma hela vägen, dvs. få fram en hösthavre för praktisk odling med nuvarande förädlingsstrategi. Ytterligare härdighetsgener måste troligen ansamlas i dessa linjer och för detta krävs en ökad kunskap om enskilda härdighetsgeners reglering och roll i acklimatiseringsprocessen så att en riktad mutagenes kan utföras, samt en utveckling av lätt använda markörtekniker. Ett mycket värdefullt resultat av hela denna insats är att vi nu har lyckats identifiera 20 linjer som har en mycket bättre vinterhärdighet än existerande vårsorter och med hyfsade agriskulturella egenskaper i behåll (tabell 3). Dessa linjer blir en ovärderlig hjälp när vi nu skall gå vidare och identifiera specifika gener som är unikt uttryckta i höstsorterna.

### **Havregenomik – gener och markörer**

Vi konstruerade ett köldinducerat cDNA bibliotek från havre och sekvenserade 9792 kloner. Efter diverse dataanalyser kunde vi identifiera 2800 olika potentiella gener varav 1620 (58%) var kända sen tidigare från andra system. Av de återstående 1180 oklassificerade sekvenserna var 427 havrespecifika (Bräutigam et al, 2005). Vidare visade vår analys att 107 sekvenser motsvarade transkriptionsfaktorer från minst 14 olika genfamiljer. Av dessa var 51 homologa till köldinducerade transkriptionsfaktorer från andra system och således mycket intressanta även ur hösthavresynpunkt (Bräutigam et al, 2005; Brautigam et al, 2006; Lindlöf et al, 2006).

**Tabell 3. Övervintring (0-9; 9=100%) och bedömning av agronomiskt värde (0-9; 9=bäst) av hösthavrelinjer under 2004-2006.**

Sort	Bestånd (0-9; 9=100%)			Agronomiskt värde (0-9)		
	2004	2005	2006	2004	2005	2006
Stork	0	0	0			
Fidelio		9	9			
Hampus	9		8			
Winnipeg	3	6	4	3	5	7
F2a		7	4		7	5
F2b		8	4		7	5
LPWH 992209	6	7	4	7	7	7
LPWH 992210	6	6	3	7	7	7
LPWH 002205-1	3	6	5	5	7	8
LPWH 992213	2	7	4	3	7	5
<b>PI 555736</b>	<b>4</b>	<b>4</b>		<b>5</b>	<b>7</b>	
<b>PI 555736</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	3	<b>3</b>	<b>7</b>	4
PI 555733	4	4		5	5	
PI 508537	3	4		5	3	
Clav 9323	5	8	2	3	5	3
Clav 9349	5	7	4	7	7	2
Clav 8213	3	7	2	5	3	4
Clav 9168	6	7		5	5	
Clav 8313	3	6		5	3	
Clav 9340	3	6	4	7	5	5
Clav 9339	3	6		3	5	
Clav 9327	2	6		3	5	
Clav 9346	4	5		7	5	
Win/Nor-1	5	4		3	3	
Win/Nor-4	5	5		3	4	
Elan	2	7	3	5	7	5
Bimbil	3	7	4	5	7	5
AR0213-3	3	5		5	5	
AR0213-3	6	4		3	5	

Under senare år har en stor mängd data på andra köldinducerade växter, fr. a. Arabidopsis blivit publikt tillgängliga (Fowler och Thomashow, 2002). Vi har utnyttjat denna information till att bygga upp bioinformatiska modeller för en systematisk genomgång av existerande mikroarray data för köldinducerade gener och i kombination med data från Arabidopsis genomsekvensen undersöka och ta fram nya genrelationer. På så vis har vi expanderat de från litteraturen kända köldregleringsscheman och kunnat identifiera potentiellt nya gen-samband i köldregleringsprocessen (Chawade et al, 2006). Vi har då identifierat ett flertal transkriptionsfaktorgenfamiljer som verkar vara involverade i köldacklimatiseringsprocessen, till exempel BHLH, BZIP, HSF, AP2, NAC, WRKY, DOF, CCA1, AGL20, och TCP2. Ett otal olika aktiviteter har tillskrivits dessa faktorer i litteraturen, men speciellt BHLH, BZIP, HSF och NAC transkriptionsfaktorerna har inte tidigare ansetts involverade i köldregleringsprocessen. Vi är särskilt intresserade av samband mellan CBF3 och WRKY (Eulgem et al, 2000; Zhang and Wang, 2005) transkriptionsfaktorerna och mellan CBF1 och CBF2 och DOF transkriptionsfaktorerna, eftersom vi har preliminära data på att dessa gäller även i havre (Brautigam et al, 2006). I vår havre EST

kollektion har vi identifierat tre olika WRKY faktorer (Brautigam et al, 2005). Med RT-PCR experiment kunde vi visa att en av dessa, döpt till AsWRKY4, induceras redan efter 20 min inkubering vid +4°C. Detta indikerar att denna faktor har en viktig roll i köldacklimationsprocessen (Brautigam et al, 2006). Vi håller nu på att sätta upp ett protoplastsystem i havre för att kunna snabbtesta aktivitet från olika promotorer, identifiera transkriptionsfaktorbindande site etc.

I parallella experiment har vi odlat alla de 20 hösthavrelinjerna vi identifierade från fältförsöken under mycket kontrollerade klimatförhållanden i en Biotron (Alnarp). Vi har samlat in material för genexpressionsanalys från växter odlade i 4°C under varierande tider.

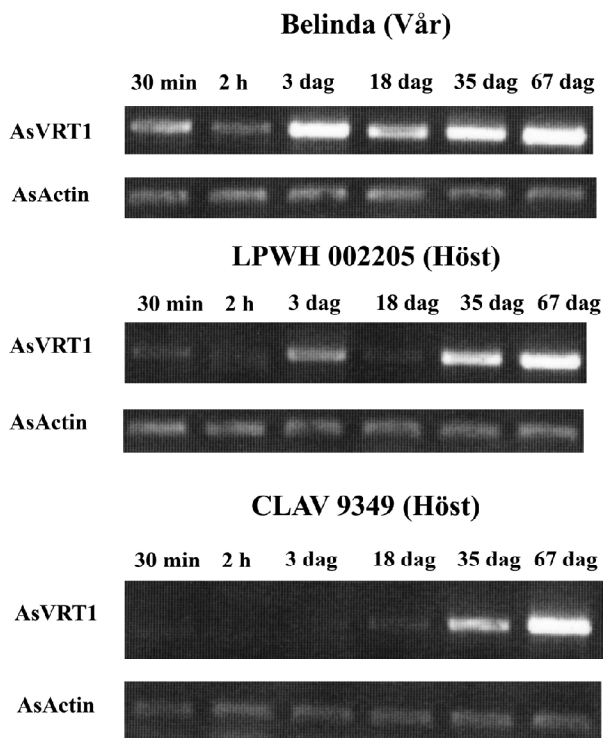
Med hjälp av dessa linjer och med stöd av liknande studier från höstvetete och höstkorn håller vi nu på att identifiera och karakterisera gener som är kraftigt upp- eller nedreglerade i höstlinjerna i jämförelse med vårhavren (Birgitta). Vår långsiktiga målsättning med detta är att identifiera mellan 50 och 100 gener som är differentiellt uttryckta i höst och vårsorter. Oligonukleotider från sådana gener kan då användas till att konstruera små så kallade mini-chips. Dessa i sin tur skulle kunna användas till att identifiera den variation inom köldacklimatisering som finns på molekylär nivå men som inte syns fenotypisk. Därmed skulle urvalet av vinterhårdiga sorter i fältvuxet material kunna effektiviseras.

Ett exempel på potentiella markörer som skulle kunna användas för att skilja ut vår och höstsorter är vernaliseringsgener som ingår i styrning av blomningstid. Från färsk data i vete har man visat att vårsorter inte har samma vernaliseringsbehov som höstsorter. Framför allt är det transkriptionsfaktorgener i MADS box familjen som känner av långvarig köldbekämpning och i sin tur inducerar blomningsgener vid rätt tillfälle. Viktiga vernaliseringsgener i vete är TaVRN-1 och TaVRN-2 (Danyluk et al., 2003). Båda dessa gener är differentiellt uttryckta i höstvetete jämfört med vårvetete (Kane et al, 2005).

Som en första test på detta koncept klonade och sekvenserade vi *VRN-1* genen från havre. Denna gen döptes till *AsVRN1*. Vi testade *AsVRN1* genens uttryck i Belinda samt i två av våra egna höstsorter med hjälp av semikvantitativ RT-PCR, där genspecifika primrar designade från havresekvenserna användes. Som framgår av Figur 1 har denna gen olika induktionskinetik i vår- och hösthavresorterna. Detta visar att de höstsorter vi tagit fram verkligen är molekylärt annorlunda i regleringen av vernaliseringen, d.v.s. att vår fenotypiska selektion fungerat så här långt. Det visar också att *AsVRN1* en analys av genuttrycket för liknande expressionsmarkörer skulle kunna utgöra ett mycket bra redskap för ett framtida, mer precist urval av segregerande köldhårdiga individer i en korsningspopulation.

**Figur 1.** RT-PCR analys av uttrycket av vernaliseringsgenen *AtVRT1* i en vårsort, Belinda och två höstsorter, LPWH002205 och CLAV9349 (se tabell 1). De olika sorterna odlades i 4 veckor i 18 timmars fotoperiod vid 22 °C. De flyttades därefter till +4°C, 18 timmars fotoperiod, och inkuberades i under varierande tider. Dessa är indikerade ovanför gelbilderna. Som kontroll på templat-RNA kvalitet och kvantitet användes havre aktin genen, *AsActin*, som är konstitutivt uttryckt under de aktuella experimentella förhållandena.





timmar mörker 20°C med en ljusintensitet av 175  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  under 4 veckor. En ljuskallus bildades då (figur 2). Denna kallus använde vi därefter som utgångspunkt för att regenerera hela plantor med mikrotillering.

## Regenerering och mikropropageringsystem

Vi har utvecklat ett regenererings och mikropropageringsystem för den mest vinterhårdiga havre linjen, Pa 7617-3460, dvs. den linje från vilken en plantan överlevde den stränga vintern 2002/2003. Detta protokoll utgår från frön som steriliseras och gros under sterila förhållanden i mörker. Mer specifikt, 25-50 sterila frön inkuberades några timmar i en 125 ml Erlenmeyer flaska med 50 ml sterilt avjoniserat vatten. De svällda fröna inkuberades därefter på fast MS medium under 3-, 6- eller 9-dagar i mörker. Ca 1-2 mm långa bitar skars därefter ut från övergångszonen mellan rot och blad i mesokotylen som då hade kommit upp och placerades på ett nytt MS medium med 2.0  $\mu\text{g/ml}$  av tillväxthormonerna naftalenättiksyra (NAA), 0.15  $\mu\text{g/ml}$  6-benzylaminopurine (BAP) och 0.15  $\mu\text{g/ml}$  kinetin. De inkuberades vid en temperatur av 22/18°C (dag/natt), en fotoperiod av 18 timmar ljus och 6



**Figur 2.** Isolering av mesokotyl/rot övergången och inducering av kallus från denna.

Mikrotillering är en mycket viktig metod om man vill massföra speciellt intressanta modifieringar av havre. Denna form av regenerering innebär också ett nedkortande av den tid som kulturerna befinner sig i kallasstadiet vilket är en fördel, eftersom risken för oönskade somatiska mutationer då minskas. Genom att modifiera MS-mediet och inkubera vidare under ytterligare ett par veckor under samma ljus och temperaturförhållanden kunde vi inducera mikrotillers från det kallus som härstammade från mesokotyl/rot övergången (Gharti-Chhetri and Olsson, 2006). Detta protokoll utarbetades både för den engelska vintersorter Gerald samt för den mest köldhårdiga Pa 7617-3460 linjen

## Publikationer, presentationer, posters och resultatförmedling till näringen

### Publikationer i internationella tidskrifter med vetenskapligt granskningssystem

Bräutigam, M., Lindlöf, A., Zakhrabekova, S., Olsson, B. and Olsson, O. 2005. Generation and analysis of 9792 EST

sequences from cold acclimated oat, *Avena sativa*. BMC Plant. Biol. 5:18

- Bräutigam, M., Chawade, A., Gharti-Chhetri, G., Lindlöf, A., Jonsson, A., Jonsson, B. and Olsson, O., 2006. Development of Swedish winter oat with gene technology and molecular breeding. Journal of Swedish Seed Association 1-2, 23-35.
- Lindlöf, A., Bräutigam, B., Chawade, A., Olsson, B. and Olsson, O. (2006). Identification of Cold-Induced Genes in Cereal Crops and *Arabidopsis* through Comparative Analysis of Multiple EST sets. BioInformat. Res. Develop.
- Chawade, A., Bräutigam, B., Lindlöf, A., Olsson, O. and Olsson, B. (2006). Novel cold acclimation pathways in *Arabidopsis thaliana* identified by a combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. (Submitted to BMC Genomics)
- Gharti-Chhetri, G. and Olsson, O. 2006. Establishment of a high efficient callus roliferation and plant regeneration system from different explants of seven commercial Swedish oats (*Avena sativa*.) cultivars. (Subm. Plant Sci.)

### **Posters visade vid internationella konferenser**

- Bräutigam, M., Lindlöf, A., Zakhrabekova, S., Olsson, B. and Olsson, O. Analysis of 9792 Expressed Sequence Tags in Cold Acclimated Oat. GCR meeting Temperature Stress in Plants, Ventura California 2003
- Bräutigam, M., Jonsson, A., Olsson, B. and Olsson, O. Development of an oat database. 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Bräutigam, M., Lindlöf, A., Zakhrabekova, S., Olsson, B. and Olsson, O. Analysis of 9896 Expressed Sequence Tags in Cold acclimated Oat, *Avena sativa*. 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Jonsson, R., Gharti-Chhetri, G., Bräutigam, M., Jonsson, A. and Olsson, O. Development of Scandinavian winter oat by molecular breeding and tissue culture techniques. 7<sup>th</sup> Int. Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Bräutigam, M., Gustavsson, Å., Zakhrabekova, S., Olsson, B and Olsson, O. Molecular characterization of *CBF* transcription factor genes in oat 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Gharti-Chhetri, G and Olsson, O (2004) Establishment of highly efficient callus proliferation, plant regeneration and micro-tillering systems in commercial oat cultivars. 7<sup>th</sup> Int. Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Bräutigam, M., Gharti-Chhetri, G., Gustavsson, Å., Jonsson, R., Olsson, B. and Olsson, O. Development of a Scandinavian winter oat by molecular breeding and transgenic techniques. GCR meeting Temperature Stress in Plants, Ventura California 2005
- Gokarna Gharti-Chhetri and Olof Olsson (2006) Establishment of highly efficient callus proliferation, plant regeneration and micro-tillering systems in commercial oat (*Avena sativa* L.) cultivars. Poster # P46038, Plant Biology 2006, Boston, USA

### **Presentationer med havreanknytning till akademi och näring**

- Olof Olsson. Havreforskning i Göteborg. Presentation för Svalöf Weibull AB i Göteborg, januari, 2002
- Olof Olsson. Olof Olsson. Oat research in my group. Seminarium på Botaniska Institutet, Göteborgs U, januari, 2003
- Olof Olsson. Towards the development of cold tolerant oat. Department of plant science, U. of Oxford. januari 2003
- Olof Olsson. Havreforskning i Göteborg. Möte med VL-stiftelsen i Marstrand, maj 2003
- Olof Olsson, Marcus Bräutigam, Gokarna Gharti-Chhetri, Rickard Jonsson and Björn Olsson. Towards the development of a Scandinavian winter oat. OatLink meeting, Aberysthwyth, June, 2003
- Olof Olsson, Marcus Bräutigam, Gokarna Gharti-Chhetri, Rickard Jonsson and Björn Olsson. Unravelling mechanism of abiotic stress in plants using functional genomics and oat as tools. Open day symposium för Nationella forskarskolan i Bioinformatik och Genomic, Skövde, september, 2003
- Olof Olsson. Developing oat to a healthy winter crop. 1st Swedish Plant Lipid meeting. Göteborg, October, 2003
- Olof Olsson, Marcus Bräutigam, Gokarna Gharti-Chhetri, Rickard Jonsson and Björn Olsson. Oat genomics and its application to breeding. EU-COST möte i Köpenhamn, maj 2004
- Marcus Bräutigam, Gokarna Gharti-Chhetri, Åsa Gustavsson, Rickard Jonsson, Björn Olsson and Olof Olsson. Development of a Scandinavian winter oat by molecular breeding and transgenic techniques. The 5th Workshop in the Nordic *Arabidopsis* Network, Danmark 2005.
- Olof Olsson. Genteknik och dess möjligheter i havreförädlingen. Möte med AnalyCen, Göteborg, januari 2006
- Olof Olsson. Genernas kraft – gränslösa möjligheter med molekylärbiologi. **Växtodlings- och växtskyddskonferensen i Uddevalla, januari 2006**
- Olof Olsson. Framtidens havre – med och utan GMO. **Bildandet av "Svensk havreförening"**. Landskrona, aug 2006