Slutredovisning av projektet

Titel: Karakterisering av Fusarium-resistent havre (H1133073)

Olof Olsson
CropTailor AB

1. Målsättning

Målsättningen med detta projekt var att fullfölja screeningen av vår mutationspopulation i havre för att identifiera Fusarium-toleranta havrelinjer. Vi skulle också utveckla alternativa infektionesmodeller för att kunna välja ut de bästa linjer för en mer detaljerad molekylär analys. Dessa linjer skulle sedan användas som en modell för att förstå resistensmekanismer. Denna kunskap leder i förlängningen till en identifiering av molekylära markörer för Fuasrium resistens. Sådana markörer är mycket användbara och i princip nödvändiga för att en effektiv förädling av *Fusarium*-resistenta havresorter skall kunna ske.

2. Bakgrund

Höga halter av mykotoxiner är ett vanligt problem på cerealier. De lokala variationerna är stora och för havre har under de senaste åren i genomsnitt 20% eller mer av skörden legat på så höga DON värden att den inte går att använda som grynhavre. I flera fall har även gränsen för foder passerats och partierna måste brännas. Även om om mykotoxinvärdena kan gå upp och ner under enskilda år, mycket beroende på hur mycket nederbörd som råkar falla under kritiska perioder i fröutvecklingen, så är den långsiktiga trenden att halterna ökar kontinuerligt år efter år. Problemet kommer därför inte försvinna av sig själv utan det kommer att krävas rejäla satsningar på forskning och utveckling för att komma till rätta med det hela. Hittills har den mesta fokus inom Fusariumforskningen lagts på att beskriva hur infektioner ser ut i fält, vilka lokaler som är mest infekterade, hur variationen ser ut från år till år och hur väder- och odlingsparametrar påverkar DON halterna som används som ett slutligt mått på problemet. Mycket lite resurser har lagts på att förstå själva mekanismerna för sjukdomen, interaktioner mellan värd och patogen och för att utveckla själva genetiken, dvs identifiera kritiska resistensmutationer för att få fram resistenta linjer.

I detta projekt ville vi utnyttja vår mutationspopulation på havre för att få fram resistenta linjer. Vi ville därefter testa sådana linjer i fält och slutligen använda dem i jämförande molekylära studier med marknadssorter, fr.a. Belinda som vi använder som vår kontrollorganism, för att kunna förstå sjukdomsmekanismer och identifiera gener som ligger bakom den ökade resistensen i våra linjer.

3. Material och metoder

3.1 Analysmetoder

I detta projekt har vi rutinmässigt utnyttjat ett spektrum av olika metoder inkluderande diverse molekylärbiologiska som mRNA analys, kloning, sekvensering, PCR etc, biokemi, analytisk kemi, mikroskopi, odlingar och fältstudier. Vi har också använt oss av avancerade metoder för databearbetning och bioinformatik.

3.2 Screening efter Fusariumtoleranta linjer från en mutationspopulation

Vi har tidigare utvecklat en mutationspopulation i havre, en s.k. TILLING-population som har en mycket stor genetisk variation (Chawade et al, 2010; Sikora et al, 2011). Genom att utveckla specifika analysmetoder, och genom att screena denna population efter specifika egenskaper har vi gång på gång kunna visa vilken enormt stor variation det finns i populationen. Vi har identifierat hög-betaglukan havre (Sikora et al, 2013), hög- och lågligninhavre (Vivekanand et al, 2014), hög-proteinhavre (Sunilkumar et al, 2015, in preparation), hög-avenantramidhavre (Oswaldo et al, 2015 in preparation) och hög-sterolhavre (Vinnovaprojekt). Vi utvecklade också en *in vitro* infektionsmodell för havre och *Fusarium* (Sikora et al, 2011). Genom att placera 5 oskalade kärnor per TILLING-linje på en vattenagaryta, infektera dessa med 20 µl av en lösning som innehåll ca 5000 *F. culmorium* makrosporer per µl och därefter selektera ut de linjer vars kärnor kunde gro och utveckla skott och/eller rötter trots detta enorma patogentryck, kunde vi identifiera ett antal linjer ur populationen som potentiellt var *Fusarium* resistenta/toleranta. Belinda, som var utgångsgrödan för mutagenesen och därför fungerade

som kontroll, överlevde aldrig denna selektion trots att 100-tals kärnor testades från flera olika Belindapartier. Totalt sätt testade vi 2300 linjer ur havremutationspopulationen med denna assay. Vi fick då fram 102 linjer (CT-linjer) där kärnorna visade på någon typ av groning och ett 30-tal linjer där både skott och rötter kom fram. Detta är endast ca 1% av alla testade linjer, dvs selektionen var mycket tät.

3.3. Blominfektionsmodell for Fusarium

Havreplantor odlades upp under optimala och kontrollerade former i en klimatkammare (Fytotronen, SLU, Alnarp). Under tidig blomning (Zadokstadium 61-65) sprayades vipporna med 5 x 700000 F. gramniareum sporer. Sprayningen gjordes från olika vinklar för en jämn spraining av sporerna över hela blomman. Därefter täcktes blomman för att ge en jämn fuktighet runt blomman. Kontrollplantorna sprayades istället med motsvarande volym vatten. Prover för RNA och proteinisolering togs därefter dels odelbar efter sprayning (0-prov) dels vid 4 timmar, 1 dag, 2 dagar och 4 dagar efter infektionsstart. Alla prover frystes ned direkt i -80 grader. Växterna fick därefter utvecklas vidare och prover för DON analys togs på mogna kärnor.

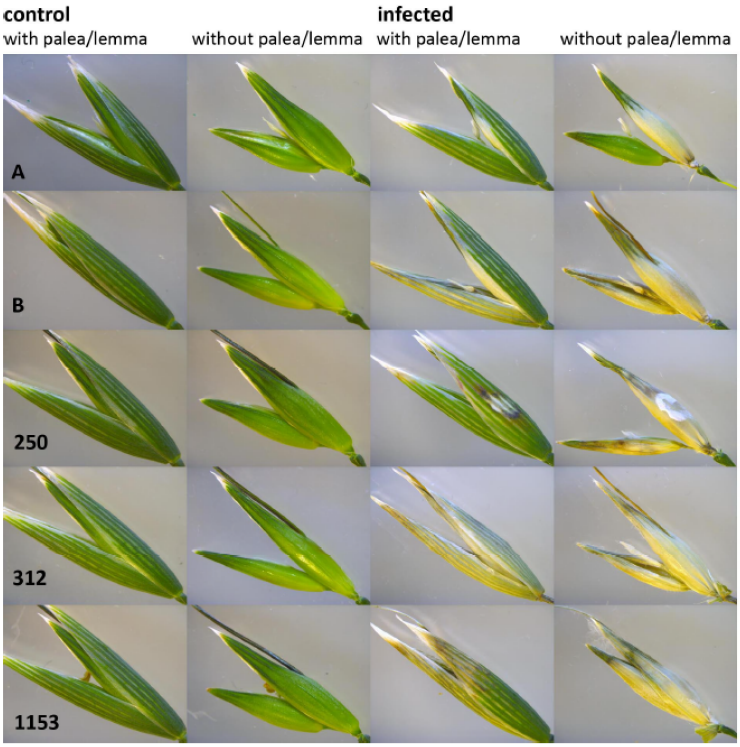


Figure 1. Havreblommor 10 dagar efter infektion med Fusarium-sporer
Från topp till botten: Argamak, Belinda CT250, CT312, CT1153

3.4. Havreomic (transkriptomik och proteomik)

Vi konstruerade cDNA bibliotek från mRNA isolerade från olika organ och utvecklingsstadier hos Belinda (stjälk, blad, rot, krona. blommor, frön, stressade och ostressade planter etc) och sekvenserade dessa. Totalt har vi nu ca 20 miljarder sk. Illumina reads och också ett stort antal sekvenser från andra plattformar (454, IonTorrent etc). Dessa har databearbetats och satts ihop till s.k contigs. För närvarande har vi 190,261 contigs med en 247 gångers täckning 247x och en genomsnittslängd (N50 värde) på 858 bp. Vi har också annoterat hela datasettet med BLAST, Gene-Ontology och Interproscan. Detta gav 71,921 GO-annoterade sekvenser och ytterligare 21,407 där vi inte fick några signifikanta GO BLAST hits. Vi tror att vi nu har ca 90%-ig täckning av hela transkriptomet i havre (Sikora et al, 2015, submitted).

Från transkriptomikdatan har vi genererat en havre protein databas på ca 50000 olika proteiner. Denna databas är unik i världen. Genom att utnyttja LC-MS/MS LTQ-Orbitrap XL massspektrometri analys

kombinerat med ett optimerat protokoll för att extrahera proteiner från havrevävnad (Sunil et al, 2015) har vi konfirmerat existensen av ca 20000 av dessa proteiner.

3.5. Fältförsök med Fusarium-resistenta havrelinjer

Eftersom växt-patogen interaktioner är mycket komplexa och ett flertal faktorer påverkar både patogenen och värdväxten vid odling i fält verifierade vi resistensen hos de *in vitro* selekterade CT-linjerna även i fält. För att eliminera lokala skillnader i infektionsgrad infekterades havreplantorna (på två-bladsstadiet) med en ymp bestående av en blandning av *F. culmorium* och *F. graminaerum* och vattnades därefter regelbundet för att ökan sannolikheten för en jämn och kontrollerad infektion.

3.6. DON assay

Eftersom de stickor för att mäta DON som finns kommersiellt tillgängliga varken är särskilt känsliga eller kvantitativa utvecklade vi en HPLC baserad metod för DON som är både kvantitativ och känslig. Dessutom blev priset per analys lägre eftersom vi kör metoden själv utan några mellanhänder. Vi utgick då från ca 250 kärnor för att få ett bra genomsnittsvärde av materialet. Efter malning av dessa vägdes 6,25g av havremjölet upp, placerades i 50ml Falcon rör och 25ml acetonitrile (84%) tillsattes. Efter extraktion och centrifugerna renades DON fram i en MycoSep 225 kolumn (Romer Labs), eluatet löstes i 10% metanol, 5mM ammonium acetate och analyserades med HPLC.

Linje nr	Block 1	Block 2	Block 3	Genomsnitt	Kommentar
312	1	1	2	1,3	plats 1 av 43
486	0	2	2	1,3	plats 1 av 43
1331	2	2	2	2	
313	7	1	0	2,7	
1153	2	3	3	2,7	
407	4	2	-	3	
1258	3	1	5	3	
399	2	5	3	3,3	
477	6	1	3	3,3	
289	4	3	-	3,5	
152	3	1	7	3,7	
323	5	3	3	3,7	
388	1	5	6	4	
330	6	3	4	4,3	
398	4	4	5	4,3	plats 15 av 43
Sang	5	7	4	5,3	plats 26 av 43
Kerstin	7	6	8	7	plats 38 av 43
Belinda	8	7	8	7,7	plats 39 av 43

Tabell 1. Skattning av *Fusarium* tolerans av 43 linjer i ett infektionsförsök i fält på Borgeby 2011. CT linjer och marknadssorter rankade efter infektionsgrad.

4. Resultat

4.1. Fältförsök med Fusarium-toleranta linjer 2011 och 2012

Vi utförde två fältförsök i Borgeby tillsammans med Hushållningssällskapet (HS). Första året satte vi ut 43 av de CT-linjer som vi hade identifierat som mer Fusarium toleranta än Belinda i den Petriskål-test som vi utvecklade. Vi planterade linjerna i rader om 20 plantor och varvade varje rad med

marknadssorterna Belinda, Sang eller Kerstin. Sammanlagt testade vi tre olika block där våra linjer var utplacerade i slumpmässig ordning i varje block för att jämna ut eventuella lokala effekter.

Efter ca 2 veckor, när plantorna befann dig på två-bladsstadiet, ympades försöket med en blandning av infekterade havre och vetekärnor enligt samma rutiner som tidigare utvecklats för infektionsförsök med vete och korn. De *Fusarium* som användes som ympmaterial i försöket har ursprungligen isolerats från olika växtodlingsförsök (Hans Pettersson, SLU). Vårt havreförsök följde således samma, tidigare utarbetade rutiner för Fusariuminfektion, som för andra grödor detta för att så långt som möjligt eliminera osäkerheter i själva försöksuppställningen.

Eftersom *Fusarium* symptom på havre inte alltid är så tydliga, lät vi experter på med en stor erfarenhet av att läsa av *Fusarium*-infektion göra själva graderingen. Graderingen gjordes utan någon vetskap om vilken linje som var vilken på 10 slumpmässigt valda vippor från 10 olika plantor i varje rad om 20 plantor från alla tre blocken. En nio-gradig skala användes där ingen synlig infektion graderas som 1 och mycket kraftig infektion (alla vippor) som 9. Vi fick då fram ett värde för varje linje i varje oberoende block. Ett genomsnitt för varje linje räknades också ut. Det visade sig då att de 25 mest toleranta linjerna var CT-linjer. Sang på 26 plats var den bästa marknadssorten. Kerstin kom på plats 38 och Belinda 39 (av 43) (Tabell 1). Allra bäst var linjerna CT312 och CT486 där i genomsnitt endast 1,3 småax var infekterade. Det var alltså en stor skillnad i detta försök mellan de bästa CT linjerna och marknadssorterna. Tyvärr hade vi vid detta tillfälle för lite material för att även kunna mäta DON-halter i de skördade kärnorna från de testade linjerna.

Sort eller CT linje	Block	DON (µg/kg)	Kommentar
666	I	548	plats 1 av 63
485	I	562	2
1746	I	575	3
1767	I	601	4
486	I	679	5
409	I	754	6
411	I	758	7
312	I	798	8
224	I	800	9
407	I	801	10
1153	1	860	11
313	I	983	12
652	I	985	13
152	I	926	14
445	I	1042	plats 15 av 63
Belinda	I	1571	plats 33 av 63
Kerstin	I	2399	plats 53 av 63
Ivory	I	2468	plats 55 av 63

Tabell 2. Preliminära DON mätningar på 63 linjer i ett infektionsförsök i fält på Borgeby 2013.
Alla DON värden anges i µg/kg. Värdena är ett genomsnitt av tre mätningar. Samtliga mätningar är från block I som var mest infekterat.

År 2012 upprepades fältförsöket i Borgeby, denna gång med 78 olika linjer och med 495 kärnor per linje. Tyvärr blev det tekniskt strul med bevattningsanläggningen vilket ledde till att varken marknadssorter eller muterade linjer blev infekterade. Vi fick dock tillbaka tillräckligt med material för att kunna göra DON assays. DON mätningarna verifierade dock att plantorna inte hade infekterats, de låg i samtliga fall runt ca 500 µg/kg, vilket är bakgrundsnivån, och det var inga linjer som skiljde ut sig

åt på något håll. Vi kunde tyvärr därför inte dra några egentliga slutsatser av detta försök. Positiva var att våra bästa linjer hade uppförökats ett varv så att vi nu hade gott om utsäde.

4.2 Fältförsök med Fusarium-toleranta linjer 2013

Under 2013 lade vi ut 60 CT linjer i Borgeby i två olika block om en kvadratmeter. Vi tog också med Belinda, Kerstin och Ivory som kontroller. Planen var att läsa av infektionssymptom på samma sätt som år 2011, och dessutom göra ett antal DON mätningar på materialet. Rent tekniskt fungerade både ympning och bevattning, men trots detta blev det inga synbara symptom på infektion i något av de två blocken. Eftersom vi hade rätt stora rutor ute kunde vi dock skörda ett tillräckligt med kärnor för att göra DON assyas**.** Vi mätte först DON i Belinda, Kerstin och Ivory, dvs. i de marknadssorter vi hade med i försöket för att bekräfta infektion. Från varje sort och ruta togs tre prov, från vilka ett genomsnittsvärde sedan räknades ut. Det visade sig då att block II var i princip oinfekterat, vi kunde där endast detektera DON halter på omkring 500-600 µg/kg vilket enligt vår erfarenhet är det bakgrundsvärde man alltid ser på i princip oinfekterat material som inte har odlats under helt sterila former. I block I hade däremot infektionen fungerat bättre och där låg värdena på mellan ca 1500 och 2500 µg/kg. Gränsvärdet för grynhavre är 1750 µg/kg så två av de tre sorterna klarade således inte denna gräns. Vi koncentrerade därför mätningarna på block I och mätte igenom alla 60 CT-linjerna. Värdena varierade mycket, från som högst 3500 µg/kg till som lägst ca 500. 36 av linjerna låg under gränsvärdet för grynhavre (1750 µg/kg) och 32 var lägre än Belinda som var lägst av marknadsorterna. 14 CT linjer låg under 1000 µg/kg (Tabell 2). Intressant att notera är att bland dessa 14 linjer finns flera av de som var rankade som minst infekterade i Borgebyförsöket 2011. Av de 10 linjer som vi, baserat på diverse laboratorieförsök, t.ex. blad-assays tidigare hade bedömt som bäst var 7 med på bästa listan för DON mätningarna från Borgebyförsöker 2013. Det ser således ut som vi har en god överensstämmelse mellan våra olika försök. Utan tvekan har vi nu identifierat några mycket lovande Fusarium-toleranta CT-linjer, som t.ex. CT312, CT313, CT152, CT407, CT411, CT486, CT1153, CT1746 och CT1767.

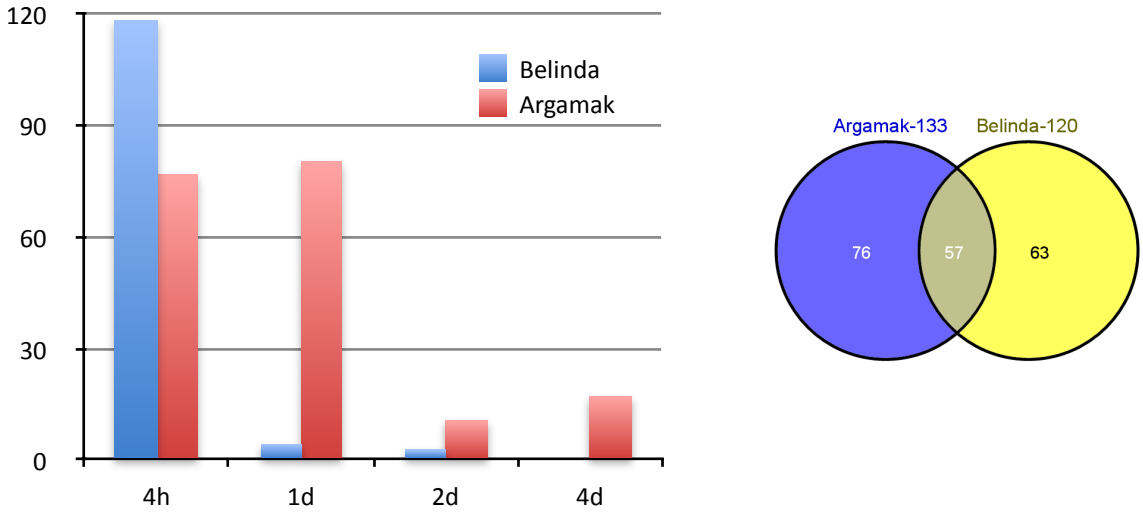


Figure 2. Differentiellt uttryckta proteiner i Belinda och Argamac
Diagrammet visar antal uttryckta proteiner (Y-axel) vid olika tidpunkter efter induktion av infektion (X-axel. Ventdiagrammet till höger visar antalet unikt uttryckta proteiner.

4.3. Utveckling av proteomik för Fusariuminfektion

Vi infekterade unga blommor från Belinda och den ryska, Fusariumtoleranta havresorten Argamac med vår egenutvecklade sprayningsteknik. Vi tog därefter ut prover för proteomikanalys. Efter

proteinextraktion, rening i Polyacrylamidgeler och trypsinering separerades peptiderna i ett LC-MS/MS system. Detta gav ett antal toppar som var och en motsvarar en specifik peptid. Efter det att aminosyrasekvensen från respektive peptid räknats fram kunde de identifieras i vår proteinsekvensdatabas. Detta visade att flera peptider reglerades olika dels mellan de olika linjerna och dels under olika tider i infektionsförloppet (figur 2). Som framgår så inducerades både fler proteiner och flera unika proteiner i Argamac jämfört med Belinda. Flera av dessa proteiner är således potentiella markörer för Fusariumtolerans.

En närmare analys av vilka proteiner som uttrycktes i de två sorterna under infektionsförloppet gjordes också. Detta visade att gener under annoteringen metabolism och proteinsyntes var de vanligaste, förutom ett stort antal med fortfarande oklar funktion.

5.6 Korsningar och sortutveckling

I vår mutationspopulation har varje enskild linje ett antal (ca 1 miljon) olika slumpmässiga mutationer, varje mutation unik för den specifika linjen. Ingen linje är således den andra lik och de resistensmekanismer som ligger bakom varje enskild linje kommer därför att skilja sig åt. Enligt samma resonemang kommer därför också olika enskilda mutationer som ger upphov till resistens vara additiva och därför förstärka varandra. En ihopkorsning av två resistensmutationer i samma linjer minskar således sannolikheten för att svampen skall kunna överbrygga denna dubbla resistens. En fördel med att korsa CT linjerna med andra sorter är att man då kan se om egenskapen nedärvs stabilt. På lite längre sikt (ca 5 år) kommer detta projekt med största sannolikhet därför att leda till en utveckling av nya havresorter med en ökad *Fusarium*-tolerans och därmed lägre mykotoxinhalter i kärnan. I vissa fall kommer även resistenta vete- och kornsorter kunna utvecklas baserat på den kunskap som kommer fram här. Vi samarbetar redan med Lantmännen Lantbruk i detta projekt, men även andra förädlingsföretag som t.ex. Graminor och Boreal skulle kunna bli aktuella när det gäller själva sortutvecklingen.

5. Publikationer

Detta projekt har endast pågått under två år och därför ligger stora delar av detta arbete fortfarande i manuskriptform. Trots detta har en vetenskaplig publikation och ett examensarbete redan kommit ut. Vårt arbete har också fått uppmärksamhet i Lantmännens tidning C (nr 3/4, 2013).

Leonova, S, Levander, F, Olsson, O and Chawade. C. (2015). Proteomic analysis of developing seeds from several oat *Fusarium* tolerant varieties during the infection process. Manuscript in preparation.

Olsson, J (2014). Proteomics comparison of resistant and susceptible oat varieties to reveal proteins involved in resistance. Master theses.

Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J. and Olof Olsson. (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics and breeding. International Journal of Plant Genomics. Article ID 314829, 13 pages

6. Slutsatser

Vi har demonstrerat att den genetiska vägen, dvs att ta fram nya havresorter med resistens mot Fusarium, är en möjlig väg att gå. Ut ett långsiktigt perspektiv är Fusariumresistenta linjer ett mycket bra komplement till nuvarande odlingsstrategier för att undvika Fusariouminfektion med medföljande mykotoxinproduktion. Erfarenhetsmässigt vet vi att en inbyggd resistens i plantan kommer att leda till mycket lägre mykotoxinhalter på ett mer reproducerbart och stabilt sätt än enbart diverse odlingsåtgärder. En resistent gröda blir mindre påverkad av svampen oberoende av väder och odlingsförhållanden. Svårigheten med resistensförädling mot Fusarium i havre är att det inte finns några riktigt bra resistenta linjer att utgå ifrån i förädlingspopulationerna. Genom att ta fram en havremutationspopulation med en mycket stor variation har vi skapat förutsättningarna för att identifiera nya genkällor för resistens. Från detta arbete har et 10-tal linjer nu kommit fram, som skulle kunna användas i diverse förädlingsprogram.

7. Resultatförmedling till näringen

Resultatet av arbetet från detta projekt har presenterats som föredrag vid den internationella havrekonferensen i Beijing, Kina, 2012, vid en internationell bioteknik-konferens i Kerala, Indien, 2012, vid Sveriges Cerealistförenings årsmöte 2012, vid Föreningen för Sveriges Spannmålsodlares årsmöte 2013 och 2014, vid Föreningen Foder och Spannmål 2013, Kostdagarna kost och hälsa och Canadian Oat Workers möte 2014. Dessutom har projektet presenterats vid åtskilliga mer slutna möten med diverse samarbetspartners och andra intresserade, tex Venture Southland Nya Zeeland, Lantmännen Lantbruk, SW Seed, Swedish Oat Fibre, Oatly, Frebaco, Industrifonden, Almi Invest, GU-Holding etc. Vi har också haft åtskilliga projektmöten med diverse forskarkollegor inom akademin både i Sverige (SLU Alnarp, SLU Skara, Umeå Plant Science Center) och utomlands (Kina, Indien, Bangladesh, Iran, Bolivia, England).