



## Projekttitel

### **Växtförädling för ökad fröavkastning hos rödklöver**

SLU Partnerskap Alnarps projekt nr: PA 1373 och 1525

Projekttitel på svenska enligt projektansökan: Växtförädling för ökad fröavkastning hos rödklöver

Projekttitel på engelska enligt projektansökan: Plant Breeding for Increased Seed Production in Red Clover

Projektledare: Åsa Lankinen

Författare till rapporten: Åsa Lankinen och Mattias Larsson

Fakultet: LTV-fakulteten

Institution: Växtskyddsbiologi

Projekttid: 2201-2512

Projektpartners: Lantmännen Lantbruk, Sveriges Frö och Oljeväxtodlare, SFO

## Projektsammanfattning

För att uppnå målet med Sveriges livsmedelsstrategi, att skapa tillväxt av bioråvaror på ett hållbart sätt, är det viktigt att trygga alla delar av livsmedelskedjan. Det övergripande syftet med projektet är att bidra till att effektivisera växtförädlingen för avkastning av frö hos rödklöver, en viktig proteingröda i Sverige. En utmaning inom rödklöverförädlingen är att avkastningen varierar extremt mycket. Hos rödklöver styrs fröavkastningen av många faktorer, bla tillgång på pollinatörer, odlingstekniska faktorer och sortskillnader (tex ploidigrad). Projektets mål är att hitta stabila kopplingar mellan fröavkastning och genomikdata som kan användas i framtida förädlingsprogram baserat på genomisk selektion. Projektet är en del av ett större SLU Grogrund projekt (2021-2026). Genom storskaliga fältförsök utförda på tre platser (Skåne, Östergötland, Uppland) under två år har vi samlat in data på fröavkastning och blomningsgrad från 222 diploida och 134 tetraploida sorter. Vi har också samlat in sortdata från mindre fältförsök, bla doftdata från blomhuvuden. Sort har en påverkan på fröavkastningen, vilket är lovande för pågående genetiska associationsstudier med målet att hitta genetiska markörer. Data på blomningsgrad, vilka har samlats in med hjälp av drönarflygningar och bildanalys, verkar korrelera med manuella mätningar, men vi behöver kvalitetssäkra analysmetoden innan dessa data kan användas. Doftdata visar att specifika dofter är kopplade till blomhuvuderna och att dessa dofter stängs ner efter pollinering. Vi kan endast hitta små skillnader i doftmängd och sammansättning mellan de fem undersökta sorterna, vilket kan tyda på att doft är en stabil egenskap innan nedstängning. Under det övergripande projektets slutskede (2026) kommer arbetet att koncentreras kring att länka de insamlade fenotypiska data med genetiska faktorer. Kunskap om genetiska markörer som är länkade med fröavkastning kommer att vara viktig för att växtförädlingen ska kunna ta fram sorter med stabil och hög fröproduktion, vilket i förlängningen gynnar både fröproducenter och vallodlingen.

## Abstract

To achieve the goal of Sweden's food strategy, to create growth of bio-raw materials in a sustainable way, it is important to secure all parts of the food chain. The overall aim of the project is to contribute to making plant breeding more efficient for seed yield in red clover, an important protein crop in Sweden. A challenge in red clover seed cultivation is that the yield varies extremely. In red clover, seed yield is controlled by many factors, including the availability of pollinators, cultivation technical factors and cultivar differences (e.g. ploidy degree). The goal of the project is to find stable connections between seed yield and genomic data that can be used in future breeding programs based on genomic selection. The project is part of a larger SLU Grogrund project (2021-2026). Through large-scale field trials conducted at three locations (Skåne, Östergötland, Uppland) over two years, we have collected data on seed yield and flowering frequency from 220 diploid and 132 tetraploid varieties. We have also collected varietal data from smaller field trials, including floral scent data from flower heads. Variety has an impact on seed yield, which is promising for ongoing genetic association studies with the goal of finding genetic markers. Data on flowering frequency, which have been collected using drone flights and image analysis, appear to correlate with manual measurements, but we need to quality-assure the analysis method before these data can be used. Floral scent data show that specific scents are linked to the flower heads and that these scents are shut down after pollination. We can only find small differences in scent amount and composition

between the five varieties investigated, which may indicate that scent is a stable trait before shutdown. During the final phase of the overall project (2026), work will focus on linking the collected phenotypic data with genetic factors. Knowledge of genetic markers linked to seed yield will be important for plant breeding to be able to produce varieties with stable and high seed production, which will ultimately benefit both seed producers and cultivation of forage.

## Bakgrund

Vall- och grönfoderväxter är Sveriges största gröda och odlas på 1,1 miljoner hektar åkermark. En väl fungerande grovfoderproduktion i Sverige, med tillgång till lämpliga sorter för både södra och norra Sverige, är av största vikt för svenska gårdars lönsamhet. En viktig beståndsdel i vallens proteinproduktion är de kvävefixerande vallbaljväxterna (Boller m fl. 2010), där rödklöver (Fig. 1) är mest använd i Sverige. I Lantmännens förädling av rödklöver ingår fem högt prioriterade egenskaper: avkastning av grönmassa, uthållighet, resistensegenskaper, foderkvalitet samt fröavkastning.

Rödklöverfröavkastningen varierar extremt mycket mellan olika gårdar och år, vilket kan leda till brister i tillgång på utsäde generellt eller av enskilda sort av rödklöver. Orsaken till variationen är inte helt säkerställd, men kan vara kopplad till flera faktorer, tex odlingstekniska, sortbundna/genetiska (tex ploidigrad), fertilitet eller andra såsom pollinatörstjänster (Boller m fl. 2010; Bommarco m fl. 2012; Vleugels m fl. 2019). Studier som har kartlagt olika egenskapers betydelse för fröskörden hos både diploida och tetraploida sorter pekar mot att viktiga egenskaper är antalet blomhuvuden per planta och antal frön per blomhuvud (Vleugels m fl. 2016, 2019; Hederström m fl. 2021). För att få en bättre förståelse för kopplingen mellan olika egenskaper och fröskörd är det viktigt att kartlägga genetiska skillnader i fröskörd mellan olika sorter samt koppla dessa till fenotypiska sortskillnader under realistiska fältförhållanden. Idag har relativt få studier undersökt hur genetiska faktorer är länkade till fröskörd (se tex Kovi m fl. 2017). Sådana data är mycket viktiga för att kunna utveckla effektiva selektionsmetoder som kan användas i växtförädlingen och som är baserade på genetisk bakgrund, tex med hjälp av genomisk selektion. Denna typ av studier bör också ta ett helhetsgrepp så att genetiska faktorer inte bara kopplas till fröskörd utan också till de andra viktiga egenskaperna som rör grönmassa mm, eftersom det är möjligt att det kan finnas avvägningar mellan olika typer av egenskaper.

Genomisk selektion är en viktig metod för att förbättra egenskaper som styrs av många gener, tex fröavkastning, vilka är svårare att förbättra med hjälp av konventionell förädling. Till skillnad från flera andra grödor, där ökad fröavkastning är primär, har förädlingen av vallväxter som mål att samtidigt öka både fröavkastning och avkastning av grönmassa. Med genomisk selektion förväntas urvalet av de två egenskaperna effektiviseras då det kan ske tidigare i förädlingsprocessen och simultant.



Fig. 1. Blommande rödklöver.

## Syfte

I detta projekt är vårt mål att effektivisera växtförädlingen för avkastning av frö hos rödklöver, genom att hitta stabila kopplingar mellan fröavkastning och genomikdata som kan användas i framtida förädlingsprogram baserat på genomisk selektion. Projektet finansieras även av SLU Grogrund (2021-2016). Vi har också ett nära samarbete med SLU Grogrundprojektet, "Genomisk selektion i rödklöver (*Trifolium pratense* L.)", där man har studerat fyra av fem viktiga egenskaper: avkastning av grönmassa, resistensegenskaper, uthållighet samt foderkvalitet. Vårt projekt kompletterar det andra projektet genom fokus på fröavkastningen, den femte viktiga egenskapen inom förädlingen. Detta kan även möjliggöra simultana studier av alla fem förädlingsmål.

## Metod

Projektet består av tre delprojekt (work packages, WPs). WP1: **fenotypning av fröavkastning i fältförsök** på tre platser i olika delar av Sverige under två år. Både diploida och tetraploida sorter utvärderas. WP2: **fenotypning på detaljnivå** i mindre skala (växthus/mindre fältförsök). Här koncentreras studierna på ett mindre antal sorter och mer komplexa egenskaper, vilka kopplas till genotyp på individnivå. WP3: **genetisk analys** inklusive genetiska associationsstudier (GWAS) för önskvärda egenskaper, identifiering av gener och genetiska markörer som kan nyttjas i de prediktionsmodeller som utvecklas i det angränsande projektet.

### *WP1: fenotypning av fröavkastning i fältförsök*

För att jämföra fröavkastning mellan olika sorter har vi etablerat fältförsök med 220 diploida och 132 tetraploida rödklöversorter på tre olika platser, i) Svalöv i Skåne, ii) Kölbäck i Östergötland och iii) Lövsta i Uppland). Dessa tre platser täcker in de delar av Sverige där klöverfröodlingen är vanligast. Fältförsöken har genomförts under två år (etablering 2022-2023, skörd 2023-2024). Vi har använt en standardmetod för fältförsök, en så kallad modified augmented design, där sorterna utvärderas i en parcell vardera och upprepningen utgörs av de olika platserna/åren. Designen använder också mätarsorter (två diploida respektive två tetraploida marknadssorter med kända fröodlingsegenskaper med flera upprepningar i varje försök), vilket möjliggör upptäckt av avvikelser i försöken.

De diploida och tetraploida sorterna har separerats helt från varandra i separata fältförsök, eftersom pollen från en annan ploidinivå kan leda till minskad fröproduktion. Urvalet av sorter har baserats på de redan genotypade sorterna i det angränsande projektet.

Fenotypning under utvärderingsåren (2023-2024) har fokuserat på mätning av blomgenskaper, dels manuellt och dels via drönare och bildanalys (metodutveckling i detta projekt), samt fröskördsdata. Försöken har tröskats och fröet rensats med standardmetoder. Analyser av grobarhet har också utförts med standardmetoder. Vi har också inventerat pollinatörstillgången på varje plats genom att lägga ut transekter, vilket är en beprövad metod (Lundin m fl. 2017), minst tre gånger per sommar.

#### *WP2: fenotypning på detaljnivå*

För att få mer detaljerad kunskap om blom- och växtgenskaper som kan vara associerade med fröavkastning, har vi utfört försök i mindre skala (fältförsök i Alnarp). Här har studierna koncentrerats på ett mindre antal sorter och mer komplexa egenskaper eller egenskaper som är mer resurskrävande att utvärdera, bla pollenkvalitet, nektarproduktion (med våra etablerade metoder, Hederström m fl. 2021), samt blomdoft. Blomdoften studeras med hjälp av etablerade metoder för doftuppsamling och kemisk analys. De fenotypiska egenskaperna, inklusive fröproduktion, kommer vi koppla till genotyp på individnivå med hjälp av RNA-sekvensering.

#### *WP3: genetisk analys*

För att koppla de fenotypiska data från WP1-2 till genetiska faktorer, används genetiska associationsstudier (GWAS) för önskvärda egenskaper, identifiering av gener och genetiska markörer (SNPs) som kan nyttjas i de prediktionsmodeller som utvecklas i det angränsande projektet. Vår ambition är också att fröavkastningen ska kunna studeras tillsammans med de tidigare inventerade fyra egenskaperna från det angränsande projektet. RNA-sekvenseringsdata kommer även att analyseras för data insamlade från de mindre fältförsöken (blad samt blomhuvuden i olika utvecklingsstadier från sex sorter).

## Resultat och diskussion

#### *WP1: fenotypning av fröavkastning i fältförsök*

De storskaliga fältförsöken på de tre platserna Svalöv (Skåne), Kölbäck (Östergötland) och Lövsta (Uppland) under 2023-2024 har genererat en stor mängd fröavkastningsdata (Fig. 2). Trots att vi kan se skillnader i avkastning mellan de olika försöksplatserna, så visar en första analys att sort har en signifikant påverkan, vilket tyder på en genetisk effekt. Tidigare studier har visat att fröskördar kan skilja sig stort mellan olika delar av Sverige (Amdahl m fl. 2016), vilket kan vara kopplat till pollinatörstillgången (Svensson m fl. 2025) eller andra miljömässiga faktorer (Jing m fl. 2021). Tex var 2023 ett utmanande år vädermässigt med en torr vår/försommar och en blöt högsommar/sensommar. Det har därför varit viktigt att vi har kunnat utföra försöken på flera platser under två år.

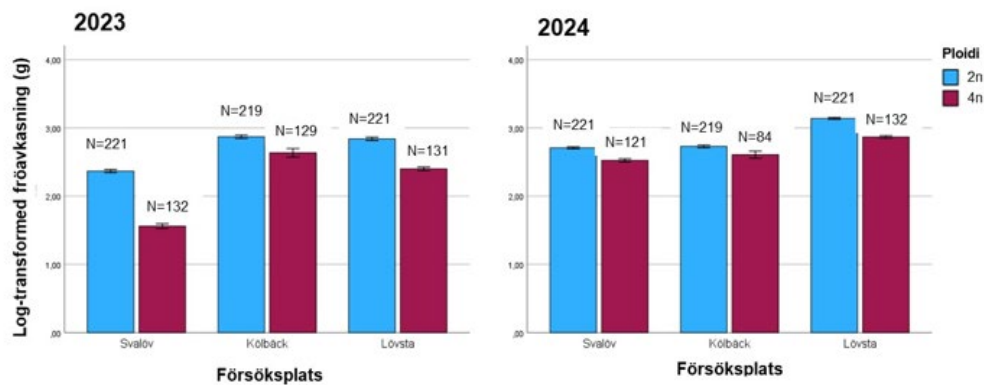


Fig. 2. Fröavkastning hos diploida (2n) och tetraploida (4n) sorter på de tre försöksplatserna under 2023 och 2024. N = antal sorter.

Förutom att samla in data på fröskörd från våra fältförsök så har vi också inventerat pollinatörsförekomst och samlat in data på antal blomhuvuden per ytenhet, både genom manuell räkning och genom bildanalys från drönarfoton tagna med en RGB kamera på låg höjd. Bildanalysmetoden är under utveckling och möjliggör en snabb inventering av blomningsgraden hos många sorter. Det är dock viktigt att vi kan säkerställa metodens tillförlitlighet innan den tas i bruk i större skala. I ett första steg kan vi se att blomningsgraden korrelerar positivt mellan bildanalyser och manuella mätningar, men att sambandet är starkare för diploida sorter. Vi har också identifierat en del avvikande värden i analyserna. Detta kan tex bero på att inte hela parcellen kom med på bilden eller att blomhuvuden hänger över kanten på parcellen. Vi arbetar därför just nu med en djupare analys av bilderna för att kunna säkerställa vilka bilder som är pålitliga och vilka som bör uteslutas från fortsatta analyser. Ett nästa steg kommer vara att testa om blomningsgraden också är direkt kopplad med fröavkastningen. Om så är fallet skulle denna metod kunna användas för snabb fältfenotypning som en indikation på fröavkastning.

Tabell 1. Medelvärden för fenotypiska egenskaper med en koppling till fröskörd hos två diploida (2n) och fyra tetraploida (4n) sorter (data insamlade från små fältförsök i Alnarp 2022 och från tidigare studier Hederström m fl. 2021, "Sverigeförsök", Svensson m fl. 2025). Olika bokstäver indikerar signifikanta skillnader ( $p < 0.05$ ).

Beroende variabel	df	p-value	Estimat marginella medelvärden						
			SW Ares (2n)	SW Yngve (2n)	Betty (4n)	Holly (4n)	Peggy (4n)	Vicky (4n)	
Frösättning (proportion av alla småblommor)	7	<0.001	0.75	0.76	0.62	0.58	0.56	0.66	
			e	e	b	a	a	c	
Frövik 200 frön (mg)	7	<0.001	319	318	421	418	442	537	
			ab	ab	bc	bc	bc	c	
Småblommor per blomhuvud	7	<0.001	123.2	119.6	129.8	115.6	128.0	118.5	
			c	bc	c	bc	c	bc	
Fröskörd Sverigeförsök 2020-2021	3	<0.001		13.8	10.2		9.1	13.6	
				b	a		a	b	
			Medel ± SD						
Grobarhet pollen (proportion 100 pollenkorn)	5	<0.001	0.634			0.314	0.426		
			c			a	b		
Pollenslängd (µm)	5	<0.001	32.54 ± 16.74			56.39 ± 31.30	49.60 ± 28.12		
			a			b	b		
Grobarhet pollen (proportion 100 pollenkorn) (Hederström m fl. 2021)			0.55	0.59	0.43			0.36	
Pollenslängd (m m) (Hederström m fl. 2021)			0.36	0.33	0.35			0.41	

### WP2: fenotypning på detaljnivå

De småskaliga fältförsöken i Alnarp utfördes under 2022-2023. Data insamlade från två diploida och fyra tetraploida sorter från 2022 påvisade sortskillnader för frösättning, frövik och pollenegenskaper, men inte för småblommor per blomhuvud (Tabell 1). Vi valde ut sorter där våra tidigare data indikerade att de var

antingen låg- eller hög-avkastande för att göra det lättare att koppla fröskörd med andra egenskaper.

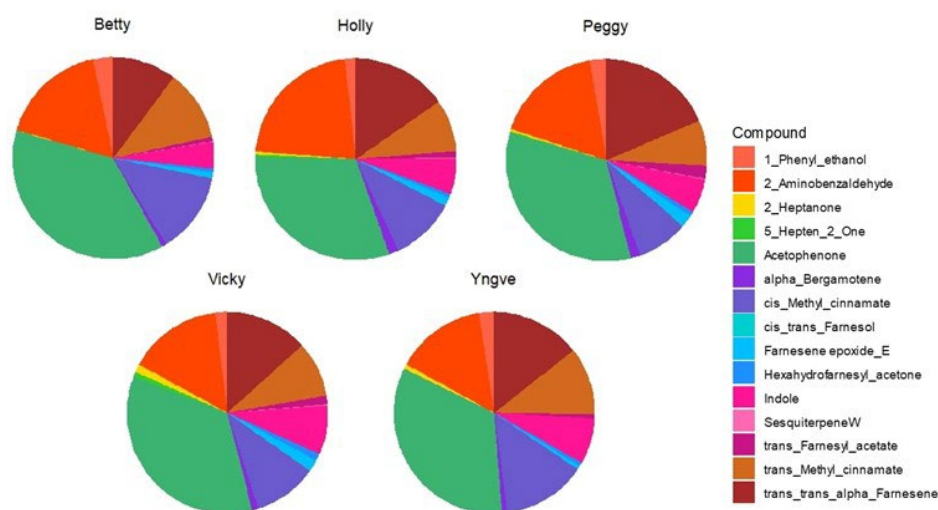


Fig. 3. Doftprofiler från blomhuvuden hos fem rödklöversorter (Yngve är diploid, Betty, Holly, Peggy, Vicky är tetraploida). "Compound" = identifierade kemiska ämnen som kan knytas till blomhuvuden.

Vi var intresserade av att studera sortskillnader i egenskaper som är viktiga för att attrahera pollinatörer, som blomdoft där det idag finns begränsad kunskap för rödklöver. Vi samlade in doft från knoppar, öppna blomhuvuden samt blomhuvuden som hade blivit besökta av pollinatörer hos fem sorter i de små fältförsöken i Alnarp under 2022-2023 och i det storskaliga försöket i Svalöv 2024. Vi kunde med hjälp av dessa data identifiera vilka kemiska ämnen som utgör blomdoft. Blomdoftprofilerna verkar dock inte skilja sig nämnvärt mellan de undersökta sorterna, varken med avseende på mängd eller sammansättning (Fig. 3). Detta skulle kunna tyda på att blomdoften är en stabil egenskap som inte påverkas nämnvärt av förädling. Resultaten visar också att pollinerade blomhuvuden reducerar blomdoften när de har blivit besökta av pollinatörer, trots att småblommorna i huvudet fortfarande är öppna. Det är vanligt hos vilda växter att blomdoften ändras efter pollinering (Schiestl m fl. 1997), men har inte tidigare visats hos rödklöver. Om blomdoften stängs ner innan alla småblommor har blivit pollinerade, vilket vi inte vet i dagsläget, skulle detta kunna leda till pollinationsbegränsning av frösättningen.

#### WP3: genetisk analys

Eftersom projektet är en del av det större SLU Grogrund projektet som fortfarande pågår (tom 2026) så har detta delprojekt inte slutförts än. I skrivande stund har vi påbörjat de planerade GWAS studierna med fröavkastningsdata. Eftersom vår analys av fröavkastningsdata från de storskaliga fältförsöken indikerar att det finns en genetisk komponent som styr denna egenskap, så är det lovande för våra möjligheter att hitta genetiska markörer. Vi har också samlat in, extraherat RNA samt fått tillbaka RNA-sekvenseringsdata från sekvenseringsföretag i vår RNA-sekvenseringsstudie, där vi vill studera genuttryck kopplade till olika stadier av blomhuvudets utveckling, sortskillnader (Tabell 1) samt eventuell koppling till

nedstängning av blomdoft hos pollinerade blomhuvuden. Dessa data möjliggör att hitta ytterligare markörer som styr fröavkastningen.

*Slutsatser, nytta för målgrupper i näringsliv/samhälle och akademi, fortsatta utvecklingsbehov och möjligheter.*

Detta projekt har möjliggjort insamling av en stor mängd fenotypiska sortdata från både storskaliga och småskaliga fältförsök hos diploid och tetraploid rödklöver. Vi kan se att fröavkastning verkar styras åtminstone delvis av genetiska faktorer. Vår metod med drönare och bildanalys verkar lovande för snabbare inventering av blomningsfrekvens, men vi behöver utveckla en metod för kvalitetskontroll av dessa bilder. Även om metoden inte är helt färdigutvecklad än, så ser vi att denna metod kan ha potential att effektivisera urvalsmetoder i fält, speciellt hos diploida sorter. Resultaten från doftanalyserna som tyder på en nedstängning av blomdoften efter pollinering är intressant. Vi vet dock inte vilken betydelse detta kan ha för pollinationsframgången och frösättningen, vilket är studier som kan vara viktiga att fortsätta med.

Eftersom projektet är en del av ett större projekt så har vi inte slutfört de viktiga genetiska analyserna än. Dessa analyser – både GWAS och RNAseq – kan förhoppningsvis hjälpa oss att hitta genetiska markörer som styr fröavkastningen. Kunskap om genetisk koppling med fröavkastning kommer kunna bidra till att effektivisera växtförädlingen, tex genom ett nytt modernt genomisk selektion-baserat förädlingsprogram på Lantmännen Lantbruk. I ett nästa steg finns också möjligheten att med dessa data undersöka hur fröavkastning är sammanlänkat genetiskt med de andra viktiga egenskaperna - avkastning av grönmassa, resistensegenskaper, uthållighet samt foderkvalitet, vilket kan ge en bättre helhetsbedömning av olika sorter.

Tillgång på rödklöversorter med stabil och hög fröavkastning, som även är högvastande i vallodlingen, är en viktig grundbult för både fröproducenter och odlare. Det är av vikt att säkerställa klöverfrötillgången för odlare i både södra och norra Sverige, och en ökad produktion av vallfrö kan leda till affärsmöjligheter för svenska fröodlare genom en ökad export. Sverige har idag en framgångsrik produktion av vallfrö och efterfrågan på både konventionellt och ekologiskt vallfrö ökar både på den inhemska och internationella marknaden. Sverige har därför stor potential att öka fröexporten då svenskt frö i allmänhet har jämn kvalitet och hög renhet och färre besvärliga ogräs.

## Referenser

- Amdahl H, Aamid TS, Ergon Å, Kovi MR, Marum P, Alsheikh M, Rognli OA. 2016. Seed yield of Norwegian and Swedish tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.) populations. *Crop Sci* 56: 603-612.
- Boller B, Schubiger FX, Koelliker R. 2010. *Red Clover*. Fodder Crops and Amenity Grasses 5.
- Bommarco R, Lundin O, Smith HG, Rundlöf M. 2012. Drastic historic shifts in bumble-bee community composition in Sweden. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 279:309-315.
- Hederström V, Rundlöf M, Birgersson G., Larsson MC, Balkenius A, Lankinen Å. 2021. Do plant ploidy and pollinator tongue length interact to cause low seed yield in red clover? *Ecosphere* 12:e03416.

- Jing S, Kryger P, Boelt B. 2021. Review of seed yield components and pollination conditions in red clover (*Trifolium pratense* L.) seed production. *Euphytica* 217:69.
- Kovi MK, Amdahl H, Alsheikh M, Rognli OA. 2017. De novo and reference transcriptome assembly of transcripts expressed during flowering provide insight into seed setting in tetraploid red clover. *Sci. Rep.* 7, 44383.
- Lundin O, Svensson GP, Larsson MC, Birgersson G, Hederström V, Lankinen Å, Anderbrant O, Rundlöf M. 2017. The role of pollinators, pests and different yield components for organic and conventional white clover seed yields. *Field Crops Res* 210:1-8.
- Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Erdmann D, Francke W. 1997. Variation of floral scent emission and postpollination changes in individual flowers of *Ophrys sphegodes* Subsp. *sphgodes*. *J Chem Ecol* 23:2881-2895.
- Svensson K, Hederström V, Valentin I, Lindholm S, Öhlund L, Larsson MC, Lankinen Å. 2025. Abundance of short- and long-tongued bees, seed eating weevils, and their impact on red clover seed production in four cultivars grown in southern and northern Sweden. *Preprint SSRN* doi: 10.2139/ssrn.5124621
- Vleugels T, Ceuppens B, Cnops G, Lootens P, van Parijs FRD, Smagghe G, Roldan-Ruiz I. 2016. Models with only two predictor variables can accurately predict seed yield in diploid and tetraploid red clover. *Euphytica* 209:507-523.
- Vleugels T, Amdahl H, Roldán-Ruiz I, Cnops G. 2019. Factors underlying seed yield in red clover: review of current knowledge and perspectives. *Agronomy* 9:829.