



Aktivering av det egna försvaret hos gran och tall

Docent Torkel Berglund
Fil Dr Anna Ohlsson
Bioteknologi, KTH



Aktivering av det egna försvaret hos gran och tall

Docent Torkel Berglund
Fil Dr Anna Ohlsson
Bioteknologi, KTH



Övergripande målsättning

Vi eftersträvar ett minskat användande av miljötoxiska substanser inom skogs- och jordbruk. Den övergripande strategin är att förbättra växternas försvarskapacitet mot olika typer av biotisk och abiotisk stress, genom behandling av frön och småplantor med ogiftiga substanser i plantskolorna. Detta projekt fokuserar på skogsbruk och skydd av unga barrträdsplantor mot torka och snytbaggar.

Vi vill belysa betydelsen av naturliga epigenetiska mekanismer för bibehållandet av biologisk information från fröbehandling till senare stadier under växtens utveckling, då en ökad försvarskapacitet kan observeras.

Bakgrund

Skogsindustrin, som står för en betydande del av Sveriges export, är beroende av ett uthålligt skogsbruk. Varje år planteras mer än 350 miljoner barrträdsplantor i Sverige. Det största problemet vid återplantering är utan tvekan den skada som åstadkoms av snytbaggen (*Hylobius abietis*) (Thuresson et al. 2003), som äter barken på unga barrträdsplantor (Långström & Day 2004). Antalet snytbaggar ökar norrut allteftersom klimatet blir varmare. Utan skydd riskerar 80% av de nysatta plantorna att dödas av snytbaggar. Kostnaderna för snytbaggeskador har beräknats till mer än 500 miljoner kronor per år (Thuresson et al. 2003). De insekticider som har använts mot snytbagge är effektiva, men läcker ut i vattendrag och är skadliga för vattenlevande organismer. Dessutom finns risker med exponering av personal som hanterar dessa toxiska preparat. Kemiska insekticider mot snytbagge får bara användas efter dispens. Detta medför ett stort behov av att utveckla nya miljövänliga växtskydds-strategier inom skogsbruket. Förutom insekticider kan andra strategier användas för att bekämpa snytbaggen, t.ex. biokemisk ekologi, där man påverkar insekternas beteende, och olika typer av mekaniska och fysiska skydd. Dessa skyddsmetoder är emellertid ganska komplicerade och dyra (Lindström et al. 1993). Förmodligen kommer man att behöva använda en kombination av skyddsmetoder för att få bukt med snytbaggen. Den metod som vi undersöker, att generellt förbättra växtens eget försvarssystem, är enkel och billig och dessutom har den fördelen att den skulle kunna öka växtens förmåga att motstå stress i allmänhet, t.ex. torka, och inte bara snytbaggeangrepp. Denna forskning ingår i ett samarbete med expertis inom plantproduktion (barrträd) (Högskolan Dalarna), biokemi/molekylärbiologi (KTH) och organisk ekologisk kemi (KTH).

Aktivering av växtens försvarssystem

Normalt aktiveras växternas försvar som reaktion på en skada eller ett angrepp. Om skadan inte blir för allvarlig kan växten överleva och förbereda sig på fler attacker med hjälp av en systemisk reaktion. Etableringen av det systemiska försvaret i hela växten styrs av signalsubstanser. Vi vill utnyttja växtens egna, väl utprovade metoder genom att behandla frön och unga plantor med sådana substanser som normalt ingår i växtens signalering i samband med försvarsaktivering. Dessa substanser är naturliga och välkända för växten, och ogiftiga även för användare och miljö. Vår strategi är att förbehandla växten så att

den reagerar snabbare och starkare när den senare utsätts för någon form av stress. En sådan förbehandling, en sorts "immunisering", brukar kallas "priming" och kan sägas vara ett sätt att hjälpa växten till självhjälp. Hur fungerar det - har växten ett minne? Vi undersöker ett eventuellt samband mellan våra behandlingar, de försvarseffekter vi får och epigenetiska förändringar.

Epigenetik

Vår strategi och vision är att påverka försvarskapaciteten hos växter via deras s.k. epigenetiska minne. Genetik behandlar sekvensen av baser i DNA, som definierar generna, och kan ses som hårdvaran i cellen. Epigenetik är den ärftliga mjukvaran som reglerar genernas åtkomlighet för avläsning, transkription. Detta är avgörande för vilka gener som kan aktiveras och bland annat åstadkomma ett försvar mot angripande och olika typer av stress. Epigenetik är ett forskningsområde av stigande intresse både inom medicin och växtvetenskap. (Lister et al. 2008, Chinnusamy & Zhu 2009, Law & Jacobsen 2010). Hos växter är upp till 30 % av C-baserna i DNA metylerade till 5-metylcytosin (Gruenbaum et al. 1981), i djur endast några procent. Detta tyder på att DNA-metylering spelar en viktig roll i växter. Flera olika typer av stress i växter har en stark effekt på nivån och mönstret av C-metylering i DNA (Wada et al. 2004, Sano 2010). Enzymatisk metylering och demetylering av C-baser i speciella positioner i DNA, t.ex. CG, påverkar modifieringen av speciella proteiner (histoner). Denna modifiering påverkar i sin tur den täta packningen av DNA och följaktligen tillgängligheten av generna för transkription. Förändringar i DNA-metylering kan snabbt etableras och inkorporeras i det cellulära minnet och ärvas epigenetiskt vid celledelningar, ett minne som kan skrivas om likaväl som suddas ut. Det finns alltså ett dynamiskt verktyg för växter att adaptatera sig till förändrade miljöförhållanden.

Kunskapen om epigenetiska mekanismer i barrträd är än så länge begränsad. DNA i granembryon (frö) är starkt metylerat, och DNA-metyleringsnivån sjunker dramatiskt vid frögroning, varefter nivån ökar igen efter ett par månader (Baumann 2004). DNA-metyleringsnivån i barrträd påverkas också av höjd över havet (altitud) och förändras som svar på värmestress (Baumann 2004).

Flyktiga substanser

En viktig del av barrträdens försvar utgörs av terpenoidbiosyntesen, inkluderande både flyktiga och lagrade substanser (Phillips et al. 2006). Flyktiga ämnen som avges från unga granplantor är t.ex. snytbagge-repellenten (S)-(-)-limonen och de attraherande enantiomererna av α -pinen (Danielsson et al. 2008). Miniplantor (se nedan) utsöndrar så kallade 'green leaf volatiles' (GLV) som svar på mekanisk skada och påminner mer om örter än om träd, medan äldre plantor primärt utsöndrar monoterpener (Danielsson et al. 2008).

Motståndskraft mot snytbaggar och torka

I skandinaviskt skogsbruk används framförallt 1-2 åriga plantor för nyplantering. Nyligen har så kallade miniplantor introducerats; de planteras vid 10–12 veckors ålder, med lovande resultat i praktiska fälttester (Lindström 2008). Miniplantor attraherar inte snytbaggar så starkt som äldre plantor (Danielsson et al. 2008) men är känsligare för torkstress. 1-2-åriga plantor är mer tåliga mot torka när de sätts ut, men lockar å andra sidan till sig snytbaggar. Om miniplantorna klarar den första tiden och lyckas etablera sig i fält har de större motståndskraft mot snytbaggar än nyutsatta plantor av motsvarande ålder. En ökad torktolerans hos unga plantor kan alltså indirekt innebära ett skydd mot snytbaggar. Utplantering av unga plantor ger också en besparing vad gäller kostnader för odling i plantskolorna.

Experiment och resultat

Genom detta projekt har vi fått möjlighet att applicera vår kunskap och våra idéer från grundforskning inom stress och försvar i växter på ett område med ett verkligt behov av ett hållbart växtskydd. Genom att vi studerar effekter på både torktolerans och direkt motståndskraft mot snytbaggar angriper vi snytbaggeproblemet från två håll. Om ett förhöjt skydd mot torka kan uppnås, ökar möjligheterna för att utplantering av riktigt unga plantor ska bli ett hållbart alternativ, eftersom de i förlängningen kan motstå snytbaggar bättre än konventionella plantor.

Experiment och analyser är utförda dels vid Bioteknologi/KTH, och dels i samarbete med våra partners, Prof Anna-Karin Borg-Karlson vid Organisk/Ekologisk kemi, KTH (analys av flyktiga substanser) och Doc Anders Lindström och Dr Eva Stattin vid HDa/Garpenberg/Vassbo (odlingsexperiment i större skala, snytbagge- och fältförsök).

Frön av gran (*Picea abies*, proveniens Öhn) och tall (*Pinus sylvestris*, proveniens Hade) har använts i dessa studier.

Frön behandlades i vattenlösningar av de substanser som studerats. Därefter har sådd och odling av plantorna skett enligt normala rutiner, i liten skala i tempererat odlingsrum på Biokemi (KTH) och i större skala i växthus i Garpenberg (HDa). I vissa fall har plantorna även exponerats för utvalda substanser genom rotupptag via vattnings.

Vi har använt olika substanser i behandlingarna och en del av resultaten redovisas här. Vilka specifika substanser vi studerar kan vi inte offentliggöra ännu, men har redovisats separat för Länsförsäkringsbolagens Forskningsfond.

Plantorna (behandlade och kontroller) har analyserats med avseende på avgivning av flyktiga substanser, DNA-metylering, torktolerans och snytbaggegnag. I mindre skala har även genuttrycket för vissa dehydriner studerats.

Avgivning av flyktiga ämnen

Flyktiga substanser (terpener, monoaromatiska föreningar), kända för att påverka insektsbeteenden, insamlades från plantorna med SPME-fiber och analyserades med GC-MS (Danielsson et al. 2008).

De preliminära resultaten visade att behandlingarna kunde orsaka ett förändrat mönster i avgivningen av flyktiga substanser, framförallt terpenoider, från tall och gran. Vi såg bl a förändringar i avgivningen av limonen (snytbaggerepellent), bornylacetat ('antifeedant') samt α -farnesen, 3-karen och α -pinen, vilka ofta avges som svar på olika typer av stress. Fig. 1 illustrerar exempel där behandlade granplantor visade ökad avgivning av en rad olika terpenener.

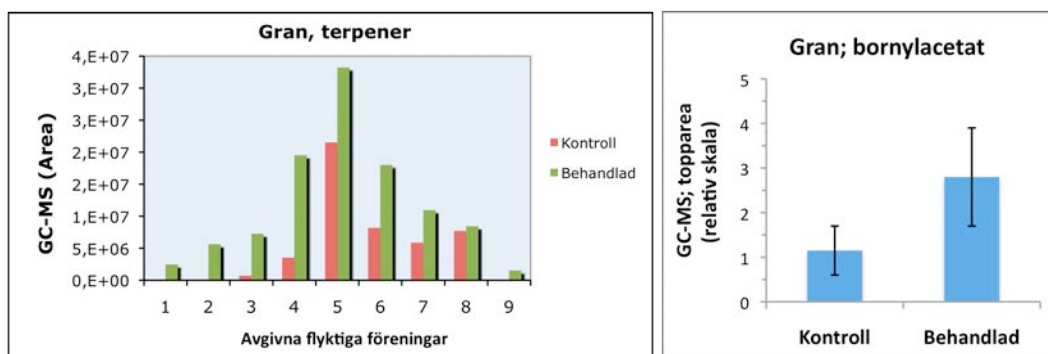


Fig. 1. Exempel på förändrat mönster av flyktiga substanser (terpener) avgivna från behandlade granplantor jämfört med obehandlade plantor.

Avgörande för insekters reaktioner på växters doftämnen är inte bara den absoluta mängden avgivna substanser, utan i hög grad även doftblandningens sammansättning, dvs de relativa mängderna av enskilda substanser. Det är alltså ett komplicerat kommunikationssystem, och beteendetester med snytbaggar är nödvändiga.

DNA-metylering

DNA-metylering analyserades med LUMA-metoden (Karimi et al. 2006), baserad på pyrosekvenseringsteknologi. Metoden anpassades till växtmaterial.

Behandlingarna påverkade DNA-metyleringsgraden i plantorna. Barr, rötter och stam (floem) analyserades. Tydligast effekter erhöles i unga plantor (upp till 2-3 månader). Exempel visas i Figur 2.

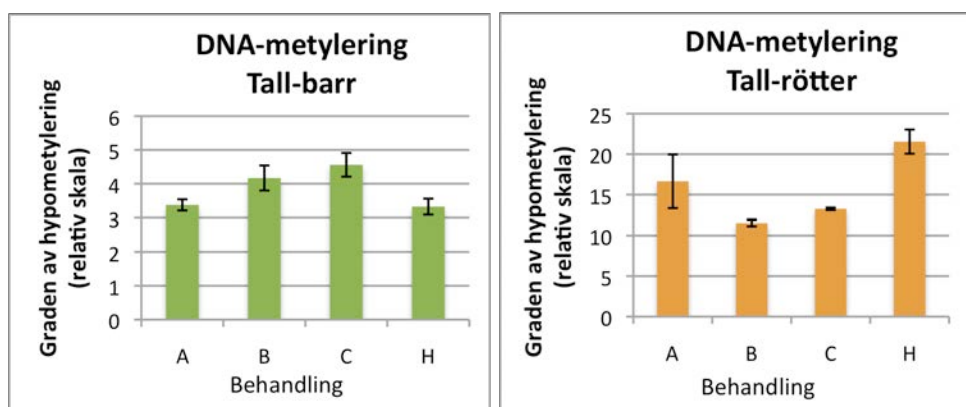


Fig. 2. Effekt av fröbehandling på DNA-metylering i barr och rötter från 12 veckor gamla tallplantor, analyserat med LUMA (Karimi et al. 2006). A = kontroll; B, C, H = olika testsubstanser. En högre stapel betyder sänkt DNA-metylering jämfört med kontroll.

Växtcellskulturer av olika arter och olika typ av differentiering användes för vissa inledande tester, bl a en kultur av rosenköna (*Catharanthus roseus*) och en skottdifferentierad kultur av ärtor (*Pisum sativum*). Kulturerna har behandlats med vissa substanser, vilket givit initial information om epigenetiska effekter.

Torkstress och snytbaggetester

Effekten av förbehandlingar på tolerans mot torka och snytbaggar har studerats. Inledande tester, som gjordes vid Bioteknologi och Organisk/Ekologisk kemi, KTH, gav positiva och hoppningivande resultat, varför mer utförliga tester utfördes vid Högskolan Dalarna.

Torkstressförsök utfördes i växthus med 15 veckor gamla plantor genom minskad vattning under tre veckor, varefter plantorna vattnades upp till normal nivå. Efter ytterligare två veckor noterades barrförluster och skada samt plantornas vitalitet. Resultatet från denna första försöksomgång antydde en ökad tolerans mot torka hos behandlade plantor (Fig. 3), men måste än så länge betraktas som preliminärt.

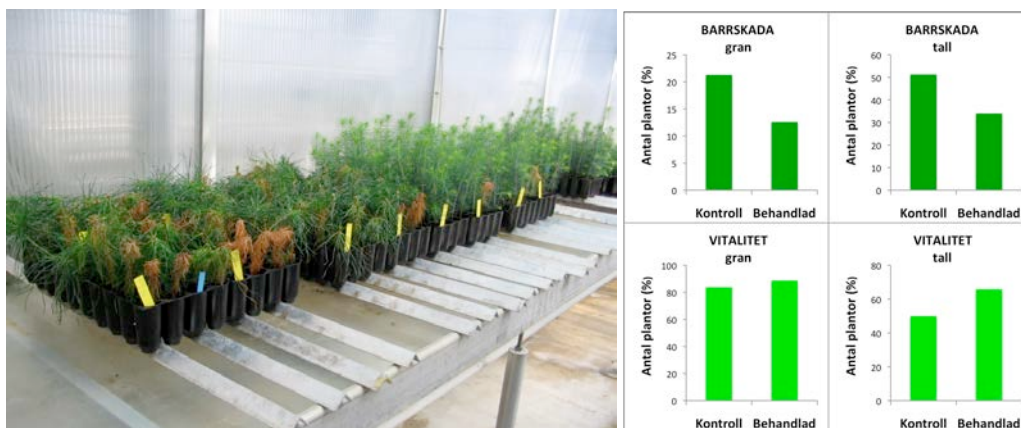


Fig. 3. Effekt av fröbehandling på barrskada och vitalitet hos 5 månader gamla gran- och tallplantor.

Behandlade plantor och kontrollplantor utsattes för snytbagg på en s.k. arena, för att undersöka om snytbaggarna föredrog den ena eller andra sorten. Kontrollplantorna blev gnagda i högre grad än behandlade plantor (Fig. 4), men även i detta fall kan resultatet inte anses som säkert förrän försöken upprepat med likartat resultat.

Mindre fältförsök har initierats och är än så länge bara inne på första året, men vi följer odlingarna, och fler fältförsök kommer att läggas ut.

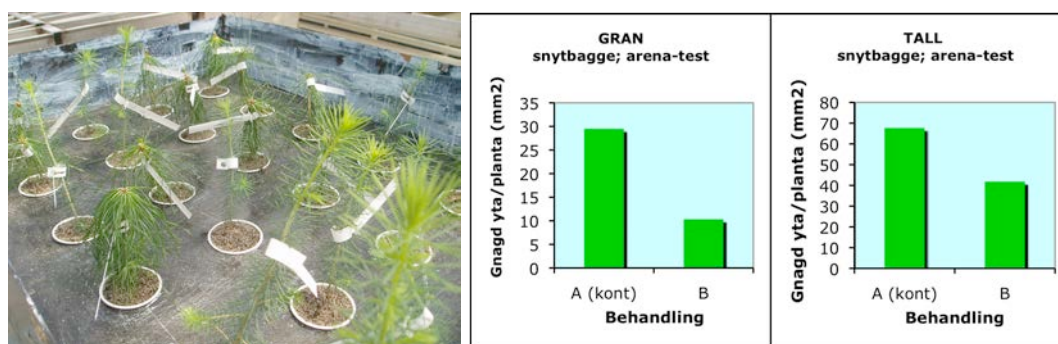


Fig. 4. Effekt av behandling (fröbehandling plus rotupptag) på snytbaggengrepp på ca 5 månader gamla gran- och tallplantor. Till vänster ses den "arena" som användes.

Dehydriner

Dehydriner är proteiner som produceras i växter som svar på torka och kyla, men även vid en rad andra stressituationer (Wachowiak et al. 2009). Ett sätt att följa förbehandlingarnas effekter på torktoleransen kan vara att studera aktiveringen av dehydriner. Uttrycket av dessa stressmarkör-gener analyseras med 'reverse transcript-polymerase chain reaction' (RT-PCR). Vi har påbörjat sådana genexpressions-studier och planerar att använda genuttrycket som markör på ett inducerat försvar i våra experiment.

Fortsatt forskning

Grundforskning

Uppgiften att lösa snytbaggproblemet är komplicerad. Långsiktig forskning krävs och grundforskning är en förutsättning för att utveckla bra tillämpningar. Vi

fortsätter att studera sambandet mellan behandlingarna och vad som händer i plantan. Vi vill fördjupa studierna av effekter på bildning och frisättning av terpenoider och andra flyktiga och lagrade substanser med betydelse för kommunikationen med snytbaggar. Dessutom vill vi utvidga studierna av epigenetiska mekanismer och genaktivering för att söka en biokemisk/molekylärbiologisk förklaring till effekterna.

Tillämpningar

Vi kommer att upprepa de tidigare experimenten och fortsätter också med optimeringar och fältförsök. Strategin bör även testas för skydd mot andra typer av stress, orsakade av t ex mikroorganismer. Vi kommer även att utvidga forskningen till jordbruksprodukter. Jordbruksnäringen står för en stor förbrukning av pesticider och här finns naturligtvis en önskan att få till stånd mer ekologiska metoder.

Sammanfattning

Vi har under projekttiden erhållit viktiga resultat som vi hoppas i förlängningen ska kunna bidra till en ny miljövänlig, enkel och billig skyddsmetod mot torka och snytbaggar inom skogsbruket. Från vår idé och inledande försök i mindre skala på KTH har vi inom ett utvidgat samarbete kunnat genomföra de första försöken i större skala.

Vårt syfte är att utveckla en enkel skyddsmetod, som innebär massbehandling av frön och eventuellt unga plantor via bevattningen i plantskolan, varefter fortsatt odling och utplantering sker på vanligt sätt. Inga dyra investeringar behövs alltså, utan behandlingen kan lätt passas in i det befintliga hanteringssystemet. Dessutom är kostnaden låg för de naturliga och ofgiftiga substanser vi satsar på, och förbrukningen blir relativt liten, speciellt vid fröbehandling. Allt detta bidrar till en kostnadseffektiv behandlingsmetod.

Ingen traditionell genmodifiering eller ändring av basordning i DNA är inblandad. Vår strategi är att, bl.a. via epigenetisk påverkan, effektivisera användandet av de gener som växterna naturligt använder i försvarssituationer. Eftersom de substanser som vi använder är naturliga och icke toxiska, är vår förhoppning att vår strategi kan bli accepterad av såväl användare som samhället i övrigt.

Referenser

- Baumann R: DNA-Methylierung nach abiotischen und biotischen Einflüssen und Expressionsanalyse pathogeninduzierter Gene in *Picea abies* (L.) Karst. Technischen Universität München. Thesis (2004).
- Chinnusamy V & Zhu J-K: Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 133-139 (2009)
- Gehring M et al.: DNA demethylation by DNA repair. *Trends in Genetics*, 25, 82-90 (2009)
- Gruenbaum Y et al.: Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292, 860-862 (1981)
- Danielsson, M., Kännaste, A., Lindström, A., Hellqvist, H., Stattin, E., Långström, B., & Borg-Karlsson, A-K. 2008. Mini-seedlings of *Picea abies* are less attacked by *Hylobius abietis* than conventional ones: Is plant chemistry the answer? *Scand. J. For. Res.* 23: 299 - 306.

- Gruenbaum Y et al.: Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292, 860-862 (1981)
- Karimi M et al.: Using LUMA - A Luminometric-Based Assay for global DNA-methylation. *Epigenetics* 1, 45-48 (2006)
- Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews/Genetics* 11, 204-220 (2010).
- Lindström A et al. Krav på mekaniska plantskydd - för skydd mot insektsangrepp i skogsplanteringar. *SkogForsk*, redogörelse nr 2, 37 pp (1993)
- Lindström A: Miniplantan på väg ut i skogen. *PLANTaktuellt* nr 2, 1-3 (2008)
- Lister R et al.: Maps of the Epigenome in Arabidopsis. *Cell* 143, 1-14 (2008)
- Långström B, Day KR: 2004. Damage, control and management of weevil pests, especially *Hylobius abietis*, chapter 19, 415-444, In: Lieutier F., Day K.R., Battisti A., Gregoire J.C., Evans H.F. (eds). *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, ISBN 1-4020-2240-9, 1-569
- Phillips MA et al: Molecular regulation of induced terpenoid biosynthesis in conifers. *Phytochem. Rev.* 5, 179-189 (2006)
- Sano H: Inheritance of acquired traits in plants. Reinstatement of Lamarck. *Plant Signaling* 6 Behaviour 5, 1-3 (2010).
- Thuresson T et al: Konsekvenser av ett förbud mot permittrinbehandling av plantor. *Skogsstyrelsen, Meddelande* 2, 1-65 (2003)
- Wada Y et al: Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. *Mol Gen Genomics* 271, 658-666 (2004)
- Wachowiak W et al: Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L). *Tree Genetics & Genomes* 5, 117-132 (2009)