



*EMS-inducerade mutationspopulationen av raps (vänster) och fältkrassing (höger)*

**Projekttitel:** Etablering av mutationspopulationer i raps och fältkrassing

**SLU Partnerskap Alnarps projekt nr:** 1264 (1401)

**Projekttitel på svenska enligt projektansökan:** Etablering av mutationspopulationer i raps och fältkrassing

**Projekttitel på engelska enligt projektansökan:** Establishment of mutation populations in rapeseed and field cress

**Projekttledare:** Li-Hua Zhu

**Författare till rapporten:** Li-Hua Zhu<sup>1</sup>, Shakil Shahriar<sup>2</sup>, Elisabeth Gunnarsson<sup>3</sup>, Johanna Fonskov<sup>3</sup>, Olof Olsson<sup>2</sup>, Alf Ceplitis<sup>2</sup>

**Fakultet:** LTV

**Institution:** Växtförädling<sup>1</sup>

**Projekttid:** 2020-2023

**Projektpartners:** CropTailor AB<sup>2</sup> och Lantmännen<sup>3</sup>

## Projektsammanfattning

Oljeväxter som raps producerar värdefulla oljor som kan användas för livsmedel, biodiesel och industriella råvaror. Vidare innehåller även frökakorna av dessa oljeväxter höga halter av protein av god kvalitet, som skulle kunna utgöra en viktig proteinkälla för högvärdigt kraftfoder och livsmedel. Dock används idag rapskakan huvudsakligen för kofoder på grund av höga halter av antinutrient, som bidrar till en besk smak, dålig smaklighet och kan vara giftiga i höga halter. Projektets syfte var att etablera mutationspopulationer i raps och fältkrassing för att öka den genetiska variationen i viktiga egenskaper såsom frökakans kvalitet, avkastning och ökad motståndskraft mot biotiska och abiotiska påfrestningar. Dessa mutationspopulationer kommer att utgöra värdefulla genetiska källor för nya sorter, eller som utgångspunkt för vidareförädling i forsknings- eller förädlingsprogram. I projektet användes det kemiska ämnet EMS för att inducera genetiska mutationer i raps och fältkrassing. Resultaten visade att 0.8% vara en lämplig koncentration för raps med en gröningsfrekvens på ca. 40% och en bra mutationsfrekvens, medan EMS koncentrationer mellan 0.6% - 0.7% fungerade bra för fältkrassing med ca. 50% gröningsfrekvens. En stor mutationspopulation av raps och en mindre mutationspopulation av fältkrassing har etablerats. Fenotypiska observationer har visat ändringar i blomningstid och frösättning i raps och fältkrassing. Kemiska analyser har visat en stor variation i protein-, olje- och glukosinolathalter av mutationslinjer av raps. I fortsättningen kommer vi att analysera en del av mutationslinjer av raps genom antingen amplicon- eller helgenomsekvensering för att koppla genetiska mutationer till önskade egenskaper. Dessa mutationspopulationer kommer sedan att vara värdefulla mutationskällor för vidareförädling av diverse viktiga egenskaper i raps respektive fältkrassing.

## Abstract

Oilseed crops such as rapeseed produce valuable oils that can be used for food, biodiesel and industrial feedstock. Furthermore, the seed cake of these oil crops contains high levels of proteins of high quality, which could be an important source of protein for high value feed and food. However, today rapeseed cake is mainly used only for cow feed due to high levels of antinutrients, which give a bitter flavor and are even toxic in some cases. In this project, we aimed at establishing mutant populations in rapeseed and field cress to increase genetic variation in important traits such as seedcake quality, yield and increased tolerance to biotic and abiotic stresses. These populations would provide valuable sources for new varieties, or as new plant materials for further breeding in ongoing and future breeding programs. In this project, the chemical substance EMS was used to induce mutation in the plant genome. EMS is a substance that affects DNA base pairing and leads to randomly induced single base pair mutations in the plant genome. Among all tested concentrations of EMS, 0.8% has been found to be the appropriate concentration for seed treatment for rapeseed, which gave both a good germination rate and a mutation rate. For field cress, it appears that EMS concentrations between 0.6% - 0.7% allowed approx. a 50% germination rate. A large mutant population of over 2500 individuals of rapeseed and a much smaller mutant population of field cress have been established. Phenotypic observations have shown variation in flowering time and seed setting in some cases in both rapeseed and field cress. The chemical analyses have shown a large variation in protein, oil and glucosinolate levels among individuals in different generations of rapeseed. The mutant populations will be evaluated both phenotypically and molecularly by amplicon or DNA

sequencing, which will be beyond the scope of this project. The developed mutant populations can then be used for further breeding of various important traits of rapeseed or field cress.

## Bakgrund

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 samt hjärta- och kärlsjukdomar. Växtbaserade proteiner för livsmedelsbruk och djurfoder kommer därför att spela en allt viktigare roll på en globalt växande proteinmarknad.

Oljegrödor 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 (*Brassica napus*) och fältkrassing (*Lepidium campestre*) är två oljegrödor som vi har arbetat med under de senaste åren. Raps är en viktig oljegröda i kommersiell produktion i Sverige, men den odlas huvudsakligen i södra Sverige på grund av kravet på vinterhärdighet norr om Mälardalen. Fältkrassing är en vild växt som är under domesticering (Merker et al. 1995; Iverson et al, 2016; Geleta et al. 2020; Hammenhag et al. 2020; Sandgrind et al, 2022) för att på sikt kunna utvecklas till en ny olje- och mellangröda. Den har högre avkastningspotential än raps i Norra Sverige och har visat sig vara en lämplig mellangröda för vete och korn (Merker et al. 1995, 2010). Fältkrassing har bra vinterhärdighet och våra fältförsök har visat att den övervintrade nästan 100% så långt norrut som i Umeå, medan raps nästan inte överlevde alls (ej publicerad data från Mistra Biotech programmet). Båda oljegrödorna innehåller höga proteinhalter av god kvalitet i frökakan, 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. Priset är lägre än för sojamjöl på grund av höga halter av antinutrientier (antinäringsämnen). Som en oljegröda under domesticering har fältkrassing också höga antinutrienthalter 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. Ett av

våra forskningsändamål är därför att minska halter av antinutienter med hjälp av bl. a. molekylära markörer.

Genetisk variation är avgörande för att öka förädlings effektiviteten, 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 att behandla växtmaterial med det kemiska ämnet EMS (ethyl methanesulfonate), som slumpmässigt inducerar förändring i DNA-sekvenser av växtgenomet, vilket i sin tur leder till förändringar i växtens egenskaper (Unan et al. 2021). Fördelen med EMS är att det inducerar huvudsakligen enkla basparsmutationer i DNA-sekvenser i växtgenomet. 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. antinutienter i pågående och framtida forskningsprogram.

## Syfte

I detta projekt var syftet att etablera mutationspopulationer i raps och fältkrassing för att öka den genetiska variationen i viktiga egenskaper såsom t.ex. kvalitet på frökakan, avkastning och ökad motståndskraft mot biotisk och abiotisk stress. Dessa populationer kommer att utgöra värdefulla källor av genetiska mutationer för nya sorter, eller som utgångspunkt för vidareförädling i pågående och framtida forsknings- eller förädlingsprogram.

## Metod

### *Växtmaterial*

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. För raps valde vi sorten 'Fergus' som startmaterial, medan för fältkrassing använde vi en genotyp som vi känner väl till från våra tidigare forskningsaktiviteter.

### *EMS behandling*

EMS inducerade mutationsprocessen omfattar flera olika steg såsom 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.

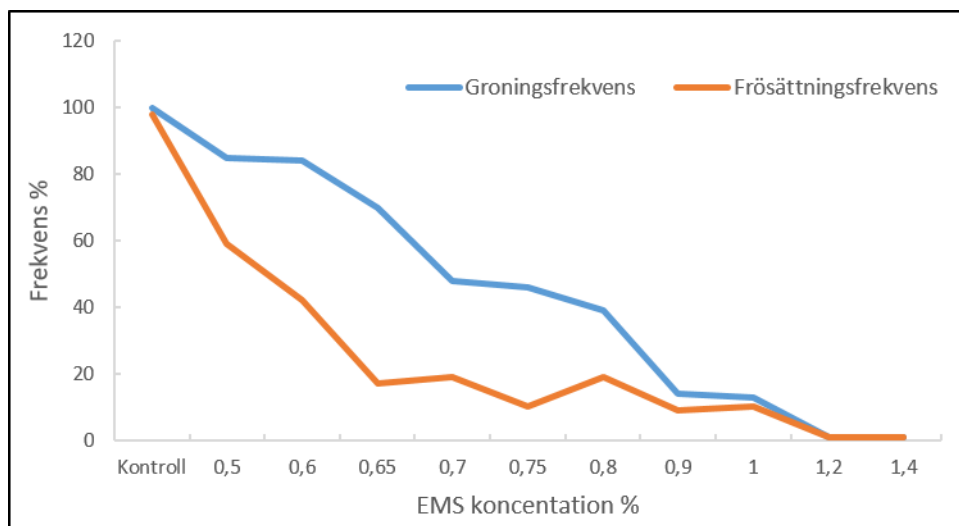
För att ta fram en lämplig EMS-koncentration för behandlingen av raps- respektive fältkrassingsfröna utfördes fyra experiment med olika EMS koncentrationer var för sig. Ett inledande EMS titreringsexperiment med EMS koncentrationer mellan 0.5-1.4 % utfördes med 100 fröer per behandling för raps respektive fältkrassing. Baserat på resultaten av detta experiment utfördes vidare ett par experiment för raps respektive fältkrassing och den detaljerade informationen om dessa experiment presenteras i samband med presentation av resultaten i den resultat- och diskussionsdelen nedan.

## Resultat och diskussion

### *Generation av mutationspopulation av raps*

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 behandlingen (**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, som inkluderade EMS koncentrationer mellan 0.6-0.8 % respektive 0.8-1.2%, 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 från experiment 1-3 uppförökades till M3 (mutation i generation 2). Alla mutationslinjer från den stora populationen uppförökades till M2 och 185 linjer av denna M3 generation växer nu i växthus tillsammans med 15 kontroller av sorten 'Fergus' (ej EMS behandlade). M3 generationslinjer bedöms vara användbara för förädlingsändamål i raps. Från alla fyra experiment har en stor mutationspopulation med över 2500 plantor i M2 eller M3 (**Fig. 2**) tagits fram för raps.



**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.





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



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

### ***Generation av mutationspopulation av fältkrassing***

För fältkrassing resulterade EMS 0.9% behandlingen i en groningsfrekvens på ca 60% från det inledande experimentet (**Fig. 3**), men det medförde en dålig blomning och fruktsättning i nästa generation. 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 köldbehandling på minst 2 månader för blomning kunde vi av praktiska skäl 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 mutationspopulationsstorleken. Vi fick därför en mycket mindre mutationspopulation med ca.300 plantor i M2 för fältkrassing. För att öka sannolikheten att identifiera önskade genetiska mutationer behövs dock en större population etableras.

### *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**) och fältkrassing (**Fig. 5**), och tidig blomning i enstaka fall i raps (**Fig. 4**). I fall av fältkrassing observerades en tydligt ökad planthöjd i ett enstaka fall (**Fig. 5**). 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 önskvärde egenskaper. Tidig blomning kan förkorta produktionstider för vårraps.



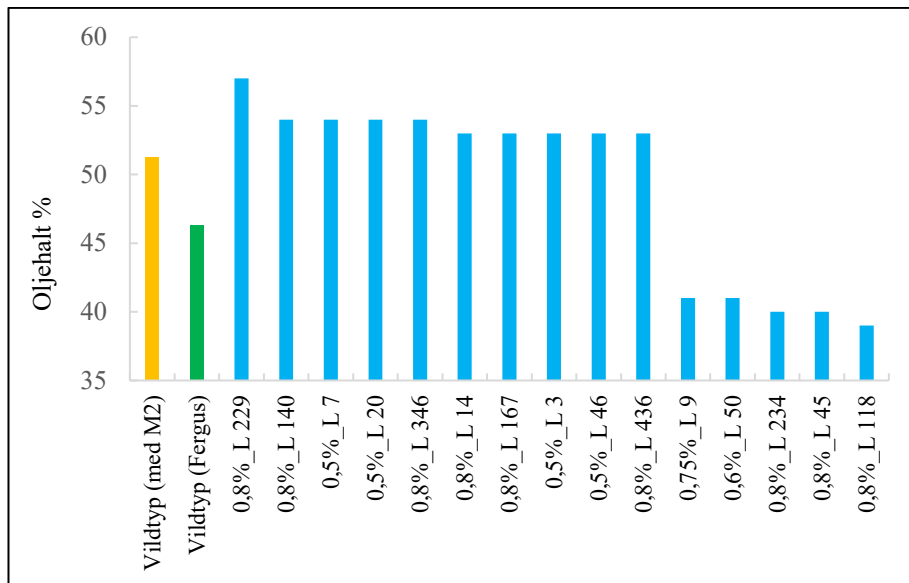
**Fig.4.** Ändring i bladfärg (vänster) och av tidig begynnande knoppsättning (höger) av raps M2 plantor, som växte i växthus.



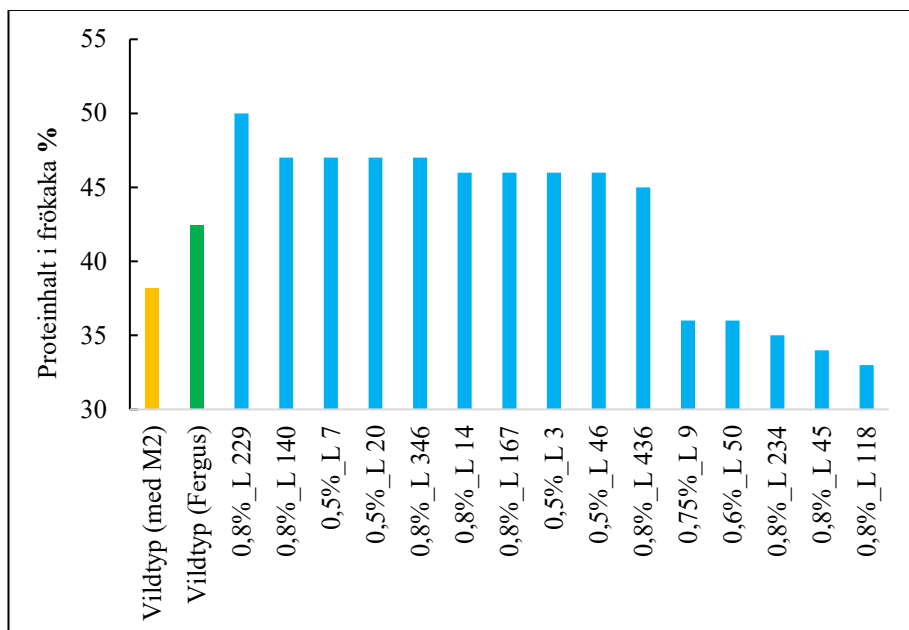
**Fig. 5.** Ändring i bladfärg (vänster) av M1 plantor och tydligt ökad plantsstorlek (höger) av fältkrassing i enstaka fall, som växte i växthus

### *Biokemiska och molekylär analyser av mutationslinjer*

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

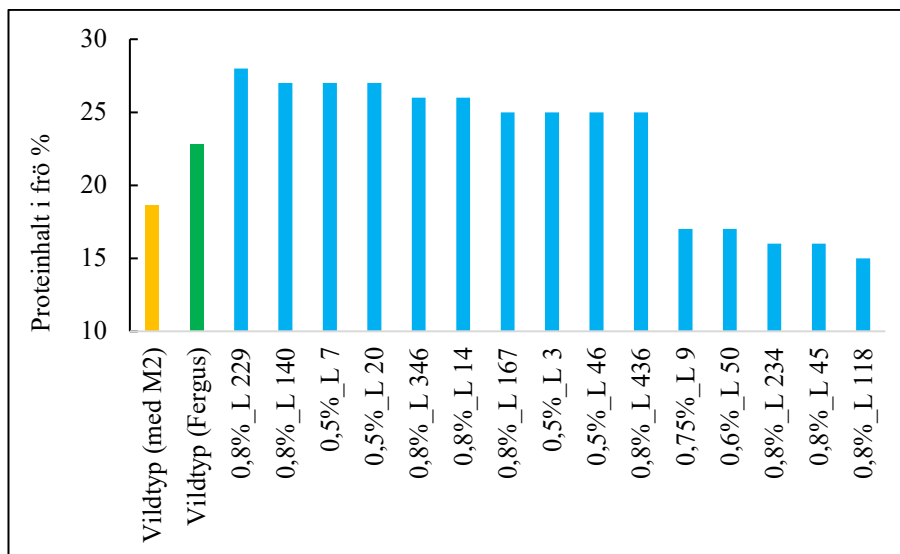


**Fig. 6.** Oljehalt i fröerna av utvalda linjer i M2 population av raps. Vildtyp med M2: vildtyp som förökades tillsammans med M2 populationen i växthus.



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





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

### *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 fortsätta utföra fenotypiska och kemiska analyser och planera för genomsekvensering av vissa linjer med finansiellt stöd från TC4F (Trees and Crops for the Future) etc. 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 behandling. 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-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 önskade egenskaper för vidareförädling av raps och fältkrassing. Mer insatser behövs för att etablera en större mutationspopulation för fältkrassing.

## Referenser

- Merker A et al. 1995. Swedish J Agric Res 25:173–178.
- Ivarson et al. 2016. Plant Cell Reports 35:2055-63.
- Geleta et al. 2020. Plant Sci. 11:448.
- Hammenhag et al. 2020. Gene 11, 1223.
- Sandgrind et al. 2022. Frontiers in Plant Science.
- Iverson et al., 2023. Int. J. Mol. Sci.
- Unan et al. 2021. Open Res. Europé 1, 19.