

Slutredovisning; Framtagning av havre med låga mykotoxinhalter

Bakgrund

Projektmedel erhöles endast under 1 år. Under den relativt korta tid som projektet fortlöpte erhöill vi dock en del viktiga resultat som bekräftar den hypotes som vi satte upp i ansökan. Jag redovisar dessa nedan, men först en kort bakgrund till själva frågeställningen.

Under de senaste åren har höga halter av fusariumtoxiner uppmätts i ett flertal cerealier både i Sverige och i övriga Europa. Toxinerna syntetiseras av olika arter av en svamp, *Fusarium*. Infektionsförloppet är komplext och ett flertal olika *Fusarium* spp. har identifierats. I cerealier som vete, korn och havre är *F. culmorum*, *F. avenaceum* och *F. graminearum* de viktigaste medan *F. langsethi* huvudsakligen förekommer i havre. De kan i olika grad infektera plantan och bl.a. orsaka axfusarios. Även om en viss skördeförlost kan ske pga. *Fusarium*-infektion är det största problemet med axfusarios är att de infekterande *Fusarium*-svamparna kan syntetisera komplexa molekyler, mykotoxiner, som kan vara giftiga för både människor och djur. Ett stort antal olika toxiner har påvisats, vilket till en stor del beror på vilken *Fusarium* art som huvudsakligen infekterat plantan.

Typiska symptomen på fusarietoxinförgiftning hos djurbesättningar är mag-tarmstörningar som kräkningar och diarré samt ett nedsatt immunförsvar med diverse komplikationer som följd. Detta kan leda till en minskad produktion. Problemen är ännu inte lika stora inom livsmedelssektorn, eftersom fusariumtoxiner som DON, ZER och FUS B1 och B2 bara i mycket begränsad utsträckning överförs från foder till kött, mjölk och ägg. De ökande halterna av fusariumtoxiner i spannmål är emellertid oroande, eftersom dessa kan finnas kvar i produkter som frukostflingor, müsli, bröd, kakor, öl, etc. Speciellt gäller detta T-2, NIV, DON, och ZER. Den 1 juli, 2006 införde EU gränsvärden för hur mycket DON och ZER det får finnas både i foder och i spannmål för humankonsumtion. Från den 1 oktober 2007 finns gränsvärden för FUS, som främst kommer från majsprodukter. Gränsvärden planeras också för T-2 och HT-2. Eftersom samtidigt mykotoxinhalterna varierar mycket upp och ner i havreodlingarna skapar detta en stor osäkerhet i produktionsledet. En förståelsebaserad forskning inom området är således viktig för att lämpliga odlingsråd så småningom skall kunna tas fram.

Biologiska mekanismer

Fokus inom *Fusarium*-forskningen till dags dato har varit att undersöka och identifiera samband mellan yttre faktorer och axfusarios. Exempel på sådana faktorer kan vara väderleks- och temperaturvariationer, ogräs, liggsäd, skörderester på markytan och efterplöjning. Eftersom sortval också kan ha en viss betydelse finns det även en genetisk komponent i sjukdomsförloppet och inom förädlingen pågår arbete med att kartlägga och selektera för resistenslocus. Identifiering och karakterisering av specifika generprodukter och deras påverkan på sjukdomsförlopp, toleransbildning, biosyntes av toxiner är dock i sin linda.

På grundforskningsidan har data kommit fram som visar att det föresiggår en intensiv kemisk kommunikation mellan svamp, t.ex. ascomycetessvampar som *Fusarium* sp. och *Aspergillus* spp, och värdväxt under infektionsförloppet (Tsitsigiannis and Keller, 2007). Viktiga signalsubstanser för kommunikationen mellan värdväxt och svamp återfinns inom en kemisk grupp av oxiderade fettsyror s.k. oxylipiner. Oxylipiner är en divers grupp av ämnen som kan bildas både enzymatiskt och icke-enzymatiskt genom autooxidation i den biologiska cellen. Efter ett antal studier av oxylipiner hos både djur, växter och svampar står det klart att de är synnerligen potenta signalsubstanser (Blee, 2002). Ett känt exempel på en växtoxylipin är jasmonsyra vars funktion som växthormon styr både reproduktiv utveckling hos växter och växtens respons vid skada och försvar mot insekter. Växtproducerade oxylipiner kan även ha direkt antimikrobiell verkan (Graner et al, 2003; Prost et al, 2005; Andersson et al, 2006; Kourtschenko et al, 2007). Hos svampar styr *psi* faktorer, som är ett sammanfattande namn för olika oxylipiner syntetiserade från linol- och linolensyra, både sporulering och mykotoxin produktion (Champe et al., 1987). Hos djur är

prostaglandiner välkända oxylipiner som verkar som signalsubstanter vid olika inflammatoriska responser (Samuelsson, 1983). Den signalerande funktionen hos dessa molekyler är således välbevarad genom evolutionen.

Studier i fr.a. transgen majs har visat att om oxylipinsammansättningen hos värdväxten modifieras stör detta patogenens inre signalering. Detta leder till svampen producerar lägre mängder mykotoxin och färre sporer. Vad vi känner till har denna princip att modulera det kemiska samspelet mellan patogen och värdväxt ännu inte utnyttjats i den klassiska växtförädlingen för att få fram svampresistent grödor. En annan poäng med detta angreppssätt är att eftersom de cellulära och molekylära mekanismerna bakom denna typ av resistens bygger på kemiska interaktioner mellan växt och svamp kommer nya resistent växtsorter sannolikt ha ett långvarigt skydd.

I detta projekt avsåg vi att testa och utveckla detta koncept. Eftersom nuvarande kunskap om exakt hur *Fusarium* angriper cerealier och kopplingarna mellan vilka toxiner som bildas under vilka omständigheter är rudimentär ville vi först att klargöra en del av de mekanismer som ligger bakom infektionsförloppet. Vi har fokuserat vår forskning på havre, eftersom vi kan denna gröda bäst och eftersom vi redan har utvecklat en unik TILLING-population i havre från vilken vi kan molekylärt screena efter mutanter i oxylipin biosyntesgener. Vi kan också fenotypiskt screena efter växtindivider i populationen som uppvisar en ökad motståndskraft mot *Fusarium* spp.

Uppnådda resultat

Upprättande av en oxylipinprofil för havre

Oxylipiner bildas kemiskt genom inkorporering av syre (O₂) i lipidmolekyler (Feussner and Wasternack, 2002). Hos växter sker inkorporeringen framförallt i linol- (C18:2) och linolensyra (C18:3) vid antingen kolatom nummer 9 eller 13 i kolkedjan. De resulterande distinkta fettsyrahydroperoxiderna fungerar därefter som substrat i olika enzymatiska biosyntesvägar. Oxylipiner har framförallt undersökts hos dikotyledoner, medan kunskapen om vilka olika oxylipiner som finns hos monokotyledoner är mer rudimentär. Förvånansvärt nog har inga studier över huvud taget gjorts i havre och vete. Vi bestämde och kvantifierade därför både fria och bundna oxylipiner i havre. De oxylipiner som detekterades och som var beroende av enzymatisk 13-LOX aktivitet var 13-HOD+/-Me, 13-HOT+/-Me, 13-H(P)O+/-Me, oPDA+/-Me samt JA och av enzymatisk 9-LOX aktivitet 9-HOD+/-Me, 9-HOT+/-Me samt 9-H(P)OT+/-Me. Vi hittade också de icke enzymatiskt formade oxylipinerna 12-HOT+/-Me och 16-HOT+/-Me. Vår undersökning visar således att både 9-LOX och 13-LOX enzymer *de facto* förekommer i havre, eftersom vi hittade både position 9 och 13 oxlipiner, samt att dessa finns i betydligt högre mängd än de icke enzymatiska formade produkterna. Oxylipinernas kvantitet är i paritet med vad vi tidigare har uppmätt i Arabidopsis blad (Andersson et al., 2006), vilket styrker vår arbetshypotes att även mellan *Fusarium* och havre är oxylipiner involverade i den primära signaleringen. Eftersom vi nu känner till havreoxylipinprofilen har vi således den bakgrundsinformation som vi behöver för att analysera de mutanter som nu håller på att isoleras, se nedan.

Kloning av oxylipinbiosyntesgener från havre

Enzymatiskt katalyseras oxylipinbiosyntesen av s.k. lipoxygenaser som avkodas från diverse *LOX* gener. Genom sekvensjämförelser av *LOX*-gener från olika växtsystem identifierade vi två konserverade delar på *LOX*-sekvenserna. Med hjälp av denna information och med s.k. RACE-PCR teknik kunde vi därefter isolera fullängds sekvenser för två putativa havre 9-*LOX*-cDNA. Den enzymatiska aktiviteten av det enzym som avkodas från dessa sekvenser kommer att bestämmas *in vitro* för att vi med säkerhet skall kunna avgöra deras aktivitet och därmed bekräfta att vi plockat upp rätt DNA bit. Arbetet med att genom rekombinant teknik producera dessa i bakterier pågår. De identifierade DNA sekvenserna kommer även att utnyttjas för att identifiera mutanter i havre TILLING populationen som vi tagit fram. Vi kommer att då att fastställa oxylipinprofilen hos mutanterna innan vi undersöker deras förmåga att förhöja resistens mot *Fusarium* och därmed minska både själva infektion svampens förmåga att producera mykotoxiner.

Tekniker och analyser

I detta projekt har vi utnyttjat diverse molekylärbiologiska tekniker såsom DNA sekvensering, olika PCR tekniker som RT-PCR, RACE och Q-PCR, kloning och metodik för att screena efter mutationer i specifika gener i TILLING-population.

För att kлона LOX gener från havre har vi utnyttjat diverse PCR och chromosomal walk tekniker, speciellt optimerade för det mycket stora havregenomet.

Oxylinbestämningar kräver apparatur som HPLC, GC och GC-MS med speciella kolonner och referenser. Den initiala bestämningen av havreprofilen havre gjordes därför i samarbete med Prof. Ivo Feussner, Göttingen. Vi kommer nu att sätta upp dessa analyser i Göteborg.

Olika metoder för att bestämma och kvantifiera *Fusarium* och deras mykotoxiner kommer att göras i samarbete med AnalyCen. Ansvarig för utveckling hos AnalyCen är utvecklingschef fil dr. Sune Eriksson.

Litteratur

- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström Å., McPhail, K.L., Gerwick, W.L., Göbel, C., Feussner, I., Ellerström M. (2006) Oxylin profiling of the hyper sensitive response in *Arabidopsis thaliana*: Formation of a novel OPDA containing galactolipid, *Arabidopsis* E. *Journal of Biological Chemistry* 281: 31528-31537.
- Blee E (2002) Impact of phyto-oxylin in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7: 315-321.
- Champe, S.P., Rao P. and Chang A., (1987) An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1383-1388.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. and McCormick, S.P. (1992). Effect of gene disruption of trichodiene-synthetase on the virulence of *Gibberella pulicaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 214–222.
- Feussner, I. and Wasternack C., (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 275-297.
- Gao, X., Shim, W-B., Göbel, C., Kunze, S., Feussner, I., Meeley, R., Balint-Kurti, P. and Kolomiets, M. (2007) Disruption of a Maize 9-Lipoxygenase Results in Increased Resistance to Fungal Pathogens and Reduced Levels of Contamination with Mycotoxin Fumonisin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 922–933
- Graner, G., Hamberg, M. and Meijer, J. (2003) Screening of oxylin for control of oilseed rape (*Brassica napus*) fungal pathogens. *Phytochemistry* 63, 89-95.
- Kourtchenko, O., Andersson, M.X., Hamberg, M., McPhail, K.L., Gerwick, W.L., Göbel, C., Feussner, I., Ellerström, M. (2007) Oxo - phytodienoic acid containing galactolipids in *Arabidopsis*: Jasmonate signalling dependence. *Plant Physiology* 145: 1-13.
- Langseth, W., and Rundberget, T., (1999), The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147, 157–165.
- Lindfors, E., Berg, S. and Rizzo, A., (1988). Determination of trichothecene-mycotoxins as their trimethylsilyl and heptafluoro-butyl derivative in feeds and grain. *Book of Abstracts*, hgedited by K. Aibara, S. Kumagai, K. Ohtsubok and T. Yoshizawa (Tokyo), pp. 57–58.
- Liu, S., Abate, Z.A., Lu, H., Musket, L., Davis, G.L. and McKendry, A.L. (2007). QTL associated with *Fusarium* head blight resistance in the soft red winter wheat Ernie. *TAG* 115, 417-427.
- Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food. Microbiol* 119 :38-46.
- Perkowski, J., Kiecana, I., Stachowiak, J. and Basinski, T., (2003). Natural occurrence of scirpentriol incereals infected by *Fusarium* species. *Food Additives and Contaminants*, 2, 572–578
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerre-Tugaye, M-T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M. and Fournier, J., (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylin supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.* 139: 1902-1913.
- Rabie, C. J., Sydenham, W., Thiel, P. G., Lübben, A., and Marasas, W. F. O., (1986). T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 594–596.

- Richardson, K.E., Toney, G.E., Haney, C.A. and Hamilton, P. B., (1989). Occurrence of scirpentriol and its seven acetylated derivatives in culture extracts of *Fusarium sambucinum* NRRL 13495. *Journal of Food Protection*, 52, 871–876.
- Samuelsson B., (1983). From studies of biochemical mechanism to novel biological mediators: prostaglandin endoperoxides, thromboxanes, and leukotrienes. Nobel Lecture, 8 December 1982. *Biosci. Rep.* 3: 791-81.
- Sulyok, M., Krska, R. and Schuhmacher, R (2007). Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. *Food additives and contaminants* 24, 1184-1195
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. and Keller, N.P., (2005). Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 151: 1809-1821.
- Turner J. G., Ellis C. and Devoto, A., (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: 153-164.

Resultatförmedling

Eftersom projektets endast pågått under 1 år har ännu ingenting publicerats i fack- eller branschtidningar. Preliminära resultat har dock presenterats på möten arrangerade av de Svenska och Nordiska Havreföreningarna.