

# Syntesrapport över projektet "Hög och uthållig biomassaproduktion från salix: integrering av molekylärgenetik, ekofysiologi och växtförädling (SAMBA)", juni 2014 (projektnr. 30599-3)

Version 20/11



## ***Sammanfattning***

**I SAMBA1 var målet att identifiera områden med intressanta gener i salix arvsmassa. I SAMBA2 är målet att identifiera generna bakom egenskaperna och utveckla genetiska markörer som kan underlätta introduktionen av dessa i framtida kommersiella sorter av salix. I samarbete med Lantmännen testas och utvärderas markörerna i ett för ändamålet framställt växtförädlingsmaterial.**

**Inom ramen för ett planerat SAMBA 3 ska vi dels utvärdera och testa markörer och kandidatgener för de växtegenskaperna som vi hittills har fokuserat på, dels utvidga vårt arbete mot framför allt kvalitetsegenskaper som är relevanta för användning av biomassan som fordonsbränsle. En mer komplett ihopsatt sekvenserad arvsmassa för korgpil kommer att underlätta utvecklandet av markörer och dessutom kan kompletterande metoder som genomisk selektion bli aktuell för ett effektivt urval av egenskaperna.**

## ***Bakgrund***

En ökning av bioenergianvändningen är en stor global utmaning som kommer att ta tid att genomföra. Utvecklingen av hållbara produktionssystem av biomassa, med höga krav på miljönytta och med de rätta egenskaperna för omvandling till bränslen kommer att vara avgörande. Sverige har väl utvecklade jord- och skogsbruksbaserade näringar och därmed en utmärkt position att bidra till denna utveckling. Biomassa står idag för 30 % av Sveriges energiförsörjning. En ökande produktion av biomassa med specifika egenskaper för olika ändamål (t.ex. inom bioekonomi) ger nya möjligheter att utveckla jord- och skogsbruket och att hålla mark som annars kan komma att överges i aktivt bruk.

I slutet av 70-talet lanserades på skogshögskolan idén att odla salix, då för att utvärdera möjligheten att använda den som råvara vid tillverkning av pappersmassa. Den omfattande energikrisen i mitten av 70-talet väckte intresse för att odla salix som en förnybar energiråvara på grund av dess höga energivärde. En omfattande insamling av olika salix-material gjordes i Sverige under 1980-talet. Detta utgångsmaterial gav sen startskottet till två förädlingsprogram, ett vetenskapligt orienterat vid SLU och ett kommersiellt vid Svalöv AB (senare Svalöv Weibull AB). Sedan dess har ett 30-tal sorter tagits fram genom konventionell korsnings- och urvalsförädling. Alla sorter har genomgått ett omfattande officiellt provningsprogram för att få europeisk sortskydd innan sorten släpps ut på marknaden. För närvarande finns det ett 20-tal salixsorter på marknaden. Den kombinerade effekten från urval för hög biomassaproduktion samt god resistens mot rostsvampar och insekter har resulterat i nya sorter med signifikant högre biomassaavkastning jämfört med de första sorterna som kom ut på marknaden. En utökning av marknaden till andra odlingsområden i Europa

kräver att ytterligare egenskaper införs som förädlingsmål, och att resistensegenskaper anpassas efter de lokala skadegörarna. Även det förväntade förändrade klimatet i Sverige kan kräva nya förädlingsmål. För att Sverige skall kunna behålla en ledande position på sortmarknaden för salix behövs en kontinuerlig utveckling av nya högproduktiva sorter som är anpassade till olika klimatförhållanden och som uppfyller de kvalitetskrav som kommer att ställas i en framtida biobaserad ekonomi.

Nya tekniker utvecklas för att förädlingsprocessen av kommersiella växter för jordbruk och trädgård ska bli mera kostnadseffektiv. Även tekniker för växtförädling av salix som energigröda på åkermark kan utvecklas. En sådan teknik är markörbaserad selektion som kan ge snabbare och mer kostnadseffektiv selektion på tidigare stadier i förädlingsprocessen för nya salixsorter. Det gäller såväl egenskaper vilka kan vara svåra att göra urval för i fält som egenskaper kopplade till biomassaavkastning där markörteknik medger ett tidigt urval för avkastningspotential bland det stora antal plantor som genereras i korsningspopulationerna.

En förutsättning för framgångsrik växtförädling är identifiering av relevanta växtegenskaper vilka dels kan förväntas höja produktionsförmåga, produktkvalitet, odlingssäkerhet eller miljöprestanda i fält under olika miljöförhållanden (t.ex. torka), dels är enkla att mäta i stora populationer. Hittills har vi inom SAMBA-projektet mest fokuserat på resistens mot skadegörare och på växtegenskaper som höjer biomassaproduktionen (t.ex. fenologi, biomassaallokering till skott eller blad) speciellt med hänsyn till förbättrat resurseffektivitet, särskilt under torka (t.ex. mer effektivt utnyttjande av näring och vatten).

Ett långsiktigt hållbart växtskydd mot skadegörare måste ta hänsyn till att förutsättningarna (exempelvis klimatet) och skadegörarna själva förändras. Därför ger satsningar på genotyper som är superresistenta mot skadegörare ofta bara kortsiktiga lösningar. Hållbara lösningar är mer komplexa och bör när det gäller svampskadegörare innefatta en satsning på en blandning av fler genotyper eller resistensegenskaper. För skadeinsekter kan man med fördel även beakta hur insekternas naturliga fiender fungerar som biokontroll-agenter (eller "livvakter") på olika växtgenotyper. När det gäller de allvarligaste skadegörarna, bladbaggar, så är de viktigaste naturliga fienderna omnivorer, vilket innebär att de är både växtätare och rovdjur. Växtens egenskaper blir därför extra intressanta att beakta. SAMBA-projektet är ett av ytterst få förädlingsprojekt i världen där man beaktar växtgenotypers påverkan på naturliga fiender (indirekt resistens) och inte enbart hur skadeinsekterna påverkas (direkt resistens).

### ***Målsättningar***

Det långsiktiga målet för projektet är att utveckla metoder som möjliggör ett effektivare urval inom växtförädlingen av salix. Målet för SAMBA 1 var att identifiera områden med intressanta gener i salix arvsmassa och målet för SAMBA 2 har varit att identifiera kandidatgener och utveckla genetiska markörer som kan underlätta introduktionen av nya egenskaper i framtida kommersiella sorter av salix. Exempelvis kan gener som ligger bakom ett mer effektivt

utnyttjande av vatten och näringsämnen, samt nya gener för sjukdomsresistens visa sig värdefulla i förädlingsarbetet mot ett växtmaterial som avkastar bra även i andra klimat, d.v.s. i andra länder i Europa eller i förändrade svenska klimatförhållanden och inom ramen för nya miljövänliga odlingsmetoder. Med hjälp av genetiska markörer, d.v.s. områden i arvsmassan som varierar mellan individer och som är kopplade till de gener som styr de egenskaper man vill göra urval för, kan man på ett tidigt stadium identifiera individer med de önskvärda genvarianterna. Dessa individer testas vidare och genomgår sedan sortprövning. För att utveckla genetiska markörer behövs genkartor, där områden med gener som är betydelsefulla för variationen i olika egenskaper är identifierade. Målet är att utveckla genetiska markörer i eller nära de betydelsefulla generna, som senare testas i ett för ändamålet framställt växtförädlingsmaterial.

Arvsmassan hos flera salixarter är idag sekvenserade och kommer snart att finnas tillgängliga. Inom SAMBA har vi sekvenserat arvsmassan hos korgvide (*S. viminalis*) och även om den inte är fullständigt ihopsatt så är den redan nu av nytta för utvecklingen av genetiska markörer. Sekvensering av växters arvsmassa har lett till att man inom växt- och skogsträdsförädlingen utvecklar en urvalsteknik där genetisk variation i hela arvsmassan används vid selektion av egenskaper (s.k. genomisk selektion). Vårt mål är att utveckla denna teknik så att den kan användas för salix.

Inom ramen för SAMBA har vi fram till nu i huvudsak studerat resistens mot bladrost och insekter samt olika tillväxtfaktorer, såsom värme- och vattenstresstolerans, näringsutnyttjande och lokal anpassning, i förhållande till biomassaavkastning. Särskilt med tanke på den förväntade utvecklingen inom bioekonomiområdet, är målet att även studera växtegenskaper som är relevanta för biomassakvalitet och potentiella nya användningsområden för biomassa som t.ex. fordonsbränsle, för att införliva visionen om en fossilfri fordonsflotta. Dessa egenskaper är det svårt att göra urval för med enkla metoder. Inom ett samarbetsprojekt där vi använt oss av en karteringspopulation utvecklad inom SAMBA pågår genetiska analyser av ett antal olika vedegenskaper hos salix med hjälp av en spektrofotometrisk mätmetod (FTIR) och pyrolysmetodik. Delar av populationen kommer också att analyseras för att undersöka möjligheten att utnyttja salix för att producera biogas. Dessa studier kommer att ge oss information om hur förädlingsarbetet med salix även kan komma inriktas mot att förändra och förbättra biomassakvaliteten för nya användningsområden av biomassan.

Ett mål har varit att hitta genetiska markörer för resistens mot bladrost och insekter, något som kräver ett samarbete mellan genetiker, mykologer och entomologer. Det är viktigt att ha en beredskap för att möta förändringar hos skadegörare. Man har sett exempel på hur resistensen mot bladrostsvampar redan efter några år kan överkommas i jordbruksgrödor. Vi har också sett exempel på detta hos bladrost i praktiska odlingar av salix och poppel. Nya angrepp av bladbaggar på sälg (*S. caprea*), som tidigare varit förskonad från angrepp, indikerar att även insekter kan förändras. En målsättning är att fortsätta vara ledande inom arbetet med att utnyttja indirekt resistens mot skadeinsekter och därmed utveckla ett mer hållbart växtskydd.

Salix är en flerårig gröda, där en slutlig bedömning av produktionen kan göras först efter flera års tillväxt i fält. Den genetiska bakgrunden för viktiga växtegenskaper studeras dock ofta hos unga plantor odlade i krukor. En viktig frågeställning i projektet har således varit att finna ut om det går att identifiera en produktionspotential hos salix odlade i fleråriga bestånd utifrån studier på unga plantor och baserat på denna kunskap utveckla genetiska markörer.

Energigrödor som effektivt utnyttjar mineralnäring kommer att spela en viktig roll i framtiden, inte minst med tanke på utvecklingen mot nya, miljövänliga odlingsmetoder. Mark- och vattenresurserna är begränsade vilket innebär att avkastningen bör vara hög på den mark som man odlar på. Samtidigt innebär inköp av mineralgödsel en kostnad för lantbrukaren vilket, tillsammans med ökad miljöhänsyn, kan minska intresset för att tillföra mineralgödsel. Därför har ett viktigt mål varit att identifiera relevanta växtegenskaper som ökar effektiviteten i näringsutnyttjande och genetiska markörer för dessa som kan användas i förädlingsarbetet, vilket kräver ett samarbete mellan ekologer, växtfysiologer och genetiker.

## **Resultat**

### Genetisk bakgrund

Målet under SAMBA 1 och 2 har varit att lokalisera regioner i salix arvs massa som är betydelsefulla för egenskaper som är intressanta för växtförädlingen samt att identifiera kandidatgener och genetiska markörer för de olika egenskaperna.

Vårt första angreppssättet var att identifiera regioner (QTLs) i salix arvs massa, d.v.s. kartlägga den genetiska bakgrunden till egenskaperna. För att påvisa dessa regioner behövdes genkartor som visar positionen av gener eller genetiska markörer relativt varandra utmed kromosomerna. Två täta genkartor för salix har konstruerats och en tredje genkarta utvecklas nu speciellt för insektsresistens (Pop IV). Vi har utvecklat genkartemarkörer för salix med hjälp av informationen om poppelns arvs massa. Det har gjort det möjligt att överföra kunskap om gener i poppel till salix. Vi ser redan nu ett behov av en mycket tätare genkarta för att studera insektsresistens. Genom att använda tekniken "genotyping by sequencing" (GBS) skulle vi få tusentals nya genkartemarkörer, vilka är slumpmässigt spridda över arvs massan. Det skulle ge större möjligheter för fortsatt forskning om den genetiska bakgrunden till insektsresistens och för att hitta kandidatgener och genetiska markörer för insektsresistens.

Vi har etablerat ett fältförsök i Sverige (SAMBA1) och ett fältförsök i Italien (SAMBA2) men även utfört försök i både växthus och odlingskammare under kontrollerade odlingsbetingelser för att studera olika egenskaper (se nedan under resp. egenskap). Vi har genom statistiska analyser kopplat ihop data för olika egenskaper med informationen från genkartorna. På så sätt har vi kunnat identifiera regioner på genkartorna som innehåller gener vilka styr variationen för egenskaper som påverkar biomassa produktionen. Varje region har studerats vidare med avseende på vilka gener som finns i regionen och för att se om vissa

typer av gener är ansamlade inom regionen, på så sätt har vi identifierat kandidatgener för egenskaperna.

Vi har identifierat regioner och kandidatgener som är kopplade till kväveekonomi, olika tillväxtegenskaper, bladrostresistens, bladgallmyggesresistens och olika fenologiegenskaper som knoppsprickning, knoppsättning, tillväxtavslutning och lövfällning. I vissa fall har vi funnit överlapp mellan regioner som är kopplade till olika egenskaper, vilket kan betyda att de har en gemensam genetisk bakgrund. Vi har också för samma egenskap identifierat identiska regioner vid olika mätår och i olika miljöer. Detta tyder på att vissa regioner i arvsmassan är speciellt viktiga för egenskapen och det är intressant och användbart med tanke på en utveckling av genetiska markörer för växtförädlingen.

Det andra angreppssättet vi följt för att nå projektmålen är att studera variationen i egenskapernas kandidatgener (som vi identifierat från de initiala QTL-studierna och från litteraturen) i en naturlig population av korgpil (en s.k. associationskarteringspopulation). Vi har hittat kopplingar mellan kandidatgen och egenskap för knoppsprickning, bladfällning, antal skott och summerad stamdiameter. Markörer i dessa gener kommer att testas i växtförädlingsmaterial under projektperioden.

Vi har även använt GBS-tekniken på associationskarteringspopulationen och kommer att kunna införa tusentals nya markörer spridda över hela arvsmassan för associationskartering under projektperioden. Dessa markörer kommer att vara användbara i kommande forskning för att identifiera kandidatgener och genetiska markörer för olika egenskaper som visar variation i korgpil.

### Tillväxtfaktorer

Huvudsyftet med tillväxtstudierna har varit att identifiera avkastningspotential på beståndsnivå utifrån studier på unga plantor samt att identifiera relevanta växtegenskaper, vilka ökar näringsutnyttjandet och förbättrar anpassningen av växtmaterialet till ett varmare och torrare klimat. Områden i arvsmassan som reglerar dessa egenskaper skulle sedan identifieras i samarbete med andra SAMBA projektdelar.

När det gäller identifiering av avkastningspotential utifrån studier på unga plantor fann vi att en kombination av skottbiomassa och bladkvävekoncentration hos unga plantor väl återspeglar trädens långsiktiga produktionsförmåga i fält. Inom ramen för SAMBA-projektet har vi identifierat områden i arvsmassan som påverkar regleringen av dessa egenskaper.

Vid studierna av relevanta växtegenskaper som ökar effektiviteten i näringsutnyttjande fann vi ett starkt samband mellan vertikala bladkvävegradients och biomassaproduktion. Maximal avkastning fann vi hos sorter med en mycket svag vertikal bladkvävegradient. Den vertikala bladkvävegradienten är alltså en växtegenskap som med fördel skulle kunna utnyttjas i förädlingen. Vidare fann vi att egenskapen att snabbt kunna öka

bladnäringshalten under vattenstress är förknippad med hög avkastning under vattenstress. Några områden i arvsmassan som styr dessa egenskaper har identifierats, men fortsatt forskning behövs för att kunna tillämpa denna kunskap i förädlingen.

Bladfenologin hos salix är avgörande för plantornas potentiella produktionsförmåga. Vi har identifierat samband mellan flera fenologiska egenskaper (vårens knoppsprickning, höstens tillväxtavslutning och lövfällning) och biomassatillväxt. Områden i arvsmassan som styr dessa egenskaper har identifierats.

I arbetet med att framställa växtmaterial som är bättre anpassat till ett varmare och torrare klimat (t.ex. tolerans för höga bladtemperaturer) har vi kunnat identifiera några växtegenskaper som återspeglar torkstress hos plantor odlade i växthus, och även funnit stora skillnader i bladtemperatur mellan olika sorter och torkbehandlingar (t.ex. permanent och temporär torkstress). Dock har vi hittills inte kunnat identifiera växtegenskaper som är bra indikatorer för värme- och torktolerans. Svårigheterna beror mest på problem att simulera klimatet i Sydeuropa (hög instrålning i kombination med hög temperatur) i växthus här i Sverige. Relevanta fysiologiska mätningar har nu utförts i en försöksodling i norra Italien under 2013 och 2014, och dataanalys samt identifiering av regioner i arvsmassan som styr de relevanta växtegenskaperna är på gång.

Vi har inom projektets löptid kunnat identifiera regioner i arvsmassan som är kopplade till biomassaproduktion och kvävehushållning under vattenstress. Genom att studera de identifierade regionerna och genuttryck vid torka har vi också identifierat kandidatgener. Dessa gener kräver ytterligare studier för att vi skall kunna ta fram användbara molekylära markörer för egenskaper kopplade till torktolerans.

### Bladrost

Målet med arbetet på bladrost är att identifiera genetiska markörer för ett flertal olika resistensgener som kan användas för att selektera fram en långsiktigt uthållig rostresistens. Redan i SAMBA 1 hade vi identifierat en region i arvsmassan som bidrar mycket starkt till bladrostresistens i salixkloner från korsningar med sibiriskt korgvide (*Salix schwerinii*). Eftersom sibiriskt korgvide finns med i släktträdet hos ett stort antal kommersiella kloner har vi funnit det angeläget att försöka kartlägga vilken eller vilka gener som styr rostresistensen i denna region. Vi har därför i detalj undersökt den genetiska koden och har lyckats identifiera en resistensgen som uppvisar skillnader mellan kloner som är resistent respektive mottagliga för bladrosten. Dessa skillnader kan nu utnyttjas som mycket precisa markörer för rostresistens. För att verifiera dessa resultat har vi även studerat hur denna förmodade resistensgen uttrycks i laborietester och även här har vi kunnat påvisa skillnader mellan resistent och mottagliga kloner.

Vi har utvecklat markörer för rostresistens och identifierat variabla områden i arvsmassan som ligger tätt intill gener för resistens och därför kan användas som genetiska markörer. Detta är en förutsättning för att kunna använda

markörer för rostsvampsresistens i alla typer av salixmaterial. Detta är särskilt viktigt eftersom vi vill kunna kombinera rostresistens med en rad andra egenskaper av vilka en del kräver korsningar mellan flera olika arter av salix.

Baserat på erfarenheter från jordbrukspatologin har vi förstått att en särskilt viktig aspekt för rostresistens är att det är nödvändigt att basera förädlingen på ett flertal gener för att uppnå en långsiktigt hållbar resistens. Ett viktigt syfte med bladroststudierna är därför också att ta fram markörer som kan hjälpa förädlaren att få reda på hur många och vilken typ av rostresistensgener som finns i en viss bladrostresistent salixklon.

Vi undersöker därför ytterligare regioner i arvsmassan där vi i SAMBA 1 fått indikationer på rostresistens (med hjälp av QTL-kartering). Vi utnyttjar sekvensdata från den nyligen sekvenserade arvsmassan hos korgvide (*S. viminalis*). Genom att jämföra den genetiska koden med den i arvsmassan hos poppel har vi kunnat identifiera flera regioner som innehåller förmodade resistensgener. Det har t ex visat sig att kromosom 19 innehåller flera kluster av resistensgener hos salix liksom hos poppel.

Våra resultat från både fältförsök och laboratorietester visar att en region i arvsmassan hos salix bidrar mycket starkt till bladrostresistensen men att det finns andra områden i arvsmassan som också bidrar till resistens i olika hög grad.

Våra resultat har också visat att olika rostsvampar känns igen av vissa salixkloner med hjälp av gener lokaliserade i olika regioner i arvsmassan. För att möta framtida förändringar i svamppopulationer är det viktigt att inte förlora variationen och därmed resistensen hos dessa gener. Jämförande mätningar av rostangreppen på samma salixkloner i Sverige, Italien och Slovakien indikerar att det finns virulensskillnader mellan rostsvamppopulationerna i dessa regioner. För framtiden är det också viktigt att koppla de olika resistensregionerna i arvsmassan till geografiska skillnader i förekomsten av rostsvampar.

Vi har också funnit genetiska markörer som är så tätt kopplade till regionen med den starkaste resistensen att vi med hjälp av markörerna kan följa den egenskapen över flera generationer i ett släktskapsträd av salixkloner. Detta visar att genetiska markörer är stabila i salix. För att lokalisera resistent genotyper från vilda salixkloner med hjälp av genetiska markörer är det dock nödvändigt att komma ännu närmare de gener som utgör själva resistensen.

### Insekter

Målet att hitta genetiska markörer för resistens mot skadliga insekter (bladbaggar) har försenats. Den främsta orsaken är att de salixkloner som visat stark till moderat resistens mot bladbaggar, direkt och indirekt, samtliga varit polyploida, dvs. de har 4-6 upplagor av arvsmassan vilket starkt försvårar sökandet efter genetiska markörer. Möjligheterna att identifiera genetiska markörer har ökat i och med att vi nyligen tagit fram en ny karteringspopulation



(popIV) genom att korsa en klon av den diploida och samtidigt resistent *S. purpurea* med en klon av den mottagliga *S. viminalis*.

En snabb och tillförlitlig metod för att kvantifiera den direkta resistensen (negativa effekter på bladbaggar) har utvecklats: man räknar antalet ägg lagda av bladbaggehonor under mindre än två veckor från att de börjar lägga ägg.

När det gäller indirekt resistens (positiva effekter på bladbaggar naturliga fiender) har vi utvecklat en bra metod för en av salixens "livvakter", nämligen anthocorider. För den kanske viktigaste gruppen "livvakter", miriderna, har vi ännu inte kunnat utveckla en metod som är tillräckligt tidseffektiv.

Resultaten visar att det finns en koppling mellan direkt (och möjligen indirekt) resistens och halten av fenoler i bladen, särskilt salicylater: ju högre halt ju starkare direkt resistens.

Den direkta och indirekta resistensen har i de kloner vi hittills studerat visat sig vara varandras spegelbilder, dvs en klon med stark direkt resistens har en svag indirekt resistens och vice versa. Ett sådant mönster har ännu inte kunnat konstateras för pop IV men vi har kunnat konstatera att det finns kloner som samtidigt har stark direkt och stark indirekt resistens.

Pop IV har fenotypats när det gäller insektsresistens enligt följande: Den direkta resistensen (äggläggning hos bladbaggehonor) har testats på ca 500 genotyper; Den indirekta resistensen (äggläggning hos "livvakten" *Anthocoris nemorum*) har kvantifierats på drygt 450 genotyper.

Två bladegenskaper som kan vara kopplade till insektsresistens mättes på delar av pop IV; bladhårighet samt bladytehärdhet ('toughness'). Blad för kemiska analyser har samlats in.

Resultaten från fenotypandet håller på att analyseras.

Ett klonarkiv av pop IV har planterats i Pustnäs i närheten av Uppsala. En inhägnad fältförsöksyta med 6 block har anlagts i Krusenbergs strax söder om Uppsala. Varje block innehåller 168 genotyper från pop IV, föräldraklonerna samt fyra kloner som studerats mycket i tidigare försök (78021, 78183, Gudrun och Loden) och som därmed kan fungera referenskloner. Det hade varit önskvärt att ha fler genotyper från pop IV representerade i fältförsöket men begränsades av tillgången på sticklingsmaterial. Försöket kan användas för att på ett vetenskapligt robust sätt läsa av skillnader i skador (insekter och rost) och tätheter av olika insekter mellan kloner i fält.

Två resultat som man bör ta hänsyn till i det fortsatta arbetet är: Bladbaggarns preferens för och framgång på olika kloner av salix verkar till viss del plastisk och tycks bero på vilken klon de ätit på tidigare. På salixkloner där "livvakterna" klarar sig särskilt bra på att enbart äta av växten så blir de mindre benägna att äta av bladbaggar ägg och larver. Den bästa kontrollen av bladbaggar kan alltså, åtminstone långsiktigt, sannolikt uppnås för kloner med moderat resistens.

## Samarbeten

Idag finns etablerade forskningssamarbeten på salix med Cornell University i USA, Rothamsted Research i England och flera universitet i Tyskland (Berlin, Freiburg, Rostock). Ett nytt internationellt samarbete planeras med Max Planck institut i Jena/Tyskland och med Jiangsu Forest Academy i Nanjing/Kina (kontakt Dr. Jie Zhou), där man har över 50 års erfarenhet av förädling av Salix (inkl. markörbaserad selektion och molekylära metoder), detta i anslutning till världens största odlingsområde för salix i Kina (43 000 ha salixodlingar).

## ***Kvarstående kunskapsluckor***

Högproduktiva salixsorter anpassade till olika odlingsförhållanden och som utnyttjar näring och vatten optimalt kommer att kunna bidra till en omställning mot en högre andel biobränslen i vår energiförsörjning. Salix kan också bidra till utvecklingen av biobaserade fordonsbränslen som är en förutsättning för att komma närmare visionen om en fossilfri fordonsflotta.

För att salix ska kunna utnyttjas effektivt krävs att man alltid använder sorter som är anpassade till den miljö där den ska växa och för de ändamål som man vill utnyttja odlingen eller slutprodukten för. Framställning av nya sorter som uppfyller olika krav sker genom växtförädling. Ett växtförädlingsprogram där man med hjälp av ett antal genetiska markörer redan hos groddplantor kan avgöra om den enskilda plantan bär de önskade anlagen (generna), skulle påskynda och effektivisera förädlingsarbetet med syfte att framställa nya hållbara salixsorter som ger en hög avkastning. Vid konventionell växtförädling är man begränsad av att bara kunna identifiera och välja utifrån fröplantans utseende vilket är kopplat till de naturliga förhållanden plantan utsätts för. Om plantorna under testperioden t. ex inte utsätts för ett insektsangrepp kan man inte välja individer som är motståndskraftiga mot skadeinsekter. Genom att utnyttja både nya och traditionella metoder för att ta fram sorter påskyndas urvalsprocessen och den blir mer effektiv. De nya metoderna, vilka bygger på ett tidigt urval med hjälp av genetiska markörer, kommer på sikt att göra det möjligt att framställa nya sorter utan stora omfattande fältförsök eftersom fröplantor med oönskade anlag redan är kasserade och inte behöver fälttestas. Men den största vinsten är att man med stor precision samtidigt kan identifiera individer som bär viktiga gener för ett stort antal egenskaper.

För att utveckla stabila markörer, vilka fungerar i många växtmaterial konstruerar vi markörer som ligger nära eller i de gener som styr egenskaperna. Med hjälp av en ny metod (associationskartering) har vi förbättrat precisionen i markörutvecklingen för rostresistens, fenologi- och vissa biomassaegenskaper. Men ytterligare arbete för att ta fram användbara markörer krävs för att möta marknadens framtida efterfrågan på nya högproduktiva sorter, vilka är anpassade till olika klimatförhållanden och som uppfyller de kvalitetskrav som

kommer att ställas i en framtida biobaserad ekonomi. Växtegenskaper som t. ex. tolerans mot biotisk och abiotisk stress, vilka krävs för en ekologisk hållbarhet i salixodlingar.

Nya metoder för växtförädling med molekylärt urval studeras och utvecklas för växter, däribland genomisk selektion. Speciellt för egenskaper som styrs av många gener som t.ex. biomassa och fenologi, skulle denna teknik vara lämplig. Genomisk selektion baseras på variationen i ett stort antal gener i hela arvsmassan och deras koppling till egenskaperna. Metoden kan även anpassas för salix och ett steg mot att göra det är att sätta ihop den sekvenserade arvsmassan för korgpil. Korgpilens arvs massa kommer dessutom att ge oss ett värdefullt redskap för att direkt undersöka och utveckla markörer i salix i stället för att, som vi hittills gjort, gå via närbesläktade arter som poppel.

Centralt i förädlingsarbetet är att identifiera sambandet mellan tillväxtegenskaper hos unga plantor och den långsiktig avkastning på beståndsnivå. Vår modell för långsiktig biomassatillväxt på beståndsnivå utifrån tillväxtdata från unga plantor odlade i krukor skulle behöva verifieras med hjälp av ett större material innan den kan rekommenderas för generell tillämpning. Vi skulle t.ex. kunna regenerera och utnyttja fältdata från fältförsök i Lantmännens regi. Inom ramen för det pågående projekt har denna projektdel inte kunnat prioriteras p.g.a. medelsbrist, och den nödvändiga verifieringen återstår därför att göras.

Sorter med hög effektivitet i näringsutnyttjandet kommer att spela en allt större roll i framtiden, inte minst för att minska behovet av konstgödsel och samtidigt hålla en hög produktion av biomassa. Vi har karakteriserat några viktiga växtegenskaper samt identifierat områden i arvs massan som är viktiga för effektiviteten i näringsutnyttjandet, men vi behöver mer kunskap om t.ex. näringsupptagningsförmåga och näringsförluster samt deras genetiska bakgrund. För att kunna förädla fram värmeteroleranta och resistent sorter som är anpassade till framtida klimatförändringar i Sverige och för nya marknader i östra och södra Europa måste vi få bättre kunskap om vilka egenskaper som är viktiga för värmeterolerans och skadegörarresistens samt hur de regleras. Vi har redan fältförsök i Italien och avser att anlägga nya fältförsök i östra Europa (Ukraina) för att genom växtfysiologiska studier få bättre kunskap om hur värmeterolerans regleras hos salix. I dessa fältförsök kommer vi också ha möjlighet att studera hur redan kända skadegörare utvecklas och om det dyker upp helt nya skadegörare.

För alla växtegenskaper med hög relevans för förädlingen behöver vi identifiera robusta markörer som inte enbart gäller för vissa miljöer eller specifika förädlingspopulationer. Här har vi kommit en bra bit på väg genom att vi har identifierat områden i arvs massan där gener som styr variationen för egenskaperna är lokaliserade. Efter projektperiodens slut återstår det att konstruera genetiska markörer som ligger nära generna.

För att erhålla en hållbar bladrostresistens är det viktigt att man i förädlingen selekterar för flera olika resistensgener samtidigt. Erfarenheten visar att rostsvampar överkommer resistens baserad på en gen mycket lättare än om den

baseras på flera gener. Vi har redan lyckats ta fram markörer för den rostresistens som är specifik för salixkloner med inslag av sibiriskt korgvide. Vi har också påbörjat identifiering av ytterligare resistensgener för att få resistens i ett bredare salixmaterial av olika genetiskt ursprung. Arbete återstår med att ta fram specifika markörer samt att undersöka korrelation mellan resistensdata från laborietester och från fältförsök. Här kommer vi också att använda oss av associationskartering med obesläktade individer av salix. Vårt mål är att sätta samman en panel av rostresistensmarkörer som kan användas i skilda salixmaterial. Ett annat viktigt område som kräver mer forskning är att koppla samman de olika resistensgenerna till lokala varianter av rostsvampen som finns i Europa. Detta har en stor betydelse för odlings säkerheten av salixkloner över hela kontinenten.

När det gäller skadeinsekter är målet ökad odlings säkerhet, dvs att man lyckas minimera skörde förlusterna på ett hållbart sätt. All kunskap som kan leda till att skadegörarnas antal och skador hålls nere är därför av hög energirelevans. Att använda resistent och/eller toleranta kloner samt att gynna växternas "livvakter" är bra alternativ till användning av pesticider som både är dyra och kan påverka miljön negativt. För att kunna göra kloka val mellan olika strategier behöver vi utveckla modeller som kan hantera flera faktorer som dessutom samspekar.

För att fylla kunskapsluckor när det gäller skadeinsekter behöver följande konkreta åtgärder genomföras: Inventering av fältförsöksytan i Krusenberget (insektsskador, naturliga fiender, rost, kön mm). Anlägga ytterligare fältförsöksytor på platser med annat klimat än Uppsala så att genotyp-miljö samspel kan analyseras, särskilt effekten av temperatur. Följa upp indikationer om att hanliga och honliga kloner av salix skiljer sig åt när det gäller insektsförekomst och undersöka de bakomliggande mekanismerna till sådana mönster. Studera hur graden av aggregering hos bladbaggar påverkas av olika faktorer (växtegenskaper, närvaro av naturliga fiender) och hur detta påverkar sannolikheten för utbrott. Undersöka orsakerna till att den största insektsskadegöraren i salixodlingar (den blå pilglansbaggen) på senare år plötsligt blivit en stor skadegörare på sälg (*S. caprea*). Utveckla metod för att mäta den indirekta resistensen som uttrycks via de vanligaste naturliga fienderna, dvs. miriderna.

Nya områden där vi har stora kunskapsluckor är mekanismer och metoder för att genom växtförädling påverka biomassakvaliteten t.ex. med avseende på egenskaper som fukthalt i grön biomassa, barkandel, makrokemiska och kalorimetriska egenskaper, vilka alla är viktiga i bedömningen av biomassans lämplighet som råmaterial för drivmedel.

Salix kan växa fort och producera upp till 15 ton TS/år/ha, har ett stort energivärde (energibalanskvot: ut/in, 20/1) och kan bidra med ett antal ekosystemtjänster därför bör vi utnyttja salix för biomassaproduktion. För att öka odlings säkerheten behöver vi minska skörde förluster som orsakas av flera samverkande faktorer, t.ex. extremt klimat och insektsangrepp. Inom projektet har vi tagit fram mycket kunskap som är högst relevant i sammanhang med odlings säkerheten, men vi saknar modeller som binder ihop dessa kunskaper för

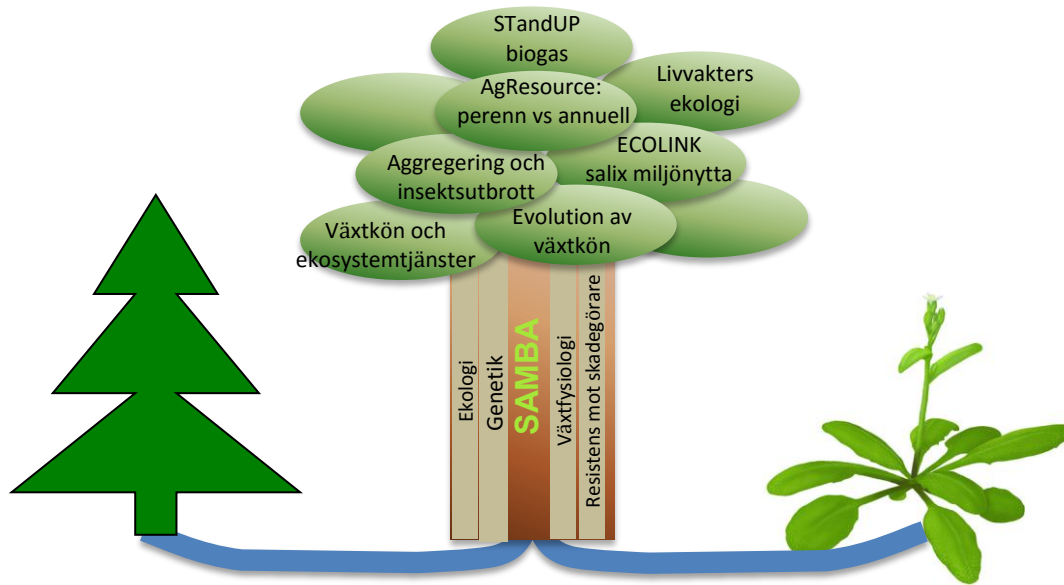
att kunna koppla ihop produktions- och riskvärderingsaspekter. Här behövs klart mer kunskap.

### ***Värdet av att ha en kompetent grupp samlad***

Inom det pågående projektet har vi byggt upp resurser och redskap i form av växtmaterial (karteringspopulationer, växtförädlingspopulationer), genkartor, fältförsök och metoder för fenotypning och markörbaserat urval inom växtförädlingen av salix. För att Sverige skall kunna behålla en ledande position på sortmarknaden för salix behövs en kontinuerlig utveckling av nya högproduktiva sorter som är anpassade till olika klimatförhållanden och som uppfyller de kvalitetskrav som kommer att ställas i en framtida biobaserad ekonomi. En "pre-breeding" grupp där samlad kompetens från olika områden inom växtförädling av salix finns, möjliggör en sådan utveckling. Av stor betydelse är ett nära samarbete med växtförädlare, vilka testar och utvärderar de genetiska markörer som forskarna tar fram. Vidare är det viktigt att ha en kontinuerlig kontakt med Salixenergi Europa som marknadsför salix, för att avstämna behovet av nya sorter med nya egenskaper.

Det intensiva samarbetet mellan de olika delarna i förädlingsarbetet (mykologi, entomologi, ekologi, växtfysiologi och genetik) har lett till ett mycket effektivt sätt att ta fram den nödvändiga kunskapen inom respektive projektdel jämfört med en situation där de olika aspekterna hade behandlats oberoende av varandra. Den samlade behandlingen av de olika delaspekterna i växtförädlingsprocessen bör också göra det enklare för näringen, myndigheter och allmänheten att kommunicera och ta till vara resultaten av projektet.

Den kunskap som vi har byggt upp inom ramen för SAMBA har gjort det möjligt för oss att utveckla salix till en modellväxt vid studier av vedartade växter. Forskare inom SAMBA har tagit initiativ till ett antal forskningsprojekt där salix används som modellväxt (Figur 1). Denna forskning finansieras med medel från bl.a. NJ fakulteten på SLU, Formas, Vetenskapsrådet och Energimyndigheten.



Figur 1. SAMBA-projektet med sina ingående delar (stammen) har byggt upp växtmaterial och resurser som används i olika samarbetsprojekt (trädkronan). Kunskap inom SAMBA och salix kan användas och överförs till andra modellorganismer och vice versa.

### ***Resultatens miljönytta och betydelse i ett framtida energiperspektiv***

Salix kan förutom energi bidra med olika miljönyttor i jordbrukslandskapet. Inte minst olika så kallade ekosystemtjänster (rening av mark och vatten, pollinering mm) kan medvetet gynnas med hjälp av salix, särskilt om man väljer att lägga odlingarna strategiskt i landskapet. En förutsättning för att utnyttja salixens fulla potential är också att man använder "rätt" sorts salixgenotyper som maximerar miljönyttan. Med de förbättrade växtförädlingsmetoderna som vi arbetar med inom SAMBA projektet, ökar också möjligheterna att snabbt förbättra växtmaterialet med hänsyn till salixodlingars miljönytta. Arbetet med miljönyttan kräver kunskap om sambanden mellan växtegenskaper och de ekosystemprocesser som är relevanta för miljönyttan. Samband mellan växtegenskaper och miljönytta studeras i ett annat forskningsprojekt med salix som modellväxt ([www.slu.se/ecolink-salix](http://www.slu.se/ecolink-salix)). Växtegenskaper som påverkar miljönyttan har inte varit centrala i det pågående SAMBA projektet, men kommer att bli viktiga i det fortsatta arbetet inom förädlingsforskningen.

För att motverka klimatförändringar kommer biomassa framställd från energigrödor som odlas i korta omdrev att spela en viktig roll, då valet av växtmaterial snabbt kan anpassas till förändrade odlingsförutsättningar. Eftersom salix gödslas mindre än ettåriga grödor och dessutom har rotsystem året om är läckaget av näringsämnen ofta mindre från salixodlingar än från spannmålsodlingar. Även användningen av bekämpningsmedel mot ogräs och skadegörare är mindre i salixodlingar än i spannmålsodlingar.

Energiskog odlas i dag främst för uppvärmingsändamål. Kunder som köper salixflis är huvudsakligen kraft/värmeverk. Den efterfrågan på salixbränsle som vi nu möter ute i Europa önskar dels torrare bränsle för sameldning i kolkraftverk, dels färsk salixflis till nybyggda kraftverk. Leverans av torr, lagringsbar pellets från salix står högt på önskelistan för de större energibolagen. I framtiden förväntas energiskog också komma att användas för produktion av biodrivmedel i form av olika alkoholer, DME och FT-diesel. Dessa nya användningsområden kommer att ställa nya krav på biomassans kvalitetsegenskaper. Biomassans kvalitetsegenskaper får därför allt större uppmärksamhet i växtförädlingsprogram, och i samband med detta har mätmetoderna för relevanta kvalitetsegenskaper utvecklats enormt på senare år. Idag finns "high-throughput" metoder för att mäta egenskaper såsom fukthalt i grön biomassa, barkandel, makrokemiska och kalorimetriska egenskaper som alla är viktiga i bedömningen av biomassans lämplighet som råmaterial för exempelvis drivmedel. Även andra egenskaper som t.ex. kol- och ligninhalt kan analyseras snabbt med nya metoder (t.ex. differentiell scanning kalorimetri och termogravimetrisk analys) och är också intressanta ur ett växtproduktionsekologiskt perspektiv

Vårt arbete rörande genetisk markörteknik, baserat på ingående kunskaper om odlings-, resistens-, tolerans- och kvalitetsegenskaper, kommer att gynna det framtida förädlingsarbetet med att ta fram nya salixsorter. Förädlingsarbetet kommer att gå fortare och kunna göras mer kostnadseffektivt även med hänsyn till växtegenskaper som inte har varit huvudfokus i det pågående SAMBA arbetet, exempelvis egenskaper som påverkar miljönyttan eller biomassans kvalitetsegenskaper.

Nya sorter av salix är viktiga inte bara för den framtida utvecklingen i Sverige utan internationellt. Utvecklingen och försäljningen av salix har tidigare varit koncentrerad till Sverige. Dock har under de senaste åren intresset för salix ökat starkt i andra europeiska länder. Marknadspotentialen utanför Sverige är större än här hemma och ger därmed underlag för en lönsam produktutveckling och sortframställning. Salixenergi Europa AB, har sedan 1 november 2010 ansvaret för sticklingsproduktion, försäljning av sortmaterial, samt olika entreprenadtjänster i samband med salixodlingar. Salixenergi Europa AB spelar en viktig roll i sticklingsproduktionen och kommersialiseringen av salixsorterna. Behovet av biobränsle är stort i Europa och alltför större energibolag letar efter lösningar att ordna en egen försörjning av bränslen, genom att i egen regi, eller på kontrakt, anlägga storskaliga odlingar av salix. Sorter och kunskap kring salixodling finns hos Lantmännen, som därför ofta blir kontaktade och anlitade för att diskutera dessa frågor. Ännu så länge har Lantmännen en unik ställning vad gäller salixsorter för bioenergi ändamål. Lantmännens sorter testas sedan några år tillbaka även i USA och Kanada. Det försprång Lantmännen nu har med ett fungerande förädlingsprogram är viktigt att upprätthålla. För att fortsättningsvis kunna hålla en hög kompetens i förädlingen så deltar Lantmännen i SAMBA-projektet.

Vi ser ännu bara början på en expansion av storskalig salixodling. Det är därför viktigt att en fortsatt kompetens upprätthålls i Sverige kring forskning och förädling av salix.

