

Etablering av mutationspopulationer i raps och fältkrassing

LI-HUA ZHU¹, SHAKIL SHAHRIAR², ELISABETH GUNNARSSON³, JOHANNA FONSKOV³, OLOF OLSSON² OCH ALF CEPLITIS²

DETTA PROJEKT ÄR ETT SAMARBETE MELLAN INST. FÖR VÄXTFÖRÄDLING, SLU¹, CROPTAILOR AB² OCH LANTMÄNNEN³.

Oljeväxter – en viktig källa av värdefulla oljor och proteiner

Vegetabiliska oljor är miljövänliga och förnybara oljor som idag används för livsmedel, biodiesel och råmaterial i kemiindustrin. Med tanke på klimatförändring, minskning av fossiloljeresurser, minskande åkerarealer och den globala befolkningsökningen kommer mer växtbaserade oljor i framtiden att behöva produceras. Dessutom förväntas den globala efterfrågan av protein fördubblas till 2050. Växtbaserade proteiner har stora fördelar jämfört med animaliska proteiner när det gäller hållbar produktion, detta eftersom det krävs mindre vatten, mark och energi för dess produktion. Detta innebär i slutändan mindre miljöbelastning och sänkta kostnader för livsmedelsproduktionen. Dessutom har det visat sig att en minskning av animaliska proteiner i vår kost minskar risken för cancer och hjärt- och kärlsjukdomar. Växtbaserade proteiner för livsmedelsbruk och djurfoder kommer därför att spela en allt viktigare roll på en globalt växande proteinmarknad.

Raps och fältkrassing – en redan viktig samt en ny oljeväxt i Sverige

Oljeväxter producerar huvudsakligen oljor, men i *Brassica* arter innehåller även frökakan höga halter av protein. Förbättring av befintliga oljegrödor och utveckling av nya oljeväxter är därför oerhört viktigt för att främja en hållbar växtoljaproduktion och för att erbjuda en extra och högvärdig proteinkälla för foder och livsmedel. Raps är en viktig kommersiell oljegröda i Sverige. Dock odlas raps huvudsakligen i södra Sverige på grund av kravet på vinterhärdighet norr om Mälardalen. Fältkrassing är en oljeväxt som är under domesticering för att

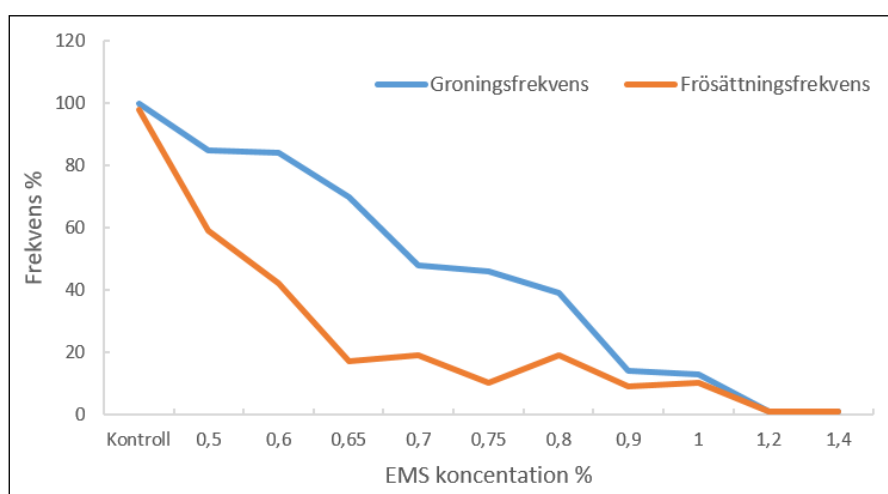


Fig. 1. Gronings- och frösättningsfrekvens av M1 (mutation 1) raps som behandlats med olika koncentrationer (0.5-1.4%) av EMS. kontroll = icke EMS behandlad.

på sikt kunna utvecklas till en ny olje- och mellangröda. Den är vinterhärdig och har hög fröavkastning. Både raps och fältkrassing innehåller höga proteinhalter av god kvalitet, lik sojaprotein. Mängden av protein som produceras i rapskakan per år i Sverige räcker för att täcka ca 50% av det mänskliga proteinbehovet i hela landet. Dock används rapskakan idag endast som foder, huvudsakligen för kor med ett längre pris än sojamejöl på grund av höga halter av antinutrientier (antinäringsämnen). Som en oljegröda under domesticering har fältkrassing också höga antinutrientier i fröna. Dessa antinutrientier bidrar till en bitter smak, dålig smaklighet, låg biotillgänglighet av aminosyror och viktiga mineraler samt miljöförorening. Därför skulle minskning av sådana antinutrientier i frökakorna av båda växtslag ge ett högvärdigt kraftfoder och möjliggöra användning av fröprotein i livsmedel.

Genetisk variation – en solid grund för effektiv växtförädling

Genetisk variation är avgörande för att öka förädlingseffektiviteten, men den är begränsad i odlade sorter, naturliga populationer eller förädlingsmaterial i raps och fältkrassing. Ett sätt att bredda den genetiska variationen är att inducera mutationer genom en fysisk eller kemisk behandling av växtmaterial, som slumpmässigt inducerar förändring i DNA-sekvenser av växtgenomet, vilket i sin tur leder till förändringar i växtens egenskaper. På så vis kan man etablera mutationspopulationer som innehåller så många mutationer att sannolikheten att någon linje i populationen har blivit muterad i någon av de önskade egenskaperna är mycket stor. Dessa mutationspopulationer kan således användas till att selektera ut önskade egenskaper, bl. a. antinutrientier i pågående och framtida forskningsprogram.

Kemiskt inducerade mutagenesis

Det kemiska ämnet EMS (ethyl methane-sulfonate) användes för att behandla fröna för att inducera genetiska mutationer i raps och fältkrassing i detta projekt (PA1264). Fördelen med EMS är att det huvudsakligen inducerar enkla basparsmutationer i DNA-sekvenser av växtgenomet. Processen omfattar flera olika steg så som optimering av EMS-koncentrationer så att ett önskat antal mutationer induceras per genom, etablering av mutationspopulation genom självkorsning i flera led, en fenotypisk och/eller genetisk screening av mutationspopulationen samt uppförökning och utvärdering av individuella linjer från populationen som identifierats på grund av deras speciella egenskaper.

Som utgångspunkt för mutagenesen är det viktigt att välja en sort som är så bra som möjligt vad gäller både agronomiska och övriga kvalitetsegenskaper, så att mutationspopulationerna redan från början har så goda egenskaper som möjligt, detta för att underlätta vidareförädlingsprocessen av valda linjer. I detta projekt, valdes sorten 'Fergus' som startmaterial för raps och sorten har goda egenskaper såsom hög avkastning, och hög olje- och proteinhalter, medan för fältkrassing användes en genotyp från våra tidigare forskningsaktiviteter.

EMS inducerade mutationer

Från det inledande experimentet för raps med olika EMS koncentrationer visade koncentrationer 0.7-0.8% en groningsfrekvens på ca 40 %, som tolkas som en lämplig EMS koncentration för behandling (Fig. 1). En oförändrad eller hög groningsfrekvens innebär en låg mutationsfrekvens i genomet, medan lägre groningsfrekvenser medför allt högre mutationsfrekvenser. Förutom direkt toxiska effekter av EMS behandlingen påverkas även tillväxt och utveckling av växten negativt av en hög mutationsfrekvens. Det gäller således att hitta en nivå som kompromissar mellan dessa ytterligheter. Vidare tester bekräftade att EMS 0.8% var optimalt vad gäller groningsfrekvens (40%) och denna koncentration användes därför för att producera den stora EMS mutationspopulationen i raps. Mutationslinjer uppförökades till M2 (mutation i generation 2) och M3 generation via självkorsning och M3 generationslinjer bedöms att vara användbara för förädlingsändamål i raps. Från fyra experi-



Fig. 2. M3 plantor av raps som växte i växthus, som visade tidig blomning i enstaka fall

ment har en stor mutationspopulation med över 2500 plantor i M2 eller M3 (Fig. 2) tagits fram för raps.

För fältkrassing resulterade EMS 0.9% behandlingen i en groningsfrekvens på ca 60% från det indelande experimentet som omfattade EMS koncentrationer mellan 0.5-1% (Fig. 3), men det medförde en dålig blomning och frösättning i nästa generation (M2). Därför sänktes EMS-koncentrationer till 0.6 och 0.7% i vidare tester, som resulterade i en groningsfrekvens på ca 50%. Eftersom fältkrassing kräver en köldbekämpning på minst 2 månader för blomning hade vi av praktiska skäl kunna endast uppföröka mutationslinjer till M2. Av någon oklar anledning var blomning och fruktsättning tyvärr det största problemet i M1 och M2, som förhindrat ökningen av mutationspopulationens storleken. Vi fick därför en mycket mindre mutationspopulation med ca. 300 plantor i M2 för fältkrassing. För att öka sannolikheten att identifiera önskade genetiska mutationer behöver dock en större population etableras.



Fig. 3. M1 plantor av fältkrassing som behandlats med olika koncentrationer av EMS. Från vänster till höger: Kontroll (ej EMS behandlade), 0.5% EMS, 0.9% EMS och 1.4% EMS.

Fenotypisk utvärdering av mutationslinjer

Morfologiska data som bladfärg och -form, plantsstorlek och blomningstid visade olika grader av gulaktig färg i ett flertal fall i raps (Fig. 4 vänster) och fältkrassing (Fig. 5 vänster), och tidig blomning i enstaka fall i raps (Fig. 4 höger) och tidig blomning i enstaka fall i fältkrassing observerades en tydlig ökad planthöjd i enstaka fall (Fig. 5 höger). Dessa fenotypiska observationer tyder på att EMS har lyckats inducera genetiska mutationer i både raps och fältkrassing. Vissa av dessa förändrade fenotyper t.ex. tidig blomning är önskvärda egenskaper. Tidig blomning kan förkorta produktionsstider för våraps.

Biokemiska och molekylära analyser av mutationslinjer

Protein-, olje- och glukosinolathalter av mutationspopulationen av raps analyserades med NIRS (Near-infrared spectroscopy) Resultaten visade variationer i halt av dessa ämnen i flera linjer (Fig. 6-8) i M2 och M3 generationer. För att



Fig. 4. Ändring i bladfärg (vänster) och av tidig begynnande knoppsättning (höger) av raps M2 plantor, som växte i växthus.



Fig. 5. Ändring i bladfärg (vänster) av M1 plantor och tydligt ökad plantsstorlek (höger) av fältkrassing i enstaka fall, som växte i växthus.

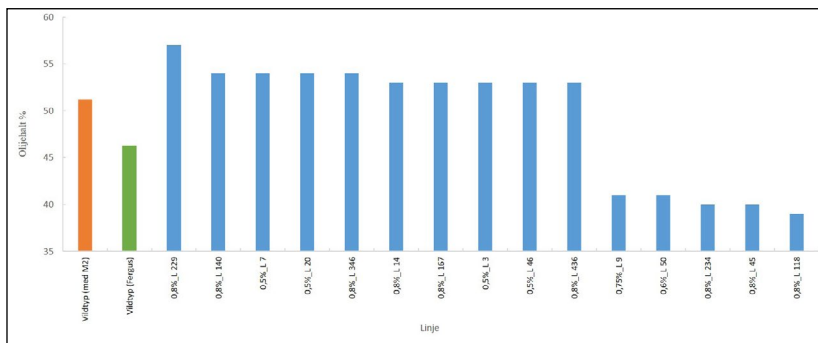


Fig. 6. Oljehalt i fröerna av utvalda linjer i M2 population av raps. Vildtyp med M2: vildtyp som förökades tillsammans med M2 populationen i växthus.

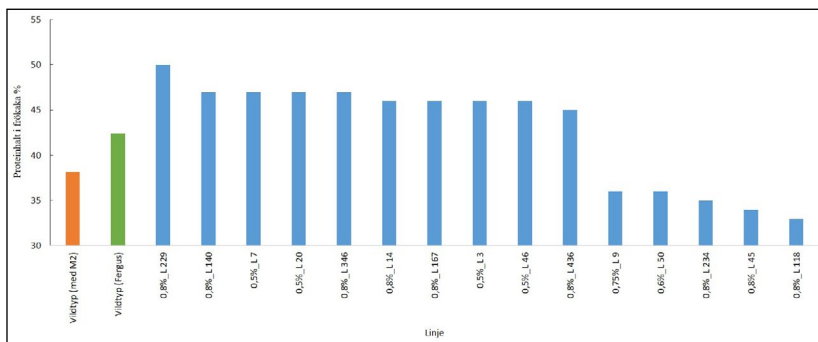


Fig. 7. Proteinhalt i fröerna av utvalda linjer i M2 population av raps. Vildtyp med M2: vildtyp som förökades tillsammans med M2 populationen i växthus.

utvärdera mutationsfrekvensen utfördes också genomsekvensering med 2 M2 linjer som behandlades med 0.8% EMS tillsammans med ursprungsorten innan mutagenes och resultaten visade att de EMS behandlade fröna hade ca. 14.000 – 15.000 unika punktmutationer (ändring i DNA baspar).

Vad som ska göras i fortsättning

Vi kommer att fortsätta vårt arbete med dessa värdefulla mutationsmaterial. När det gäller raps har vi en del M3 mutationslinjer som nu odlas i växthus. Vi kommer att fortsätta utföra fenotypiska och kemiska analyser och planera för genomsekvensering av vissa linjer med finansiellt stöd från TC4F (Trees and Crops for the Future) och Carl Tryggers Stiftelse. Vi kommer att söka mer medel för att kunna utföra helgenomsekvensering på ett större antal mutationslinjer. Sådana sekvenseringsdata kommer att vara en värdefull biobank för växtförädling i raps. De bekräftade önskade egenskaperna kan sen korsas in i elitsorter för att utveckla nya sorter med de önskade egenskaperna. När det gäller fältkrassing behöver alla mutationslinjer uppföras till M3 generation i kombination med fenotypiska, kemiska och genetiska analyser. Dessutom behöver en större mutationspopulation etableras för att skaffa mer genetisk variation för växtförädling av fältkrassing.

Slutsatser: Olika EMS koncentrationer har testats och EMS behandlingsdoseringen har optimerats för att både få en bra mutationsfrekvens och plantor med god vigör där befintliga och värdefulla egenskaper inte har påverkats negativt. Lämpliga EMS koncentrationer har tagits fram för raps och fältkrassing. Sekvenseringsresultaten har visat att det finns en bra mutationsfrekvens i raps vid 0.8% EMS behandlingen. En stor mutationspopulation av raps i M2 och M3 och en mindre mutationspopulation av fältkrassing i M2 har etablerats. Både fenotypiska och kemiska analyser på M2 och M3 mutationsgenerationer av raps har visat variationer i viktiga egenskaper så som olje-, protein- och glukosinolathalter. Dessa två mutationsmaterial kommer att vara en viktig källa av nya genetiska resurser för vidareförädling av raps och fältkrassing. Mer insatser behövs för att etablera en större mutationspopulation för fältkrassing.

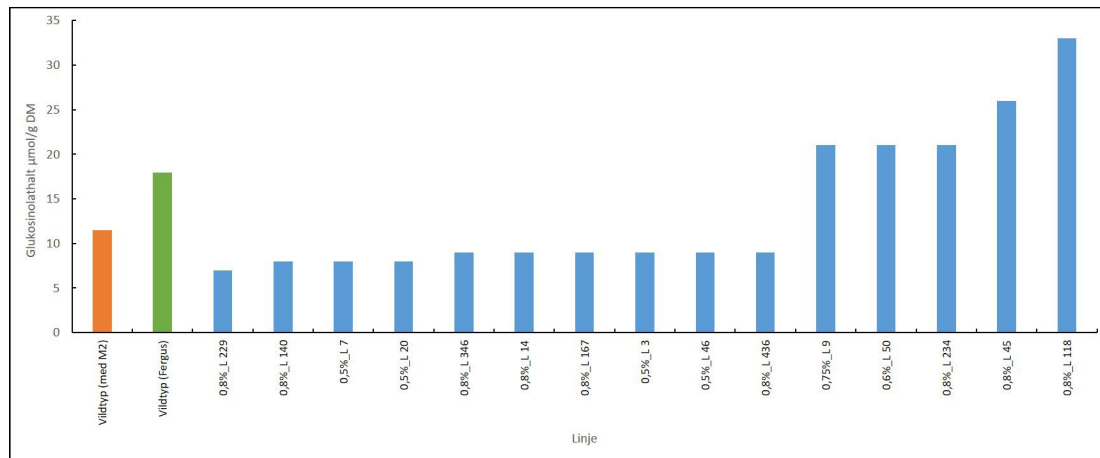


Fig. 8. Glukosinolathalt i fröerna av utvalda linjer i M2 population. Vildtyp med M2: vildtyp som förökades tillsammans med M2 populationen i växthus

- Faktabladet är utarbetat vid Institutionen för Växtförädling vid LTV-fakulteten
- Projektet är finansierat av CropTailor AB, Lantmännen och Partnerskap Alnarp
- Projektansvarig: Li-Hua Zhu, Li-Hua.Zhu@slu.se