

Slutrapport för projektet : Tiamin – ett stärkande växtskyddsmedel? (H0933088)

Bakgrund

I projektet har vi undersökt om tillsats av vitamin B1 (tiamin) kan förstärka växters försvarskraft mot insektsangrepp. Vid projektets början fanns redan preliminära resultat från tidigare studier utförda av en egyptisk gästprofessor, Afaf Hamada i min forskargrupp. Hon hade visat att sprejning av kornplanter med tiaminlösning eller blötläggning av kornfrön i tiaminlösning hade lett till att populationstillväxten av bladlöss påverkades negativt på dessa planter. I dessa studier hade hon använt unga kornplanter odlade i jord under kontrollerade odlingsförhållanden. Plantornas tillväxt var densamma oavsett om de var vitaminbehandlade eller inte. Syftet med projektet var att göra en grundligare studie om tiamin kan påverka växternas kvalitet som värdväxter för bladlöss för att undersöka möjligheterna att använda denna metod som en alternativ bekämpningsstrategi.

Material och metoder

Växtmaterial och odling. Vi har använt korn (*Hordeum vulgare* L.), sorterna Lina, Barke, Golf och C.I. 16145 och ärt (*Pisum sativum* L.) sorten Fintva, erhållen från Rolf Stegmark, Findus Sverige AB, Bjuv. Frön steriliserades, groddes i petriskålar och planterades i krukor i vermikulit och perlit (1: 1). Krukorna vattnades med en näringslösning (Metwally et al., 2003). Plantorna odlades i en odlingskammare med 16 t ljus/8 t mörker med 200 μmol fotoner $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vid 20-22 °C.

Tiaminbehandlingar. Tiamintillsats: Tiamin hydroklorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tillsattes näringslösningen till olika slutkoncentrationer under 5 dagar. Tillsatsen upphörde de sista 24 timmarna innan bladlöss sattes på plantorna. Fröbehandling: Ytsteriliserade frön blötlades med luftgenombubbling i vatten (kontroll) eller olika tiaminkoncentrationer under 10 timmar (korn) eller 8 timmar (ärtor). Doftbehandlingar: 100 μl vatten (kontroll) eller tiaminlösning applicerades på ett filterpapper som under 2 timmar fastsattes i övre delen av en 4 L polykarbonatbur som innehöll en planta. Efter behandlingen togs buren bort och plantan fick stå öppet under 2 timmar innan bladlöss sattes på.

Bladlusodling och behandlingar. Individer av havrebladlus, *Rhopalosiphum padi* (L.) var insamlade i fält i närheten av Uppsala, odlade i växthus och erhöles från Dr. V. Ninkovic. Individer av sädesbladlusen (*Sitobion avenae*) insamlades i ett vetefält i närheten av Alnarp, odlades i växthus och erhöles från Prof. I. Åhman. Ärtbladlöss (*Acyrtosiphon pisum* H.) erhöles från Rolf Stegmark, Findus AB. De hade insamlats på fält i närheten av Bjuv och odlats i växthus. Bladlössen växte på planter i ett odlingsrum vid 20 °C, 50% fuktighet, fotoperiod 16 t ljus/ 8 t mörker med 100 μmol fotoner $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Planter som användes för bladluskolonierna inspekterades visuellt för växtvirussymptom och inga sådana symptom observerades. När effekter på *R. padi* med och utan *Rhopalosiphum padi* virus (RhPV) jämfördes, odlades bladluskolonier med och utan virus i separata odlingskammare. För att starta virus-fria bladluskulturer, hölls nyfödda nymfer åtskilda och testades med hjälp av RT-PCR om de innehöll bladlusvirus med hjälp av den metod som beskrivits i Ban et al., (2007). Prover togs även under experimentets gång för att undersöka status vad gäller bladlusviruset. Bladlusbehandlingar: Sju dagar gamla kornplanter försågs med en plastcylinder (5 cm lång och 3 cm diameter) runt första bladet. Tjugo ovingade bladlöss (blandade generationer) placerades försiktigt inuti cylindern med hjälp av en pensel. Cylindern förslöts sedan med skumgummi i båda ändar. Kontrollplanter försågs med likadana cylindrar utan bladlöss. Efter

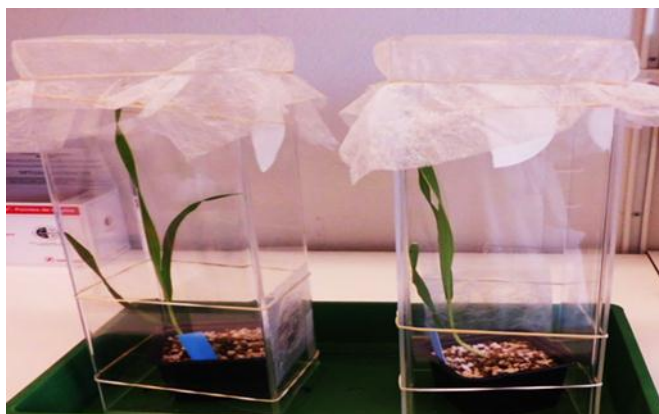
2 timmar togs övre skumgummit bort och krukorna placerades i var sin genomskinlig bur (10 x 10 x 40 cm) som upptill var försluten med nylonnät. Nästa dag togs cylindern bort. I experiment med ärtbladlus placerades cylindern mellan första och andra bladet på 15 dagar gamla ärtplantor inuti den större buren.

Bladlössens livslängd och förökningsförmåga. Vuxna bladlöss placerades på andra bladet på kornplantor av sorten Lina i 2-3 blads stadium. De placerades inuti 50 ml genomskinliga polystyrenrör i odlingsrum under förhållanden som ovan beskrivet. I övrigt utfördes experimentet som i Ban et al., 2008. Varje behandling utfördes med 15 upprepningar.

Test av bladlusbeteenden. Havrebladlusens respons på dofter undersöktes i en olfaktometer med två anslutningar i enlighet med Pettersson, 1970. Experimenten utfördes som i Ban et al., 2008. Antalet observationer jämfördes med Wilcoxon matched-pairs tests. Dofterna som bladlössen kunde välja mellan var antingen kornplantor från plantor vars frön blötlagts i tiaminlösning eller i vatten; kornplantor i burar med filterpapper indränkta i tiaminlösning eller vatten; eller bägare med 10 ml vatten alternativt tiaminlösning (1 mM eller 2 mM).

Odling av bladlöss på artificiella dieter. Sammansättningen av den artificiella dieten var som i van Emden (2009). Tiaminkoncentrationen var antingen 0 μM , 75 μM (dietens recept) eller 150 μM . Näringslösningen placerades mellan två lager av Parafilm M vid ena änden av cylindrar av akryl (2.4 cm x 2.4 cm in diameter) medan den andra änden av cylindern var i en petriskål där bladlusen placerats. En nymf av *R. padi* placerades på varje portionspåse och alla nymfer som föddes från varje bladlus räknades och togs bort upp till 33 dagar. Tio bladlöss testades parallellt för varje tiaminkoncentration. Experimentet utfördes i ett odlingsrum under förhållanden som för bladlusodlingen beskriven ovan.

Real time RT-PCR. Analyser utfördes i prover från plantor före och 24 timmar efter att bladlöss satts på dem. Tjugo bladlöss sattes på 9 dagar gamla plantor på första bladet. Plantorna kom från frön som blötlagts i vatten eller tiamin som ovan beskrivits. Bladet frystes i flytande kväve och förvarades i -80°C till dess RNA extraherades. För detaljer angående dessa experiment hänvisas till manuskript Hamada och Jonsson, (se nedan) som kan skickas in till SLF om så önskas.



Burar för studier av bladlusens populationstillväxt

Resultat

Populationstillväxten av havrebladlus på kornplantor reduceras markant om kornfröna förbehandlas med tiamin

Ett stort antal experiment visar att tiaminbehandling av frön har en kraftigt reducerande effekt på populationstillväxt av bladlöss. Förbehandling av frön eller tillsats av tiamin till näringslösning i en koncentration av 150 μM resulterar i att bladlustillväxten reduceras till ungefär 60% av den på en kontrollplanta (Fig.1). Högre koncentrationer av tiamin än 150 μM ger inte starkare effekt (Fig.1). Om man följer populationstillväxten dag för dag visar det sig att effekten är något starkare de första två dagarna, men sett över en veckas tid håller den sig till omkring 40% reduktion (Fig.2). Effekten har visats i fyra olika kornsorter (Fig. 3) och bedöms därmed vara generell i korn. En närmare studie av olika aspekter av havrebladlusens livslängd och reproduktion visade att den reproduktiva livslängden samt antal avkomor reduceras på plantor som tiamin-behandlats. Däremot påverkas inte antal dagar innan reproduktionen påbörjas (Tabell 1). Effekterna av tiaminbehandling var för alla faktorer något starkare på virusinfekterade bladlöss än friska bladlöss. Det virus som här avses är det s.k. havrebladlusviruset, som vi funnit vara vitt spridd i bladluspopulationer i Sverige (Ban et al., 2007). Studier av bladlusens acceptans för sin värdväxt visade att även denna påverkas av tiaminbehandling, så att den reduceras till 60-70% av den på en kontrollplanta (Fig. 4). Behandlingar av plantorna med doften av tiamin under 2 timmar visade att även detta påverkade plantorna så att de blev sämre värdväxter för bladlöss som sattes på upp till 7 dagar efter behandlingen (Fig. 5).

Tiaminbehandling reducerar populationstillväxt av sädesbladlus på korn och ärtbladlus på ärt

Studier av sädesbladlus på kornplantor visade att populationstillväxten av sädesbladlus reducerades på tiaminbehandlade kornplantor (Tabell 2).. Studier av tillväxt av ärtbladlus på ärtor visade också lägre populationstillväxt på tiaminbehandlade växter. Detta visar att tiaminbehandling påverkar olika arter av bladlus och har effekt både i tvåhjärtbladiga och enhjärtbladiga växter.

Tiamineffekten beror inte på direktpåverkan på bladlusen

För användning av tiamin i praktisk växtodling är det viktigt att utreda om effekten är direkt på insekten eller via påverkan på plantans metabolism. För att studera eventuella direkteffekter på bladlusen har vi låtit bladlössen leva på s.k. artificiella dieter, där de suger en näringslösning genom parafilm. Vid jämförelse mellan lösningar med och utan tiamin eller med en hög dos tiamin erhöles ingen skillnad i reproduktionsförmåga under trettio dagar, vilket tyder på att tiamin inte direkt påverkar bladlusens ämnesomsättning (Tabell 3). En annan fråga är om tiamin kan vara en repellent, d.v.s. att bladlössen skyr plantan på grund av lukten från tiamin (som innehåller svavel). Vi har studerat detta genom s.k. olfaktometertest, där bladlusen befinner sig i en kammare där den via luftströmmar kan känna dofter och kan välja att röra sig åt olika håll. Bladlössen kunde välja mellan kontroller och prover med tiamindoft. Resultaten visade att bladlössen inte reagerade på tiaminlukt, lukten av tiamin i kombination med kornplantor eller lukten av plantor som behandlats med tiamin (för resultat hänvisas till manuskript Hamada och Jonsson, se nedan).

Tiaminbehandling påverkar växternas genuttryck innan angrepp av bladlöss

I tidigare studier av tiaminbehandlade plantor har det föreslagits att effekter mot patogener är en s.k. *priming*-effekt, vilket innebär att växterna uppnår ett stadium av förberedelse och därigenom snabbare kan svara med försvarsreaktioner vid angrepp (Ahn et al., 2005; 2007). I dessa studier har skillnader i genuttryck mellan tiaminbehandlade och kontrollplantor observerats först när växten blivit infekterad. Vi studerade genuttrycket i kornplantor före och efter bladlusangrepp och fann skillnader innan angreppet, men inga ytterligare skillnader efter angreppet (Fig. 7).

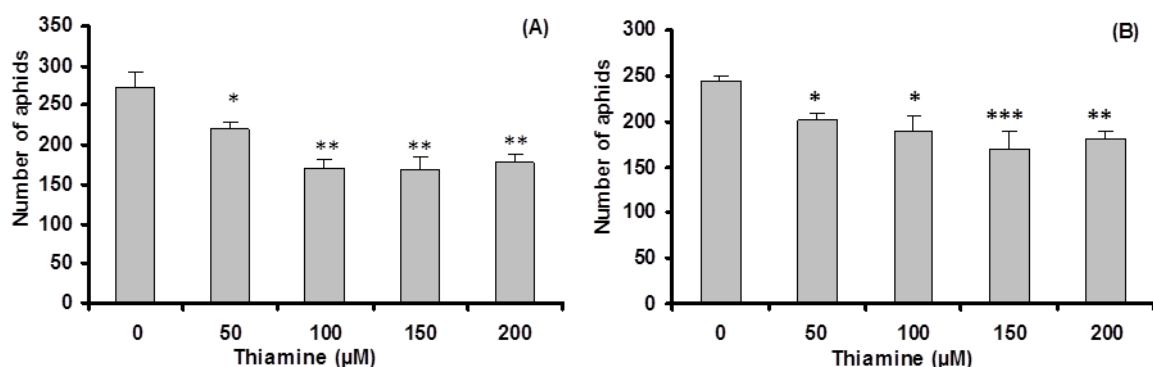


Fig.1. Effekt av olika koncentrationer av tiamin på populationstillväxt av havrebladlus på kornplantor. Sort= Lina. A: Tiamin tillsatt via näringslösning 6 dagar före experimentets början. B: Frön har blöttagts i lösning med tiamin under 10 h före sådd. n=5. Olika bokstäver ovanför staplarna anger statistiskt signifikanta skillnader (t-test).

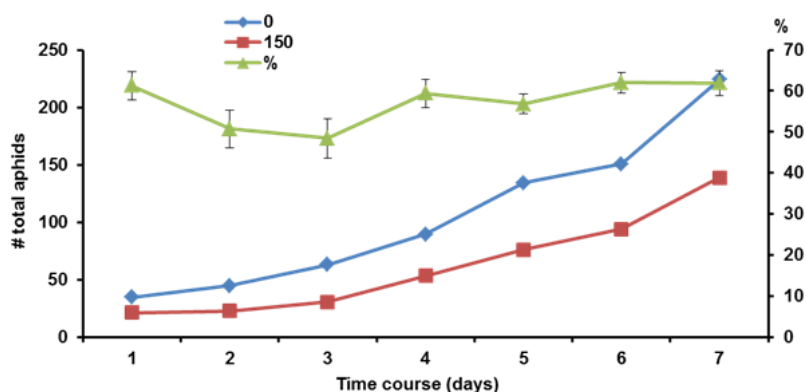


Fig. 2. Effekt av behandling av tiamin på populationstillväxt av havrebladlus på kornplantor under en veckas tid. Tjugo bladlöss sattes på varje planta vid försökets början och varje dag avslutades försöket med att räkna totala antalet bladlöss på en andel av plantorna. Frön har förbehandlats med 150 μM tiamin (röd linje) eller vatten (blå linje). Grön linje anger % bladlöss på behandlade plantor i förhållande till antal på kontrollplantor. Sort = Lina. n=5 för varje tidpunkt och behandling.

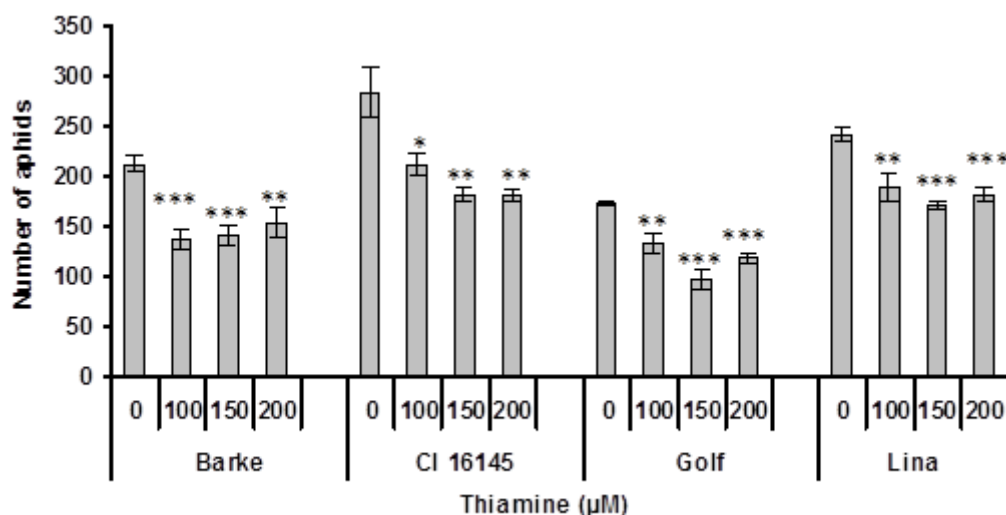


Fig. 3: Effekt av behandling med tiamin i olika koncentrationer på populationstillväxt av havrebladlus på fyra kornsorter: Barke, CI 16145 (CI), Golf och Lina. Försöken är utförda vid olika tidpunkter och resultaten kan inte jämföras sinsemellan. Medelvärden ($\pm$ SE) anges. $n=5$. Asterisker visar signifikanta skillnader mellan kontroller och behandlingar med t -test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

Tabell 1. Effekter av tiaminbehandling med 150 µM på livslängd och reproduktion hos friska och virusinfekterade bladlöss på kornplantor. ¹ Bladlössen bär på havrebladlusvirus (Ban et al., 2007). $n=15$. Siffror anger medelvärden ($n=15$). Asterisker anger signifikanta skillnader mellan behandlade och kontroller med Mann-Whitney test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

	Friska bladlöss		¹ Infekterade bladlöss	
	Kontroll	B1 (150 µM)	Kontroll	B1 (150 µM)
Dagar innan reproduktion	6,4	6,7	5,73	6,0
Livslängd (dagar)	28,3	26,7	21,93	18,2*
Reproduktiv livslängd (dagar)	16,3	14,1*	12,73	9,13**
Antal nymfer/individ	79,9	57,1 ***	60,87	36,0***
Antal nymfer/reproduktiva dagar	5,0	4,1**	4,79	3,6**

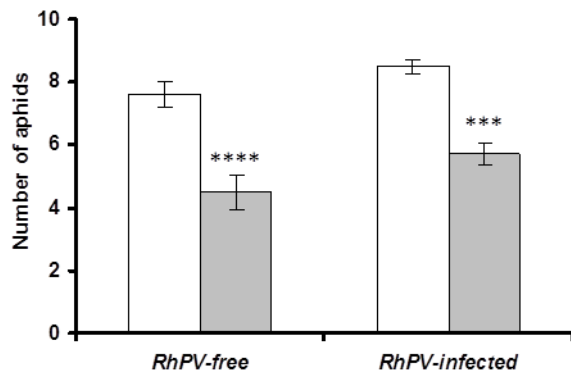


Fig. 4. Effekt av tiaminbehandling av kornplantor på bladlusacceptans. Sort= Lina. Frön har förbehandlats med vatten (vita staplar) eller 150 µM tiamin (grå staplar). Antal bladlöss av totalt 10 som äter på växten inom 2 timmar anges. Resultaten är medelvärden ($\pm$ SE). n=10. *** anger signifikant skillnad med $P < 0,05$ (t-test)

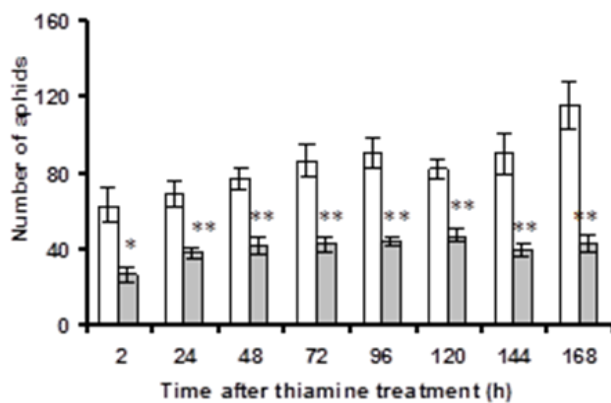


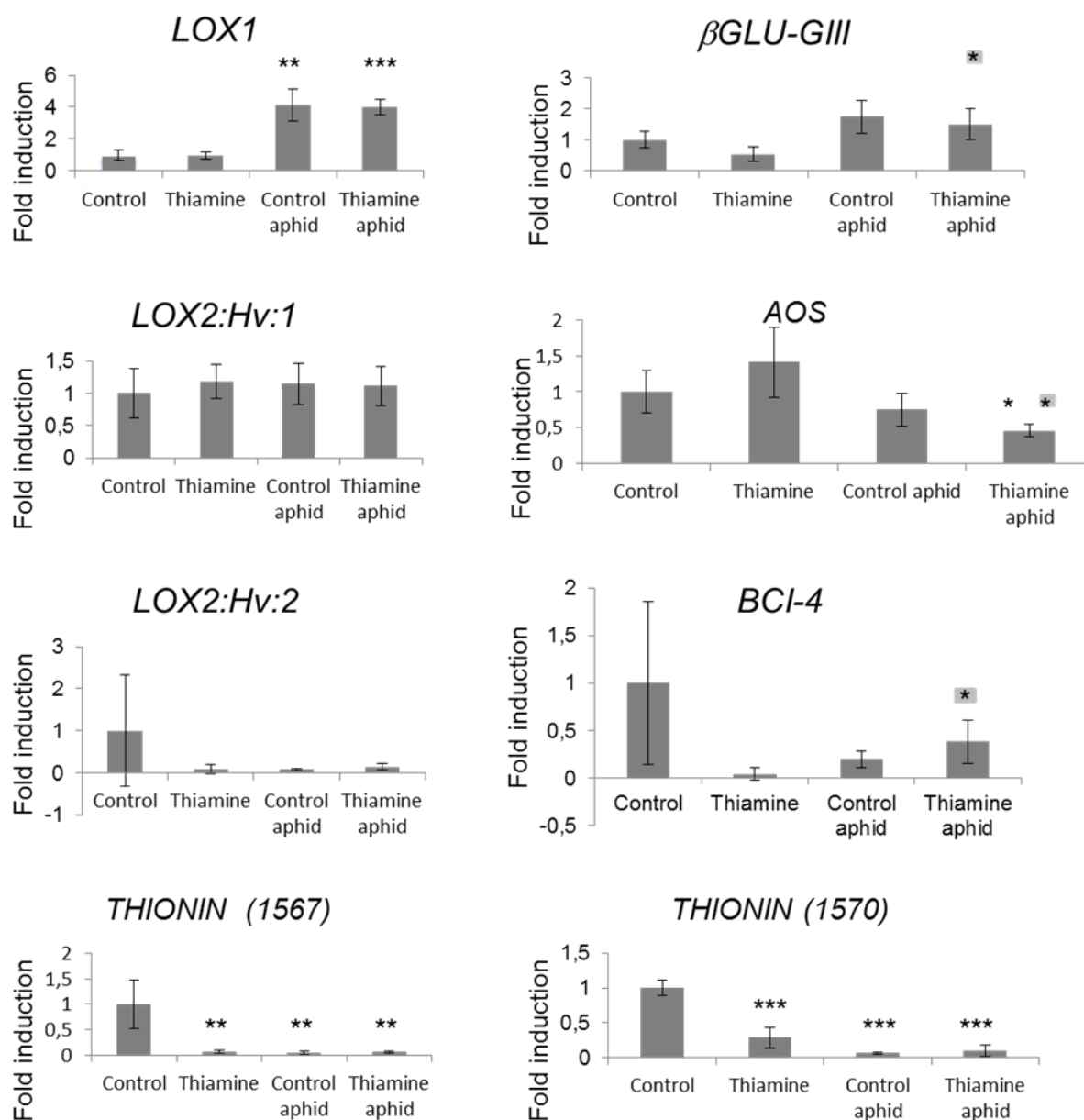
Fig. 5: Effekt av behandling av kornplantor med tiaminlukt på populationstillväxt av havrebladlus Sort =Lina. Tiamin (100 µl, 150 µM) har adderats till ett filterpapper som placerats inuti odlingsburen under 2 timmar. Tjugo bladlöss sattes på plantorna angivet antal timmar efter behandlingen och totala antalet bladlöss räknades efter 5 dagar. Resultaten är medelvärden ($\pm$ SE). n=4. Asterisker visar signifikanta skillnader mellan behandlingar och kontroller med t -test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$).

Tabell 2. Effekter av att blötlägga frön i tiamin på populationsutveckling av olika arter av bladlus. Frön av korn (Lina) respektive ärt (Fintva) blötlades i olika koncentrationer av tiamin eller vatten under 10 timmar innan groning. På nio dagar gamla kornplantor sattes antingen havrebladlus (*R. padi*) eller sädesbladlus (*S. avenae*) (10 bladlöss per planta). Totala antalet bladlöss räknades efter en vecka. På femton dagar gamla ärtplantor sattes 10 ärtbladlöss (*A. pisum*) per planta och totala antalet räknades efter två veckor. Resultaten är medelvärden ($\pm$ SE). n=5. Asterisker visar signifikanta skillnader mellan kontroll och behandling med *t*-test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$). NT = ej testat.

Tiamin (μ M)	<i>R. padi</i>	<i>S. avenae</i>	<i>A. pisum</i>
0	67.0 $\pm$ 3.6	23.0 $\pm$ 3.1	225.0 $\pm$ 13.7
50	NT	10.0 $\pm$ 1.7 *	80.7 $\pm$ 15.7 **
100	NT	12.3 $\pm$ 1.8*	129.0 $\pm$ 21.7 *
150	30.0 $\pm$ 7.6**	7.7 $\pm$ 2.3*	124.7 $\pm$ 15.9**
200	31.2 $\pm$ 2.8***	5.0 $\pm$ 2.0**	129.0 $\pm$ 7.0 **

Tabell 3. Antal nymfer av havrebladlöss som en bladlus producerat under 11 dagar eller 33 dagar. Bladlössen livnärde sig på artificiella dieter med olika tiaminkoncentrationer. n = 10 (11 dagar) och n= 3 (33 dagar). Inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna enligt *t*-test.

Tiamin (μ M)	Antal nymfer		
	0	75	150
11 dagar	9.30 $\pm$ 0.98	12.70 $\pm$ 1.56	8.70 $\pm$ 1.82
33 dagar	34.33 $\pm$ 4.70	40.67 $\pm$ 2.73	33.00 $\pm$ 4.36



Figur 7. Effekter av tiaminbehandling på genuttryck i kornplantor före och efter bladlusangrepp. Kornfrön (Lina) blötlades i tiamin eller vatten (kontroll) före groning. Plantornas första blad skördades för qPCR analys dag 9 eller dag 10, 24 timmar efter att 20 stycken havrebladlöss satts på varje planta. LOX = lipoxygenas, AOS = allenoxid syntas, GLU = glukanas, BCI4= "barley chemically induced 4" (Besser et al., 2000). Data visar medelvärden $\pm$ SD av fyra upprepningar med vardera fyra plantor, med tre tekniska upprepningar. Asterisker mot vit bakgrund visar signifikanta skillnader jämfört med kontroll vid $t = 0$ och asterisker mot grå bakgrund visar signifikanta skillnader jämfört med tiaminbehandlade plantor vid $t=0$. t-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Resultaten bekräftades i två oberoende experiment.

Diskussion

Våra resultat visar tydligt att tiaminbehandling av plantor påverkar livslängden och fertiliteten hos bladlöss. Effekten visas för kornplantor med havrebladlus och sädesbladlus och för ärt med ärtbladlus. Det finns inga tecken på att tiamin påverkar bladlössen direkt utan effekten tycks gå via plantorna. Andra forskare har tidigare publicerat tiamineffekter mot mikroorganismer för andra arter; tobak (Malamy et al., 1996; Ahn et al., 2007), Arabidopsis, (Ahn et al., 2005, 2007), gurka (Ahn et al., 2007), ris (Ahn et al., 2007; Bahuguna et al., 2012) och vindruva (Hattem et al., 2012). Våra resultat stämmer överens med tidigare publikationer såtillvida att plantorna får starkare motståndskraft mot angripare. Våra resultat skiljer sig dock mot tidigare resultat i flera aspekter. Vi erhåller effekter mot bladlöss vid 150 μ M tiamin, jämför med tidigare effekter som erhållits vid 1 mM (injektion i blad) (Malamy et al., 1996); 10 mM i spraybehandlingar (Ahn et al., 2005, 2007); 50 mM i spray eller fröbehandlingar (Bahuguna et al., 2012); och 30 mM i spray eller behandlingar av bladskivor (Hattem et al., 2012). Det finns inga uppgifter om den slutliga koncentrationen av tiamin (eller dess fosforylerade form) i vävnaden, men det förefaller som att de koncentrationer som ger effekter mot bladlöss är en eller två tiopotenser lägre än vid tidigare studier som berör bakterier, svampar eller virus.

Mekanismerna förefaller också vara olika. Tidigare studier tyder på *priming*, d.v.s. att genuttrycket ändras först när ett angrepp har skett och det har främst berört gener som styrs med signalöverföring via salicylsyra (Malamy et al., 1996; Ahn et al., 2005, 2007). Vi ser däremot inga effekter på gener som styrs via salicylsyra och vi kan för ett par gener påvisa effekter på genuttryck redan innan bladlössen angripit plantorna. De gener som visar skillnad i uttryck i tiaminbehandlade plantor är sådana som vi redan tidigare identifierat vara av intresse eftersom de visat högre uttryck i kornplantor med viss resistens mot bladlöss (Delp et al., 2009). Tiaminbehandlingen påverkar dem dock i motsatt riktning mot förväntat, så att genuttrycket är lägre i de behandlade plantorna. För att få klarhet i mekanismerna av tiamineffekterna krävs fördjupade studier.

Sammanfattningsvis har vi inom projektet tydligt bekräftat att tillskott av tiamin till växter leder till förstärkt motståndskraft mot bladlöss. Vi har fördjupat kunskapen om vilka aspekter av bladlössens reproduktion, tillväxt och beteende som påverkas och vi har starka belägg att effekterna går via plantorna. Det finns ansatser till en vetenskaplig förklaringsgrund. Med projektet har vi visat att det finns en potential att utveckla metoder för att använda tiamin för att stärka växters motståndskraft i praktisk växtodling.

Referenslista

Ahn I-P., Kim S., Lee Y-H., 2005. Vitamin B₁ functions as an activator of plant disease resistance. Plant Physiol. 138, 1505-1515.

Ahn I-P., Kim S., Lee Y-H., Suh S-C., 2007. Vitamin B₁-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the *NPR1* gene in Arabidopsis. Plant Physiol. 143, 838-848.

Bahuguna RN., Joshi R., Shukla A., Pandey M., Kumar J., 2012. Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Physiol. Biochem. 57, 159-167.

Ban L., Didon A., Jonsson L.M.V., Glinwood R., Delp G., 2007. An improved detection method for the *Rhopalosiphum padi* virus (RhPV) allows monitoring of its presence in aphids and its movement within plants. J. Virol. Methods 142, 136-142.

Ban L., Ahmed A., Ninkovic V., Delp G., Glinwood R., 2008. Infection with an insect virus affects olfactory behaviour and interactions with host plant and natural enemies in an aphid. Ent. Exp. Appl. 127, 108-117.

Besser K., Jarosch B., Langen G., Kogel KH., 2000. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. Mol. Plant Pathol. 1, 277-286.

Delp G., Gradin T., Åhman I., Jonsson L., 2009. Microarray analysis of the interaction between the aphid *Rhopalosiphum padi* and host plants reveals both differences and similarities between susceptible and partially resistant barley lines. Mol. Gen. Genomics 281, 233-248.

Hatem B., Wahab MA., Chong J., Bertsch C., Mliki A., Soustre-Gacougnolle I., 2012. Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defense responses, including HR-like-cell death. Plant Physiol. Biochem. 57, 120-133.

Malamy J., Sánchez-Casa P., Hennig J., Guo A., Klessig DF., 1996. Dissection of the salicylic acid signalling pathway in tobacco. Mol. Plant-Microbe. Interact. 9, 474-482.

Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K-J., 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiol. 132, 272-281.

Pettersson J., 1970., Studies on *Rhopalosiphum padi* (L): laboratory studies on olfactometric responses to the winter host *Prunus padus* L. Lanbrukshögs. Annaler 36, 381-399.

Van Emden HF., 2009. Artificial diets for aphids –thirty years' experience. Redia. 92, 163-167.

Publikationer

Hamada A.M., Jonsson, L.M.V. Thiamine alleviates aphid infestation in barley and pea. Manuscript submitted to Phytochemistry.

Övrig resultatförmedling till näringen

Vi har av hänsyn till IP-rättigheter varit restriktiva med resultatförmedling till näringen under projektets gång. Vi har bedömt att resultaten varit mycket lovande och vidare att användning av tiamin som ett alternativ i bekämpning får störst genomslag om det kan tas till en kommersiell tillämpning. Vi har kontaktat Innovationsenheten vid Stockholms universitet för att diskutera detta och därifrån fått stark uppmuntran. Med hjälp av SU Innovation och Forskarpatent i Uppsala har vi fått beskedet att det inte går att söka patent för de idéer som beskrevs och därmed offentliggjordes i vår ansökan till SLF. Under sommaren 2012 har vi visat och diskuterat våra resultat med representanter för Lantmännen. För närvarande har vi en forskningsansökan tillsammans med BioAgri AB till Lantmännens forskningsstiftelse med syfte att fortsatt utveckla tiaminbehandling som ett alternativt bekämpningsmedel.